



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

Estudio de la función del extremo carboxilo terminal de Cox1 en la biogénesis de la Citocromo c Oxidasa en mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

RODOLFO GARCÍA VILLEGAS

TUTORA: DRA. XOCHITL PÉREZ MARTÍNEZ

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

COMITÉ TUTOR

DR. DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

DRA. ROSA LAURA CAMARENA MEJÍA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO, 2018



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.

Reconocimientos

Esta tesis se llevó a cabo en el laboratorio 204 oriente del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma México con la asesoría de la Dra. Xochit Pérez Martínez.

Se agradece el valioso apoyo y asesoría técnica de la Dra. Yolanda Camacho Villasana del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular en este proyecto.

Se agradece la asesoría y comentarios a este trabajo del Comité tutorial conformado por:

Dra. Rosa Laura Camarena Mejía	Instituto de Investigaciones Biomédicas
Dr. Diego González Halphen	Instituto de Fisiología celular

Se agradece al Dr. Miguel Ángel Shingú Vázquez y a Luisa Sandoval Romero por la creación de cepas y experimentos preliminares.

Se agradece la asistencia técnica y la donación de reactivos del Dr. Salvador Uribe Carvajal y del Dr. Alfredo Cabrera Orefice del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

Se agradece la asistencia técnica del Dr. Alexander de Luna y de Sergio Esteban Campos del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad.

Se agradece la asistencia técnica y la donación de reactivos/anticuerpos del Dr. Diego González Halphen y de la Q.B.P. Miriam Vázquez Acevedo del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

Se agradece la donación de cepas de levadura al Dr. Gabriel del Río y a la Dra. María Teresa Lara Ortiz del Departamento de Bioquímica y Biología Estructural del Instituto de Fisiología Celular.

Se agradece la asistencia técnica de la Dra. Emma Berta Gutiérrez-Cirlos Madrid y M. en C. Tecilli Cabellos Avelar de la Facultad de Estudios Superiores de Iztacala.

Se agradece la donación de anticuerpos y plásmidos por parte del Dr. Jared Rutter, Dr. Antonio Barrientos, Dra. Rosemary Stuart y Dr. Thomas D. Fox.

Se agradece el del M.V.Z. Claudia V. Rivera Cerecedo y M.V.Z. Héctor Malagón-Riveiro del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular por la asistencia en la obtención de antisueros.

Este trabajo fue apoyado por CONACYT (47514) y PAPIIT, UNAM (IN204414 y IN209217).

Durante los estudios de doctorado conté con una beca otorgada por CONACYT (250726).

Se agradece al Jurado integrado por:

Dr. Oscar Flores Herrera

Dr. Diego González Halphen

Dra. Emma Berta Gutiérrez-Cirlos Madrid

Dr. Roberto Coria Ortega

Dr. Federico Martínez Montes

Contenido

Abreviaturas	7
Resumen	8
Abstract	10
Introducción	12
La mitocondria	12
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudio	13
El genoma mitocondrial de <i>S. cerevisiae</i>	13
La cadena respiratoria de <i>S. cerevisiae</i>	13
Síntesis de proteínas mitocondriales y activadores traducionales	15
Biogénesis de la Citocromo c oxidasa	17
Regulación de la síntesis de Cox1	19
Justificación	23
Hipótesis	23
Objetivo	23
Objetivos particulares	24
Materiales y métodos	25
Cepas y medios	25
Clonación de las mutantes puntuales de <i>cox1</i>	26
Transformación de las mutantes puntuales de <i>cox1</i> en mitocondrias de <i>S. cerevisiae</i>	26
Transformación de levaduras	30
Determinación de proteínas por Lowry modificado	30
Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)	31
Western blot	32
Obtención de la fracción mitocondrial cruda	33
Traducción in vivo de proteínas mitocondriales a partir de células completas	35
Coinmunoprecipitación de proteínas	36

Electroforesis azul nativa (BN-PAGE)	38
Electroforesis de segunda dimensión (2D)	39
Actividad en gel de la Citocromo c oxidasa	40
Medición del consumo de oxígeno en mitocondrias de levadura	41
Medición espectrofotométrica de actividades enzimáticas.	41
Ensayos de sensibilidad a peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂).	42
Ensayo de envejecimiento	42
Resultados	46
<u>Determinación de los residuos de Cox1 que regulan su síntesis</u>	46
Los últimos 15 residuos de Cox1 contienen aminoácidos conservados en hongos y mamíferos.	46
Las mutantes Cox1-P521A/P522A y Cox1-V524E no regulan su síntesis	49
En las mutantes Cox1-P521A/P522A y Cox1-V524E se reduce la interacción de Mss51 con los complejos COA	52
La forma traduccionalmente activa de Mss51 se incrementa en las mutantes Cox1ΔC15, Cox1-P521A/P522A y Cox1-V524E	54
<u>Análisis del ensamblaje de la citocromo c oxidasa en las mutantes de Cox1 que no regulan su síntesis</u>	59
En la mutante Cox1ΔC15 se forman supercomplejos aberrantes en la ausencia de la subunidad Cox2	59
Cox3 es necesaria para la formación y/o estabilización de los supercomplejos aberrantes	64
La adición del grupo hemo a Cox1 es necesaria para la formación y/o estabilización de los supercomplejos aberrantes	65
<u>Estudio de la viabilidad celular en mutantes de Cox1 que no regulan su síntesis</u>	68
La mutante Cox1ΔC15 envejece más rápido	68
La cadena respiratoria de la mutante Cox1ΔC15 funciona normalmente.	69

Discusión	71
Conclusiones	79
Perspectivas	79
Anexo 1. Artículos publicados durante mi doctorado	81
Anexo 2. Listas de cepas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados	96
Referencias	99

Abreviaturas

3'-UTR	Región no traducida del extremo 3' del mRNA.
5'-UTR	Región no traducida del extremo 5' del mRNA.
ρ^+	Cepas con DNA mitocondrial.
ρ^0	Cepas sin DNA mitocondrial.
ρ^- s	Cepas rho- sintéticas.
APS	Siglas en inglés de persulfato de Amonio.
BSA	Siglas en inglés de albumina de suero bovino.
CcO o CIV	Citocromo c oxidasa o Complejo IV
CIII	Complejo bc_1 o Complejo III
Complejos COA	Módulo de ensamblaje de Cox1.
DDM	Siglas en inglés de n-dodecil- β -maltosido.
DTT	Siglas en inglés de Ditiotreitól.
DNAmt	DNA mitocondrial.
EDTA	Siglas en inglés de ácido etilendiaminotetraacético.
EIM	Espacio intermembranal.
G418	Geneticina.
HEPES	Siglas en inglés de ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacínil-(1)] etanosulfónico.
MEM	Membrana externa mitocondrial.
MIM	Membrana interna mitocondrial.
PMSF	Siglas en inglés de fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
PVDF	Siglas en inglés de fluoruro de polivinilideno.
SC	Supercomplejos.
TA	Traduccionalmente activo.
TEMED	Siglas en inglés de N, N, N, N-tetrametil-etanol-1,2-diamina.
TLCK	Siglas en inglés de hidrocloreuro de Na-Tosil-Lys Clorometil Cetona
TMPD	Siglas en inglés de N, N, N, N-tetrametil- <i>p</i> -fenilendiamina.

Resumen

La citocromo c oxidasa (CcO) es el último aceptor de electrones de la cadena respiratoria en mitocondrias. En *Saccharomyces cerevisiae* la CcO tiene 12 subunidades, de las cuales Cox1, Cox2 y Cox3 están codificadas en el DNA mitocondrial y constituyen el núcleo catalítico de la enzima. Se propone que la CcO se ensambla a partir de tres módulos, cada uno con una de las subunidades codificadas en la mitocondria. El módulo de ensamblaje de Cox1 (Complejos COA) estabiliza al módulo de Cox3 y probablemente también al de Cox2, lo que sugiere que su formación controla en gran medida el ensamblaje de la CcO. Diversos estudios indican que la presencia de Cox1 mal ensamblada parece ser deletérea para la célula, ya que puede formar un intermediario pro-oxidante. De hecho, mutaciones en Cox1 o en factores que participan en su biogénesis causan diversas patologías humanas. La CcO interactúa con el Complejo bc_1 (Complejo III) para formar los llamados supercomplejos, se propone que la formación de estos complejos aumenta la eficiencia de la fosforilación oxidativa y disminuye la generación de especies reactivas de oxígeno.

En *S. cerevisiae* la síntesis de Cox1 disminuye si no se ensambla correctamente la CcO. Para acoplar ambos procesos se requiere a Mss51, proteína que promueve la traducción del mRNA de *COX1* y además interacciona con el extremo carboxilo terminal (C-terminal) de Cox1 y otras proteínas, que conforman los complejos COA. Cuando Mss51 está asociado a los complejos COA es incapaz de activar la traducción del mRNA de *COX1*.

En un estudio previo demostramos que los últimos 15 residuos de Cox1 funcionan como un regulador negativo de su síntesis, ya que su eliminación (Cox1 Δ C15) ocasiona que Cox1 se sintetice de manera normal, aunque no se ensamble la CcO. En este trabajo encontramos que existen aminoácidos específicos en el extremo C-terminal de Cox1 que participan en la regulación de su síntesis. Encontramos que los residuos P521, P522 y V524 controlan la

síntesis de Cox1, mientras que H525 y P530 no parecen participar en esta regulación. Con experimentos de coimmunoprecipitación demostramos que los residuos P521, P522 y V524 estabilizan la unión de Mss51 a los complejos COA. Además, comprobamos por electroforesis en geles azules nativos que la cantidad de Mss51 disponible para activar la traducción del mRNA de COX1 es mayor cuando mutamos los residuos P521, P522 y V524 de Cox1.

Otro de nuestros objetivos era determinar si el ensamblaje de la CcO era afectada por una síntesis de Cox1 constante y no controlada. Para ello separamos los complejos mitocondriales de las mutantantes de Cox1 por geles azules nativos. Encontramos que en la ausencia de las subunidades Cox2 o Cox4, en la mutante Cox1 Δ C15 se promueve la formación y/o estabilidad de SC aberrantes no funcionales, los cuales no se observaron en la cepa Cox1 WT. DE hecho, la formación y/o estabilidad de los SC aberrantes depende de la presencia del complejo III, de Cox3 y de la adición del grupo hemo *a* a Cox1.

Nuestros datos indican que el C-terminal de Cox1 es un regulador central de la biogénesis de la CcO. Los últimos 15 residuos de Cox1, en particular los residuos P521, P52 y V524 acoplan la síntesis de Cox1 con el ensamblaje de la CcO. Por otro lado, el extremo C-terminal de Cox1 participa en la formación y/o estabilización de los SC. De manera interesante, encontramos que la mutante Cox1 Δ C15 envejece más rápido que una cepa Cox1 silvestre, lo cual indica la importancia de los procesos que regula el extremo C-terminal de Cox1.

Abstract

Cytochrome *c* oxidase (CcO) is the last electron acceptor of the respiratory chain. In *Saccharomyces cerevisiae*, the CcO contains 12 subunits. Three of these subunits, Cox1, Cox2 and Cox3 are encoded by mitochondrial genes and form the catalytic center of the enzyme. It is proposed that CcO is assembled by three independent modules each one of them containing a mtDNA-encoded subunit. The Cox1 assembly module (COA complexes) stabilizes the Cox3 module (and probably also the one containing Cox2). This suggests that the formation of the Cox1 module is critical for CcO assembly. When Cox1 is not properly assembled it promotes the formation of a pro-oxidant intermediary, that is deleterious for the cells. Moreover, mutations that affect Cox1 expression cause severe diseases in humans. The CcO interacts with complex III (*bc₁* complex) to form the so-called supercomplexes, it is proposed that these complexes improve the oxidative phosphorylation and reduce the reactive oxygen species production.

Synthesis of Cox1 in *S. cerevisiae* decreases if CcO assembly is blocked. Mss51 is the key factor that coordinates Cox1 synthesis and CcO assembly. This protein activates translation of the *COX1* mRNA, and interacts with newly synthesized Cox1 and with other proteins to form the COA complexes. The association of Mss51 with the COA complexes inhibits its translational function.

In a previous study, we found that the last 15 residues of Cox1 are a negative regulator of its own synthesis, after deletion of this region (Cox1 Δ C15) Cox1 synthesis was normal even when CcO assembly was defective. In the present work, we looked for some specific amino acids of the C-terminal end that are necessary to control Cox1 synthesis. Using site-directed mutagenesis and mitochondrial transformation we found that P521, P522 and V524 residues from Cox1 are necessary to control its own synthesis, while H525, F527 and P530 are not required for this function. By coimmunoprecipitation assays we determined that the mutation of these amino acids reduced binding of Mss51 to the COA

complexes. Moreover, using blue native gel electrosopes we found that the fraction of Mss51 that activates Cox1 synthesis increased when the P521, P522 and V524 residues from Cox1 were mutated.

In addition, we studied if the CcO assembly was affected by the constant synthesis of Cox1. By applying blue native gels electrophoresis, we found that the Cox1 Δ C15 mutant lacking Cox2 or Cox4 promoted the formation and/or stabilization of aberrant non functional supercomplexes (SC). As expected, these aberrant supercomplexes were not observed in mitochondria with wild type Cox1. The presence of Cox3, complex III and Cox1 hemylation are necessary for the formation/stabilization of the aberrant SC.

Our results indicate that the Cox1 C-terminal end is a central regulator of CcO biogenesis. The last 15 residues of Cox1, in particular P521, P522 and V524 control the synthesis of Cox1 during CcO assembly. In addition, the Cox1 C-terminal end participates in the formation and/or stabilization of SC. Interestingly, we found that the chronological lifespan of the Cox1 Δ C15 mutant is shorter. This result, supports the importance of the processes regulated by the Cox1 C-terminal end.

Introducción

La mitocondria

La mitocondria es el principal productor de adenosina trifosfato (ATP) en la mayoría de eucariontes. Está formada por la membrana externa mitocondrial (ME) y la membrana interna mitocondrial (MIM), entre estas 2 membranas se localiza el espacio intermembranal (EIM) y encapsulada por la MIM se encuentra la matriz mitocondrial. En la MIM se encuentran embebidos los complejos de la cadena respiratoria, la ATP sintasa y proteínas de transporte. La MIM forma invaginaciones hacia la matriz conocidas como crestas mitocondriales que son muy importantes para la fosforilación oxidativa. Dentro de la matriz mitocondrial hay una gran cantidad de enzimas necesarias para el metabolismo celular como: la β -oxidación de ácidos grasos, el catabolismo de algunos aminoácidos, el ciclo de la urea, todas las enzimas del ciclo de Krebs, etc. (B Alberts, A Johnson, J Lewis, M. Raff, K. Roberts, 2015).

La mitocondria surgió por un evento de endosimbiosis (Sagan, 1967). Por estudios de filogenia se determinó que el ancestro de la mitocondria era muy parecido a una α -proteobacteria capaz de realizar la fosforilación oxidativa, sin embargo, aún hay controversia a cerca de la identidad de la célula que endocitó al ancestro de la mitocondria . Actualmente hay dos propuestas principales, en la primera se menciona que era una célula con características eucariontes, la cual ya contaba con un núcleo. La segunda idea propone que era una célula similar a una archea, lo cual sugiere que la aparición del núcleo y de la mitocondria ocurrió al mismo tiempo. Después de la endosimbiosis la α -proteobacteria perdió la capacidad de vida libre como resultado de la transferencia de la mayoría de su genoma al núcleo de la célula huésped (Gray, 2014). No obstante, las mitocondrias aún conservan parte del material genético que no pudo ser transferido al núcleo, y cuentan con toda la maquinaria necesaria para su replicación, transcripción y traducción (Contamine and Picard, 2000; Lipinski et al., 2010).

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

Saccharomyces cerevisiae es un organismo facultativo utilizado ampliamente como modelo de estudio. Esto se debe principalmente a que se mantiene con facilidad en el laboratorio y la rapidez a la cual prolifera. Una de las principales ventajas que ofrece *S. cerevisiae* es que se pueden realizar mutaciones que afecten su capacidad respiratoria pero no su viabilidad (porque fermenta y respira), por lo cual es ideal para el estudio de la mitocondria y sus funciones. En *S. cerevisiae* se pueden realizar mutaciones por recombinación homóloga de una manera sencilla tanto en su genoma nuclear como en el genoma mitocondrial. Además, se cuenta con la secuencia completa de su genoma nuclear y su genoma mitocondrial (Sherman, 2002).

El genoma mitocondrial de *S. cerevisiae*.

El DNAm_t de *S. cerevisiae* tiene un tamaño de entre 75-85 kilobases dependiendo de la cantidad de intrones presentes (Figura 1). En el DNAm_t de *S. cerevisiae* se encuentran codificados ocho proteínas, de las cuales siete forman parte de los complejos de la cadena respiratoria: Cox1, Cox2 y Cox3 son subunidades de la Citocromo c oxidasa (CcO) o Complejo IV (CIV); Cytb del complejo *bc₁* o complejo III (CIII); Atp6, Atp8, Atp9 de la ATP sintasa y Var1 forma parte de la subunidad chica del ribosoma mitocondrial. El DNAm_t también codifica para 24 tRNAs, los rRNAs 16S y 21S, además de un RNA 9S componente de una RNasa tipo P encargada del procesamiento de los tRNAs (Contamine and Picard, 2000; Lipinski et al., 2010).

La cadena respiratoria de *S. cerevisiae*.

Los complejos respiratorios acoplan el transporte de electrones hacia el O₂ con el bombeo de protones de la matriz hacia el EIM para generar un gradiente electroquímico que se utiliza para sintetizar ATP y transportar metabolitos (Figura 2). La β-oxidación de ácidos grasos, el ciclo de Krebs y diversos procesos catabólicos son los principales generadores de las moléculas

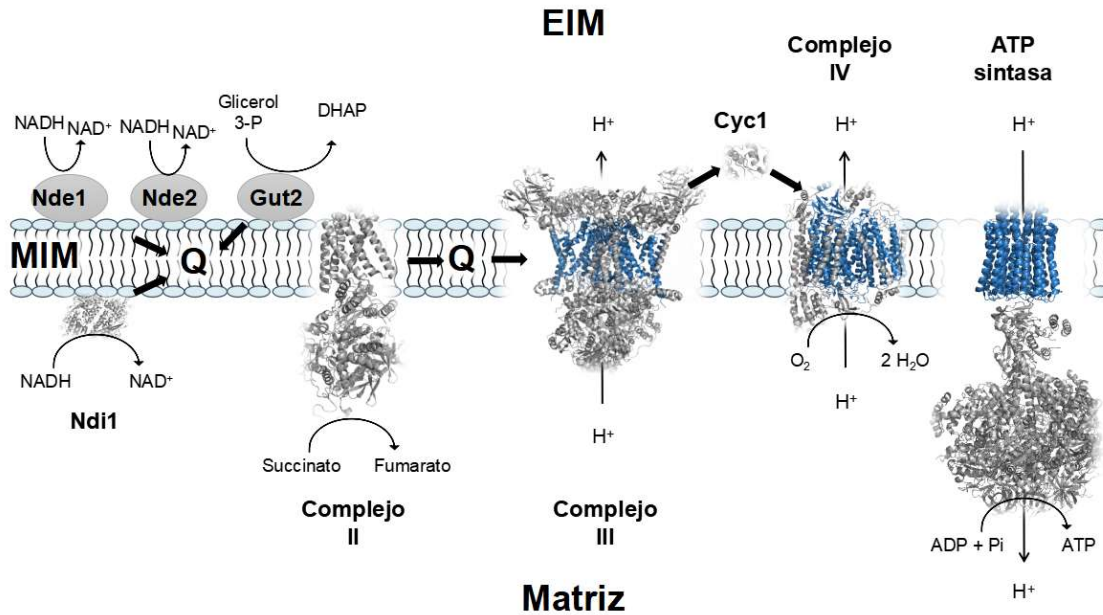


Figura 2. Cadena Respiratoria de *S. cerevisiae* (Figura basada en Joseph-Horne et al., 2001). Se muestran los sustratos y productos de las reacciones en cada complejo. Las proteínas codificadas en la mitocondria se muestran en azul, en gris las proteínas codificadas en el núcleo. Las flechas gruesas representan el flujo de electrones a través de los complejos respiratorio, mientras que las flechas delgadas representan el bombeo de protones de la matriz al EIM. Nde1 y Nde2=NADH deshidrogenasa externa mitocondrial. Ndi1=NADH deshidrogenasa interna mitocondrial (PDB: 46G6). Gut2=Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial. DHAP=Dihidroxiacetona Q=poza de ubiquinonas. Cyc1=Citocromo c. Complejo II, PDB: 1ZOY. Complejo III, PDB: 1KYO. Complejo IV, PDB: 1OCC. ATP sintasa, PDB: 2XOK.

Síntesis de proteínas mitocondriales y activadores traduccionales.

A pesar de su origen bacteriano, la maquinaria de traducción mitocondrial cambió a lo largo del tiempo adaptándose a las condiciones particulares del organelo, por ejemplo: la traducción mitocondrial se especializó en sintetizar proteínas de membrana, la mayoría de los RNA mensajeros (mRNA) no tienen modificación Cap 5', el ribosoma mitocondrial contiene la mayor proporción de proteínas conocida, etc. Las diferentes adaptaciones de la maquinaria de traducción mitocondrial ocasionaron que los mecanismos generales de traducción varíen entre organismos, en especial en el inicio de la traducción (García-Guerrero et al., 2016).

En *S. cerevisiae* la traducción de los mRNAs codificados en el DNAmT depende de proteínas conocidas como “activadores traduccionales” (Costanzo and Fox, 1990). Estas proteínas, promueven la traducción de un mRNA mitocondrial específico al unirse a su región 5' no traducida (5'-UTR). Se propone que los activadores traduccionales ayudan al reclutamiento y posicionamiento de los ribosomas sobre el codón de inicio. Sin embargo, a la fecha no se conoce el mecanismo de acción exacto. Los activadores traduccionales se encuentran asociados a la MIM, ya sea como proteínas integrales de membrana o de manera periférica, lo que sugiere que facilitan la inserción co-traduccional de las proteínas recién sintetizadas en la MIM. La eliminación de los activadores traduccionales ocasiona que no se traduzca su mRNA blanco y que por lo tanto la célula no pueda respirar por falta de alguna subunidad de los complejos de la fosforilación oxidativa (García-Guerrero et al., 2016; Herrmann et al., 2013). En la tabla 1, se enumeran los activadores traduccionales de cada proteína codificada en la mitocondria.

En *S. cerevisiae* se encontró que algunos activadores traduccionales tienen una función más, ya que pueden acoplar la traducción de su mRNA blanco al ensamblaje de la proteína en el complejo respiratorio del cual forman parte. Tal es el caso para los activadores traduccionales Mss51, el complejo Cbp3-Cbp6 y Atp22, que promueven la traducción de los mRNAs de *COX1*, de *COB* y de *ATP6/ATP8* respectivamente (Gruschke et al., 2012; Perez-Martinez et al., 2003; Rak and Tzagoloff, 2009). Para el caso de Mss51 y el complejo Cbp3-Cbp6 se demostró que además de actuar en el extremo 5'-UTR de su mRNA blanco, interaccionan con la proteína recién sintetizada (Gruschke et al., 2012; Perez-Martinez et al., 2003).

Un punto de regulación muy importante en la biogénesis de los complejos respiratorios en *S. cerevisiae* se da en la traducción de los mRNAs codificados en el DNAmT (Herrmann et al., 2013). En este trabajo nos enfocamos a estudiar cómo se acopla la síntesis de Cox1 al ensamblaje de la CcO.

Tabla 1. Activadores traduccionales de *S. cerevisiae*.

mRNA	Activador Traduccional	Asociación membranal	Referencia
COX1	Pet309	Periférica	(Manthey and McEwen, 1995)
	Mss51	Periférica	(Decoster et al., 1990)
COX2	Pet111	Integral	(Poutre and Fox, 1987)
COX3	Pet54	Periférica	(Costanzo et al., 1986)
	Pet494	Integral	(Costanzo and Fox, 1986)
	Pet122	Integral	(Kloeckener-Gruissem et al., 1988)
COB	Cbs1	Integral	(Rödel, 1986)
	Cbs2	Periférica	(Rödel, 1986)
	Cbp1	Periférica	(Islas-Osuna et al., 2002)
	Cbp3	Periférica	(Gruschke et al., 2012)
	Cbp6	Periférica	(Gruschke et al., 2012)
ATP6/ ATP8	Atp22	—	(Helfenbein et al., 2003)
ATP9	Aep1	—	(Payne et al., 1993)
	Aep2	—	(Finnegan et al., 1991)
VAR1	Sov1	—	(Herrmann et al., 2013)

Biogénesis de la Citocromo c oxidasa.

La CcO cataliza la reducción del O₂ molecular a dos moléculas de agua, para ello requiere de 4 electrones donados por el citocromo c y de 4 protones, a su vez, 4 protones se bombean al EIM (B Alberts, A Johnson, J Lewis, M. Raff, K. Roberts, 2015). En *S. cerevisiae* la CcO está conformada por 12 subunidades, de estas Cox1, Cox2 y Cox3 están codificadas en el DNAm y forman el núcleo catalítico de la enzima. El resto de las subunidades están codificadas en el genoma nuclear, son sintetizadas en el citosol e importadas a la mitocondria. Las subunidades nucleares son necesarias para la regulación, estabilidad y ensamblaje de la CcO. Hasta el momento se han identificado al menos 30 factores de origen nuclear que son necesarios para la formación de la enzima funcional (Mick et al., 2011; Soto et al., 2012).

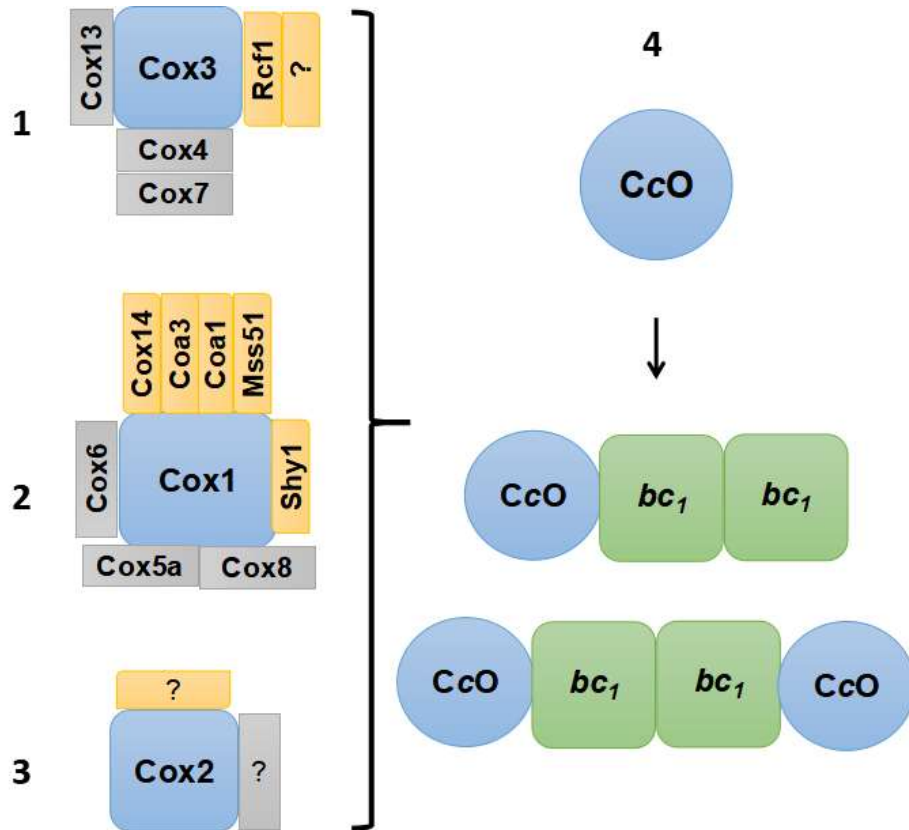


Figura 3. Ensamblaje modular de la CcO (Figura basada en (Gavin P McStay et al., 2013). 1. Composición del módulo de Cox1. 2. Composición del módulo de Cox3. 3. Composición del módulo de Cox2. Hasta el momento no se conoce el módulo de Cox2, ni cuál es el orden de interacción entre los módulos para formar una CcO funcional. 4. Se esquematiza el Complejo IV ensamblado y la formación de los SC III_2/IV y III_2/IV_2 . Las proteínas codificadas en el DNAm_t se muestran en azul, en gris las subunidades codificadas en el núcleo y en amarillo las chaperonas que participan en el ensamblaje.

Fallas en la biogénesis de la CcO se han asociado a diferentes patologías en humanos, como el síndrome de Leigh, síndrome de MELAS (por sus siglas en inglés de *“Mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes”*) y diferentes enfermedades de índole neurológica (Rak et al., 2016). Incluso, se reportó que la eliminación *PET494*, uno de los activadores traduccionales del mRNA de *COX3* ocasiona envejecimiento prematuro en células de levadura, de hecho, la eliminación de genes implicados en la

traducción mitocondrial y el mantenimiento del genoma mitocondrial también causan envejecimiento prematuro de las células de levadura (Garay et al., 2014). Adicionalmente, se sabe que la generación de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria y el potencial membranal de la mitocondria son factores determinantes en el envejecimiento de las células de la levadura (Jazwinski, 2005; Longo et al., 2012).

La biogénesis de la CcO es un proceso complicado y altamente regulado ya que necesita acoplar el ensamblaje de proteínas codificadas en diferentes genomas. Además, se requieren añadir los grupos prostéticos hemo *a* y Cu Cox1 y Cox2, proteínas altamente hidrofóbicas que se encuentran embebidas en la MIM (Mick et al., 2011; Soto et al., 2012). Se propone que la CcO se ensambla a partir de tres módulos independientes, cada uno formado por una de las subunidades codificadas en la mitocondria con su repertorio específico de subunidades citosólicas y chaperonas (Figura 3; (Su et al., 2014). El módulo de ensamblaje de Cox1 (Complejos COA. Figura 3, paso 1) estabiliza al módulo de Cox3 (Figura 3, paso 2) y posiblemente al módulo de Cox2 (Figura 3, paso 3), por lo cual, es necesario que se ensamblen correctamente los complejos COA para que prosiga el ensamblaje de la CcO (Gavin P McStay et al., 2013; Gavin P. McStay et al., 2013; Su et al., 2014). Adicionalmente, uno o dos monómeros de la CcO se asocian con el complejo III para formar los supercomplejos (SC) III₂/IV y III₂/IV₂ (Figura 3, paso 4; (Cruciat et al., 2000; Schägger and Pfeiffer, 2000) . La formación y/o estabilidad de los SC depende de chaperonas como Rcf1, Rcf2, Aac2, Cox13, Cox26, así como de la presencia de cardiolipina en la MIM (Chen et al., 2012; Levchenko et al., 2016; Pfeiffer et al., 2003; Strecker et al., 2016; Strogolova et al., 2012b; Stuart, 2008; Vukotic et al., 2011).

Regulación de la síntesis de Cox1.

Cox1 contiene al sitio hemo *a_B*-Cu_B para la reducción del oxígeno y los canales por donde se bombean los protones hacia el EIM (Tsukihara et al., 1996). Estudios anteriores reportaron que Cox1 puede formar un intermediario

pro-oxidante que contiene el grupo hemo *a* y a Cox2 (Khalimonchuk et al., 2007), lo cual sugiere que la cantidad de Cox1 presente en la MIM debe estar muy controlada. De hecho, sabemos que en *S. cerevisiae* en la mayoría de las mutantes de ensamblaje de la CcO la síntesis de Cox1 disminuye y la proteína es inestable (Barrientos et al., 2004; Shingú-Vázquez et al., 2010). En otros organismos también se regula estrictamente la cantidad de Cox1 presente en la MIM, aunque el mecanismo principal consiste en degradar rápidamente a la proteína (Soto et al., 2012). Inclusive, mutaciones en la región codificante de *COX1* o en factores que participan en su biogénesis están asociadas a enfermedades, como el síndrome de MELAS o rabdiomiolisis (Rak et al., 2016).

La traducción del mRNA de *COX1* la promueven Mss51 y Pet309 que actúan sobre el 5'-UTR del mRNA (Figura 4, paso 1), de hecho, Pet309 interactúa físicamente con esta región (Decoster et al., 1990; Manthey and McEwen, 1995; Zamudio-Ochoa et al., 2014). Además, Mss51 interactúa con la proteína Cox1 recién sintetizada y con Cox14 y Coa3 en los complejos COA para ayudar a su ensamblaje (Figura 4, paso 2). Las proteínas Cox14 y Coa3 estabilizan la unión de Mss51 con el C-terminal de Cox1 (Barrientos et al., 2004; Mick et al., 2010; Shingú-Vázquez et al., 2010). Cuando Mss51 se encuentra en los complejos COA no puede activar la síntesis de Cox1, por lo tanto, se propone que Mss51 es un vínculo entre el ensamblaje de Cox1 y su síntesis (Perez-Martinez et al., 2009, 2003). La incorporación de las chaperonas Coa1, Coa2 y Shy1 al complejo COA estabiliza a Cox1 y facilita la incorporación de sus grupos hemo *a*. Mientras que la adición de las subunidades Cox6, Cox5a y Cox8 al complejo COA permiten que avance el ensamblaje de la CcO (Figura 4, paso 3). (Gavin P. McStay et al., 2013; Mick et al., 2007; Pierrel et al., 2008, 2007). Cuando la CcO se ensambla correctamente, Mss51 se libera de los complejos COA, pero no tiene la conformación necesaria para activar eficientemente la síntesis de Cox1 (Figura 4, paso 3). Se propone que Mss51 adquiere la conformación adecuada (Mss51 Traduccionalmente activa) para activar la síntesis de Cox1 cuando interactúa con Pet54, posiblemente cerca del mRNA de *COX1* (Figura 4, paso 4).

Mayorga, 2016). Finalmente, Mss51 traduccionalmente activa (TA) puede volver a promover la traducción del mRNA de COX1 (Figura 4, paso 1).

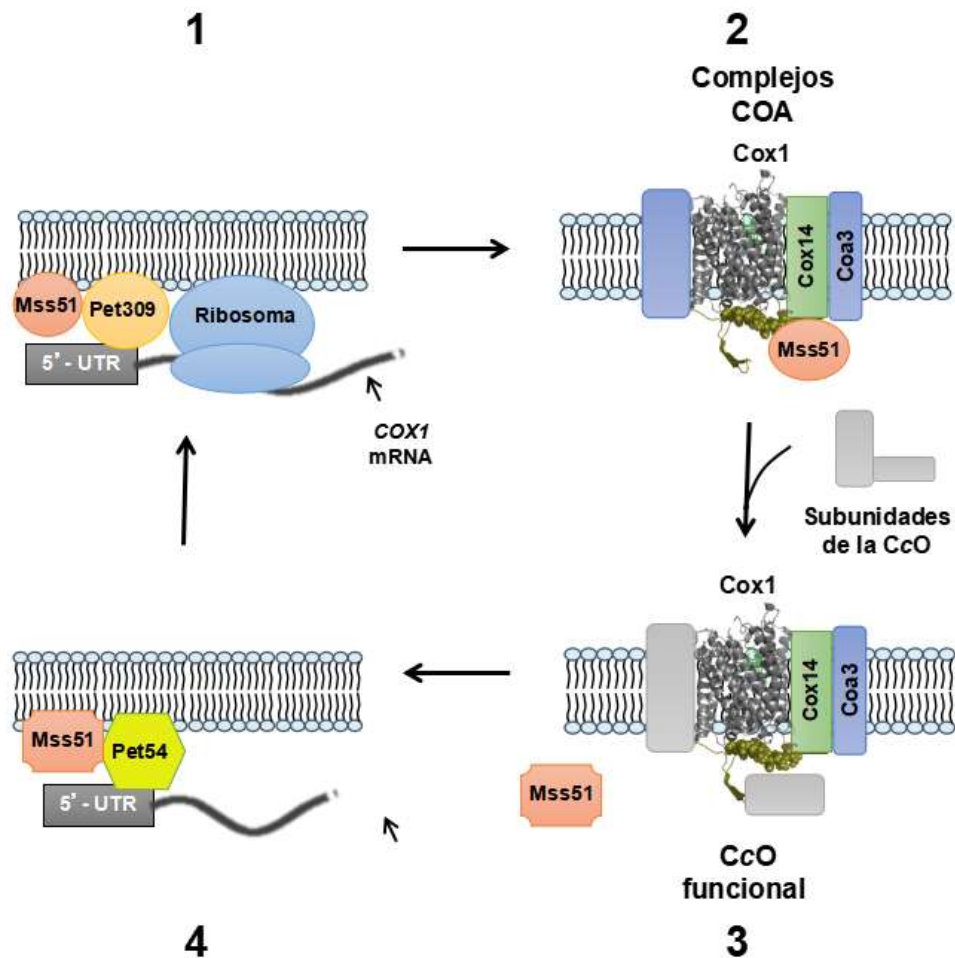


Figura 4. Modelo simplificado de la regulación de la síntesis de Cox1 en *S. cerevisiae* (Basado en (Mayorga et al., 2016; Mick et al., 2011) 1) Mss51 y Pet309 activan la traducción del mRNA de COX1. 2) Mss51 interactúa con el C-terminal de Cox1 en los complejos COA para ayudar en el ensamblaje de la CcO. La unión de Mss51 a los complejos COA impide que active la síntesis de Cox1. 3) La formación de una CcO funcional promueve la liberación de Mss51, pero con una conformación poco eficiente para activar la traducción del mRNA de COX1. 4) La interacción de Pet54 con Mss51 promueve que adquiera la conformación adecuada para activar la síntesis de Cox1. La estructura de Cox1 de *S. cerevisiae* se obtuvo con el servidor SWISS-MODEL usando como templado la estructura cristalográfica de Cox1 de bovino (Tsukihara et al., 1996). Los últimos 15 residuos de Cox1 se presentan como esferas de color verde.

Mss51 consta de 436 residuos, pero no se han reportado regiones específicas para cada una de sus funciones. Se propone que Mss51 une al hemo *b* y se propone que cambios en el estado redox del hemo *b* podrían regular la función como activador traduccional o chaperona de Mss51 (Soto et al., 2012; Soto and Barrientos, 2015). Además de Pet54 (Mayorga et al., 2016), posiblemente Ssc1 (que está asociada a Mss51 todo el tiempo) también es importante para que Mss51 active eficientemente la síntesis de Cox1 (Fontanesi et al., 2010). Mam33 es otra proteína importante para promover una síntesis eficiente de Cox1 en ciertas condiciones, pero no sabemos qué relación pueda tener con Mss51 (Roloff et al., 2015).

En mutantes de ensamblaje de la CcO, Mss51 permanece atrapado en los complejos COA, por lo cual disminuye la traducción del mRNA de *COX1* (Mick et al., 2011). El modelo de regulación actual propone que Cox14, Coa3 y el extremo carboxilo terminal de Cox1 (C-terminal de Cox1) actúan como reguladores negativos de la síntesis de Cox1 (Figura 4, paso 2), ya que su eliminación ocasiona que el mRNA de *COX1* se traduzca, aunque no se ensamble la CcO (Barrientos et al., 2004; Mick et al., 2010; Shingú-Vázquez et al., 2010). Cox1 es la subunidad más grande de la CcO, y tiene 12 cruces transmembranales (Tsukihara et al., 1996). La región más hidrofílica de Cox1 es el C-terminal de 54 aminoácidos y se localiza del lado de la matriz mitocondrial. En un trabajo previo encontramos que el C-terminal de Cox1 en particular los últimos 15 residuos de Cox1, participan en la regulación de su síntesis. Esta región estabiliza la unión de Mss51 y Cox14, por lo cual, controla la cantidad de Mss51 disponible para activar la traducción del mRNA de *COX1* (Shingú-Vázquez et al., 2010).

En este trabajo analizamos si existían residuos específicos dentro de los últimos 15 aminoácido de Cox1 que regulen su síntesis. Estudiamos también, los efectos de tener una síntesis descontrolada de Cox1 sobre el ensamblaje de la CcO y sobre la formación de supercomplejos. Finalmente, comenzamos a analizar cuál es el efecto fisiológico de que no se controle la síntesis de Cox1.

Justificación

Cox1 es una proteína esencial para la función y el ensamblaje de la CcO. Diversos reportes indican que si Cox1 no está correctamente ensamblada puede ser perjudicial para la célula, por lo cual, existen diversos mecanismos que controlan la cantidad de Cox1 presente en la MIM. En *S. cerevisiae* la síntesis de Cox1 está regulada por el ensamblaje de la CcO y para ello se requiere de Mss51. Esta proteína actúa a dos niveles, primero, activa la traducción del mRNA de *COX1* y después interactúa con la proteína Cox1 para monitorear el ensamblaje de la CcO. Sabemos que los últimos 15 residuos de Cox1 son importantes para la interacción con Mss51 y por lo tanto para la regulación de su síntesis. Por tal motivo queremos saber cuáles son los aminoácidos esenciales en Cox1 que median la interacción con Mss51. Adicionalmente, queremos explorar cuales son las consecuencias de una constante síntesis de Cox1 sobre el ensamblaje de la CcO y analizar si podría afectar la formación de supercomplejos.

Hipótesis

Hay aminoácidos específicos en los últimos 15 residuos de Cox1 que controlan su síntesis y modulan la formación o estabilidad de la CcO y de los supercomplejos mitocondriales. La mutante Cox1 Δ C15 tendrá un envejecimiento prematuro ya que la síntesis de Cox1 ya no se regula.

Objetivo

Identificar cuáles aminoácidos de los últimos 15 residuos de Cox1 regulan su síntesis y analizar si afectan la formación o estabilidad de la CcO y de supercomplejos mitocondriales. Analizar si las mutantes que ya no regulan la síntesis de Cox1 envejecen prematuramente.

Objetivos Particulares

1. Determinar qué aminoácidos de los últimos 15 residuos de Cox1 regulan su síntesis.
 - Identificar por análisis de secuencia de aminoácidos a los candidatos en los últimos 15 residuos de Cox1 que podrían regular su síntesis y el ensamblaje de la CcO.
 - Generar mutantes puntuales de Cox1 de los aminoácidos candidatos.
 - Estudiar si las mutantes puntuales de Cox1 regulan su síntesis.
 - Analizar la interacción entre Mss51 y los complejos COA en las mutantes puntuales de Cox1.

2. Investigar si en las mutantes de Cox1 que no regulan su síntesis se afecta el ensamblaje de la CcO.
 - Estudiar la formación de intermediarios de ensamblaje de la CcO y de supercomplejos en las mutantes puntuales de Cox1 y Cox1 Δ C15.
 - Definir si en la mutante Cox1 Δ C15 el complejo III interactúa con una CcO parcialmente ensamblada.
 - Analizar si la formación o estabilidad de los supercomplejos aberrantes requiere de la adición del grupo hemo a Cox1.

3. Estudiar si en la mutante de Cox1 Δ C15 se afecta la viabilidad celular.
 - Medir la actividad de la cadena respiratoria.
 - Analizar si se afecta su resistencia a peróxido de hidrógeno.
 - Determinar el envejecimiento cronológico de las células.

Materiales y métodos

Cepas y medios.

En este trabajo usamos cepas isogénicas a D273-10B (Número de catálogo ATCC: 24657). En el anexo 2 se muestra la lista completa de cepas y su genotipo. Las células se incubaron en medio fermentativo completo con 2% glucosa (YPD) ó 2% galactosa (YPGal) o en medio respiratorio completo con 3% etanol y 3% glicerol (YPEG). La composición de los medios se basó en (Sherman, 2002).

<u>YPD</u>		<u>YPGal</u>	
Extracto de levadura	1%	Extracto de levadura	1%
Peptona	2%	Peptona	2%
Dextrosa	2%	Galactosa	2%
Adenina mg/L	30 mg/L	Adenina	30
<u>YPEG</u>		<u>YPD-G418</u>	
Extracto de levadura	1%	Extracto de levadura	1%
Peptona	2%	Peptona	2%
Glicerol	3%	Glucosa	2%
Etanol mg/L	3%	Adenina	30
Adenina	30 mg/L	G418	100 mg/L
<u>-Ura</u>		<u>-Leu</u>	
Base nitrogenada sin aminoácidos	0.67%	Base nitrogenada sin aminoácidos	0.67%
Dextrosa	2%	Dextrosa	2%
Medio drop out sin uracilo mg/L	770 mg/L	Medio drop out sin uracilo	770
<u>-Met Gal</u>			
Base nitrogenada sin aminoácidos	0.67%		
Galactosa	2%		
Medio drop out sin leucina	790 mg/L		

Clonación de las mutantes puntuales de *cox1*.

La clonación de las mutantes puntuales de *cox1* la realizó Miguel A. Shingú Vázquez como se describe a continuación (Shingú-Vázquez et al., 2010).

Para la construcción de las mutantes puntuales de *cox1* se usó como templado el plásmido pXPM57 el cual contiene el gen mitocondrial COX1 flanqueado por 395 y 990 nucleótidos del 5'-UTR y 3'-UTR respectivamente (Perez-Martinez et al., 2003). Las mutaciones puntuales P521A/P522A, V524E, F527A, H525A y P530A se introdujeron en COX1 por PCR usando el oligonucleótido CO1NdeF y oligonucleótidos específicos para introducir cada mutación y un sitio de restricción para *AflII*. Los productos de PCR se ligaron al plásmido pGEM-T easy y se generaron los plásmidos pXP132-pXP136. Posteriormente se liberaron los insertos mutantes de *cox1* con NdeI y *AflII* y se subclonaron en el plásmido pXPM57 cortado con las mismas enzimas generando los plásmidos pXP139-pXP143 (el anexo 3 contiene la lista completa de plásmidos y oligonucleótidos usados).

Transformación de las mutantes puntuales de *cox1* en mitocondrias de *S. cerevisiae* (Bonney et al., 2007).

Miguel A. Shingú Vázquez generó las mutantes puntuales de *Cox1* como se describe a continuación (Shingú-Vázquez et al., 2010).

Las mitocondrias de las células se transformaron con dos plásmidos. Uno sirvió como marcador de transformantes nucleares (Yep352), mientras que el otro plásmido contenía nuestro gen mitocondrial de interés (pXP139-pXP143). La transformación de las mitocondrias de levadura siguió los pasos descritos a continuación.

Preparación de las células.

- Se creció un cultivo de 2 mL en YPRaf de la cepa NAB69 por toda la noche.

- Con 0.3 mL del cultivo anterior se inoculó 30 mL de YPRaf y se creció hasta saturación.
- Se centrifugaron las células y se resuspendió el botón celular en 0.6 mL de YPD.
- Se plaqueó 0.1 mL de células en 6 cajas de medio de transformación y se dejó secar por 3 h a temperatura ambiente (TA).

Medio de transformación

Base nitrogenada sin aminoácidos y sin (NH ₄) ₂ SO ₄	0.67%
Dextrosa	5%
Sorbitol	1 M
Bacto Agar	2%
Adenina	0.01%
Arginina	0.0105%

Preparación de las partículas de tungsteno (W).

- Se pesó entre 10-50 mg de partículas de W (Bio-rad 0.5 µm) y se esterilizaron con etanol al 70%. El tubo con las partículas de W se incubó 10 min a temperatura ambiente y se agitó 4 veces.
- El tubo se centrifugó por 15 min a 13000 rpm y las partículas se lavaron con 1.5 mL de agua estéril.
- Se volvió a centrifugar por 15 min a 13000 rpm las partículas de W y se resuspendieron en glicerol al 50% (17 µL por cada mg de partículas).

Precipitación del DNA en las partículas de W.

- Se añadió a un tubo en hielo: 100 µL de perlas de W preparadas, 4 µL de espermidina 1 M (Sigma-Aldrich), 100 µL de CaCl₂ 2 M (estéril), 5 µg del plásmido YEp352 y 15 µg del plásmido con el gen mitocondrial de interés (pXP139-pXP143)
- El tubo se incubó por 10 min en hielo. Se agitó cada 3 min.
- Se centrifugaron la perlas a 4°C por 30 seg a 13,000 rpm.

- Se añadió 200 µL de etanol al 100 % (-20°C), después agitamos suavemente.
- Se centrifugaron las perlas y descartamos el sobrenadante.
- Los dos pasos anteriores se repitieron dos veces.
- Se resuspendió las partículas en 120 µL de etanol al 100%.
- Se insertaron los “macrocarriers” en sus sujetadores y los colocamos en una caja petri (Se utilizaron 6 “macrocarriers” por caja para transformar una sola construcción).
- Se distribuyeron las perlas de W con el DNA precipitado sobre los “macrocarriers” (Se agitaron bien las partículas de W para distribuir homogéneamente. Si lo requería se añadió más etanol al 100%).
- Se dejó secar por 20 min a temperatura ambiente.

Bombardeo (De acuerdo con las instrucciones del manual del equipo PDS-1000He Biolistic Gun Bio-rad)

- Se lavó cuidadosamente la cámara del equipo con etanol al 70% y secamos completamente.
- Colocamos el disco de ruptura de 1350 psi como indica el manual.
- Colocamos en el quinto nivel (de abajo hacia arriba) el sujetador del “macrocarrier” insertado en el sistema de ensamblaje.
- Introducimos la caja petri con las células a bombardear en el segundo nivel de la cámara.
- Esperamos a que el equipo generara un vacío de 21-25 pulgadas de mercurio en la cámara del equipo.
- Disparamos
- Se eliminaron los fragmentos del “macrocarrier” de la caja petri
- Incubamos las cajas a 30°C hasta por 7 días.

Selección de las transformantes mitocondriales con los genes mutantes de *cox1* (cepas rho 0 sintéticas ó ρ^- -s)

Seleccionamos las transformantes mitocondriales o cepas rho 0 sintéticas (ρ^- -s) con la cepa L74, la cual tiene una mutación puntual en el exón 4 de *COX1* que le impide respirar (Meunier et al., 1993). Las cepas ρ^- -s pueden recombinar con el DNAm_t de la cepa L74 y pueden restaurar el crecimiento respiratorio cuando se generan células diploides. En las placas bombardeadas seleccionamos las colonias que recuperaran el crecimiento en medio respiratorio YPEG al aparearlas con la cepa L74. Este proceso de selección se repitió varias veces hasta que obtuvimos una cepa ρ^- -s estable. Las cepas ρ^- -s sólo tenían el gen mitocondrial de nuestro interés.

Obtención de las mutantes puntuales de *cox1* integradas en un DNAm_t completo (ρ^+).

Una vez que obtuvimos las cepas ρ^- -s estables la usamos para transferir nuestro gen mutante a cepas con un DNAm_t completo (ρ^+). Para ello usamos a la cepa XPM10b como receptora, en esta cepa la región codificante de *COX1* esta sustituida por el gen reportero *ARG8^m*, y flanqueado con los extremos UTR de *COX1*. La cepa XPM10b no respira, pero puede crecer en un medio sin arginina (Perez-Martinez et al., 2003). Como donadoras usamos las cepas ρ^- -s, que tienen la mutación *kar1-1*, la cual previene que se lleve a cabo la fusión nuclear durante el apareamiento, sin embargo, los citoplasmas de ambas células si se pueden mezclar, por lo tanto, permite la transferencia y recombinación del DNAm_t (Conde and Fink, 1976).

Para seleccionar las mutantes puntuales de *cox1* en cepas ρ^+ se siguieron los siguientes pasos:

- Se aparearon las cepas ρ^- -s con XPM10b por 4 h en medio solido YPD y se incubaron por 3 h en 2 mL de YPD.

- El cultivo se diluyó 1:1000 en agua estéril y se plaqueó en un medio selectivo donde sólo puede crecer la cepa receptora XPM10b y las células diploides.
- Se incubaron las cajas por 2 días a 30°C.
- Replicamos las cajas en medio selectivo para las cepas ρ^- para descartar las células diploides que se formaron. Seleccionamos las cepas ρ^+ con las mutaciones puntuales de *cox1* con un medio respiratorio YPEG.
- Repetimos todos los pasos de selección hasta obtener cepas ρ^+ estables.

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

Se incubó 2 ml de cultivo a 30°C por toda la noche, al día siguiente centrifugamos entre 0.35-1 mL de cultivo y eliminamos el sobrenadante. Posteriormente se agregaron 52 μ L de la mezcla de transformación (40 μ L de PEG 3350 al 50 %, 5 μ L acetato de litio 2 M, 5 μ L de DTT 2 M y 2.5 μ L de DNA de espermatozoos de salmón desnaturalizado). A la mezcla anterior se le agregó el DNA deseado (0.1-1 μ g) y se incubó a 30°C por 15 min y después a 42°C por 30 min. Al terminar retiramos la mezcla de transformación e incubamos las células en 1 mL de YPD por 3 h a 30°C. Recuperamos el botón celular por centrifugación y seleccionamos las transformantes positivas en el medio selectivo requerido, incubando las células a 30°C por 2 o 3 días.

Determinación de proteínas por Lowry modificado Markwell et al., 1978).

La curva de calibración se realizó con una solución de albúmina a 1 mg/mL. De esta tomamos 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 μ l. Diluimos las muestras problema 1:5 y tomamos 10 μ l para la determinación de proteína. Posteriormente seguimos los siguientes pasos para todas las muestras:

- Ajustamos la muestra con agua a 1 mL.
- Adicionamos 3 mL de solución C e incubamos por 10 min a TA.
- Adicionamos 300 μ l de solución D e incubamos por 30 min a TA.

- Medimos la absorbancia a 740 nm.

Solución A

Na ₂ CO ₃	2%
NaOH	0.4%
Tartrato de sodio	0.16%
SDS	1%

Solución B

Cu ₂ SO ₄ ·5H ₂ O	4%
--	----

Solución C

Mezclar 100 volúmenes de solución A con 1 volumen de solución B (preparar al momento)

Solución D

Reactivo de Folin diluido al 50% con agua estéril.

Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE, Laemmli, 1970).

Las muestras para el SDS-PAGE se resuspendieron en el amortiguador de muestra y se calentaron por 5 minutos a 65°C. La electroforesis se inició a 100 V hasta que la muestra entró al gel separador, posteriormente se aumentó el voltaje a 130 V hasta que el colorante salió del gel

Amortiguador de muestra 2X

SDS	4 %
Glicerol	20 %
Azul de bromofenol	0.2 %
β-Mercaptoetanol	2 %
Tris pH 6.8	0.1 M

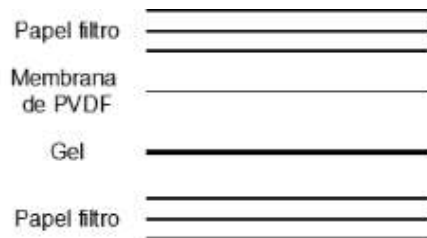
Amortiguador de corrida

Tris	25 mM
Glicina	250 mM
SDS	0.1%

Soluciones	Gel separador 16%	Gel apilador 5%
Acrilamida 30%/ Bisacrilamida 0.3%	9 mL	0.83 mL
Tris 2 M pH 8.8	3.28 mL	-
Tris 2 M pH 6.8	-	150 mL
SDS 20%	84 mL	25 mL
H ₂ O	4.5 mL	4 mL
APS 10%	100 µL	50 µL
TEMED	10 µL	5 µL

Western blot.

Las proteínas separadas por SDS-PAGE, BN-PAGE o 2D-PAGE se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore) mediante un método semi-seco usando la cámara de transferencia de FischerBiotech. La transferencia se realizó acomodando el gel y la membrana de PDF como se muestra a continuación.



Todos los componentes se humedecieron con el amortiguador de transferencia (Tris 25 mM, glicina 250 mM, SDS 0.1%, metanol 20%). Se transfirió el gel entre 1 o 2 hrs a 1.5 mA/cm^2 , cuidando que no pase de 10 V. Posteriormente, se siguieron los siguientes pasos para la incubación de los anticuerpos.

- Se dejó secar la membrana con las proteínas para bloquearla.
- Se incubó por una hora a temperatura ambiente la membrana con la solución de blot usando el anticuerpo deseado.
- Se lavó la membrana con solución de lavado por 10 minutos. Se repitió el lavado de la membrana dos veces más.
- Se incubó la membrana por una hora a temperatura ambiente con la solución de blot con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa.
- Se lavó la membrana con solución de lavado por 10 minutos. Se repitió el lavado de la membrana dos veces más.
- Se reveló por quimioluminiscencia la presencia del anticuerpo siguiendo las indicaciones del Kit Pierce ECL Western blot (Pierce) o con el kit Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore)
- La quimioluminiscencia se detectó con la película BioMAX XAR Film (Kodak) exponiendo durante 1 min inicialmente y posteriormente se ajustó el tiempo de exposición.

- Se eliminó el anticuerpo unido a las proteínas de la membrana incubando con la solución de eliminación de anticuerpo por 30 minutos a 50 °C
- Repetimos todos los pasos con cada anticuerpo que se incubó con la membrana.

Anticuerpo	Dilución	Marca/Donación
α -Cox1	1:40,000	Rodolfo García Villegas
α -Cox2	1:2,000	Mitosciences
α -Cox3	1:2,000	Mitosciences
α -HA	1:10,000	Roche
α -Myc	1:500	Roche
α -Coa3	1:5,000	Antonio Barrientos
α -CS	1:2,000	Thomas D. Fox
α -ATPasa	1:30,000	Diego González Halphen
α -Cytb	1:5,000	Aldo E. García Guerrero
α -Cyt1	1:5,000	Rosemary Stuart
α -Rip1	1:10,000	Rosemary Stuart
α -Cor1	1:10,000	Rosemary Stuart

Solución de eliminación (50 mL)

Tris 1 M pH 6.8	3.12 mL
SDS 10%	10 mL
β -Mercaptoetanol	350 μ L

Solución de lavado (1 L)

Tris 1 M pH 7.6	10 mL
NaCl 5M	20 mL
EDTA 0.5 M	2 mL
Tween-20	1 mL

Solución de blot (10 mL)

Tomamos 10 mL de la solución de lavado y agregamos el anticuerpo deseado. Adicionalmente, añadimos 180 μ L de Tween-20.

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

- Incubamos un cultivo de 5 mL de medio YPGal a 30°C hasta saturación.
- Inoculamos 500 mL del medio YPGal con 5 mL del pre-cultivo e incubamos hasta fase exponencial.
- Centrifugamos las células a 2,850 RCF por 10 min. a 4°C.
- Lavamos el botón celular con agua fría desionizada

- Centrifugamos las células a 2,850 RCF por 10 min. a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y pesamos el botón celular.
- Resuspendimos el botón celular en el amortiguador TD (2 mL por gr de peso húmedo).
- Agitamos 10 min. a 30°C a 250 rpm.
- Centrifugamos las células a 1,950 RCF por 5 min a 4°C.
- Lavamos el botón celular con el amortiguador MPZ sin zimoliasa (7 mL por gr de peso húmedo).
- Centrifugamos a 1,950 RCF por 5 min a 4°C.
- Resuspendimos el botón celular con el amortiguador MPZ con zimoliasa-20T (7 mL por gr de peso húmedo).
- Se agitaron las células por 60 minutos a 30°C a 250 rpm.

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

- Centrifugamos a 1,100 RCF por 5 min a 4°C.
- Resuspendimos el botón celular en 40 mL de amortiguador Dounce.
- Homogenizamos 10 veces con el homogenizador y el pistilo de vidrio.
- Centrifugamos a 1,950 RCF por 5 min a 4°C y recuperamos el sobrenadante.
- Repetimos una vez más el paso anterior
- Centrifugamos el sobrenadante a 17,450 RCF por 12 min a 4°C para recuperar las mitocondrias crudas en el botón.
- Resuspendimos el botón mitocondrial en 10 mL de amortiguador SH, primero se resuspendió un volumen pequeño con la punta de la micropipeta.
- Centrifugamos a 1,950 RFC por 5 min a 4°C y recuperamos el sobrenadante.
- Repetimos el paso anterior dos veces más.
- Centrifugamos a 17,450 por 12 min a 4°C.

- Resuspendimos el botón de mitocondrias crudas en 300 μ L de amortiguador SH (con la punta de la micropipeta).

Amortiguador SH

HEPES pH 7.4	20 mM
Sorbitol	0.6M

Amortiguador TD

Tris-SO4 pH 9.4	0.1 M
DTT	10 mM

Amortiguador MPZ

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

Amortiguador Dounce

Tris pH 7.4	10 mM
EDTA	1 mM
BSA (libre de ácidos grasos)	0.2 %
PMSF (se preparó en etanol al momento)	1 mM
TLCK	50 μ g/mL
Sorbitol	0.6M

Traducción *in vivo* de proteínas mitocondriales a partir de células completas (Modificado de Bonnefoy et al., 2001).

- Se incubaron 2 o 3 colonias de células en 2mL de YPGal a 30°C hasta saturación.
- En 10 mL de YPGal diluimos 1:20 (cepas pet⁻) o 1:10 (cepas pet⁺) el cultivo saturado e incubamos a 30°C por 4 h.
- Recuperamos el botón de celular y se resuspendió en 0.5 mL de medio –Met.
- Incubamos 10 min a 30°C con agitación.
- Adicionamos 5 μ L de cicloheximida para inhibir la traducción citósolica (10 mg/mL, disuelta en etanol al 100%) e incubamos por 5 min a 30°C con agitación.
- Adicionamos 5 μ Ci de S³⁵-Metionina e incubamos por 30 min a 30°C con agitación.

- Centrifugamos a 15,690 RFC por 1 min. a 4°C y eliminamos el sobrenadante.
- Resuspendimos el botón celular en 200 µL de amortiguador SHP frío, con inhibidor de proteasas de Sigma (3.3 µL/10 mL)
- Se adicionó un volumen de perlas de vidrio, previamente enfriadas a -20°C.
- Agitamos 30 segundos en vortex a velocidad máxima e incubamos a 30 segundos en hielo.
- Repetimos dos veces el paso anterior.
- Centrifugamos a 600 g por 5 min. a 4°C.
- Recuperamos el sobrenadante y centrifugamos a 15,690 RFC por 10 min. a 4°C.
- Eliminamos el sobrenadante y adicionamos 20 µL de amortiguador de carga 1X.
- Calentamos las muestras a 65°C por 5 min.
- Se separó 5 µL de muestra en un gel SDS-PAGE al 16%, el resto lo guardamos a -70°C. La electroforesis se realizó a 27 mA constantes hasta que el colorante llegó a 7 cm de la interfase del gel.
- Secamos el gel por 1 hora a 55°C o transferimos a una membrana de PVDF (Millipore).
- Se dejó exponiendo el gel seco o la membrana de PVDF seca a la pantalla de fósforo por toda la noche.
- Escaneamos la emisión radioactiva de la pantalla de fósforo en el Typhoon 8600 Phosphoimager (Molecular Dynamics).

Coinmunoprecipitación de proteínas (Modificado de Shingú-Vázquez et al., 2010)

- Tomamos el volumen necesario para tener 500 µg de proteína mitocondrial. De este volumen tomar el 3% del total de proteína mitocondrial.

- Centrifugamos a 15,690 RCF a 4°C por 5 min para recuperar el botón de mitocondrias.
- Resuspendimos el botón mitocondrial en 500 µl de amortiguador de lisis con la punta de la micropipeta. Incubamos por 10 min en hielo.
- Centrifugamos por 10 min a 15,690 RCF y recuperamos el sobrenadante.
- Agregamos al sobrenadante 40 µl de perlas de proteína A sefarosa (Roche) preparadas y 3.5 µl de anti-HA de rata de alta afinidad (Roche).
- Incubamos a 4°C por dos horas en agitación.
- Centrifugamos a 600 RCF a 4°C por 1 min y desechemos el sobrenadante.
- Lavamos las perlas con 500 µl de amortiguador de lisis y centrifugamos a 600 RCF a 4°C por 1 min
- Lavamos las perlas con 1 mL de Tris pH 7.4 20 mM y centrifugamos a 15,690 RCF a 4°C por 1 min. En este paso se eliminó todo el sobrenadante con una microjeringa.
- Agregamos 15 µl de amortiguador de muestra de SDS-PAGE e incubamos 5 min a 65°C.
- Cargamos la muestra con una microjeringa en un gel de SDS-PAGE al 16% y corrimos el gel hasta que el colorante llegó a 7 cm de la interfase del gel
- Transferimos el gel a una membrana PVDF por 90 min a 1.5 mA por cm² de membrana.

Preparación de las perlas de A sefarosa.

- Pesamos aproximadamente 100 mg de las perlas de proteína A sefarosa (Roche).
- Lavamos con 1 mL de agua bidestilada estéril y centrifugamos a 600 RCF a 4°C por 1 min.
- Repetimos el paso anterior paso cuatro veces más.

- Resuspendimos las perlas en 500 μ l de etanol al 20%.
- Las perlas se guardaron a 4°C.

Amortiguador de lisis

DDM	0.5%
NaCl	100 mM
Tris pH 7.4	20 mM

Electroforesis azul nativa (BN-PAGE, Wittig et al., 2006).

- Descongelamos las mitocondrias en hielo por 5 min.
- Resuspendimos 100 μ g de proteína mitocondrial en 180 μ l de amortiguador de lavado.
- Centrifugamos las mitocondrias a 15,690 RCF por 2 min para eliminar el sobrenadante.
- Homogenizamos completamente las mitocondrias en 45 μ l de amortiguador de muestra
- Se agregó 5 μ l de digitonina al 10 % y se incubó en hielo por 30 min.
- Centrifugamos la muestra por 12 min a 15,690 RCF a 4°C.
- Rescuperamos el sobrenadante (50 μ l aproximadamente) y agregamos 2 μ l de solución de coomassie al 5 % disuelto en amortiguador de muestra.
- Cargamos 20 μ l de muestra por carril (40 μ g) en un gel con gradiente del 5-12% o del 4-12%.
- Corrimos el gel 25 min a 15 mA con el amortiguador del cátodo al 0.02 % de coomassie (aproximadamente un tercio del gel).
- Cambioamos el amortiguador del cátodo por el de 0.002 % de coomassie y se dejó correr a 6 mA hasta que el colorante salió del gel.

- Transferimos el gel a una membrana de PVDF por 2 horas a 1.5 mA por cm² de membrana.
- Lavamos con metanol 100 % tres veces para eliminar el colorante.

Soluciones	Gel apilador 4 %	Gel separador 5 %	Gel separador 13 %
Acrilamida 48.5% Bisacrilamida 1.5%	125 µl	0.51 mL	1.34 mL
Amortiguador de gel 3X	0.5 mL	1.69 mL	1.69 mL
Glicerol (80%)	-	0.32 mL	1.28 mL
Agua	0.86 mL	2.5 mL	0.72 mL
APS 10%	8 µl	13.5 µl	13.5 µl
TEMED	2.25 µl	4.9 µl	4.9 µl
Volumen total	2.25 mL	9 mL	9 mL

Amortiguador de lavado

Sorbitol 250 mM
mM

Bis-tris 50 mM

Ajustar el pH a 7.0 con HCl

Amortiguador de muestra

Ácido aminocaproico 750

Bis-tris 50 mM

Ajustar el pH a 7.0 con Hcl

Amortiguador del gel 3X

Bis-tris 150 mM

Ácido aminocapróico 1.5 M

Ajustar el pH a 7.0 con HCl

Amortiguador de ánodo (inferior)

Bis-tris 50 mM

Ajustar el pH a 7.0 con HCl

Amortiguador del cátodo (superior)

Tricina 50 mM

Bis-tris 15 mM

azul de coomassie ServaG 0.02% ó 0.002%

Electroforesis de segunda dimensión (2D-PAGE, Wittig et al., 2006).

La electroforesis de segunda dimensión se realizó con un carril de la BN-PAGE que previamente se incubó por 30 min en amortiguador de eliminación. Posteriormente, se introducimos el carril de la BN-PAGE y se colocó en contacto directo con el gel desnaturizante. En este paso procuramos dejar libre de burbujas la interfase entre geles. La electroforesis se inició a 50 V, una vez que

la muestra entró al gel separador el voltaje se incrementó a 100 V. Al finalizar la corrida el gel se transfirió a una membrana de PVDF por 90 min a 1.5 mA por cm² de membrana.

Soluciones	Gel apilador 4%	Gel separador 12%
Acrilamida 48.5% Bisacrilamida 1.5%	0.25 µL	2.2 mL
Amortiguador de gel 3X	1 mL	3 mL
Glicerol (80%)	-	1.8 mL
Agua	1.75 mL	2 mL
APS 10%	20 µL	40 µL
TEMED	6 µL	6 µL
Volumen total	3 mL	9 mL

Amortiguador de eliminación (50 mL)

Tris 1 M pH 6.8 3.12 mL
 SDS 10% 10 mL
 β-Mercaptoetanol 350 µL
 Llevar a 50 mL con agua

Amortiguador de gel 3X

Tris 3 M
 SDS 0.3%
 Ajustar el pH a 8.45 con HCl

Amortiguador del cátodo

Tris 0.1 M
 Tricina 0.1 M
 SDS 0.1 %

Amortiguador del ánodo

Tris 0.2 M
 Ajustar el pH a 8.9 con HCl

Actividad en gel de la citocromo c oxidasa (Wittig et al., 2007).

La actividad de la CcO se reveló en los geles azules nativos, incubando el gel en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4 por 10 minutos. Después se desechó el amortiguador y añadimos amortiguador de fosfatos con diaminobencidina al 0.04% y citocromo c de corazón de caballo al 0.02%. El gel se incubó por dos horas. Posteriormente las proteínas se fijaron al gel con metanol al 50% y ácido acético al 10%. El exceso de coomassie se eliminó con ácido acético al 10% para visualizar mejor las bandas de actividad de la CcO.

Medición del consumo de oxígeno en mitocondrias de levadura.

Los cambios en el consumo de oxígeno se midieron en un oxímetro 782 (Warner/Strathkelvin Instruments) con un electrodo tipo Clark en un volumen de 1 mL a 30°C. Medimos el consumo de oxígeno por la cadena respiratoria con 250 µg de proteína mitocondrial usando etanol como sustrato. La medición del consumo de oxígeno en estado IV se realizó en un amortiguador con: Sorbitol 0.6 M, HEPES pH 7.4 20 mM, KCl 20 mM, MgCl₂ 2 mM. El estado III se midió con la adición de ADP 0.5 mM.

Medición espectrofotométrica de actividades enzimáticas (Spinazzi et al., 2012).

Estos experimentos los realizó Alfredo Cabrera Orefice como se describe a continuación.

La actividad de la CcO y el complejo III se determinó por los cambios en absorbancia de la reducción u oxidación del citocromo c, respectivamente, a 550 nm ($\epsilon_{550\text{nm}}=18.5 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) en un lector de microplacas SPECTRAMax PLUS384 (Molecular Devices) de acuerdo a Spinazzi, 2012. En breve, la actividad del complejo III se determinó en un amortiguador con: 25 mM de fosfato de potasio (pH 7.5), 75 mM de citocromo c oxidado de corazón de caballo, 0.1 mM EDTA, 1 mM de cianuro de sodio y 10 mg/mL de proteína mitocondrial. Iniciamos la reacción añadiendo 100 mM de decilubiquinol. La actividad de la CcO se midió en un amortiguador con: 25 mM de fosfato de potasio (pH 7) y 50 mM de citocromo c reducido de corazón de caballo. La reacción se inició al añadir 10 mg/mL de membranas mitocondriales. La actividad de la citrato sintasa se determinó a 412 nm ($\epsilon_{412\text{nm}}= 13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en un amortiguador con: 10 mM de Tris-HCl (pH 8), 0.3 mM de acetil-CoA, 0.1 mM de DNTB (ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico), 0.1 % Triton X-100 y 10 mg/mL de membranas mitocondriales. Iniciamos la reacción con la adición de 0.5 mM de oxalacetato (Barrientos, 2009).

Ensayos de sensibilidad a peróxido de hidrógeno (H₂O₂, Khalimonchuk et al., 2007).

Estos experimentos los realizó Yolanda Camacho Villasana como describo a continuación.

Se incubaron por toda la noche las células en YPD hasta fase exponencial a una $DO_{600nm} = 0.6$. Posteriormente, se añadió 3 mM de H₂O₂ a los cultivos (10 mg/mL de peso húmedo) e incubamos por 2 horas a 30 °C con agitación leve. Como control, incubamos células del mismo cultivo con agua. Finalmente, lavamos las células con agua estéril y realizamos diluciones seriales 1:10 para replicar en placas de YPD que incubamos por 2 días a 30 °C.

Ensayo de envejecimiento (Modificado de Murakami et al., 2008).

Estos experimentos los realicé en el laboratorio del Dr. Alexander de Luna con el apoyo de Sergio Campos como describo a continuación:

- Incubamos 5 mL de cultivo en medio SC por 2 días a 30°C.
- Inoculamos 50 mL de medio de envejecimiento con 100 µl del precultivo y dejamos crecer por 3 días a 30°C a 220 rpm. Verificamos que los matraces tuvieran una capacidad 5 veces mayor al volumen del cultivo.
- Tomamos 10 µl del cultivo envejecido y lo diluimos en 150 µl de medio de baja fluorescencia (YNB-LF). Las lecturas se hicieron en placas de 96 pozos y sólo se utilizaron los pozos centrales de la placa. Consideramos este día como el primero en el experimento de envejecimiento
- Tomamos la lectura inicial de DO_{600nm} y dejamos crecer a 30°C sin agitación hasta saturación. Antes de tomar las lecturas agitamos por 20 segundos.
- Tomamos lecturas a 600nm cada hora para obtener una curva de crecimiento de las cepas. La primera lectura se realizó después de 4 hrs.

- Repetimos todos los pasos anteriores por 8 días o hasta que la DO_{600nm} del cultivo no cambió durante las 13 hrs de mediciones.

Se usaron placas de 96 pozos de Poliestireno de Corning Incorporated. Número de catálogo: 3598

Determinación del número de células viables a lo largo del experimento (Murakami, 2008)

Las levaduras al envejecer mueren o se tornan inviables, por lo cual se reduce la población de células viables con el paso de los días. Durante cada día del experimento obtuvimos una curva de crecimiento, a partir de la cual calculamos el tiempo de duplicación, y el tiempo que le tomó al cultivo llegar a una $DO_{600nm} = 0.3$. Posteriormente, se calculó la diferencia de tiempo entre cada día consecutivo y el anterior para llegar a una $DO_{600nm} = 0.3$, entre más envejecen las células tardan más en alcanzar la DO fijada. Por lo tanto, el porcentaje de células viables de levadura a lo largo del tiempo puede calcularse con la siguiente fórmula:

$$S = 1/2^{(\Delta t_n / \delta)}$$

Donde:

Δt_n es la diferencia entre el tiempo que tarda el cultivo en alcanzar la OD de interpolación (0.3) con respecto al primer día.

δ es el tiempo de duplicación que obtenemos de la pendiente máxima del gráfico semilogaritmico de la curva de crecimiento de cada día.

Medios.

Todos los medios se esterilizaron por filtración, no hay que utilizar a autoclave.

Medio SC

Base nitrogenada sin aminoácidos	0.67 %
Dextrosa	2 %
Mezcla de aminoácidos	0.2 %

Medio de envejecimiento

Base nitrogenada sin aminoácidos	0.17 %
Dextrosa	2 %
CSM	790 mg/L

La mezcla de aminoácidos del manual de Cold Spring Harbor contiene 2 g de cada aminoácido, excepto de adenina 0.5 g y de Leucina 10 g. Además, contiene 2 g de Inositol, 2 g de Uracilo y 2 g de ácido *para*-aminobenzoico.

Medio de baja fluorescencia (YNB-FL)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5 %
KH_2PO_4	0.1 %
MgSO_4	0.05 %
NaCl	0.01 %
CaCl_2	0.01 %
Stock de elementos traza	1 mL
Stock de vitaminas	1 mL
CSM	690 mg/L
Dextrosa al 20%	100 mL

Si se requiere se puede utilizar un medio dropout en vez del CSM.

Solución de elementos traza 1000x

H ₃ BO ₄	50 mg
CuSO ₄	4 mg
KI	10 mg
FeCl ₃	20 mg
MnSO ₄	40 mg
Na ₂ MoO ₄	20 mg
ZnSO ₄	40 mg

Llevar a 100 mL con Milli-Q H₂O estéril. La solución será turbia, no hay que filtrarla. Guardar a 4°C

Solución de vitaminas 1000x

Biotina	0.2 mg
Pantonenato de Calcio	40 mg
Inositol	200 mg
Niacina	40 mg
Ácido <i>para</i> -aminobenzoico	20 mg
Piridoxina- HCl	40 mg
Tiamina-HCl	40 mg

Llevar a 100mL con Milli-Q H₂O estéril. Guardar a 4°C

Resultados

Identificación de los residuos en el extremo carboxilo terminal de Cox1 que regulan su síntesis.

Los últimos 15 residuos de Cox1 contienen aminoácidos conservados en hongos y mamíferos.

En un trabajo previo encontramos que al eliminar los últimos 11 o 15 residuos de Cox1 su síntesis era independiente del ensamblaje de la CcO, lo cual no sucedió con la eliminación de los últimos 5 residuos de Cox1. Estos datos sugieren que los residuos de Cox1 entre -5 y -11, VHSFNT, participan en la regulación de su síntesis (Shingú-Vázquez, 2010). Para encontrar los aminoácidos específicos que pudieran controlar la síntesis de Cox1, realizamos un alineamiento de la secuencia de Cox1 de *S. cerevisiae* con otras especies de hongos y de mamíferos, en particular se eligieron especies donde se reportaron ortólogos de los factores que participan en la regulación de la síntesis de Cox1 (ej. *S. pombe*, *H. sapiens*. (Kühl et al., 2012; Moyer and Wagner, 2014; Weraarpachai et al., 2012).

El alineamiento reveló que los aminoácidos P521, H525 y F525 se encuentran conservados en todas las especies analizadas. Mientras que la P522 y P530, sólo fueron diferentes en el hongo *S. pombe* (Figura 5A). Los residuos H525 y F527 fueron interesantes ya que se encuentran dentro de la región VHSFNT que proponemos regula la síntesis de Cox1, mientras que las P521 y P522 podrían mantener la estructura de la región VHSFNT ya que la prolina es un residuo que se caracteriza por restringir el movimiento de la cadena peptídica (Kay et al., 2000). La P530 es un residuo que se eliminó en la mutante que no tiene los últimos 5 residuos de Cox1, por lo cual, no esperábamos que tuviera algún efecto sobre la regulación de la síntesis de Cox1. Tomando en cuenta estos datos, decidimos mutar los aminoácidos P521, P522, H525, F527 y P530

por alanina, asimismo, decidimos mutar la V524 por ácido glutámico para probar si sólo los aminoácidos conservados eran importantes para la regulación de la síntesis de Cox1. Las mutantes puntuales de Cox1 se generaron como se describió en materiales y métodos.

Inicialmente, analizamos si las mutantes puntuales de Cox1 afectaron la estabilidad de la proteína. Para ello cuantificamos a Cox1, Cox2 y Cox3 por Western blot utilizando extractos mitocondriales de cada mutante de Cox1. Encontramos que todas las mutantes puntuales de Cox1 y la mutante Cox1 Δ C15 tienen niveles de proteína Cox1, Cox2 y Cox3 similares a la cepa silvestre (Figura 5B). En concordancia, observamos que todas las mutantes de Cox1 crecieron de forma similar a la cepa silvestre en un medio respiratorio con etanol y glicerol (Figura 5C). La determinación espectrofotométrica de la actividad de la CcO confirmó que las mutantes de Cox1 tenían una actividad similar a la cepa silvestre, con la excepción de la mutante Cox1 Δ C15 que únicamente mantuvo el 30% de actividad de la CcO (Figura 5D). Sin embargo, esta disminución no afectó el crecimiento de la mutante en un medio respiratorio con etanol y glicerol (Figura 5C). Asimismo, la actividad del complejo III fue similar en todas las mutantes de Cox1 y la cepa silvestre (Figura 5D). Nuestros resultados indican que las mutaciones puntuales en Cox1 no afectaron significativamente la función de la CcO, con excepción de la mutación Cox1 Δ C15.

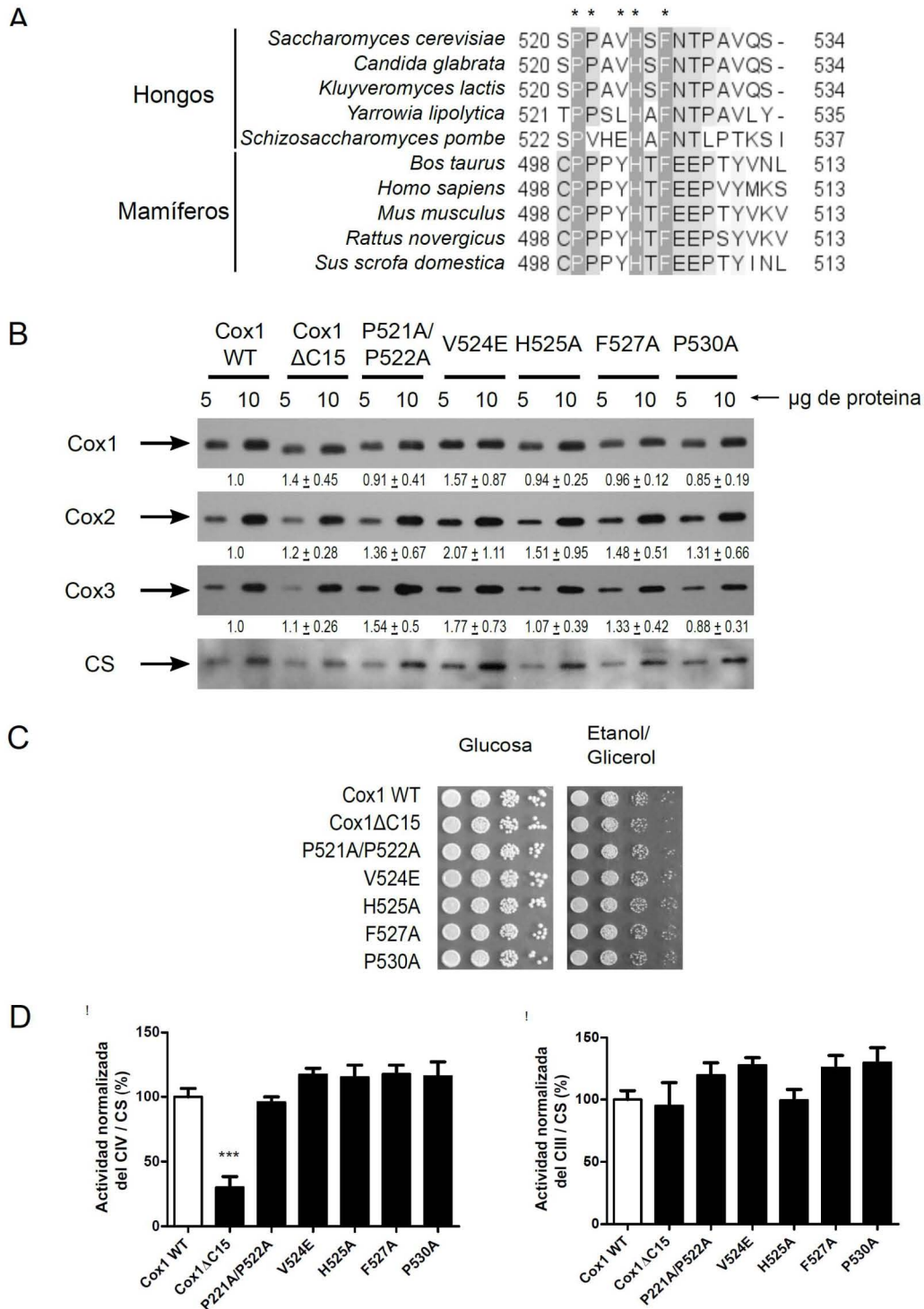


Figura 5. Las mutaciones puntuales en Cox1 no afectaron la función de la CcO. A) Alineamiento de Cox1 en diferentes especies (Jalview 2.8.0b1), sólo se muestra la región alineada con los últimos 15 residuos de Cox1. Los asteriscos indican los residuos mutados. B) Las proteínas mitocondriales de la cepa WT y de las mutantes de Cox1 se separaron por SDS-PAGE y se

transfirieron a una membrana de PVDF. Se muestra el Western blot contra las proteínas indicadas. CS=Citrato Sintasa. Los números debajo de las imágenes indican el promedio y el error estándar del análisis densitométrico de tres experimentos independientes. La señal de cada proteína se ajustó a la de la CS C) Diluciones seriales 1:10 de la cepa silvestre y las mutantes de Cox1. Se indica la fuente de carbono usada. D) Medición espectrofotométrica de la actividad del complejo III y de la CcO en las cepas indicadas. Los datos se normalizaron respecto a la actividad de la Citrato Sintasa. *** indica una diferencia significativa ($p < 0.0001$, $n=3$), determinada por un análisis de ANOVA de una vía y una comparación múltiple con la prueba de Dunett's. La estadística se realizó en el programa Prism 6.

Las mutantes Cox1-P521A/P522A y Cox1-V524E no regulan su síntesis.

La regulación de la síntesis de Cox1 esta acoplada al ensamblaje de la CcO (Mick, 2011), sin embargo, la mutante Cox1 Δ C15 es incapaz de regular su síntesis (Shingú-Vázquez et al., 2010). Para determinar si las mutaciones puntuales en Cox1 afectaron este proceso, realizamos un ensayo de traducción mitocondrial (*in vivo* translation) en cepas que no ensamblan la CcO (Figura 6). Este ensayo se realizó en células completas incubadas con cicloheximida para inhibir la traducción citosólica y en presencia de S³⁵-Metionina para marcar la proteínas recién sintetizadas en la mitocondria. Realizamos el experimento con dos mutantes de ensamblaje diferentes para verificar que los resultados fueran reproducibles en diferentes mutantes de ensamblaje de la CcO. Las proteínas que eliminamos fueron: el activador traduccional del mRNA de COX2 (Poutre and Fox, 1987), Pet111 (cepas *pet111* Δ) y la subunidad Cox4 (cepas *cox4* Δ) de la CcO (Maarse et al., 1984).

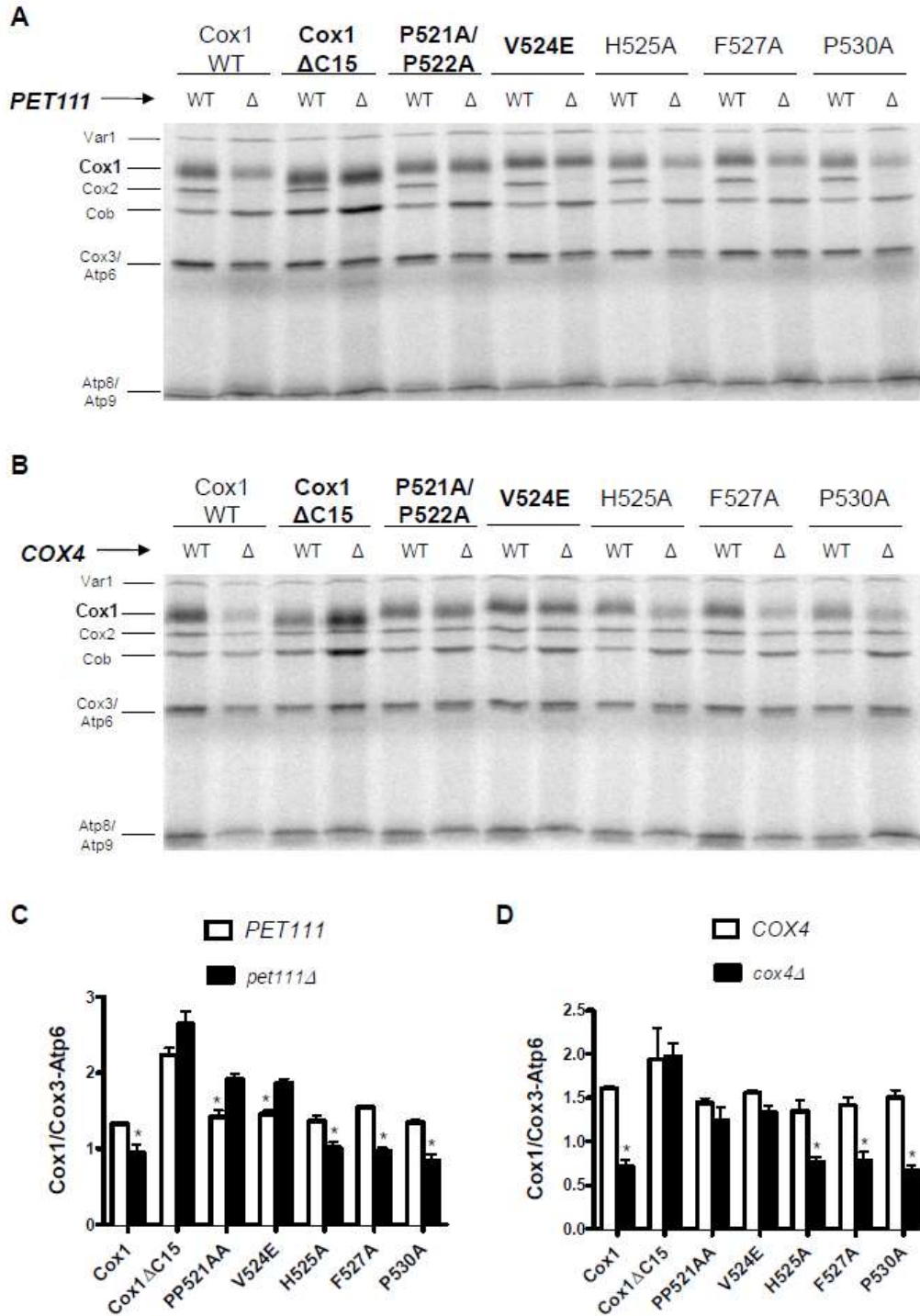


Figura 6. Las mutaciones puntuales Cox1-P521A/P522A y Cox1-V524E afectaron la regulación de su síntesis. Se indica la mutación correspondiente del C-terminal de Cox1. A) Experimento representativo del marcaje radiactivo de proteínas codificadas en la mitocondria de la cepa WT y de las mutantes de Cox1. WT indica la presencia del gen silvestre *PET111*. Δ indica la presencia

de la mutante *pet111Δ*. N = 3 experimentos independiente B) Mismo experimento que en A) pero en cepas sin Cox4. WT indica la presencia del gen silvestre COX4. Δ indica la presencia de la mutante *cox4Δ*. N = 3 experimentos independientes C) Análisis densitométrico de la señal de Cox1 de tres experimentos independientes. La señal de Cox1 se ajustó respecto a la de Cox3/Atp6. Las barras blancas representan a las cepas con el gen silvestre *PET111*, las barras negras representan a las mutantes *pet111Δ*. D) Mismo análisis que en C) pero en cepas *cox4Δ*. Las barras blancas representan a las cepas con el gen silvestre COX4, las barras negras representan a las mutantes nulas. Los asteriscos indican una diferencia significativa entre la señal de Cox1 de la mutante nula y la cepa silvestre.

Como esperábamos, la síntesis de Cox1 WT disminuyó en las mutantes *pet111Δ* y *cox4Δ*, mientras que la síntesis de Cox1ΔC15 fue normal en ambas mutantes de ensamblaje. De todas las mutantes puntuales de Cox1, observamos que la síntesis de Cox1-P521A/P522A y Cox1-V524E fue normal en las mutantes *pet111Δ* y *cox4Δ* (Figura 6A y 6B), lo cual indica que su síntesis no está regulada. Este resultado se corroboró realizando el experimento por triplicado y cuantificando la señal de Cox1 (Figura 6C y 6D). Nuestros datos indican que los aminoácidos P521, P522 y V524 de Cox1 son importantes para la regulación de su síntesis.

En las mutantes Cox1-P521A/P522A y Cox1-V524E se reduce la interacción de Mss51 con los complejos COA.

Para que la síntesis de Cox1 se regule negativamente es necesario que Mss51 interaccione con los complejos COA (Mick et al., 2011), en particular Cox14 es una chaperona necesaria para mantener a Mss51 asociada a estos complejos (Barrientos et al., 2004). En la mutante Cox1ΔC15 la interacción de Mss51 con Cox14 disminuye, lo que sugiere que Mss51 está libre para activar la traducción del mRNA de COX1 (Shingú-Vázquez et al., 2010). Para observar si ocurría lo mismo en las mutantes puntuales Cox1-P521A/P522A y Cox1-V524E, se analizó la interacción de Mss51 con los complejos COA por coimmunoprecipitación. En este experimento usamos cepas con epítopes HA y Myc en Mss51 y Cox14 respectivamente, ya que no contamos con anticuerpos

dirigidos contra estas proteínas. Anteriormente determinamos que los epítopes no afectan la capacidad respiratoria de las células (Shingú-Vázquez et al., 2010).

La interacción de Mss51-HA con los complejos COA se analizó inmunoprecipitando con un anticuerpo anti-HA y determinando por Western blot la presencia de las proteínas Cox1, Cox14-Myc y Coa3 que forman parte de los complejos COA (Figura 7A), adicionalmente, realizamos un análisis densitométrico de la señal de las proteínas inmunoprecipitadas (Tabla 2). Al inmunoprecipitar a Mss51-HA en cepas con Cox1 WT, se observó la interacción esperada con Cox14, así como con Cox1 y Coa3. En contraste, en la mutante Cox1 Δ C15 la interacción de Mss51-HA con Cox14-Myc disminuyó aproximadamente 10 veces (Shingú-Vázquez et al., 2010), al igual que la interacción con Cox1 y Coa3 (Tabla 2). En las mutantes Cox1-P521A/P522A y Cox1-V524E observamos que la interacción de Mss51-HA con Cox14-Myc y Coa3 disminuyó aproximadamente a la mitad, en cambio, no se detectó una disminución en la interacción con Cox1. En la mutante Cox1-H525A, que si regula su síntesis, observamos interacciones similares a las que ocurren en la cepa con Cox1 WT (Figura 7A, Tabla 2).

Para confirmar los resultados, inmunoprecipitamos a Cox14-Myc y se determinó por Western blot la presencia de Mss51-HA, Cox1 y Coa3. En este caso, observamos que la interacción de Cox14-Myc con Mss51-HA, Cox1 y Coa3 disminuyó aproximadamente cinco veces en presencia de Cox1 Δ C15 y aproximadamente tres veces en las cepas con Cox1-P521A/P522A y Cox1-V524E para la interacción de Cox14-Myc con Mss51-HA y Coa3, sin embargo, no detectamos una disminución en la interacción de Cox14-Myc con Cox1. Asimismo, en la mutante Cox1-H525A las interacciones entre Cox14-Myc, Mss51, Cox1 y Coa3 fueron similares a las observadas en la cepa silvestre (Figure 7B, Tabla 2).

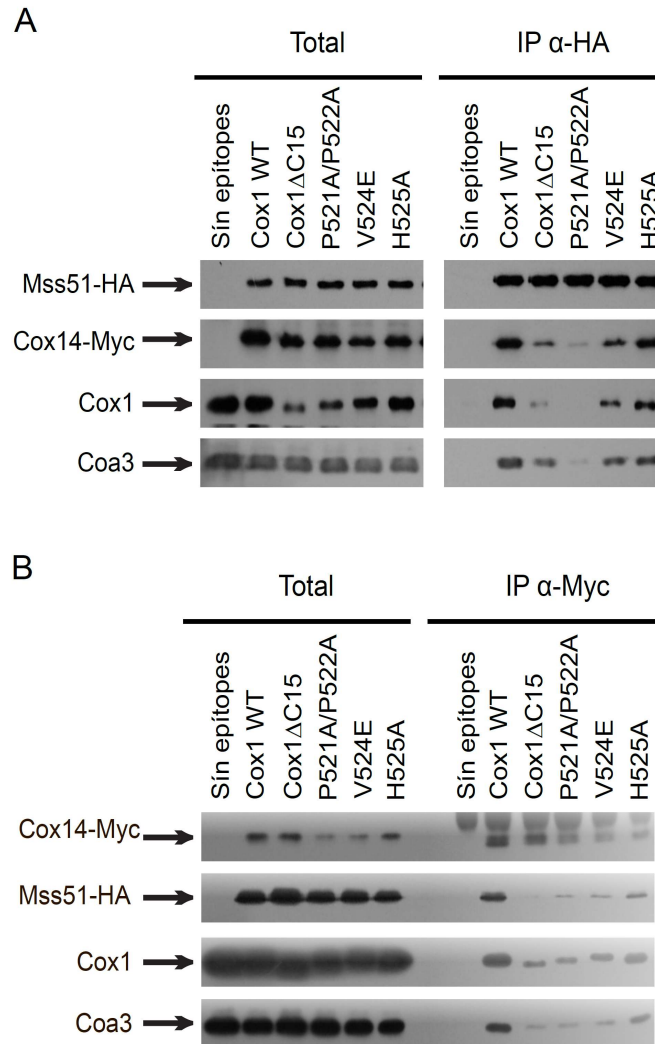


Figura 7. En las mutantes puntuales Cox1-P521A/P522A y Cox1-V524E disminuyó la interacción de Mss51 con proteínas de los complejos COA. A) Inmunoprecitación de Mss51-HA y análisis por Western blot de las proteínas indicadas. Experimento representativo de tres repeticiones independientes B) Inmunoprecitación de Cox14-Myc y análisis por Western blot de las proteínas indicadas en la figura. Experimento representativo de dos experimentos independientes. Sin epitopes: control negativo de inmunoprecitación. Total: indica el 3% de la cantidad de proteína mitocondrial usada en el experimento. IP: indica la fracción inmunoprecipitada con anticuerpos anti-HA o anti-Myc.

Nuestros datos indican que la interacción de Mss51 con los complejos COA disminuyó en las mutantes puntuales Cox1-P521A/P522A y Cox1-V524E, aunque en menor medida que en la mutante Cox1ΔC15.

Tabla 2. Análisis densitométrico de la fracción inmunoprecipitada de Mss51-HA y Cox14-Myc.

Inmunoprecipitación Mss51-HA					
	Cox1 WT	Cox1ΔC15	P521A/P522A	V524E	H525A
Cox14-Myc	1.0	0.055 \pm 0.007*	0.38 \pm 0.12	0.51 \pm 0.3	0.99 \pm 0.33
Coa3	1.0	0.11 \pm 0.08*	0.63 \pm 0.24	0.66 \pm 0.21	0.74 \pm 0.08
Cox1	1.0	0.085 \pm 0.058*	0.41 \pm 0.18	0.72 \pm 0.23	0.69 \pm 0.32
Inmunoprecipitación Cox14-Myc					
	Cox1 WT	Cox1ΔC15	P521A/P522A	V524E	H525A
Mss51-HA	1.0	0.017 \pm 0.015*	0.28 \pm 0.06*	0.28 \pm 0.07*	0.95 \pm 0.03
Coa3	1.0	0.11 \pm 0.018*	0.17 \pm 0.007*	0.37 \pm 0.11*	1.27 \pm 0.073
Cox1	1.0	0.21 \pm 0.086*	0.36 \pm 0.004	0.42 \pm 0.15	0.96 \pm 0.19

Se indica la fracción respecto a la cepa Cox1 WT. La señal de las proteínas se ajustó con la cantidad de proteína Mss51-HA o Cox14-Myc inmunoprecipitada, según sea el caso. \pm : indica el error estándar de tres experimentos independientes para la Mss51-HA y de dos experimentos independientes para Cox14-Myc. * indica una diferencia significativa ($p < 0.05$), determinada por un análisis de ANOVA de una vía y una comparación múltiple con la prueba de Dunett's. La estadística se realizó en el programa Prism 6.

La forma traduccionalmente activa de Mss51 se incrementó en las mutantes Cox1 Δ C15, Cox1-P521A/P522A y Cox1-V524E.

Nuestros resultados sugieren que en las mutantes puntuales Cox1-P521A/P522A y Cox1-V524E hay mayor cantidad de Mss51 libre para activar la síntesis de Cox1 que en una cepa con Cox1 WT. Para comprobar nuestra hipótesis decidimos separar los diferentes complejos en los que se encuentra Mss51 por geles azules nativos (Figura 8). Mss51 está presente en al menos tres complejos, dos de ellos son de aproximadamente 200-450 KDa y corresponden a los complejos COA que secuestran y reprimen la función de activador traduccional de Mss51. En el complejo de menor peso molecular Cox1 está ausente y se propone que corresponde a la forma traduccionalmente activa (TA) de Mss51 (Fontanesi et al., 2010; Khalimonchuk et al., 2010; Mayorga et al., 2016; Mick et al., 2010).

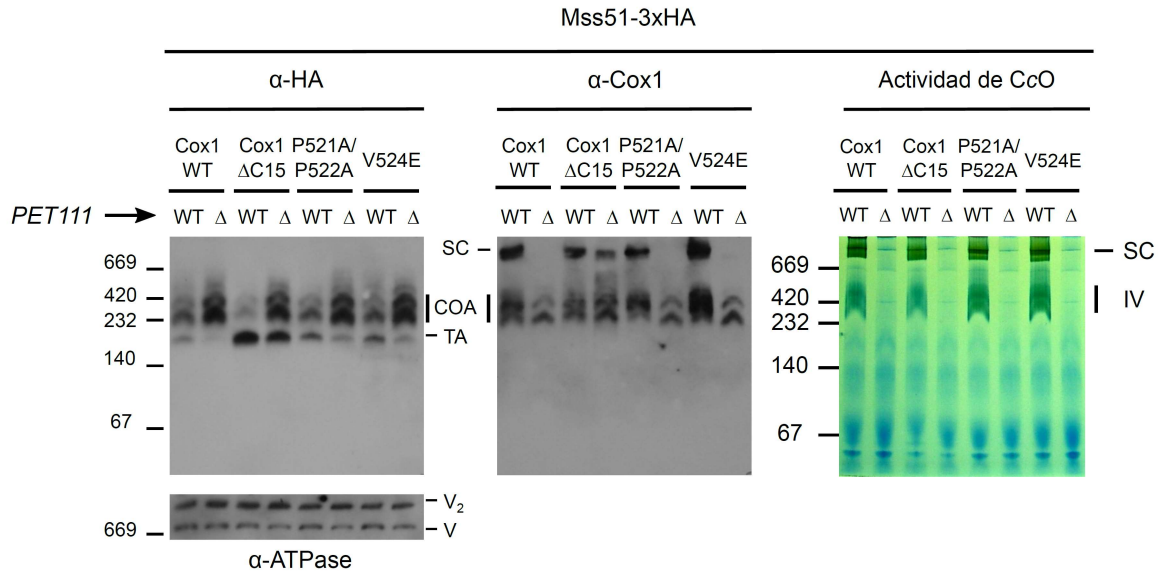
Para detectar los complejos de Mss51, solubilizamos mitocondrias con 1% de digitonina y separamos los complejos solubilizados por BN-PAGE. Posteriormente fueron analizados por Western blot (Figura 8). En mitocondrias con Cox1 WT, detectamos a Mss51-HA mayoritariamente en los tres complejos previamente reportados (Fontanesi et al., 2010; Khalimonchuk et al., 2010; Mayorga et al., 2016; Mick et al., 2010). En los dos complejos de mayor peso molecular detectamos a Cox1 que corresponden a los complejos COA. En el complejo de menor peso molecular (180 KDa) sólo detectamos a Mss51-HA y corresponde a la forma TA de Mss51. Como esperábamos, el patrón de los complejos de Mss51-HA en las mutantes puntuales Cox1-H525A, Cox1-F527A y Cox1-P530A es similar al de la cepa silvestre. Esto debido a que en esas mutantes no se afectó el mecanismo de regulación de la síntesis de Cox1. En cambio, en las mutantes Cox1 Δ C15, Cox1-P521A/P522A y Cox1-V524E detectamos un aumento en la forma TA de Mss51 en comparación con la cepa con Cox1 WT. Sin embargo, sólo en la mutante Cox1 Δ C15 detectamos una disminución evidente de Mss51-HA en los complejos COA (Figura 8A).

Cuando utilizamos el anticuerpo contra Cox1, detectamos a la proteína en los complejos COA. También, observamos a Cox1 en bandas de alto peso molecular que corresponden a los supercomplejos (Cruciat, 2000; Schagger and Pfeiffer, 2000). Para comprobarlo, separamos a los supercomplejos III₂/IV y III₂/IV₂ en un gel nativo del 4-12% y realizamos una tinción en gel de la actividad de la CcO. Notamos que en la mutante Cox1 Δ C15, la cantidad de supercomplejo III₂/IV₂ disminuyó ligeramente, mientras que el supercomplejo III₂/IV se enriqueció tanto en el Western blot como en la actividad en gel de la CcO (Figura 8B). Esto sugiere que la formación o estabilidad del supercomplejo III₂/IV₂ se afecta cuando no se encuentra el extremo C-terminal de Cox1, pero se requieren más estudios para confirmarlo.

gel de la CcO se determinó con citocromo *c* de corazón de caballo y DAB. La ATPasa se usó como control de carga. Los números indican la migración del marcador de alto peso molecular (GE Healthcare). SC= supercomplejos. TA= Forma traduccionalmente activa de Mss51. V y V₂= Monómero y dímero de la ATPasa respectivamente. Experimento representativo de 3 repeticiones independientes.

En las mutantes Cox1 Δ C15, Cox1-P521A/P522A y Cox1-V524E detectamos mayor cantidad de la forma TA de Mss51 (Figura 8A), en concordancia, encontramos que estas mutantes no regulan la síntesis de Cox1 (Figura 6). Para probar si se acumulaba la forma TA de Mss51 cuando no se ensambla la CcO, separamos los complejos de Mss51 por BN-PAGE en mutantes *pet111* Δ , que no sintetizan a la subunidad Cox2. (Figura 9). De acuerdo al modelo de acción de Mss51 sobre la síntesis de Cox1 (Figura 4, (Fontanesi et al., 2010; Khalimonchuk et al., 2010; Mayorga et al., 2016; Shingú-Vázquez et al., 2010), en la cepa con Cox1 WT observamos que en la mutante *pet111* Δ , se enriqueció la fracción de Mss51 presente en los complejos COA, mientras que la forma TA de Mss51 prácticamente desapareció. De hecho, en todas las mutantes *pet111* Δ detectamos un incremento de la señal de Mss51-HA en los complejos COA. Sin embargo, la señal de la forma TA de Mss51 incrementó en las mutantes Cox1 Δ C15, Cox1-P521A/P522A y Cox1-V524E en comparación con la cepa con Cox1 WT (Figura 9A, panel α -HA). Asimismo, la cantidad de la forma TA de Mss51 fue mayor en la mutante Cox1 Δ C15 que en las mutantes puntuales Cox1-P521A/P522A y Cox1-V524E. Nuestros datos sugieren que se requiere una pequeña cantidad de Mss51 en su forma TA para sostener una síntesis normal de Cox1.

A



B

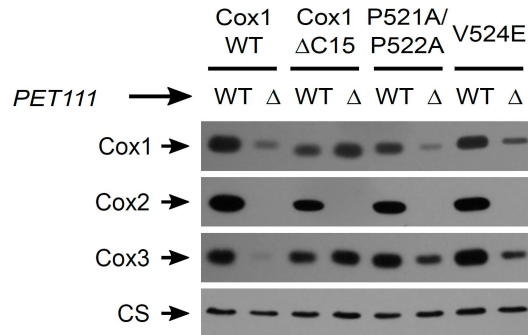


Figura 9. La interacción de Mss51 con los complejos COA disminuyó aunque no se ensamble la CcO. A) BN-PAGE (5-13%) de mitocondrias solubilizadas con digitonina de la cepa Cox1 WT y las mutantes indicadas. Se determinó la actividad en gel de la CcO como en la figura 8B. WT: indica la presencia del gen silvestre *PET111*. Δ: indica la presencia de la mutante *pet111Δ*. La ATPasa se usó como control de carga. Los números indican la migración del marcador de alto peso molecular (GE Healthcare). SC= supercomplejos. TA= Forma traduccionalmente activa de Mss51. V y V₂= Monómero y dímero de la ATPasa respectivamente. B) Gel desnaturizante con las mismas muestras que en A, posteriormente detectamos por Western blot las proteínas indicadas. La CS funciona como nuestro control de carga. CS= Citrato sintasa.

Análisis del ensamblaje de la citocromo c oxidasa en las mutantes de Cox1 que no regulan su síntesis.

En la mutante Cox1 Δ C15 se forman supercomplejos aunque la CcO no se ensamble.

Como se describió en la sección anterior, en las mutantes *pet111 Δ* la proteína Mss51 se enriqueció en su forma asociada a los complejos COA, sin embargo, en la mutante Cox1 Δ C15 aún se detectó una fracción considerable de Mss51 en su forma TA. Cuando las membranas de este experimento se incubaron con un anticuerpo anti-Cox1 encontramos un dato inesperado; en la mutante *pet111 Δ* con Cox1 Δ C15 observamos una banda de alto peso molecular de un tamaño similar a los supercomplejos. En contraste, en una mutante *pet111 Δ* con Cox1 WT no detectamos bandas de alto peso molecular, (Figura 9A. (Cruciat et al., 2000; Mick et al., 2010). Asimismo, en las mutantes *pet111 Δ* con Cox1-P521A/P522A y Cox1-V524E tampoco detectamos bandas de alto peso molecular (cabe mencionar que en ocasiones detectamos una pequeña señal de Cox1 a la altura de los supercomplejos en la mutante Cox1-V524E, pero se requieren más experimentos para verificar la reproducibilidad del dato).

Para verificar que la presencia de bandas de alto peso molecular en la mutante *pet111 Δ* con Cox1 Δ C15 no eran algún tipo de contaminación con cepas WT, realizamos un ensayo de actividad en gel de la CcO y comprobamos que ninguna mutante *pet111 Δ* presentaba actividad (Figure 9A, panel actividad CcO).

La detección de los complejos de alto peso molecular en la mutante Cox1 Δ C15 podrían relacionarse a una mayor estabilidad de la proteína Cox1. Para probarlo, analizamos por SDS-PAGE y Western blot el estado estacionario de las subunidades codificadas en la mitocondria de la CcO (Figura 9B), adicionalmente, realizamos un análisis densitométrico de la cantidad de proteína detectada. Como esperábamos, la cantidad de Cox1 WT disminuyó significativamente en la mutantes *pet111 Δ* respecto a la cepa *PET111* (Barrientos et al., 2004), lo mismo ocurrió con la cantidad de las proteínas Cox1-

P521A/P522A y Cox1-V524E (Figura 9B, Tabla 3). También observamos una disminución de la proteína Cox1 Δ C15 en la mutante *pet111* Δ respecto a la cepa *PET111*, pero no fue un cambio significativo (Tabla 3). Llama la atención que los niveles de Cox3 también aumentaron en la mutante *pet111* Δ con Cox1 Δ C15 y en menor medida en las mutantes *pet111* Δ con Cox1-P521A/P522A respecto a las cepas *PET111* (Figura 9B, Tabla 3).

Tabla 3. Análisis densotimétrico de las mutantes *pet111* Δ .

	Cox1		Cox1 Δ C15		P521A/P522A		V524E	
	WT	Δ	WT	Δ	WT	Δ	WT	Δ
<i>PET111</i>								
Cox1	1.0	0.109* \pm 0.068	0.901 \pm 0.41	0.31 \pm 0.21	0.703 \pm 0.031	0.167* \pm 0.155	0.92 \pm 0.12	0.23* \pm 0.019
Cox2	1.0	-	1.095 \pm 0.37	-	1.47 \pm 0.95	-	1.54 \pm 0.83	-
Cox3	1.0	0.147* \pm 0.092	1.17 \pm 0.25	0.548 \pm 0.31	1.08 \pm 0.37	0.612 \pm 0.429	1.38 \pm 0.45	0.28* \pm 0.123

Se indica la fracción respecto a la cepa Cox1 WT. La señal de las proteínas se ajustó con la señal de la citrato sintasa. \pm : indica el error estándar de dos experimentos independientes para la Mss51-HA y de dos experimentos independientes para Cox14-Myc. * indica una diferencia significativa ($p < 0.05$), determinada por un análisis de “*t* de student” de dos vías entre las cepas *PET111* y *pet111* Δ . La estadística se realizó en el programa Prism 6.

Nuestros datos sugieren que el extremo carboxilo terminal de Cox1 tiene una función importante en el control de la cantidad de proteína de Cox1 en la mitocondria y en la formación/estabilidad de los supercomplejos. Los supercomplejos que observamos en mutantes de ensamblaje de la CcO no son funcionales, por lo que a partir de este momento los llamaremos “supercomplejos aberrantes” o SC aberrantes.

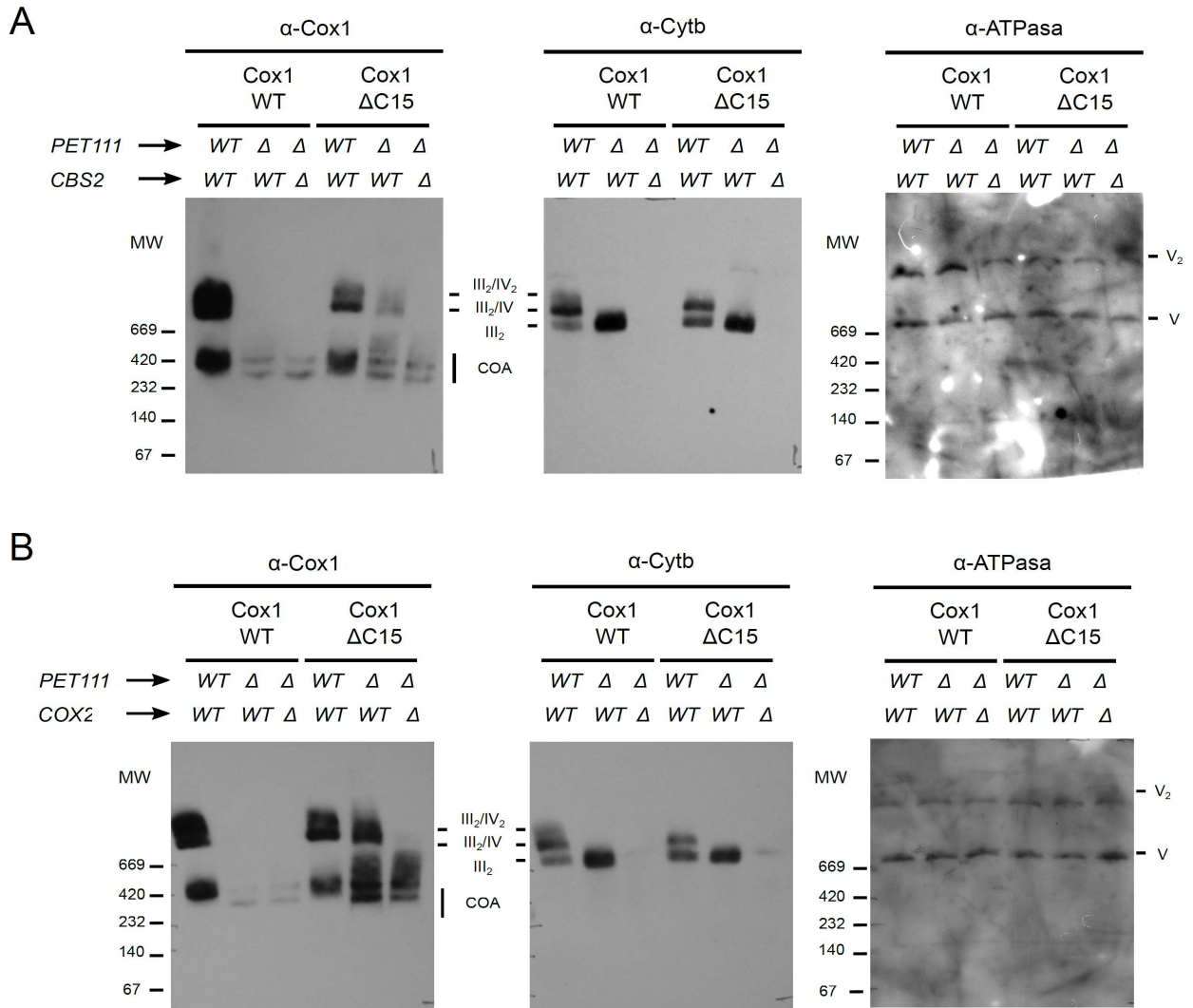


Figura 10. El complejo III favorece la formación/estabilidad de los SC aberrantes en la mutante Cox1 Δ C15. A) y B) Análisis por western blot de los complejos separados por geles azules nativos (4-12%) de los complejos mitocondriales solubilizados con digitonina de la cepa WT y las mutantes indicadas en la figura. La ATPasa se usó como control de carga. Los números indican la migración del marcador de peso molecular (GE Healthcare). V y V₂= Monómero y dímero de la ATPasa respectivamente. III₂= dímero del complejo III. III₂/IV= dímero complejo III con un monómero de la CcO. III₂/IV₂= dímero complejo III con dos monómeros de la CcO. IV= CcO. N = tres repeticiones independientes.

Nos preguntamos si la presencia de los SC aberrantes dependía del complejo III para comprobarlo, se inhibió el ensamblaje del complejo III eliminando a Cbs2,

uno de los activadores traduccionales del mRNA de *COB* (Rodel, 1986). Posteriormente, mediante BN-PAGE y Western blot se buscó la presencia de SC aberrantes en la mutante *pet111Δ* y en la doble mutante *pet111Δ/cbs2Δ* con Cox1 WT o Cox1ΔC15 (Figura 10). En la cepa con Cox1 WT el anticuerpo anti-Cytb detectó a los supercomplejos III₂/IV y III₂/IV₂, los cuales no se observaron en la mutante *pet111Δ* donde sólo detectamos la banda que corresponde al dímero del complejo III. En la doble mutante *pet111Δ/cbs2Δ* no detectamos ninguna señal (Figure 10A, panel α-Cytb) porque Cytb no se sintetizó. En la mutante *pet111Δ* con Cox1ΔC15 detectamos los SC aberrantes con el anticuerpo anti-Cox1, los cuales no fueron detectados en la doble mutante *pet111Δ/cbs2Δ* (Figura 10A, panel α-Cox1). Resultados similares se obtuvieron con la mutante *cox2Δ*, demostrando que la presencia de los SC aberrantes se debe a la ausencia de Cox2 y no a un efecto específico de la mutante *pet111Δ* (Figura 10B).

Para analizar la composición de los SC aberrantes realizamos una segunda dimensión SDS-PAGE con tricina de los complejos separados en la BN-PAGE, y los analizamos por Western blot (Figura 11). En particular, buscamos a la proteína Rcf1, una de las chaperonas que participan en el ensamblaje de los supercomplejos (Chen et al., 2012; Strogolova et al., 2012a; Vukotic et al., 2011). Para detectar a Rcf1, transformamos las levaduras con un plásmido con Rcf1-His-HA (Chen et al., 2012).

En la cepa con Cox1 WT (Figura 11A) detectamos una clara comigración de las subunidades Cox1, Cox2 y Cox3 de la CcO, de las subunidades Cytb, Cyc1, Cor1 y Rip1 del complejo III y de Rcf1-His-HA en los supercomplejos. En la mutante *cox2-62* con Cox1ΔC15 (Figura 11B), observamos que una pequeña fracción de las subunidades Cytb, Cor1 y Cyc1 del complejo III comigraron con Cox1ΔC15, Cox3 de la CcO y con Rcf1. La subunidad Rip1 del complejo III no se detectó en comigración con los SC aberrantes, lo que sugiere que este complejo no está completamente ensamblado en los SC aberrantes. Nuestros datos sugieren que los SC aberrantes que observamos en la mutante Cox1ΔC15

en la ausencia de Cox2, contienen una CcO no funcional y parcialmente ensamblada y un complejo III parcialmente ensamblado.

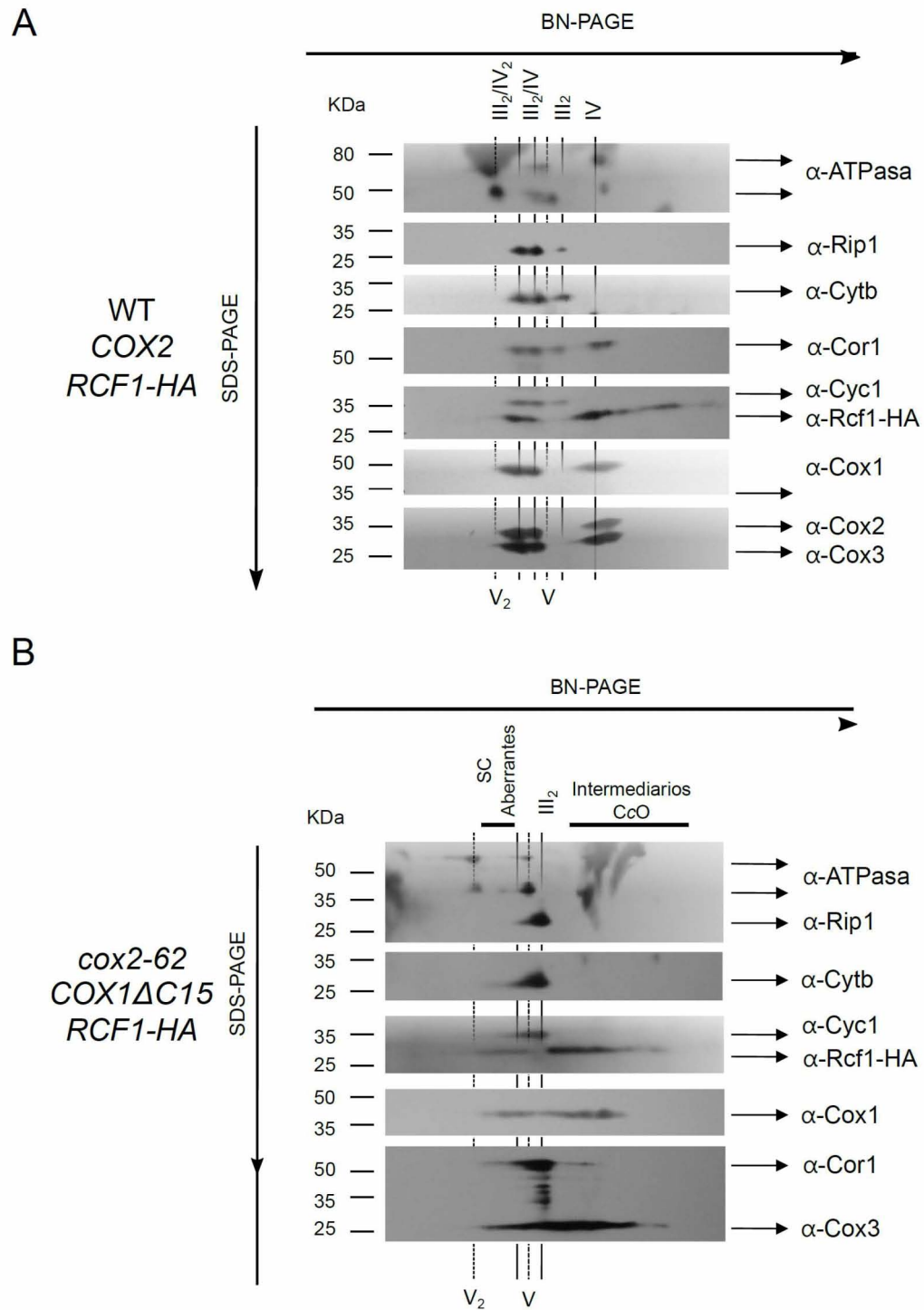


Figura 11. Los SC aberrantes contienen una CcO y un complejo III parcialmente ensamblados.

A) Después de separar por geles azules nativos (4-12%) los complejos mitocondriales

solubilizados con digitonina de la cepa WT con *RCF1-HA*, se realizó una segunda dimensión para su análisis por Western blot con los anticuerpos indicados en la figura C) Mismo experimento que en B, pero de la mutante *pet111Δ* con *Cox1ΔC15*. La ATPasa se usó como control de carga. Los números indican la migración del marcador de peso molecular (GE Healthcare). V y V₂= Monómero y dímero de la ATPasa respectivamente. III₂= dímero del complejo III. III₂/IV= dímero complejo III con un monómero de la CcO. III₂/IV₂= dímero complejo III con dos monómeros de la CcO. IV= CcO. N = tres experimentos independientes

Cox3 es necesaria para la formación y/o estabilización de los supercomplejos aberrantes.

En la mutante *Cox1ΔC15* se forman SC aberrantes en la ausencia de *Cox2*, sin embargo, nos preguntamos si esto también sucedía en otras mutantes de ensamblaje de la CcO. Nos interesamos en mutantes que afectaran a *Cox3*, ya que esta subunidad interactúa con la chaperona de ensamblaje de supercomplejos *Rcf1*. Incluso, se propone que la interacción entre subunidades en ambos complejos respiratorios se da antes de que se formen los supercomplejos. (Chen et al., 2012; Strogolova et al., 2012a; Su et al., 2014; Vukotic et al., 2011). Por esta razón, eliminamos a *PET122*, uno de los activadores traduccionales del mRNA de *COX3* (Kloeckener-Gruissem et al., 1988). Adicionalmente, eliminamos a *Cox4* (Maarse et al., 1984), ya que se propone que puede interactuar independientemente con los módulos de *Cox1* o *Cox3* durante el ensamblaje de la CcO (Gavin P. McStay et al., 2013; Su et al., 2014). Los complejos solubilizados con digitonina de las mutantes *pet122Δ*, *pet111Δ* y *cox4Δ* con *Cox1* o *Cox1ΔC15* se analizaron por BN-PAGE y Western blot para determinar la presencia de los SC aberrantes (Figura 12).

En las mutantes *pet122Δ*, *pet111Δ* y *cox4Δ* con *Cox1* no detectamos a los SC aberrantes. En las cepas con *Cox1ΔC15* observamos los SC aberrantes en la mutantes *pet111Δ* como esperábamos, los cuales también se encontraron en la mutante *cox4Δ*. Sin embargo, en la *pet122Δ* no detectamos la presencia de los SC aberrantes (Figura 12, panel α-Cox1). Los resultados descritos sugieren

que la formación y/o estabilidad de los SC aberrantes en la mutante Cox1 Δ C15 requiere de la presencia de Cox3.

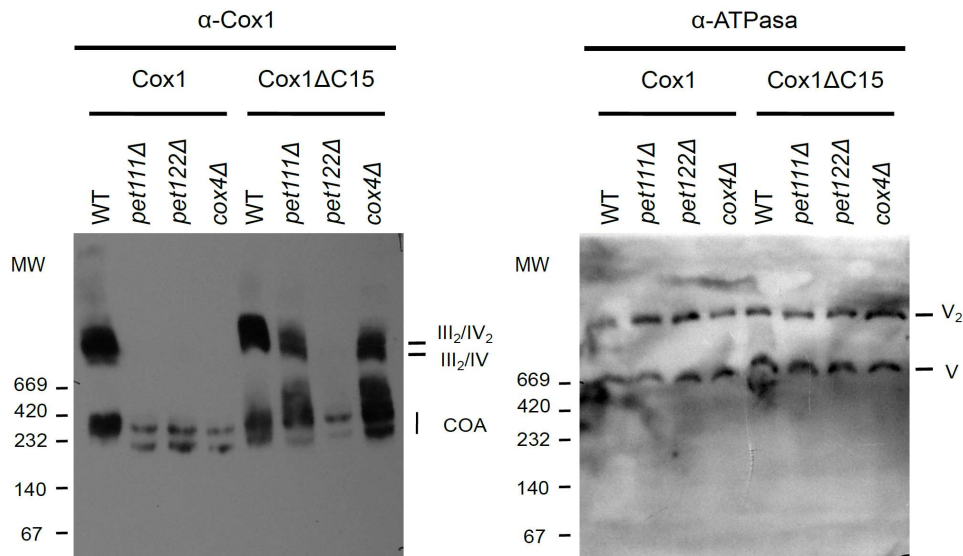


Figura 12. En la ausencia de Cox3 no se forman SC aberrantes en la mutante Cox1 Δ C15. A) Análisis por Western blot de los complejos solubilizados con digitonina y separados por geles azules nativos (4-12%) de la cepa WT y las mutantes indicadas en la figura. La ATPasa se usó como control de carga. Los números indican la migración del marcador de peso molecular (GE Healthcare). V y V₂= Monómero y dímero de la ATPasa respectivamente. III₂= dímero del complejo III. III₂/IV= dímero complejo III con un monómero de la CcO. III₂/IV₂= dímero complejo III con dos monómeros de la CcO. IV= CcO

La adición del grupo hemo a a Cox1 es necesaria para la formación y/o estabilización de los SC aberrantes.

La proteína Cox1 se estabiliza con la adición del hemo *a* y favorece el ensamblaje de la CcO (Khalimonchuk et al., 2010; Soto et al., 2012), por lo cual nos preguntamos si la adición del grupo hemo *a* a Cox1 promueve la formación/estabilidad de los SC aberrantes, para probarlo, eliminamos a Cox15, una enzima necesaria para la síntesis del hemo *a* (Barros et al., 2001; Glerum et al., 1997). Analizamos los complejos mitocondriales de las mutantes *cox15* Δ con Cox1 WT, Cox1-P521A/P522A o Cox1 Δ C15, mediante BN-PAGE y Western blot para determinar la presencia de los SC aberrantes. En las mutantes *cox15* Δ con

Cox1 WT y Cox1 Δ C15 observamos bandas muy tenues de los SC aberrantes, mientras que en la mutante *cox15 Δ con Cox1-P521A/P522A no detectamos los SC aberrantes (Figura 13A). Adicionalmente, realizamos un ensayo de Western blot de las mismas cepas, pero separamos las proteínas por SDS-PAGE para determinar la estabilidad de las subunidades Cox1, Cox2 y Cox3. En este caso, en todas las mutantes *cox15 Δ se observaron niveles bajos de todas las subunidades en comparación con las cepas *COX15* (Figura 13B, Tabla 4).**

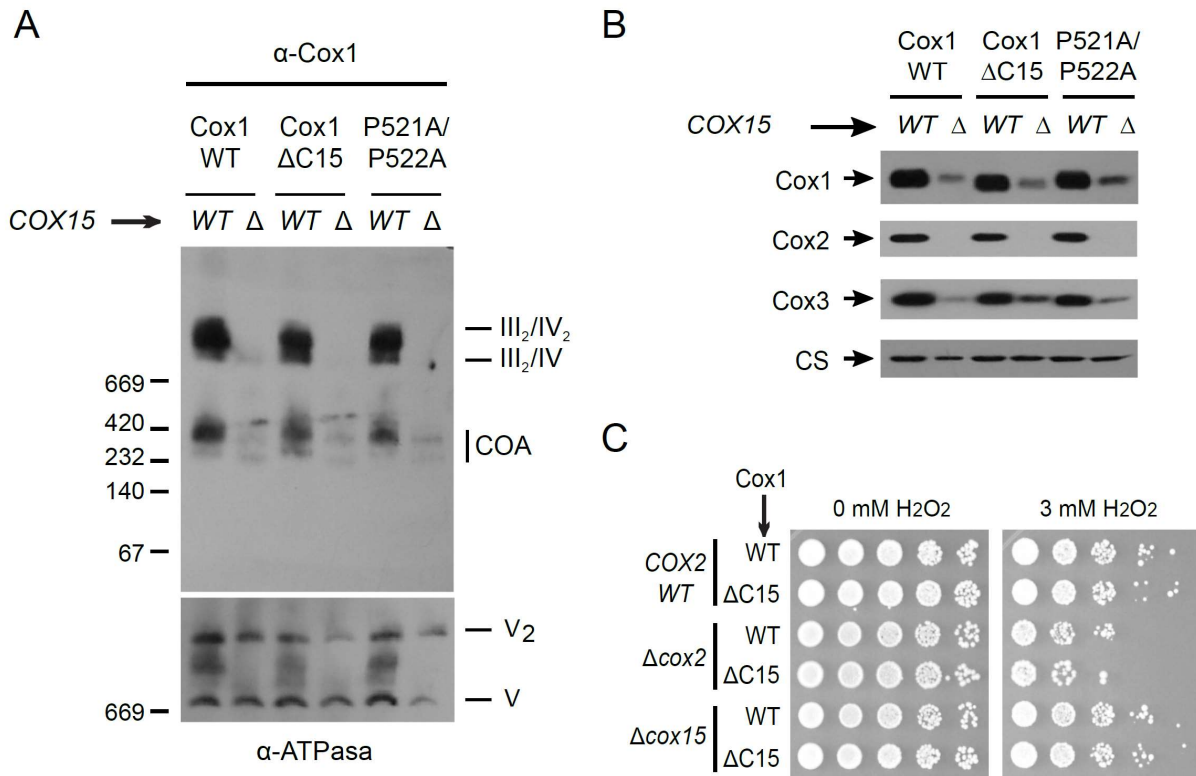


Figura 13. La adición del grupo hemo a Cox1 promueve la formación/ estabilidad de los supercomplejos aberrantes. A) Análisis por western blot de los complejos separados por geles azules nativos (4-12%) de los complejos mitocondriales solubilizados con digitonina de la cepa WT y las mutantes indicadas en la figura. La ATPasa se usó como control de carga. Los números indican la migración del marcador de peso molecular (GE Healthcare). V y V₂= Monómero y dímero de la ATPasa respectivamente. III₂= dímero del complejo III. III₂/IV= dímero complejo III con un monómero de la CcO. III₂/IV₂= dímero complejo III con dos monómeros de la CcO. IV= CcO. B) Análisis por SDS-PAGE y Western blot de las mismas muestras que en A. La

CS funciona como nuestro control de carga. CS= Citrato sintasa. C) Diluciones seriales 1:10 de las cepas indicadas que fueron previamente tratadas con peróxido (H₂O₂). Δ cox2= cox2-62.

Se propone que durante la adición del grupo hemo a Cox1 se producen intermediarios pro-oxidantes, los cuales ocasionan sensibilidad a H₂O₂ en mutantes de ensamblaje de la CcO. La sensibilidad a peróxido disminuye con la eliminación de Cox1 o al impedir la adición del grupo hemo a (Khalimonchuk et al., 2007). Para determinar si Cox1 Δ C15 contenía grupo hemo *a* en los SC aberrantes, analizamos la sensibilidad a peróxido de mutantes cox2-62 con Cox1 Δ C15, en la cual observamos los SC aberrantes (Figura 10B). Las cepas COX2 WT con Cox1 WT y Cox1 Δ C15 fueron resistentes a 3 mM de H₂O₂ (Khalimonchuk et al., 2007). En contraste, las cepas cox2-62 con Cox1 WT y Cox1 Δ C15 fueron igualmente sensibles a 3 mM de H₂O₂. Comprobamos que la sensibilidad a H₂O₂ fue ocasionada por el grupo hemo *a*, dado que la eliminación de Cox15 en cepas con Cox1 Δ C15 o Cox1 WT abatió su sensibilidad a H₂O₂ (Figura 13C) a pesar de que no se ensambla correctamente la CcO (Figura 13B). Nuestros resultados indican que la adición del grupo hemo a Cox1 es muy importante para la formación/estabilidad de los SC aberrantes y que Cox1 Δ C15 contiene el grupo hemo *a* en esos complejos.

Tabla 4. Análisis densitométrico de las mutantes cox15 Δ .

COX15	Cox1		Cox1 Δ C15		P521A/P522A	
	WT	Δ	WT	Δ	WT	Δ
Cox1	1.0	0.246* \pm 0.154	0.974 \pm 0.159	0.137* \pm 0.085	0.99 \pm 0.17	0.233* \pm 0.1
Cox2	1.0	-	0.98 \pm 0.08	-	1.04 \pm 0.22	-
Cox3	1.0	0.297* \pm 0.188	0.949 \pm 0.14	0.379* \pm 0.15	1.11 \pm 0.21	0.57* \pm 0.23

Se indica la fracción respecto a la cepa Cox1 WT. La señal de las proteínas se ajustó con la señal de la Citrato Sintasa. \pm : indica el error estándar de dos experimentos independientes para la Mss51-HA y de dos experimentos independientes para Cox14-Myc. * indica una diferencia significativa (p<0.05), determinada por un análisis de "t de student" de dos vías entre las cepas COX15 y cox15 Δ . La estadística se realizó en el programa Prism 6.

Estudio de la viabilidad celular en mutantes de Cox1 que no regulan su síntesis.

En esta sección presentaré datos preliminares que obtuvimos al analizar el envejecimiento cronológico de las mutantes de Cox1 y la actividad de la CcO por oximetrías. Los siguientes experimentos los hicimos en colaboración con el grupo del Dr. Alexander de Luna (LANGEBIO) y el grupo del Dr. Salvador Uribe Carvajal (IFC).

La mutante Cox1 Δ C15 envejece más rápido.

La cantidad de Cox1 en la MIM está muy controlada (Herrmann et al., 2013; Mick et al., 2010), por lo cual nos preguntamos si la viabilidad celular de las mutantes que no regulan la síntesis de Cox1 está afectada. Estudios previos indican que la respiración mitocondrial y el potencial membranal son muy importantes para evitar el envejecimiento prematuro de las células de levadura (Jazwinski, 2005; Longo et al., 2012). Un estudio con la colección de mutantes de *S. cerevisiae* demostró que aquellas en las que se afectó la función mitocondrial (ej. mantenimiento de genoma mitocondrial, traducción mitocondrial, respiración, ciclo de Krebs, etc.) morían antes que la cepa WT (Garay et al., 2014). Por tal motivo decidimos evaluar si las mutantes Cox1 Δ C15 y Cox1-P521A/P522A envejecían prematuramente.

En *S. cerevisiae* hay dos ensayos principales para medir envejecimiento; en el replicativo se mide la cantidad de veces que una célula puede dividirse, mientras que en el cronológico se determina el tiempo que una célula que no se divide sobrevive. Ambos ensayos han servido para determinar genes y vías de señalización que participan en el envejecimiento celular (Jazwinski, 2005; Longo et al., 2012). En este estudio medimos el envejecimiento cronológico de la cepa WT y de las mutantes de Cox1 Δ C15 y Cox1-P521A/P522A, para lo cual incubamos las células de levadura hasta la fase estacionaria y posteriormente evaluamos la cantidad de células viables en el cultivo a lo largo del tiempo (Ver

métodos). Observamos que la supervivencia de la mutante Cox1 Δ C15 es menor comparada con la cepa WT, mientras que la supervivencia de la mutante Cox1-P521A/P522A es similar a la de la cepa WT (Figura 14A). Este resultado indica que la mutación Cox1 Δ C15 afecta la viabilidad de las células de levadura. Proponemos que el efecto no se debe únicamente a que la mutante Cox1 Δ C15 no regula su síntesis, ya que la mutante Cox1-P521A/P522A no envejece antes.

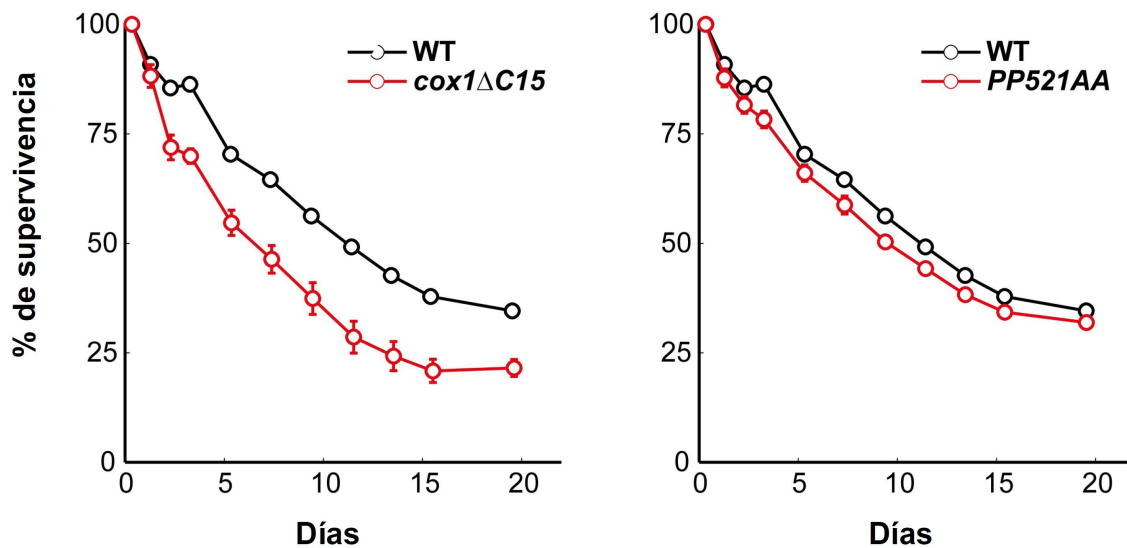


Figura 14. La mutante Cox1 Δ C15 envejece antes que una cepa silvestre. Gráfica de supervivencia de las mutantes Cox1 Δ C15 y Cox1-P521A/P522A. Las líneas negras indican la supervivencia de la cepa WT y las líneas rojas indican la supervivencia de las mutantes de Cox1. La gráfica resume los resultados de tres réplicas biológicas hechas con cinco réplicas técnicas.

La cadena respiratoria de la mutante Cox1 Δ C15 funciona normalmente.

El correcto funcionamiento de la respiración mitocondrial parece ser vital para prevenir el envejecimiento prematuro de las células (Garay et al., 2014), por lo cual estudiamos como la mutación Cox1 Δ C15 podría afectar la respiración celular dado que disminuye en un 70% la actividad de la CcO comparada con Cox1 WT (Figura 5D). Aunque, es importante señalar que la mutante puede crecer en medio respiratorio (Figura 5C). Para hacer un ensayo cuantitativo de la cadena respiratoria medimos el consumo de O₂ usando etanol como sustrato. En

concordancia con el crecimiento en medio respiratorio, no observamos una disminución significativa del consumo de O₂ en estado IV o III en mitocondrias de la mutante Cox1ΔC15 comparada con la cepa WT. Asimismo, el control respiratorio de las células fue similar indicando que el acoplamiento de la mutante Cox1ΔC15 no se afectó (Tabla 5). Resultó interesante que el consumo de O₂ de la cadena respiratoria en la mutante Cox1ΔC15 fue similar al de una cepa WT, a pesar de que tiene sólo el 30% de actividad de la CcO (Figura 5D), lo cual podría indicar que la CcO no es el paso limitante de la cadena respiratoria en *S. cerevisiae*, sin embargo, faltan más datos para comprobarlo. Con los datos obtenidos hasta el momento no podemos inferir si hay una relación directa entre el envejecimiento prematuro de la mutante Cox1ΔC15 y un defecto respiratorio, sin embargo, podría ser que los defectos causados por la mutación sean paulatinos y acumulativos.

Tabla 5. Consumo de O₂ de la cadena respiratoria de la mutante Cox1ΔC15.

Cepa	Estado IV (μmoles O₂/min*mg)	Estado III (μmoles O₂/min*mg)	Coefficiente Respiratorio (Estado III/IV)
Cox1	0.291 ± 0.022	0.497 ± 0.1	1.68 ± 0.27
Cox1ΔC15	0.254 ± 0.054	0.436 ± 0.133	1.72 ± 0.15

Se midió el consumo de O₂ en extractos mitocondriales crudos de la cepa Cox1 y de la mutante Cox1ΔC15. Se indica el consumo en estado III y IV con etanol como sustrato. La cantidad de consumo de O₂ se ajustó a la cantidad de proteína mitocondrial usada en el ensayo (125 mg).

Discusión

En este trabajo demostramos que los residuos P521, P522 y V524 de Cox1 son necesarios para la regulación de su traducción. Estos aminoácidos estabilizaron la unión de Mss51 a los complejos COA y por lo tanto controlaron la cantidad de Mss51 disponible para activar la traducción del mRNA de *COX1*. Además, encontramos que en la mutante Cox1 Δ C15 se formaron SC aberrantes cuando la CcO no se ensambla correctamente. La formación y/o estabilización de estos complejos dependieron de la presencia de Cox3, del complejo III y de la adición del grupo hemo a Cox1. Nuestros resultados indican que el C-terminal de Cox1 es un regulador central de la biogénesis de la CcO.

Para que se acople la síntesis de Cox1 y el ensamblaje de la CcO se necesita a Mss51, esta proteína activa la síntesis de Cox1 e interacciona con el C-terminal de Cox1 en los complejos COA para monitorear el ensamblaje de la CcO. Se ha propuesto que Mss51 es incapaz de activar la traducción del mRNA de *COX1* cuando está asociada a los complejos COA (Barrientos et al., 2004; Mick et al., 2010; Perez-Martinez et al., 2009, 2003; Shingú-Vázquez et al., 2010). En este trabajo descubrimos que los aminoácidos P521, P522 y V524 de Cox1 estabilizan la unión de Mss51 a los complejos COA. Cuando mutamos estos residuos, observamos una ligera reducción en la interacción de Mss51-HA con Cox1, Cox14-Myc y Coa3, que forman parte de los complejos COA. Asimismo, detectamos que la cantidad de la forma TA de Mss51 aumentó en las mutantes Cox1-P521A/P522A y Cox1-V524E, aunque en menor medida que en la mutante Cox1 Δ C15. Al inmunoprecipitar a Cox14-Myc en las mutantes Cox1 Δ C15, Cox1-P521A/P522A y Cox1-V524 no sólo disminuyó la interacción con Mss51-HA sino también la interacción con Cox1 y Coa3, lo cual sugiere que los residuos P521, P522 y V524 de Cox1 estabilizan la unión de Cox14 al complejo COA. Sin embargo, no podemos descartar que la unión de Cox14 con los complejos COA esté afectada por la reducción de Mss51 en estos complejos.

Las P521 y P522 de Cox1 están conservadas en todas las especies analizadas. Dado que la prolina es un residuo que restringe el movimiento de la cadena polipeptídica (Kay et al., 2000), proponemos que las P521 y P522 fijan la conformación de los últimos 15 residuos de Cox1 y de esta manera estabilizan la unión de Mss51. De hecho, la región homóloga a los últimos 15 residuos de Cox1 de levadura pudo ser determinada en la estructura cristalográfica de Cox1 de bovino a pesar de tener una estructura de “random coil” (Tsukihara et al., 1996). Datos previos sugirieron que los residuos VHSFNT de Cox1 eran los más importantes para regular su síntesis (Shingú-Vázquez et al., 2010). Al mutar los residuos V524, H525 y F527 de esta región, encontramos que sólo la mutación de la V524 afectó la regulación de la síntesis de Cox1. La V524 fue el único aminoácido que no mutamos por alanina (ya que es muy parecido a la valina), sino por ácido glutámico, un residuo con una cadena lateral más grande y cargada que podría interferir con la unión con Mss51 dado que la posición de la cadena polipeptídica está restringida por las prolinas 521 y 522.

Reportes previos indican que Mss51 es un factor limitante para la síntesis de Cox1 (Perez-Martinez et al., 2009). Sin embargo, encontramos que en las mutantes de ensamblaje *pet111Δ* con Cox1-P521A/P522A y Cox1-V524 hubo una cantidad menor de la forma TA de Mss51 en comparación con la mutante *pet111Δ* con Cox1ΔC15. No obstante, la síntesis de todas las mutantes de Cox1 fue similar. Nuestros datos indican que se requiere una pequeña cantidad de la forma libre de Mss51 para tener una traducción normal del mRNA de *COX1*.

La síntesis de Cox1ΔC15, Cox1-P521A/P522A y Cox1-V524E no fue regulada, sin embargo, no observamos un incremento significativo de la cantidad de las proteínas Cox1ΔC15, Cox1-P521A/P522A y Cox1-V524E en las mutantes *pet111Δ*. El resultado anterior nos llevó a pensar que Cox1 contiene señales de degradación que disminuyen su estabilidad cuando hay defectos de ensamblaje en la CcO. En el humano se reportaron eliminaciones en el C-terminal de Cox1 que promueven su rápida degradación. Este estudio encontró que una mutante sin los últimos 34 residuos de Cox1 podía incorporarse a la CcO e incluso formar

SC, no obstante, estos complejos eran muy inestables posiblemente por la rápida degradación de Cox1 (Hornig-Do et al., 2012)

En este trabajo descubrimos que el C-terminal de Cox1 podría participar en la formación y/o estabilización de los supercomplejos III₂/IV y III₂/IV₂. En la ausencia de Cox2 o Cox4, Cox1ΔC15 migró en complejos de alto peso molecular en geles azules nativos que llamamos SC aberrantes. Estos complejos disminuyeron drásticamente en la ausencia Cytb (subunidad del complejo III), Cox3 o cuando Cox1 no contiene el grupo hemo *a*. Adicionalmente, detectamos que en la ausencia de Cox2, Cox1ΔC15 comigró con Cox3, Rcf1, y las subunidades Cytb, Cyt1 y Cor1 del complejo III en los SC aberrantes. Pensamos que los SC anormales no contienen un complejo III completo ya que no observamos la comigración de Cox1ΔC15 con Rip1, una de las últimas subunidades que se añade al complejo III (Smith et al., 2012; Zara et al., 2009). Proponemos que los SC aberrantes no son funcionales ya que contenían una CcO incompleta y posiblemente el complejo III tampoco este completamente ensamblado.

Esta no es la primera vez que se reporta la formación de SC no funcionales, ya que un estudio previo reportó que en las mutantes *rip1Δ*, *qcr9Δ* y *bcs1Δ* se acumula un intermediario tardío de ensamblaje del complejo III, el cual puede asociarse con la CcO para formar SC no funcionales (Cui et al., 2014). Incluso se ha reportado que algunas chaperonas de ensamblaje de la CcO como Shy1, Pet54, Cox14, Coa3, Cox11 y Cox16 interactúan con subunidades del complejo III, probablemente durante el ensamblaje de los supercomplejos (Mick et al., 2010, 2007). Todos estos datos indican que en *S. cerevisiae* el ensamblaje de los complejos respiratorios esta acoplado.

En la ausencia de Cox3, los SC aberrantes desaparecieron casi por completo en la mutante Cox1ΔC15, esto sugiere que la formación y/o estabilización de los SC aberrantes depende de Cox3. El grupo de Tzagoloff propuso que la CcO se ensambla a partir de tres módulos, cada módulo contiene una de las subunidades codificadas en la mitocondria asociada a diferentes

chaperonas y subunidades nucleares (Gavin P McStay et al., 2013). En el módulo de Cox3 se encontró a Rcf1 (Su et al., 2014), el cuál es un factor importante para la formación y/ estabilización de los SC (Chen et al., 2012; Strogolova et al., 2012a; Vukotic et al., 2011). En la ausencia de Cox2 detectamos la comigración de Rcf1 con los SC aberrantes, por lo cual proponemos que la presencia de Rcf1 facilita la formación/estabilización de estos complejos. Rcf1 también es capaz de unirse directamente al complejo III (Chen et al., 2012) especulamos que, por esta razón, aún en la ausencia de Cox3 o cuando no se añade el grupo hemo a Cox1 podemos detectar una leve banda de los SC aberrantes en la mutante Cox1 Δ C15.

La adición del grupo hemo *a* a Cox1 es un proceso fundamental para el ensamblaje de la CcO (Khalimonchuk et al., 2010; Soto et al., 2012). Nuestros datos indican que Cox1 Δ C15 contiene hemo *a* en los SC aberrantes y que su presencia promueve la formación/estabilización. Dos evidencias nos llevaron a esta conclusión: primero, en mutantes *cox15* Δ que no sintetizan hemo *a* disminuyó drásticamente la cantidad de SC aberrantes. Segundo, la mutante *cox2-62* con Cox1 Δ C15 fue igual de sensible a peróxido que la cepa con Cox1 WT. Resulta interesante que la proteína Cox1 Δ C15 contenga el grupo hemo *a*, ya que su síntesis no se regula (Shingú-Vázquez et al., 2010, este trabajo) y podría llevar a la acumulación de intermediarios pro-oxidantes perjudiciales para la célula. Aún no estudiamos si esta hipótesis es cierta, pero la disminución de la actividad del complejo IV y el incremento del envejecimiento cronológico (datos preliminares) de la mutante Cox1 Δ C15 nos sugieren un efecto de la mutación sobre la viabilidad celular.

En la ausencia de Cox2, en la mutante Cox1 Δ C15 detectamos una CcO incompleta posiblemente formada por los módulos de Cox1 y Cox3 que fue capaz de interactuar con el complejo III, lo cual sugiere que el módulo de Cox2 es prescindible en esta interacción. Especulamos que el módulo de Cox2 podría integrarse directamente a supercomplejos parcialmente ensamblados. De hecho, en experimentos de pulso y caza de las proteínas codificadas en la mitocondria

se detectó primero la interacción de Cox1 con Cox3, mientras que la interacción de Cox1 con Cox2 y de Cox1 con Cytb ocurrió a tiempos similares (Gavin P. McStay et al., 2013).

Proponemos que la formación y/o estabilización de los SC aberrantes en la mutante Cox1 Δ C15 podría ser resultado de una combinación de factores. Cox1 Δ C15 se sintetiza constantemente aún cuando no se ensambla la CcO, además la proteína recién sintetizada interaccionó menos con Mss51, Cox14 y Coa3, lo que podría promover la interacción de Cox1 Δ C15 con el módulo de Cox3. Esta CcO parcialmente ensamblada contiene a Rcf1, por lo cual es posible que interaccione con el complejo III para formar los SC aberrantes. Pensamos que en las mutantes puntuales Cox1-P521A/P522A y Cox1-V524E no observamos los SC aberrantes debido a que su interacción con Mss51, Cox14 y Coa3 no se afectó tanto como en la mutante Cox1 Δ C15, por lo tanto, el módulo de Cox3 no puede interaccionar con el módulo de Cox1.

Los datos obtenidos en este estudio indican que el C-terminal de Cox1 es un regulador central de la biogénesis de la CcO. En la figura 15 proponemos un modelo de como el C-terminal de Cox1 podría regular la biogénesis de la CcO. En etapas tempranas del ensamblaje los últimos 15 residuos de Cox1, en particular los aminoácidos P521, P522 y V524E estabilizan la formación de los complejos COA y la unión de Mss51 a estos (Figura 14, paso 1). En mutantes de ensamblaje de la CcO, el C-terminal de Cox1 promueve su degradación y detiene la formación de intermediarios de ensamblaje posteriores, ya que Cox1 estabiliza al módulo de Cox3 y probablemente al de Cox2 (Gavin P McStay et al., 2013; Su et al., 2014). Cuando no hay defectos de ensamblaje, entonces el módulo de Cox1 interacciona con el módulo de Cox3 (Figura 14, paso 2). En este punto es probable que se pierda la interacción de Mss51 con Cox1, dado que este intermediario puede interaccionar con el complejo III y nunca se ha detectado a Mss51 en los SC (Mick et al., 2010; Su et al., 2014). Finalmente, el intermediario formado por los módulos de Cox1 y Cox3 interacciona con el módulo de Cox2 y con el complejo III para formar los supercomplejos (Figura 14,

paso 3). Hasta el momento no sabemos si el módulo de Cox2 interactúa antes o al mismo tiempo que el complejo III.

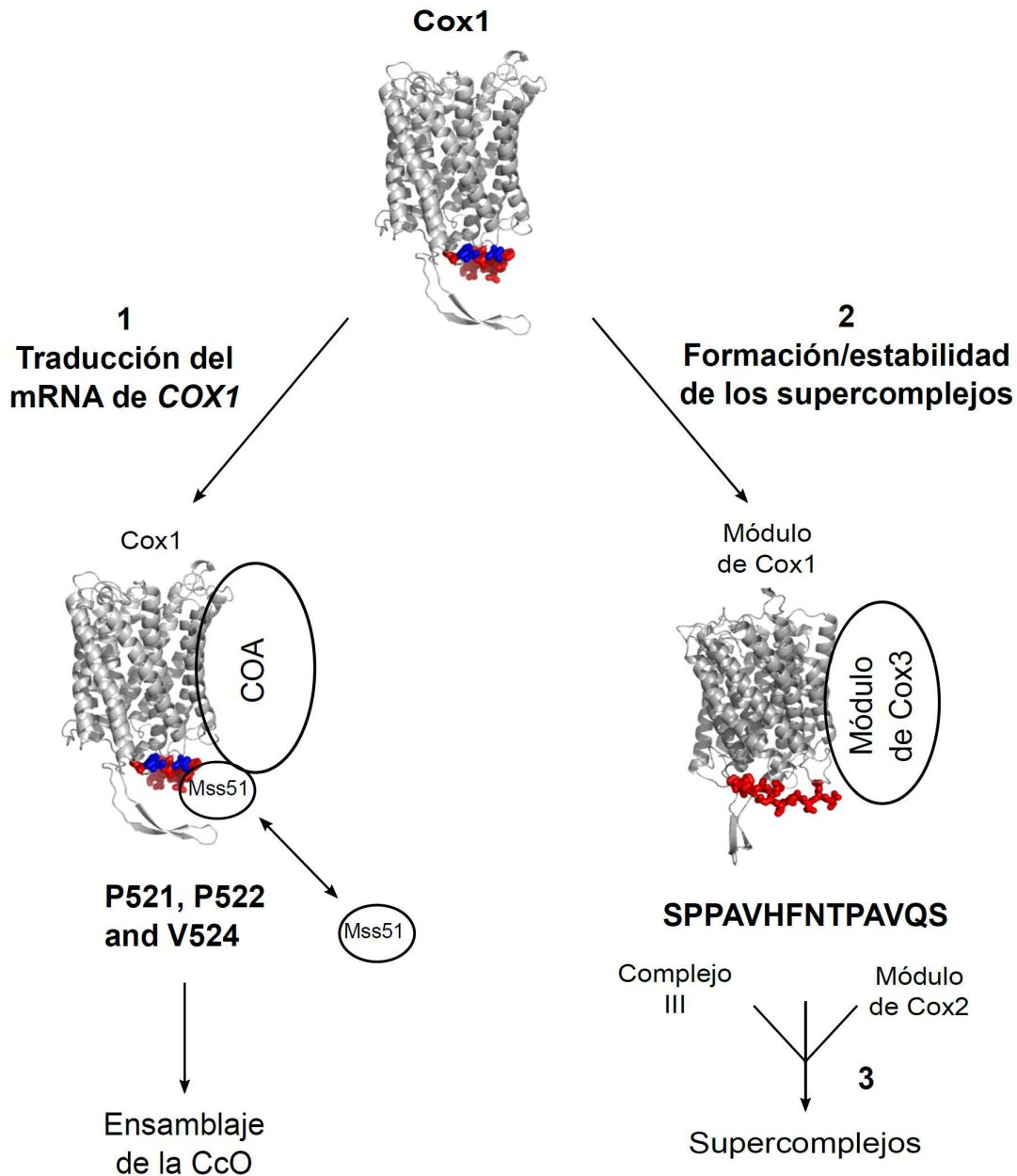


Figura 15. Modelo de regulación de la biogénesis de la CcO mediada por el carboxilo terminal de Cox1. 1) Los últimos 15 aminoácidos de Cox1, particularmente la P521, la P522 y la V524 estabilizan la unión de Mss51 a lo complejos COA y su disponibilidad para activar la traducción del mRNA de Cox1. El C-terminal de Cox1 promueve su degradación si falla el ensamblaje de la CcO 2) El ensamblaje de la CcO procede con la adición del módulo de Cox3. 3) Al final el

módulo de Cox2 y el complejo III (posiblemente incompleto) pueden interaccionan con el intermediario del paso 2 para formar una CcO funcional y los supercomplejos III₂/IV y III₂/IV₂.

En otras especies también hay mecanismos que controlan la cantidad de proteína Cox1 presente en la MIM, pero son diferentes al descrito en *S. cerevisiae*. Por ejemplo, en *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) se encontró que el homólogo de Mss51 no activa la síntesis de Cox1, pero si es necesario para estabilizar a la proteína Cox1 (Kühl et al., 2012). En mamíferos, el posible homólogo de Mss51 (llamado Zmynd17) parece ser un modulador del metabolismo celular específico de músculo esquelético (Moyer and Wagner, 2014). En humanos, TACO1 activa la síntesis de Cox1, aunque parece que TACO1 no participa en el ensamblaje de la CcO (Weraarpachai et al., 2009). Sin embargo, el homólogo humano de Cox14 (C12orf62) podría participar en la regulación de la síntesis de Cox1 (Weraarpachai et al., 2012). Cuando se reduce la expresión de Cox14 humana hay menor síntesis de COXI, además, Cox14 humana interactúa con las subunidades COXI, COXII y COXIV, por lo cual se propuso Cox14 podría coordinar la síntesis de COX1 y el ensamblaje de la CcO, aunque se requieren más estudios para comprobarlo (Weraarpachai et al., 2012). Adicionalmente, en el humano se reportó que el C-terminal de Cox1 es importante para la estabilidad de la proteína (Hornig-Do et al., 2012).

En *S. cerevisiae*, la síntesis de Cytb también esta acoplada al ensamblaje del complejo III, en este caso el complejo Cbp3-Cbp6 es el encargado de coordinar ambos procesos (Gruschke et al., 2012). El homólogo de Cbp6 en *S. pombe* sólo es necesario para estabilizar al Cytb y no participa en la activación de la síntesis de Cytb (Kühl et al., 2012). Sin embargo, se reportó que los homólogos humanos de Cpb3 (UQCC1) y Cbp6 (UQCC2), son necesarios para la síntesis, estabilidad y/o ensamblaje del Cytb, lo cual sugiere que en humanos también podría existir un mecanismo de regulación de la síntesis de Cytb (Tucker et al., 2013). Los mecanismos para regular la síntesis de proteínas codificadas en el DNAm varían entre diferentes organismos, sin embargo, es

interesante que los mecanismos parecen ser más similares entre *S. cerevisiae* y humanos, que entre dos especies de hongos como *S. cerevisiae* y *S. pombe*.

El acoplamiento entre traducción y ensamblaje no es exclusivo de complejos mitocondriales, de hecho, este tipo de mecanismo fue descrito inicialmente para los fotosistemas del cloroplasto en *Chlamydomonas reinhardtii* por el grupo de Choquet. Este grupo llamó al mecanismo proceso CES (por sus siglas en inglés de “*control by epistasis of synthesis*”) y básicamente consiste en que en la ausencia de algunas subunidades de un fotosistema, la traducción de una proteína del mismo fotosistema codificada en el cloroplasto disminuye (Choquet y Wollman, 2009). Inicialmente se describió el proceso CES en el complejo citocromo *b₆f*, en este complejo la síntesis del citocromo *f* (subunidad codificada en el DNA del cloroplasto) se reduce en la ausencia del citocromo *b₆* o la subunidad IV (Choquet et al., 1998). Incluso, se demostró que el carboxilo terminal del citocromo *f* es un regulador negativo de su síntesis (Choquet et al., 2003). Estudios posteriores demostraron que el proceso CES ocurría en todos los complejos fotosintéticos de *C. reinhardtii* e incluso también en la enzima Rubisco, la cual cataliza el primer paso del ciclo de Calvin (Choquet and Wollman, 2009).

Otro ejemplo es el ensamblaje del flagelo bacteriano, cuyo proceso es muy complejo y altamente regulado, ya que se necesita que sus componentes se expresen en tiempos definidos. El mecanismo principal de control consiste en regular la transcripción de los mRNAs de las subunidades del flagelo, pero a su vez, la expresión de los factores de transcripción se regula a nivel traduccional y de secreción lo cual añade otro punto de control al ensamblaje del flagelo (Aldridge and Hughes, 2002).

Los estudios de los procesos CES en cloroplasto de *C. reinhardtii*, del ensamblaje del flagelo bacteriano y de regulación de la síntesis de las proteínas codificadas en el DNAm en *S. cerevisiae* muestran que el acoplamiento entre traducción y el ensamblaje de complejos moleculares es una estrategia de regulación conservada en diferentes organismos.

Conclusiones.

- Los residuos P521, P522 y V524 de Cox1 son necesarios para regular la traducción del mRNA de COX1.
- Los residuos P521, P522 y V524 de Cox1 estabilizan la unión de Mss51 a los complejos COA.
- La cantidad de Mss51 en su forma traduccionalmente activa no limita la síntesis de Cox1.
- La mutación Cox1 Δ C15 promueve la formación y/o estabilización de supercomplejos aberrantes cuando no se ensambla la CcO.
- Los supercomplejos aberrantes están formados por un complejo III incompleto y un intermediario de la CcO que contiene a Cox1 y a Cox3.
- La formación y/o estabilización de los supercomplejos aberrantes depende de Cox3, Cytb y de la adición del grupo hemo a Cox1.

Perspectivas.

- Definir la región de Mss51 que interacciona con el C-terminal de Cox1. El conocer esta región nos ayudaría a esclarecer como funciona Mss51, ya que Mss51 no cuenta con ningún dominio predicho por análisis de secuencia que nos lo indique. Además, podríamos probar si la región necesaria para activar la traducción y la que interactúa con el C-terminal de Cox1 es la misma. Para encontrar la región de interacción, podríamos hacer mutantes truncas de Mss51 y analizar su asociación a Cox1. Alternativamente, se podría purificar a Mss51 y la región soluble del C-terminal de Cox1, para intentar determinar la estructura cristalográfica del complejo C-terminal de Cox1-Mss51.

- Conocer la composición de los SC aberrantes nos ayudaría a definir si los SC aberrantes contienen un complejo III completo o algún intermediario, además podríamos analizar si en estos complejos faltan componentes presentes en los SC funcionales. Para conocer la composición de los SC aberrantes se podría separar en una doble dimensión las proteínas que los conforman y secuenciar las proteínas.
- Determinar si la mutación Cox1 Δ C15 promueve la formación o la estabilización de los SC aberrantes. Para intentar diferenciar entre estas dos posibilidades podríamos realizar ensayos de pulso y caza de las proteínas codificadas en la mitocondria y tomar muestras a diferentes tiempos para separarlas en geles azules nativos. Si los SC no funcionales se forman en la cepa con Cox1 WT deberíamos poder observarlos en tiempos cortos.
- Investigar por qué la mutación Cox1 Δ C15 acelera el envejecimiento cronológico de las células. Hasta la fecha son limitados los estudios que analizan las consecuencias de una falla en la regulación de la síntesis de Cox1, por lo cual sería importante analizar cómo se afecta la función mitocondrial en la mutante Cox1 Δ C15 con el tiempo. Para ello, propongo hacer un análisis bioenergético de las mutantes Cox1 Δ C15 conforme van envejeciendo las células. El análisis bioenergético incluiría: la medición del consumo de oxígeno de la cadena respiratoria, la medición de la actividad de la CcO, la medición de la producción de especies reactivas de oxígeno, la determinación de la estabilidad del DNAm, el análisis de los supercomplejos por geles azules nativos y la medición de la producción de ATP.

ANEXO 1

Artículos publicados durante mi doctorado.

1. The Cox1 Carboxyl-terminal Domain is a Central Regulator of Cytochrome c Oxidase Biogenesis in Yeast Mitochondria. García-Villegas R, Camacho-Villasana Y, Shingú-Vázquez MÁ, Cabrera-Orefice A, Uribe-Carvajal S, Fox TD, Pérez-Martínez X. *J Biol Chem.* 2017 May 10. pii: jbc.M116.773077. doi: 10.1074/jbc.M116.773077

tapraid4/zbc-bc/zbc-bc/zbc02817/zbc6925-17z ZSUBMIT 12 xppws 5=4 22/5/17 1:49 4/Color Figure(s) F3,4,8 ARTNO: M116.773077

JBC ARTICLE



The Cox1 C-terminal domain is a central regulator of cytochrome c oxidase biogenesis in yeast mitochondria

Received for publication, December 16, 2016, and in revised form, May 9, 2017. Published, Papers in Press, May 10, 2017. DOI 10.1074/jbc.M116.773077

Rodolfo García-Villegas[‡], Yolanda Camacho-Villasana[‡], Miguel Ángel Shingú-Vázquez[§], Alfredo Cabrera-Orefice[‡], Salvador Uribe-Carvajal[‡], Thomas D. Fox[¶], and Xochitl Pérez-Martínez^{‡1}

From the [‡]Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, 04510, Mexico, the [§]Australian Research Council Centre of Excellence for Advanced Molecular Imaging, Monash University, Clayton, Victoria 3800, Australia, the [¶]Radboud Center for Mitochondrial Medicine, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands, and the ¹Department of Molecular Biology and Genetics, Cornell University, Ithaca, New York 14853

Edited by Ronald C. Wek

Cytochrome *c* oxidase (CcO) is the last electron acceptor in the respiratory chain. The CcO core is formed by mitochondrial DNA-encoded Cox1, Cox2, and Cox3 subunits. Cox1 synthesis is highly regulated; for example, if CcO assembly is blocked, Cox1 synthesis decreases. Mss51 activates translation of *COX1* mRNA and interacts with Cox1 protein in high-molecular-weight complexes (COA complexes) to form the Cox1 intermediary assembly module. Thus, Mss51 coordinates both Cox1 synthesis and assembly. We previously reported that the last 15 residues of the Cox1 C terminus regulate Cox1 synthesis by modulating an interaction of Mss51 with Cox14, another component of the COA complexes. Here, using site-directed mutagenesis of the mitochondrial *COX1* gene from *Saccharomyces cerevisiae*, we demonstrate that mutations P521A/P522A and V524E disrupt the regulatory role of the Cox1 C terminus. These mutations, as well as C terminus deletion (Cox1ΔC15), reduced binding of Mss51 and Cox14 to COA complexes. Mss51 was enriched in a translationally active form that maintains full Cox1 synthesis even if CcO assembly is blocked in these mutants. Moreover, Cox1ΔC15, but not Cox1-P521A/P522A and Cox1-V524E, promoted formation of aberrant supercomplexes in CcO assembly mutants lacking Cox2 or Cox4 subunits. The aberrant supercomplex formation depended on the presence of cytochrome *b* and Cox3, supporting the idea that supercomplex assembly factors associate with Cox3 and demonstrating that supercomplexes can be formed even if CcO is inactive and not fully assembled. Our results indicate that the Cox1 C-terminal end is a key regulator of CcO biogenesis and that it is important for supercomplex formation/stability.

Cytochrome *c* oxidase (CcO)² is the last redox multisubunit complex of the mitochondrial respiratory chain. This enzyme couples the transference of electrons from cytochrome *c* to oxygen with the translocation of protons from the matrix to the intermembrane space. In *Saccharomyces cerevisiae*, CcO contains at least 12 subunits, where Cox1, Cox2, and Cox3 are encoded by mitochondrial genes and constitute the catalytic core. The corresponding mRNAs are translated by the organelle's ribosomes, and the proteins are subsequently integrated into the CcO. The remaining subunits are encoded by nuclear DNA and imported from the cytosol (1, 2). CcO assembly requires at least 30 factors to correctly coordinate the incorporation of subunits and to add prosthetic groups (1, 2). Yeast CcO is assembled after formation of three subassembly modules, each containing a mtDNA-encoded subunit and a subset of cytosolic subunits (3–6). The Cox1 module stabilizes the Cox3 module and possibly the Cox2 module (6), suggesting that assembly of Cox1 orchestrates CcO assembly. One or two monomers of CcO interact with the dimeric *bc*₁ complex to form III₂/IV and III₂/IV₂ supercomplexes (7, 8). Formation and stabilization of these supercomplexes is dependent on the Rcf1, Rcf2, Aac2, and Cox13 proteins (6, 9–11). Cardiolipin (12), and the proteins Rcf3 and Cox26 are also components of supercomplexes (13–15).

Cox1 is the largest CcO subunit, with 12 transmembrane stretches comprising the bulk of the protein. Its only significant hydrophilic domain is formed by ~59 residues exposed on the inner side of the inner membrane in the assembled enzyme. Cox1 contains hemes a and a₃ plus Cu_B cofactors for oxygen reduction as well as the channels for proton translocation (1, 2). Partially assembled Cox1 may form pro-oxidant intermediaries containing unassembled heme a₃-Cu_B (16). Indeed, yeast Cox1 synthesis is down-regulated when CcO assembly is defective (for reviews, see Refs. 1 and 17).

Translation of the *COX1* mRNA in mitochondria is specifically activated by Pet309 and Mss51 (18–22). According to the current model, newly synthesized Cox1 enters a progressive series of intermediaries named D1–D5 (or COA complexes) in which Mss51 is present together with Cox14, Coa3, and Coa1

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Research Grant 47514 (to X. P.-M.) and Fellowships 250726 (to R. G.-V.) and 289024 (to A. C.-O.) and Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) UNAM Grants IN204414 and IN209217 (to X. P.-M.). This work is part of the Ph.D. thesis of R. G.-V. from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

¹ To whom correspondence should be addressed: Dept. de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico. Tel.: 52-55-5622-56662; Fax: 52-55-5622-5630; E-mail: xperez@ifc.unam.mx.

² The abbreviations used are: CcO, cytochrome *c* oxidase; BN-PAGE, blue-native gel electrophoresis; TA, translational activator; Tricine, N-[2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl]glycine; CS, citrate synthase.

The Cox1 C-terminal end regulates CcO biogenesis

and subunits Cox4, Cox5, Cox6, and Cox8 (4, 6). In these sub-assembly complexes, Shy1, Ssc1, and Cox15 are also present (23–25). Progression of CcO assembly promotes release of Mss51 and Ssc1 from the COA complexes (24, 26), making Mss51 available for further translational activation. At this point, Pet54 is required to render Mss51 competent for efficient translational activation of the *COX1* mRNA (27). If CcO assembly is blocked, then Cox1 synthesis decreases because Mss51 is sequestered in the COA complexes and thus is unavailable for translational activation (21, 26).

Interaction of the translational activator/assembly factor Mss51 with COA complexes is stabilized by Cox14 and Coa3. Elimination of these factors disrupts the assembly-mediated down-regulation of Cox1 synthesis (21, 26, 28, 29). We previously demonstrated that deletion of the last 11 or 15 C-terminal residues of Cox1 also disrupted the assembly-mediated regulation of Cox1 synthesis, but not the assembly of active CcO. In the *cox1* truncation mutants, the interaction of Mss51 with Cox14 was reduced (30), indicating that, together with Cox14 and Coa3, the Cox1 C-terminal residues are necessary for normal sequestration of Mss51 in COA complexes for assembly-mediated regulation of Cox1 synthesis. In the present study, we examined the effects of site-directed mitochondrial mutations affecting conserved residues near the Cox1 C terminus and identified several that have functional importance. We found that this region of Cox1 was not only essential for assembly-mediated regulation of Cox1 synthesis, but also for supercomplex formation and/or stability. The Cox1 C-terminal end is important to stall supercomplex formation/stability when CcO assembly is blocked. Our results point to important participation of the hydrophilic Cox1 C-terminal domain in regulation of CcO biogenesis.

Results

Mutations P521A/P522A and V524E on the Cox1 C-terminal end disrupt Cox1 synthesis regulation

We previously demonstrated that in site-directed mitochondrial mutants lacking the last 15 or 11 residues of Cox1, there was no assembly-mediated regulation of Cox1 synthesis. In contrast, deletion of the last 5 residues did not affect the Cox1 assembly-feedback regulatory loop (30). An alignment of the last 15 residues of *S. cerevisiae* Cox1 with those of several fungi and mammals revealed that at least Pro-521, Pro-522, His-525, Phe-527, and Pro-530 are conserved in fungi and mammals, despite the fact that their deletion does not prevent respiratory growth of yeast (Fig. 1A). To ask whether these residues have a role in the Cox1 C-terminal regulatory function, we integrated into mtDNA *COX1* genes encoding the double mutation P521A/P522A or the single point mutations H525A, F527A, and P530A. In addition, we mutated V524E, which is partially conserved in fungi. None of these mutations affected the steady-state levels of Cox1, Cox2, or Cox3 (Fig. 1B) or growth on non-fermentable medium (Fig. 1C) compared with wild type. Spectrophotometric determination of complex IV activities indicated that all of the Cox1 mutants had activity similar to that of the strain carrying wild-type Cox1, with the exception of the Cox1ΔC15 mutant, which retained 30% CcO activity.

Complex III activities were similar in all Cox1 mutants and wild-type Cox1 (Fig. 1D).

To test whether the Cox1 missense mutations affected the assembly-mediated regulation of Cox1 synthesis, we disrupted CcO assembly in the mutants by deletion of either the Cox4 CcO subunit or Pet111, translational activator of the mitochondrially encoded *COX2* mRNA (31). Mitochondrial translation products were pulse-labeled in whole cells with [³⁵S]methionine in the presence of cycloheximide, and the products were detected by SDS-PAGE and autoradiography. As expected, wild-type Cox1 labeling decreased upon deletion of *cox4* (Fig. 2A) and *pet111* (Fig. 2B). In agreement with previous observations, synthesis of truncated Cox1ΔC15 was not reduced by either the *pet111* or *cox4* deletions (30). Interestingly, the double *COX1* missense mutant P521A/P522A and the single mutant V524E also prevented any reduction in Cox1 synthesis when CcO assembly was disrupted by *cox4* or *pet111* deletions. In contrast, Cox1 mutants H525A, F527A, and P530A did not affect assembly-mediated regulation of Cox1 synthesis because deletion of *cox4* or *pet111* decreased labeling of those Cox1 variants. These results suggest that the Cox1 residues Pro-521 and/or Pro-522, as well as Val-524, promote interactions required for sequestration of the translational activator/assembly factor Mss51 in COA complexes.

The Cox1 P521A/P522A and V524E mutants reduce interaction of Mss51 with the COA complexes

Mss51 sequestration in the COA complexes depends upon interactions with Cox14 that occur when Cox1 is newly synthesized (1, 21, 26). The Cox1ΔC15 mutation compromises the interaction between Mss51 and Cox14, as detected by co-immunoprecipitation (30), making free Mss51 more abundant to promote *COX1* mRNA translation (27, 32). We therefore investigated whether binding of Mss51 to Cox14 and other components of the COA complexes was similarly compromised in our Cox1 missense mutants. Mss51 and Cox14 in the mutant strains were tagged with triple hemagglutinin (Mss51-HA) or triple c-MYC (Cox14-Myc) epitopes at their C-terminal ends, respectively. The addition of these epitopes did not affect respiratory growth (data not shown). Purified mitochondria carrying wild-type Cox1, Cox1ΔC15, or the Cox1 missense proteins were solubilized with 0.5% dodecyl maltoside. Mss51-HA was immunoprecipitated from the resulting extracts, and co-precipitated proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. As reported previously (30), the co-precipitation of Mss51-HA and Cox14-Myc decreased in the Cox1ΔC15 mutant as compared with Cox1 wild type (Fig. 3A). In addition, interaction of Mss51-HA with Coa3 was also reduced. The missense mutations P521A/P522A and V524E similarly reduced the interactions of Mss51-HA with Cox14-Myc and Coa3 (Fig. 3A). In contrast, the H525A Cox1 mutation, which does not affect assembly-mediated regulation of Cox1 synthesis (Fig. 2), did not reduce co-precipitation of Mss51 with Cox14-Myc, Cox1, or Coa3 (Fig. 3A). We also immunoprecipitated Cox14-Myc from the mitochondrial extracts and analyzed the presence of co-precipitated Mss51-HA, Cox1, and Coa3. As

F1

AQ: B

F2

AQ: C

F3

The Cox1 C-terminal end regulates CcO biogenesis

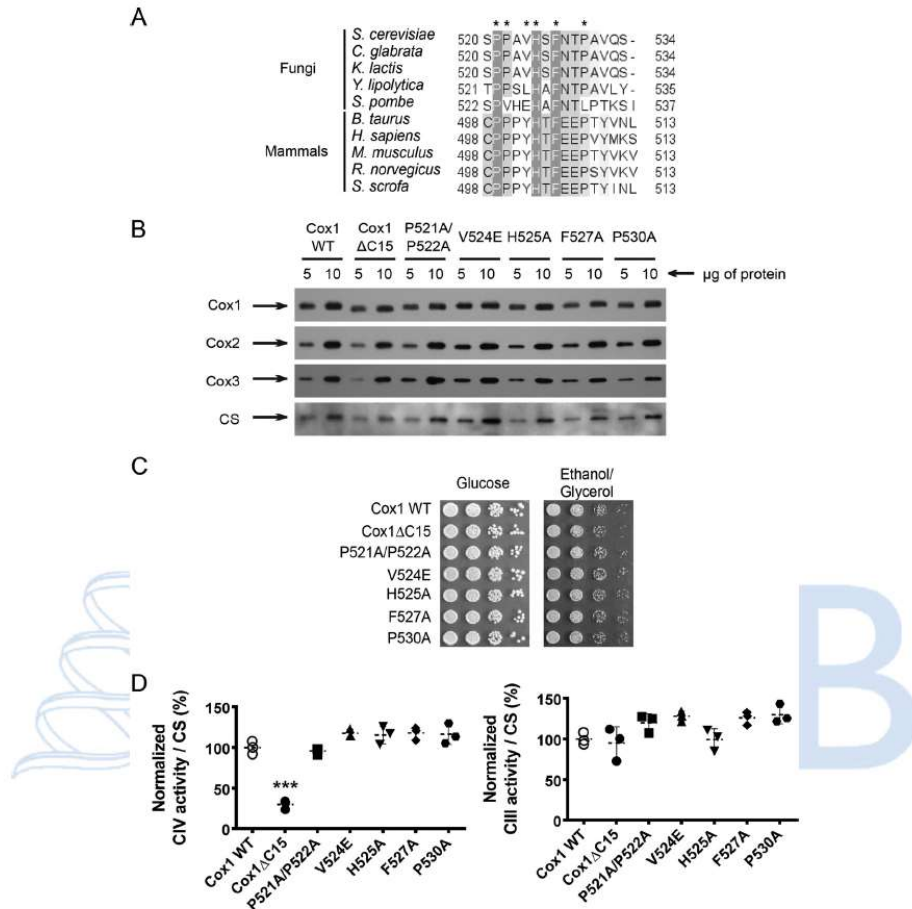


Figure 1. Cox1 C-terminal end mutations do not affect CcO activity. A, alignment of the last 15 residues from *S. cerevisiae* Cox1 with fungal and mammal Cox1 homologues. The alignment was obtained using the Jalview version 2.8.0b1 software (56). Dark gray boxes, highly conserved residues; light gray boxes, partially conserved residues. Asterisks show the amino acids that were mutated in the present study. Numbers indicate position of the last 15 residues of Cox1 in each species. B, mitochondria from wild type and the Cox1 mutants were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using the indicated antibodies. C, 10-fold serial dilutions from wild type and Cox1 mutants were spotted in complete medium with either glucose or ethanol/glycerol. The plates were incubated for 3 days at 30 °C. D, spectrophotometric measurements of complex IV and complex III activities from mitochondria carrying the indicated Cox1 mutations were normalized to the activity of CS. Statistical significance was determined by one-way analysis of variance and Dunnett's test for multiple comparisons with the WT values (***, $p < 0.001$; $n = 3$ independent assays) using Prism version 6 software. Error bars, S.D.

AQ: O
AQ: P

expected, only Cox1ΔC15, Cox1 P521A/P522A, and Cox1 V524E caused decreased interactions with Mss51-HA, Cox1, or Coa3 (Fig. 3B).

Mss51 molecules are present in distinct complexes within mitochondria that are distinguishable by blue-native gel electrophoresis (BN-PAGE) and sedimentation velocity (24, 27, 29, 33, 34). Mss51 is detected in high-molecular-weight COA complexes that correspond to Cox1 assembly intermediates. Mss51 is also detected in lower-molecular-weight complexes that correspond to the translational activator (TA) form of the protein. If the Cox1 missense mutations P521A/P522A and V524E dis-

rupt assembly-mediated regulation of Cox1 synthesis by reducing sequestration of Mss51 in COA complexes, then mutant mitochondria should contain elevated levels of the lower-molecular-weight TA Mss51 complex relative to wild type. To test this idea, we solubilized mitochondria from the different Cox1 mutants with 1% digitonin and then analyzed the extracts by BN-PAGE and Western blotting. Under these conditions, Mss51 co-migrated with high-molecular-weight COA complexes of ~250–450 kDa, whereas the translational activator form migrated at ~120–180 kDa. Mitochondria carrying the Cox1ΔC15, P521A/P522A, and V524E alleles showed elevated

The Cox1 C-terminal end regulates CcO biogenesis

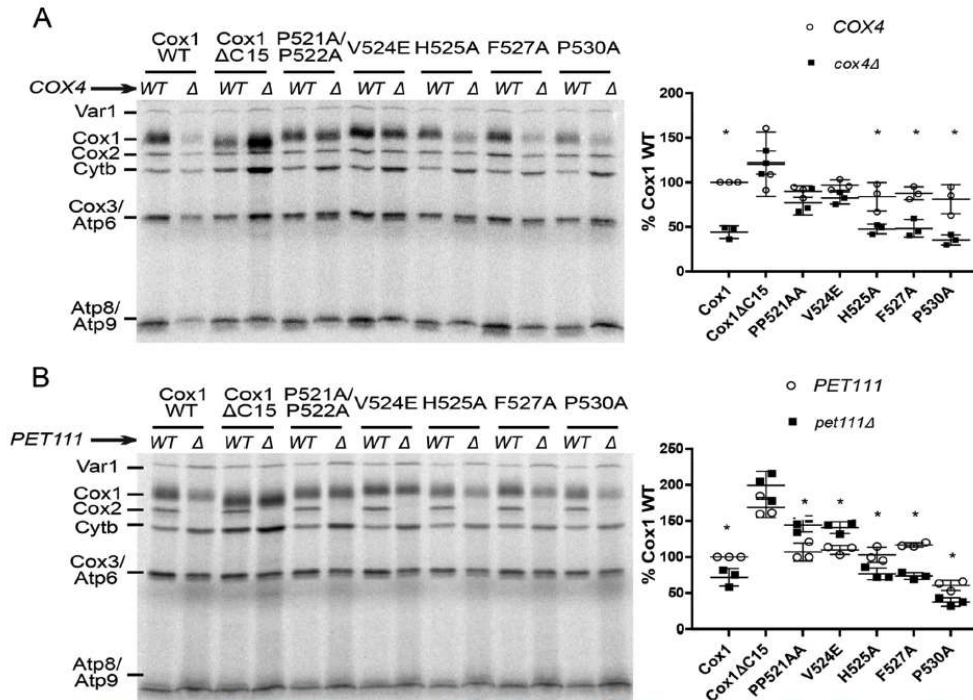


Figure 2. Mutations Cox1ΔC15, Cox1-P521A/P522A, and Cox1-V524E are important for assembly feedback regulation of Cox1 synthesis. A and B, cells carrying either wild-type or mutated Cox1 were pulse-labeled with [³⁵S]methionine in the presence of cycloheximide. The Cox1 variants were combined with either *cox4Δ* (A) or *pet111Δ* (B) mutations, as indicated. Translation products were separated by SDS-PAGE and analyzed by autoradiography. Cox1 labeling intensity is shown at the right side of each panel. It was quantified using the ImageJ software and normalized to the Cox3/Atp6 (ATPase subunit 6) signal. Labeling intensity was expressed as a percentage of the wild-type Cox1 signal. Error bars, S.D. from three independent experiments. We also compared the signals of Cytb and Var1 (ribosomal protein) to the Cox3/Atp6 signal, showing that the observed pattern in A and B is specific for Cox1 (data not shown). The relevant significant differences between strains (*) were determined by Student's t test. A p value of < 0.01 was considered statistically significant.

accumulation of Mss51 in the translational activator form, although Mss51 in COA complexes was also detected. In contrast, mitochondria carrying H525A, F527A, or P530A Cox1 alleles showed distribution of Mss51 complexes similar to that of mitochondria bearing the wild-type Cox1 protein (Fig. 3C). When the same blot was decorated with antibodies against Cox1, respiratory supercomplexes were evident in strains carrying either wild-type or mutant Cox1 proteins, suggesting that supercomplex formation is not affected by impairing the assembly-mediated regulation. An improved separation of supercomplexes by BN-PAGE indicated that in the Cox1ΔC15 mutant, the supercomplex III₂/IV is enriched as compared with mitochondria carrying wild-type Cox1, suggesting that in this mutant supercomplex III₂/IV₂ formation/stability is compromised. Mitochondria from Cox1-P521A/P522A and Cox1-V524E mutants also showed accumulation of supercomplex III₂/IV, but to a lesser extent (Fig. 3D).

AQ: D

AQ: E

CcO assembly mutants overaccumulate Mss51 in the COA complexes and underaccumulate Mss51 in translational activator form, decreasing the rate of Cox1 synthesis (24, 27, 29, 33, 34). We examined the distribution of Mss51 in the Cox1 point

mutants when CcO assembly was blocked by deletion of Pet111 (causing the absence of Cox2). As expected, disrupting CcO assembly in mitochondria containing wild-type Cox1 caused Mss51 to overwhelmingly accumulate in COA complexes, whereas the translational activator form was barely detectable (Fig. 3E). In contrast, disrupting CcO assembly in mitochondria containing Cox1ΔC15 did not prevent accumulation of the translational activator form of Mss51. The Mss51 translational activator form was also enriched in the absence of assembly by the Cox1 missense mutations P521A/P522A and V524E, albeit to a lesser extent. Taken together, these data indicate that Cox1ΔC15, Cox1-P521A/P522A, and Cox1-V524E mutations compromise the association of Mss51 with the COA complexes when CcO assembly is blocked. Moreover, because the Cox1 mutants affect Cox1 synthesis similarly to Cox1ΔC15, our data suggest that the lower levels of translational activator Mss51 are sufficient to support normal synthesis of Cox1. This conclusion is consistent with the finding that overall levels of Mss51 are not strongly rate-limiting for expression of a reporter gene inserted in the *COX1* locus (21).

The Cox1 C-terminal end regulates CcO biogenesis

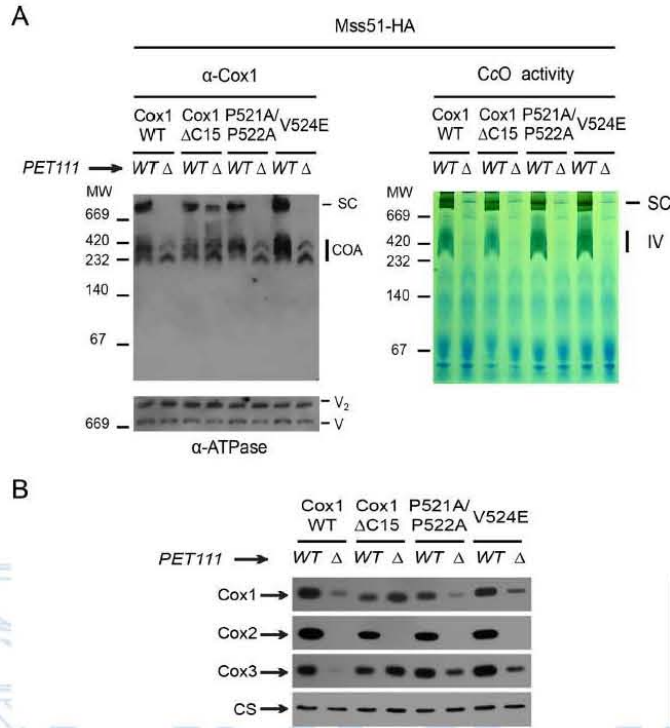


Figure 4. In the absence of *Pet111*, *Cox1ΔC15* led to formation of a supercomplex-like band in BN-PAGE. *A*, digitonin-solubilized mitochondria from wild type and *Cox1* mutants carrying either wild-type *PET111* (WT) or a *pet111Δ* mutation (Δ) were separated by BN-PAGE (5–13%) as in Fig. 3. In parallel, a second BN gel was stained for CcO activity using diaminobenzidine and cytochrome *c* (right). The monomeric form of active CcO is indicated (IV). *B*, mitochondria from *A* were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using the indicated antibodies. CS was used as a loading control.

F4

Cox1 variants showed the presence of high-molecular-weight bands associated with III₂/IV and III₂/IV₂ supercomplexes (Fig. 4A). Additional bands corresponding to COA complexes and the assembled CcO enzyme (200–450 kDa) were also detected. Therefore, assembly-mediated regulation of *Cox1* synthesis is not necessary for respiratory supercomplex formation.

As expected, disruption of CcO assembly by a *pet111Δ* mutation prevented the accumulation of supercomplexes in otherwise wild-type mitochondria, as well as in those containing missense variants of *Cox1* (Fig. 4A). Surprisingly, however, disruption of CcO assembly in mitochondria containing the truncated *Cox1ΔC15* protein did not prevent accumulation of a

high-molecular-weight species exhibiting similar size as normal supercomplexes. This supercomplex-like band was consistently observed in extracts of *Cox1ΔC15* mitochondria, but not in extracts of wild-type *Cox1* or *Cox1*-P521A/P522A mitochondria. In some repeats of this experiment, a faint supercomplex-like band was also visible in *Cox1*-V524E mitochondria. As expected, CcO assembly-competent (*PET111*) mitochondria exhibited CcO enzymatic activity, whereas the *pet111Δ* mutants did not (Fig. 4A, right).

Formation of the observed aberrant high-molecular-weight complex could be promoted if C-terminal truncation of *Cox1* makes it unusually stable in the absence of CcO assembly.

AQ F

Figure 3. The interaction between *Mss51* and the COA complexes decreased in the *Cox1*-P521A/P522A, *Cox1*-V524E, and *Cox1ΔC15* mutants. *A*, mitochondria (500 μg of proteins) from wild type and the *Cox1* mutants were solubilized with dodecyl maltoside and incubated with an antibody against HA epitope to immunoprecipitate *Mss51*-HA. A strain without HA tag in *Mss51* was used as a negative control. The total and immunoprecipitated (IP) fractions were separated by SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane for Western blotting analysis with the indicated antibodies. Total fractions represent 3% of the mitochondrial extract, whereas all immunoprecipitated protein was loaded onto the gel. *B*, mitochondrial proteins from wild type or *Cox1* mutants were analyzed as in *A*, but an antibody against Myc was used to immunoprecipitate *Cox14*-Myc. *C*, digitonin-solubilized mitochondria from WT and *Cox1* mutants were separated by BN-PAGE (5–13%) and transferred to a PVDF membrane for Western blotting analysis with antibodies against HA epitope (α -HA) or *Cox1* (α -*Cox1*). An antibody against ATP synthase was used as loading control (*V* and *V*₂). Bands corresponding to supercomplexes (SC), COA complexes containing *Cox1*, and the translational active form of *Mss51* (*T4*) are indicated. All strains carried the *Mss51*-HA variant. *D*, mitochondria from *C* were separated by a BN-PAGE (4–12%) to resolve supercomplexes III₂/IV₂ and III₂/IV. The separated proteins were analyzed by Western blotting using antibody against *Cox1* and by CcO in-gel activity. *E*, digitonin-solubilized mitochondria from WT and *Cox1* mutants bearing wild-type *PET111* or a *pet111Δ* mutation were separated by BN-PAGE and analyzed as in *C*.

The Cox1 C-terminal end regulates CcO biogenesis

Steady-state accumulation of the mitochondrially encoded CcO subunits was analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. The truncated Cox1ΔC15 protein was indeed present at higher levels than wild-type Cox1, Cox1-P521A/P522A, or Cox1-V524E when assembly was disrupted by the *pet111Δ* mutation (Fig. 4B). Interestingly, the accumulation of unassembled Cox3 was also increased in mitochondria containing Cox1ΔC15 and, to a lesser extent, Cox1-P521A/P522A or Cox1-V524E, compared with wild-type Cox1.

F5
AQ: G To test whether the aberrant supercomplex-like species actually contain respiratory complex III (the *bc₁* complex), we removed cytochrome *b* by deleting the *COB* mRNA-specific translational activator *Cbs2* (35). Mitochondrial extracts were prepared from *pet111Δ* and *pet111Δ/cbs2Δ* double mutants containing either wild-type Cox1 or Cox1ΔC15 and subjected to BN-PAGE. Blots were probed with antibodies against Cox1 or cytochrome *b* (Fig. 5A). Respiratory supercomplexes III₂/IV and III₂/IV₂ containing either wild-type Cox1 or Cox1ΔC15 were detected using both antibodies when assembly of complexes III and IV was allowed to occur (*PET111*, *CBS2*). As expected, the supercomplexes containing wild-type Cox1 disappeared when assembly was disrupted by *pet111Δ* or *pet111Δ/cbs2Δ* mutations. The aberrant supercomplex-like species containing Cox1ΔC15 that formed in the absence of CcO assembly (*pet111Δ*) co-migrated with a species containing cytochrome *b* and disappeared when cytochrome *b* synthesis was prevented (*cbs2Δ*), strongly suggesting that it contains complex III in addition to unassembled subunits of CcO, complex IV. To rule out the possibility that the aberrant supercomplex-like species form as a direct result of the absence of Pet111 rather than the absence of Cox2, we also analyzed a Cox1ΔC15 mutant bearing a mitochondrial *cox2* deletion (*cox2-62* allele (36)). We obtained similar results with *cox2-62* mutants, indicating that the presence of the supercomplex-like band is due to the lack of Cox2 rather than the lack of Pet111 itself (data not shown; Fig. 5C).

AQ: H We further investigated the composition of the aberrant supercomplex-like species using a second Tricine-SDS-PAGE dimension after BN-PAGE. To detect Rcf1, the chaperone involved in supercomplex assembly, we transformed cells with a plasmid carrying Rcf1-His₆-HA₃ (9). Wild-type mitochondria showed clear co-migration of CcO subunits (Cox1, Cox2, and Cox3), complex III subunits (cytochrome *b*, cytochrome *c*₁, core 1, and Rip1), and Rcf1 in supercomplexes (Fig. 5B). When CcO assembly of mitochondria carrying Cox1ΔC15 was disrupted by the *cox2-62* allele, a small fraction of cytochrome *b*, cytochrome *c*₁, and core 1 subunits co-migrated with the aberrant supercomplex-like species, together with Cox3, Cox1ΔC15, and Rcf1 (Fig. 5C). These results further support the hypothesis that the high-molecular-weight band containing Cox1ΔC15 but lacking Cox2 is an aberrant supercomplex. Rip1, however, was not observed on aberrant supercomplexes, suggesting that the *bc₁* complex is not fully assembled on these species. Alternatively, the observed high-molecular-weight complexes could represent genuine intermediates in supercomplex assembly that accumulate as a result of the combined deletion of the Cox1 C-terminal end and Cox2.

Cox3 is required for the formation/stability of the aberrant supercomplexes containing Cox1ΔC15

Each mitochondrially encoded CcO subunit interacts with a subset of cytoplasmic subunits to form intermediate preassembly modules (4, 6). In addition, Cox3 physically interacts with Rcf1, a factor that participates in formation of III₂/IV and III₂/IV₂ supercomplexes (6, 9–11). Indeed, Rcf1 interacts with newly synthesized Cox3, probably before assembly (6, 10). Thus, we investigated whether Cox1ΔC15 could induce formation of aberrant supercomplexes in the absence of Cox3. To remove Cox3, we deleted *Pet122*, one of the *COX3* mRNA-specific translational activators (37, 38). We also deleted the Cox4 subunit, which is proposed to interact with either the Cox1 or Cox3 modules (4, 6). Analysis of mitochondrial extracts by BN-PAGE revealed that the aberrant supercomplex containing Cox1ΔC15 failed to accumulate in the absence of Cox3 but did accumulate in the absence of Cox4 (Fig. 6). These data suggest that Cox3 is essential for the formation of aberrant supercomplexes in the Cox1ΔC15 mutant.

Cox1 hemylation is necessary for formation of aberrant supercomplexes

F7 We investigated whether the addition of heme a to Cox1 was necessary for formation of aberrant supercomplexes. We eliminated Cox15, a chaperone necessary for heme a synthesis (39, 40), from cells carrying either wild-type Cox1, Cox1-P521A/P522A (both strains are controls of cells unable to form aberrant supercomplexes), or Cox1ΔC15. Digitonin-solubilized mitochondrial extracts were analyzed by BN-PAGE and Western blotting. Only trace amounts of aberrant supercomplexes were detectable in the *cox15Δ*, Cox1ΔC15 strain (Fig. 7A), indicating that hemylation of Cox1 is a requisite to form/stabilize these complexes. This observation could result from the low levels of Cox1 in the absence of Cox15, making it difficult to detect in supercomplexes (Fig. 7B). Interestingly, Cox1ΔC15, *cox15Δ* mitochondria accumulated slightly higher levels of Cox3 compared with Cox1, *cox15Δ* mitochondria (Fig. 7B). This is reminiscent of the observation in Fig. 4B, where Cox3 accumulates in Cox1ΔC15, *pet111Δ* mitochondria. This result suggests that even when Cox1ΔC15 drives accumulation of Cox3, hemylation is necessary to form/stabilize aberrant supercomplexes.

Hemylated Cox1 intermediaries produce pro-oxidant species that result in cell sensitivity to H₂O₂. The peroxide sensitivity is reduced by deletion of Cox1 or inhibition of Cox1 hemylation (16). To test whether Cox1ΔC15 present in aberrant supercomplexes is hemylated, we analyzed the peroxide sensitivity of a strain with the *cox2-62* mutation, which drives the formation of aberrant supercomplexes (Cox1ΔC15, *cox2-62*). This strain was sensitive to 3 mM peroxide, whereas cells carrying Cox1ΔC15 with wild-type *COX2* were resistant (Fig. 7C). Moreover, Cox1ΔC15, *cox2-62* cells were equally sensitive to H₂O₂ when compared with a strain carrying wild-type Cox1 and *cox2-62*. As expected, when Cox15 was deleted from these strains, peroxide resistance increased. Together, these results indicate that Cox1 hemylation is necessary for formation of aberrant supercomplexes and that hemylated Cox1ΔC15 is present in these supercomplexes.

The Cox1 C-terminal end regulates CcO biogenesis

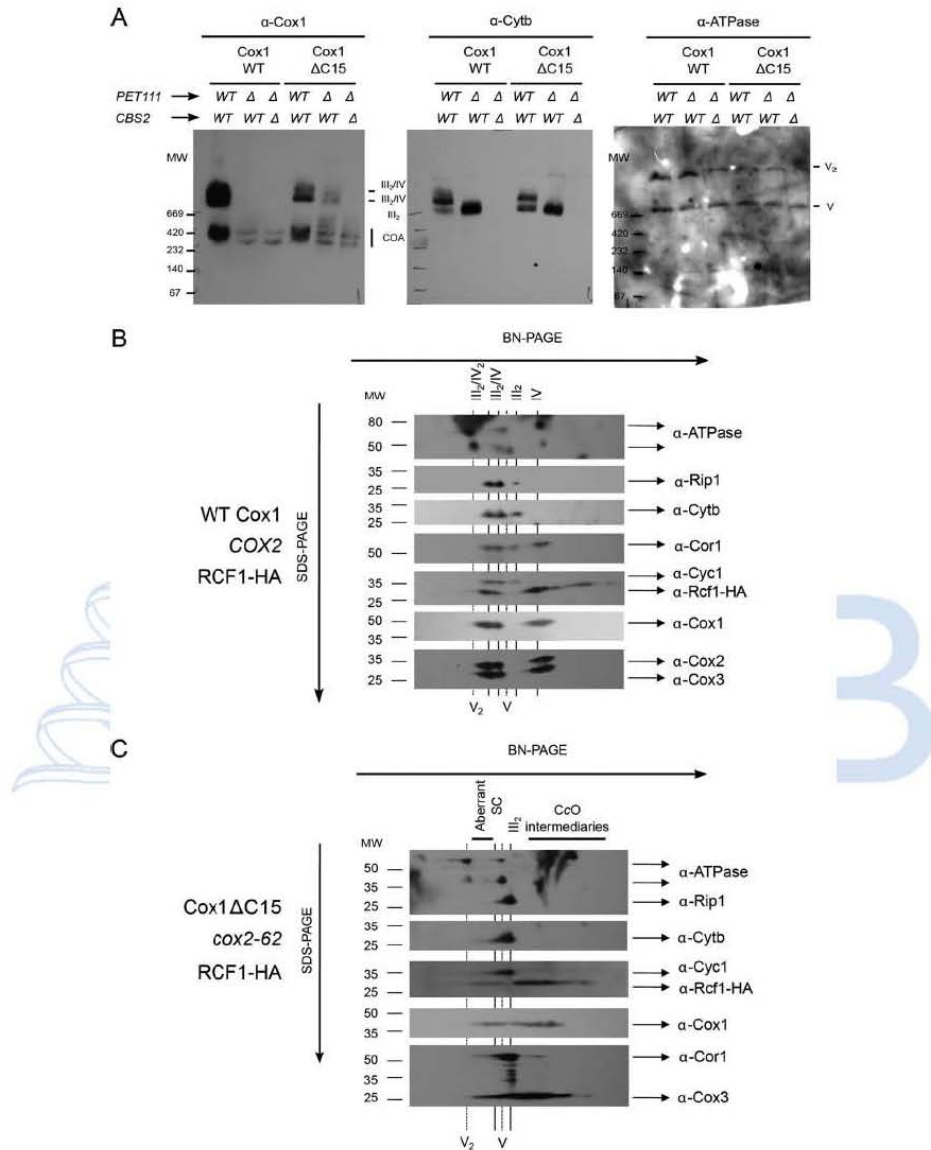


Figure 5. Cox1ΔC15-induced formation of non-functional, bc₁ complex-dependent supercomplexes in the absence of Cox2. A, digitonin-solubilized mitochondria of WT, *pet111Δ*, or *pet111Δ/cbs2Δ* mutants containing Cox1 or Cox1ΔC15 were separated by BN-PAGE (4–12%) and analyzed by Western blotting using antibodies against Cox1 (α-Cox1), cytochrome b (α-Cytb), or ATP synthase. Supercomplexes III₂/IV₂ and III₂/IV are indicated. B, mitochondria from cells carrying wild-type Cox1, COX2, and a plasmid encoding Rcf1 fused to His₆ and HA₃ (9) were solubilized with digitonin and separated by BN-PAGE (4–12%). A lane of this gel was further resolved by 2D Tricine-SDS-PAGE (12%) and analyzed by Western blotting with the indicated antibodies. C, mitochondria of *cox2-62* cells containing Cox1ΔC15 and Rcf1-His₆-HA₃ were analyzed as in B.

Discussion

Newly synthesized Cox1 plays a central role in the assembly of yeast CcO (3–6), and its synthesis is coupled to assembly at the level of translation (21, 26). CcO assembly and its incorpo-

ration into respiratory chain supercomplexes are highly regulated processes that involve a plethora of factors (1, 13–15, 41, 42). In this study, we have examined the effects of altering the sequence of Cox1 C-terminal amino acids on the regulation of

The Cox1 C-terminal end regulates CcO biogenesis

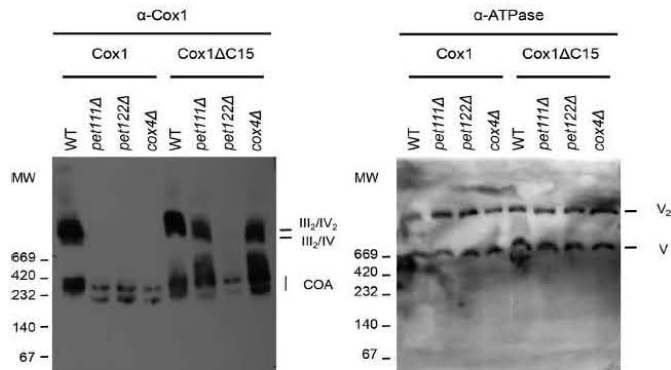


Figure 6. Supercomplex-like bands induced by Cox1ΔC15 are absent in *pet122Δ* (and thereof *Cox3* deletion) but present in *cox4Δ* mutants. Digitonin-solubilized mitochondria of *pet111Δ*, *pet122Δ*, and *cox4Δ* cells containing either Cox1 or Cox1ΔC15 were separated by BN-PAGE (4–12%) and analyzed by immunoblotting with a Cox1 antibody. ATPase antibodies were used to detect complex V as loading control.

its own synthesis, its stability, and the incorporation of CcO into supercomplexes.

We previously demonstrated that deletion of the last 15 residues of the yeast Cox1 C terminus does not prevent assembly of active CcO, as judged by respiratory growth of the mutant, despite the fact that this region includes a number of residues that are highly conserved among fungi and mammals (30). Because these residues do not appear to be critical for function *per se*, it is likely that these C-terminal Cox1 residues play regulatory roles that confer selective advantage. Indeed, deletion of the last 15 Cox1 residues does impair assembly-mediated regulation of Cox1 synthesis in yeast. Furthermore, this region of the protein is required for a stable association of the translational activator Mss51 with the COA assembly-intermediate complexes during Cox1 biogenesis (30). In the present work, we explored the effects of mutations altering conserved amino acids in this region of Cox1. We identified at least two, and possibly three, missense mutations that similarly impaired regulation of Cox1 synthesis and association of Mss51 with COA complexes: P521A and/or P522A and V524E (Fig. 8 (I)). These mutations also increased the relative amounts of the translational activator form of Mss51, although the effect was less pronounced in the point mutants than in the Cox1ΔC15 truncation. However, mutations altering conserved residues Pro-530, His-525, and Phe-527 to alanine did not detectably alter the regulation of Cox1 synthesis. Thus, because prolines restrict the movement of polypeptide chains (43), it seems likely that Pro-521 and Pro-522 stabilize a conformation of newly synthesized Cox1 that nucleates association of Mss51 and other factors (21) in COA complexes. The nearby V524E mutation could similarly affect a binding structure or simply interfere sterically. In any event, conservation of these residue positions near the Cox1 C terminus in fungi and mammals may be due more to a role for this region in regulation of Cox1 synthesis and assembly than to function of the assembled enzyme.

Our experiments with the truncated Cox1, lacking the last 15 residues, have revealed new post-translational effects of this mutation, beyond the abrogation of assembly-mediated syn-

thesis control. First, deletion of C15 greatly increased the steady-state level of Cox1 under conditions where CcO assembly was blocked by a mutation that prevented Cox2 synthesis. This suggests that degradation of unassembled Cox1 is carried out by proteases that recognize the Cox1 C terminus in defective COA complexes. The increased level of Cox1 under these conditions does not appear to be due to loss of assembly-mediated regulation leading to an increase in Cox1 synthesis because the Cox1-P521A/P522A and Cox1-V524E variants did not have a dramatic effect on the steady-state levels of unassembled Cox1. Interestingly, the Cox1ΔC15 truncation also greatly increased the steady-state level of unassembled Cox3. Assembly of yeast CcO proceeds through parallel formation of three modules, each one containing a mitochondrially encoded subunit and a set of cytoplasmic subunits and chaperones (3–6). Our finding is consistent with the previous observation by others that the Cox1 module stabilizes the Cox3 module (6). The yeast Cox1 C-terminal end also triggers oligomerization of Cox10, the heme o synthase involved in Cox1 hemylation (32).

CcO containing wild-type Cox1 is assembled into respiratory supercomplexes with complex III (*bc₁*) (7, 8). We found that CcO containing truncated Cox1ΔC15 was also assembled into such supercomplexes. Interestingly, we observed that in mitochondria with Cox1ΔC15, the III₂/IV supercomplex accumulated, whereas the III₂/IV₂ supercomplex levels decreased when compared with wild-type mitochondria. This phenotype is similar to that of cells lacking Rcf1, a supercomplex assembly factor (9–11). Pull-down and immunoprecipitation experiments indicate that Cox1, directly or indirectly, interacts with Rcf1 (9–11), suggesting that deletion of the Cox1 C terminus could affect Rcf1 function. In otherwise wild-type cells, disruption of CcO assembly by removal of Cox2 prevented supercomplex formation. However, disruption of CcO assembly in mitochondria synthesizing truncated Cox1ΔC15 led to the accumulation of aberrant supercomplex-like species. Our data demonstrate that these aberrant complexes contain cytochrome *b* and do not form in its absence, indicating that they contain complex III that associates with preassembly modules of CcO containing

F8

AQ1

The Cox1 C-terminal end regulates CcO biogenesis

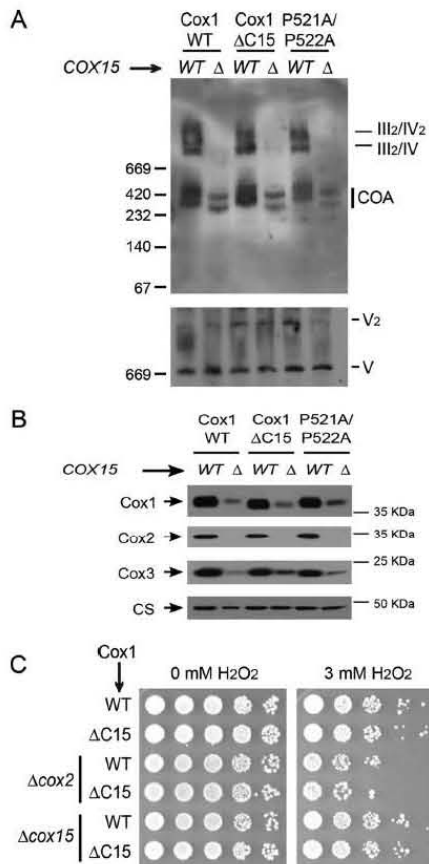


Figure 7. Formation of aberrant supercomplexes requires Cox1 hemylation. A, mitochondria from cells carrying wild-type Cox1, Cox1ΔC15, or Cox1-P521A/P522A and either *cox15Δ* or wild-type *COX15* were separated on BN-PAGE and analyzed as in Fig. 6. B, mitochondria from A were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using the indicated antibodies. CS was used as a loading control. C, cells carrying either the wild-type Cox1 or Cox1ΔC15 and either *cox2Δ* (allele *cox2-62* (36)) or *cox15Δ* were incubated with 3 mM H₂O₂ or were mock-treated. 10-fold serial dilutions were grown on YPD plates for 3 days at 30 °C.

Cox1ΔC15 and Cox3. Formation/stability of these aberrant supercomplexes requires hemylation of Cox1. Consistent with this observation, cells that produce the aberrant supercomplexes (Cox1ΔC15, *cox2-62*) are sensitive to hydrogen peroxide, suggesting that Cox1ΔC15 is hemylated. They also contain Cox3, which is stabilized by the truncated Cox1ΔC15, and do not form in its absence. We propose that the stabilization of unassembled Cox1ΔC15, caused by the C-terminal truncation, leads to aberrant accumulation of CcO preassembly modules in the absence of Cox2, which are then able to associate with complex III to form the aberrant supercomplex-like species we observed (Fig. 8 (2)).

The exact composition of the non-functional, aberrant supercomplexes remains to be determined, whereas it is possi-

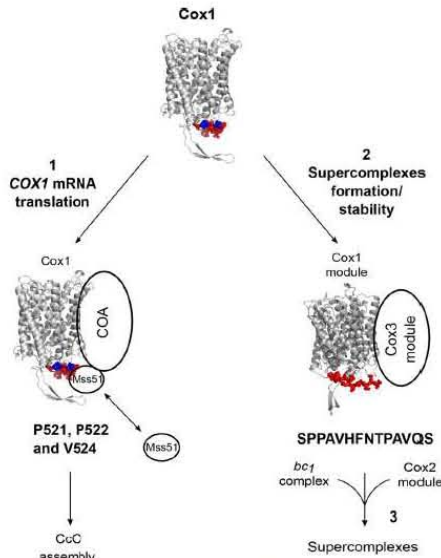


Figure 8. Model depicting the participation of the Cox1 C-terminal end in CcO biogenesis and supercomplex accumulation. A model of *S. cerevisiae* Cox1 was constructed with SWISS-MODEL (57) based on the crystallographic structure of bovine Cox1 (58). The last 15 residues of Cox1 are indicated in red. Pro-521, Pro-522, and Val-524 are indicated in blue. The last 15 Cox1 residues, and mainly Pro-521/Pro-522 and Val-524, regulate Cox1 synthesis by promoting association of Mss51 with the COA complexes (1). In addition, the whole Cox1 15-residue C terminus (with sequence SPPAVHFNTPAVQS), rather than Pro-521/Pro-522 and V524E is important to modulate accumulation of respiratory chain supercomplexes (2). According to our results, the Cox1 and Cox3 assembly modules can associate with *bc*₁ complex before the integration of the Cox2 module to form fully functional supercomplexes (3).

ble that the *bc*₁ dimer is not fully assembled in them. In our experiments, Rip1 was not detected in these complexes, but core 1 and cytochrome *c*₁ subunits were present, suggesting that *bc*₁ complex is not fully assembled. Indeed, *rip1Δ*, *qcr9Δ*, and *bcs1Δ* mutants accumulate a late-assembly intermediary of *bc*₁ complex, which can interact with assembled CcO to form non-functional supercomplexes (44). CcO assembly chaperones such as Shy1, Pet54, Cox14, Coa3, Cox11, and Cox16 interact with *bc*₁ subunits, probably during assembly of supercomplexes (11, 25, 29). Rcf1, which was present in the aberrant supercomplexes, facilitates formation or stabilization of III₂/IV and III₂/IV₂ supercomplexes and interacts with Cox3 (6, 9–11). This is in agreement with our observation that in the absence of Cox3, the Cox1ΔC15 mutant does not form aberrant supercomplexes, indicating that Cox3 is important for their formation. Thus, the assembly of CcO and *bc*₁ complexes may substantially be interconnected in wild type.

Our data indicate that the Cox1 and Cox3 preassembly modules are able to interact with the *bc*₁ complex in the absence of the Cox2 module (Fig. 8 (3)). Thus, it is possible that in wild type, the Cox2 module could integrate with partially assembled supercomplexes to complete the assembly of CcO. Consistent with this possibility, rapid interactions between newly synthesized pulse-labeled Cox1 and Cox3 are detectable, before inter-

The Cox1 C-terminal end regulates CcO biogenesis

Table 1
List of strains used in this study

All of these strains are congenic or isogenic to D273-10B. Mitochondrial genotypes are shown in parenthesis. ΔΣai refers to an intronless COX1 gene.

Strain	Genotype nuclear (mitochondrial)	Reference/source
LSR2	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, cov4Δ::LEU2 (ρ⁺, ΔΣai, COX1ΔC15)</i>	Ref. 30
TF258	<i>Mata, lys2, ura3-52 or Δ, his4-519, leu2-3, 112, MSS51::3xHA, COX14::3xMYC, (ρ⁺, ΔΣai)</i>	Ref. 21
TF272	<i>Mata, lys2, ura3-52 or Δ, his4-519, leu2-3, 112, MSS51::3xHA, COX14::3xMYC, (ρ⁺, ΔΣai, COX1ΔC15)</i>	Ref. 21
IPM49	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, pet122Δ::KANMX (ρ⁺, ΔΣai)</i>	Ref. 27
IPM57	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, pet122Δ::KANMX (ρ⁺, ΔΣai, COX1ΔC15)</i>	Ref. 27
YC146	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, cov4Δ::LEU2, (ρ⁺, ΔΣai)</i>	This work
YC151	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, cov4Δ::LEU2, (ρ⁺, ΔΣai, COX1ΔC15)</i>	This work
XPM51	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, cov4Δ::LEU2 (ρ⁺, ΔΣai)</i>	Ref. 30
XPM201	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, (ρ⁺, ΔΣai)</i>	Ref. 30
XPM202	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, his3::HindIII, (ρ⁺, ΔΣai, cox2-62)</i>	Ref. 30
XPM209	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, (ρ⁺, ΔΣai, COX1ΔC15)</i>	Ref. 30
XPM210	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, his3::HindIII, (ρ⁺, ΔΣai, COX1ΔC15, cox2-62)</i>	Ref. 30
XPM295	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, (ρ⁺, ΔΣai)</i>	Ref. 30
XPM298	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, (ρ⁺, ΔΣai, COX1ΔC15)</i>	Ref. 30
MS62	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, (ρ⁺, ΔΣai, COX1-P521A/P522A)</i>	This work
MS63	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, (ρ⁺, ΔΣai, COX1-V524E)</i>	This work
MS64	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, (ρ⁺, ΔΣai, COX1-H525A)</i>	This work
MS65	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, (ρ⁺, ΔΣai, COX1-F527A)</i>	This work
MS66	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, (ρ⁺, ΔΣai, COX1-P530A)</i>	This work
RGV22	<i>Mata, lys2, ura3-52 or Δ, his4-519, leu2-3, 112, MSS51::3xHA, COX14::3xMYC, (ρ⁺, ΔΣai, COX1-P521A/P522A)</i>	This work
RGV23	<i>Mata, lys2, ura3-52 or Δ, his4-519, leu2-3, 112, MSS51::3xHA, COX14::3xMYC, (ρ⁺, ΔΣai, COX1-V524E)</i>	This work
RGV24	<i>Mata, lys2, ura3-52 or Δ, his4-519, leu2-3, 112, MSS51::3xHA, COX14::3xMYC, (ρ⁺, ΔΣai, COX1-H525A)</i>	This work
RGV73	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, pet111Δ::URA3, (ρ⁺, ΔΣai)</i>	This work
RGV74	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, pet111Δ::URA3, (ρ⁺, ΔΣai, COX1ΔC15)</i>	This work
RGV75	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, (ρ⁺, ΔΣai, COX1-H525A)</i>	This work
RGV77	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, (ρ⁺, ΔΣai, COX1-P521A/P522A)</i>	This work
RGV78	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, (ρ⁺, ΔΣai, COX1-V524E)</i>	This work
RGV79	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, (ρ⁺, ΔΣai, COX1-F527A)</i>	This work
RGV80	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, (ρ⁺, ΔΣai, COX1-P530A)</i>	This work
RGV95	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, cov4Δ::LEU2, (ρ⁺, ΔΣai, COX1-P521A/P522A)</i>	This work
RGV96	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, cov4Δ::LEU2, (ρ⁺, ΔΣai, COX1-H525A)</i>	This work
RGV97	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, cov4Δ::LEU2, (ρ⁺, ΔΣai, COX1-F527A)</i>	This work
RGV98	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, cov4Δ::LEU2, (ρ⁺, ΔΣai, COX1-P530A)</i>	This work
RGV99	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, cov4Δ::LEU2, (ρ⁺, ΔΣai, COX1-V524E)</i>	This work
RGV101	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, pet111Δ::URA3, (ρ⁺, ΔΣai)</i>	This work
RGV102	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, pet111Δ::URA3, (ρ⁺, ΔΣai, COX1ΔC15)</i>	This work
RGV103	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, pet111Δ::URA3, (ρ⁺, ΔΣai, COX1-P521A/P522A)</i>	This work
RGV104	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, pet111Δ::URA3, (ρ⁺, ΔΣai, COX1-V524E)</i>	This work
RGV105	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, pet111Δ::URA3, (ρ⁺, ΔΣai, COX1-H525A)</i>	This work
RGV106	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, pet111Δ::URA3, (ρ⁺, ΔΣai, COX1-F527A)</i>	This work
RGV107	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, pet111Δ::URA3, (ρ⁺, ΔΣai, COX1-P530A)</i>	This work
RGV108	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, pet111Δ::URA3, (ρ⁺, ΔΣai, COX1-V524E)</i>	This work
RGV109	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, pet111Δ::URA3, (ρ⁺, ΔΣai, COX1-P521A/P522A)</i>	This work
RGV112	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, pet111Δ::URA3, cbs2Δ::KanMX4, (ρ⁺, ΔΣai)</i>	This work
RGV113	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, pet111Δ::URA3, cbs2Δ::KanMX4, (ρ⁺, ΔΣai, COX1ΔC15)</i>	This work
YCV163	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, cov15Δ::LEU2, (ρ⁺, ΔΣai, COX1-PP521AA)</i>	This work
YCV164	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, cov15Δ::LEU2, (ρ⁺, ΔΣai)</i>	This work
YCV165	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, cov15Δ::LEU2, (ρ⁺, ΔΣai, COX1ΔC15, cox2-62)</i>	This work

actions of Cox1 with Cox2 and interactions of Cox1 with cytochrome *b*, which exhibit similar kinetics (4). Interestingly, it was reported that a C-terminal deletion in the human Cox1 was able to assemble in CcO and to form supercomplexes, although these complexes were highly unstable because Cox1 was rapidly degraded (45). It is likely that the Cox1 C terminus is a key regulator of CcO biogenesis in different organisms. As demonstrated in the present work, this region of the protein contains signals that regulate formation/stability of supercomplexes, depending on the assembly state of the CcO.

Experimental procedures

Strains, media, and genetic methods

S. cerevisiae strains used in this study are congenic or isogenic to D273-10B (ATCC24657) and are listed in Table 1. Standard genetic procedures and recipes for media were as described elsewhere (46, 47). Complete fermentable media were YPD or YPGal (1% yeast extract, 2% Bacto-peptone, and 2% glucose or 2% galactose) or synthetic complete media (0.67% yeast nitrogen base, 2% glucose) lacking the indicated amino

acids. Non-fermentable medium was YPEG (1% yeast extract, 2% Bacto-peptone, 3% ethanol, and 3% glycerol). The nuclear deletion constructs with *URA3*, *LEU2*, or *KanMX4* were obtained by PCR. Plasmids containing the *cox1* point mutations were transformed by high-velocity microprojectile bombardment into the rho0 strain NAB69 (48). Transformants were selected by their ability to rescue respiratory growth when mated with the strain L74 carrying a G124D mutation in Cox1 (49). Transformants with the *cox1* mutant plasmids were mated with XPM10b (containing *cox1Δ::ARG8m* construct), and cytoductants were selected for their ability to grow in YEPG as haploids. Correct integration of the *COX1* constructs into mtDNA was confirmed by PCR and DNA sequencing.

Construction of cox1 mutant genes

The 3' half of the *COX1* coding region was amplified with primers that incorporated the mutations encoding P521A/P522A, V524E, H525A, F527A, or P530A. As template, we used plasmid xPXM57 containing the full-length, intronless *COX1* gene (30). These products were digested with NdeI and AflIII

The Cox1 C-terminal end regulates CcO biogenesis

and ligated into pXPM57 equally digested. Mutations were confirmed by PCR and DNA sequencing.

Analysis of mitochondrial proteins

Yeast cells were grown in YPGal to late exponential phase. Crude mitochondria were obtained by treating the cells with Zymolyase 20T or with glass bead disruption, as described elsewhere (50). Immunoprecipitation was performed as described previously (30). Briefly, mitochondria (500 μ g) were solubilized with 0.5% (w/v) dodecyl maltoside and centrifuged, and the cleared supernatant was incubated with anti-HA or anti-Myc antibodies coupled to protein A-Sepharose beads. Total (3% of sample) and immunoprecipitated fractions were separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane. Western blots were probed with antibodies against HA (Roche Applied Science), Myc (Roche Applied Science), Cox1, Coa3 (A. Barrientos), Cox2 (Mitosciences), Cox3 (Mitosciences), and citrate synthase. *In vivo* pulse labeling of cells or *in organello* labeling of crude mitochondria with [³⁵S]Methionine was performed as described previously (51). The radiolabeled proteins were separated by SDS-PAGE, and the gel was dried before analysis with a Typhoon 8600 PhosphorImager (GE Healthcare).

BN-PAGE and 2D Tricine-SDS-PAGE

BN-PAGE and 2D Tricine-SDS-PAGE were performed as described previously (52). The mitochondrial pellet (100 μ g of proteins) was resuspended in 50 μ l of sample buffer (750 mM 6-aminocaproic acid, 50 mM BisTris, pH 7, 1% digitonin) and centrifuged. The supernatant was loaded in either 5–13% or 4–12% polyacrylamide gradient gels. When indicated, BN-PAGE lanes were excised and separated by 2D Tricine-SDS-PAGE using 12% polyacrylamide gels. Gels were transferred to PVDF membranes and probed with antibodies against HA (Roche Applied Science), Cox1, Cox2 (Mitosciences), Cox3 (Mitosciences), Cytb, and ATPase (Diego González-Halphen). The high-mass protein markers were obtained from GE Healthcare. In-gel CcO activity was performed after BN-PAGE using 0.04% diaminobenzidine (Sigma-Aldrich) and 0.02% horse heart cytochrome *c* (Sigma-Aldrich) in phosphate buffer, pH 7.4 (53).

Spectrophotometric enzyme assays

Complex III and complex IV activities were determined by following the absorbance changes resulting from the reduction and oxidation of cytochrome *c*, respectively, at 550 nm ($\epsilon_{550\text{ nm}} = 18.5\text{ mm}^{-1}\text{cm}^{-1}$) in a SPECTRAMax PLUS384 microplate reader (Molecular Devices) according to Ref. 54. Briefly, complex III activities were measured in a buffer containing 25 mM potassium phosphate (pH 7.5), 75 μ M oxidized cytochrome *c* from horse heart, 0.1 mM EDTA, 1 mM sodium cyanide, and 10 μ g of protein/ml of mitochondrial membranes. The reaction was started with 100 μ M decylubiquinol. Complex IV activities were measured in a buffer containing 25 mM potassium phosphate (pH 7) and 50 μ M reduced cytochrome *c* from horse heart. The reaction was started by adding mitochondrial membranes to a final concentration of 10 μ g of protein/ml. Citrate synthase (CS) activity was measured at 412 nm ($\epsilon = 13.6\text{ mm}^{-1}\text{cm}^{-1}$) in a buffer containing 10 mM Tris-HCl (pH 8), 0.3 mM

acetyl-CoA, 0.1 mM 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid, 0.1% Triton X-100, and 10 μ g of protein/ml of mitochondrial membranes. The reaction was started with 0.5 mM oxaloacetate (55).

Peroxide sensitivity assays

Cells were grown overnight on YPD until exponential phase, at an A_{600} of 0.6. H₂O₂ was added to a 3 mM final concentration, and cultures (10 mg/ml of wet weight cell pellet) were incubated for 2 h at 30 °C with gentle agitation. Alternatively, mock-treated cells were incubated with H₂O and treated equally. Cells were washed with sterile water and plated on YPD in 10-fold serial dilutions for 2 days at 30 °C.

Author contributions—X. P.-M. conceived and coordinated the study, analyzed the results, and wrote the manuscript. R. G.-V. performed and analyzed the experiments from Figs. 1–7 and contributed to the writing of the manuscript. M. A. S.-V. and T. D. F. created the mitochondrial Cox1 point mutants. T. D. F. also contributed to the writing of the manuscript. Y. C.-V. constructed yeast strains, performed the experiment in Fig. 7C, and provided technical assistance for all of the experiments. A. C.-O. and S. U.-C. bioenergetically characterized the Cox1 mutants. All authors analyzed the results and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgments—We thank Luisa Sandoval-Romero, Jared Rutter, Gabriel del Río-Guerra, and Teresa Lara-Ortiz for the gift of yeast strains and plasmids; Miriam Vázquez-Acevedo, Liesbeth Wintjes Guadalupe Códiz-Huerta, Minerva Crespo-Ramírez, and Laura Ongay-Larios for technical assistance; Antoni Barrientos, Rosemary Stuart, and Diego González-Halphen for the gift of antisera; Prof. Dr. Ulrich Brandt for kindly sharing equipment; and Claudia Rivera-Cerecedo and Héctor Malagón-Rivero for technical assistance obtaining antisera.

References

- Mick, D. U., Fox, T. D., and Rehling, P. (2011) Inventory control: cytochrome *c* oxidase assembly regulates mitochondrial translation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 14–20
- Soto, I. C., Fontanesi, F., Liu, J., and Barrientos, A. (2012) Biogenesis and assembly of eukaryotic cytochrome *c* oxidase catalytic core. *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 883–897
- McStay, G. P., Su, C. H., Thomas, S. M., Xu, J. T., and Tzagoloff, A. (2013) Characterization of Cox1p assembly intermediates in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 288, 26546–26556
- McStay, G. P., Su, C. H., and Tzagoloff, A. (2013) Modular assembly of yeast cytochrome oxidase. *Mol. Biol. Cell* 24, 440–452
- McStay, G. P., Su, C. H., and Tzagoloff, A. (2013) Stabilization of Cox1p intermediates by the Cox14p-Coa3p complex. *FEBS Lett.* 587, 943–949
- Su, C. H., McStay, G. P., and Tzagoloff, A. (2014) The Cox3p assembly module of yeast cytochrome oxidase. *Mol. Biol. Cell* 25, 965–976
- Cruciat, C. M., Brunner, S., Baumann, F., Neupert, W., and Stuart, R. A. (2000) The cytochrome *bc*₁ and cytochrome *c* oxidase complexes associate to form a single supracomplex in yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* 275, 18093–18098
- Schägger, H., and Pfeiffer, K. (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* 19, 1777–1783
- Chen, Y. C., Taylor, E. B., Dephore, N., Heo, J. M., Tonhato, A., Papandreou, I., Nath, N., Denko, N. C., Gygi, S. P., and Rutter, J. (2012) Identification of a protein mediating respiratory supercomplex stability. *Cell Metab.* 15, 348–360
- Strogolova, V., Furness, A., Robb-McGrath, M., Garlich, J., and Stuart, R. A. (2012) Rcf1 and Rcf2, members of the hypoxia-induced gene 1 pro-

The Cox1 C-terminal end regulates CcO biogenesis

tein family, are critical components of the mitochondrial cytochrome *bc₁*-cytochrome *c* oxidase supercomplex. *Mol. Cell Biol.* 32, 1363–1373

11. Vukotic, M., Oeljeklaus, S., Wiese, S., Vögtle, F. N., Meisinger, C., Meyer, H. E., Zieseniss, A., Katschinski, D. M., Jans, D. C., Jakobs, S., Warscheid, B., Rehling, P., and Deckers, M. (2012) Rcf1 mediates cytochrome oxidase assembly and respirasome formation, revealing heterogeneity of the enzyme complex. *Cell Metab.* 15, 336–347
12. Pfeiffer, K., Gohil, V., Stuart, R. A., Hunte, C., Brandt, U., Greenberg, M. L., and Schagger, H. (2003) Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *J. Biol. Chem.* 278, 52873–52880
13. Levchenko, M., Wuttke, J. M., Römpler, K., Schmidt, B., Neifer, K., Juris, L., Wissel, M., Rehling, P., and Deckers, M. (2016) Cox26 is a novel stoichiometric subunit of the yeast cytochrome *c* oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1863, 1624–1632
14. Römpler, K., Müller, T., Juris, L., Wissel, M., Vukotic, M., Hofmann, K., and Deckers, M. (2016) Overlapping role of respiratory supercomplex factor Rcf2 and its N-terminal homolog Rcf3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 291, 23769–23778
15. Streckler, V., Kadeer, Z., Heidler, J., Cruciat, C. M., Angerer, H., Giese, H., Pfeiffer, K., Stuart, R. A., and Wittig, I. (2016) Supercomplex-associated Cox26 protein binds to cytochrome *c* oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1863, 1643–1652
16. Khalimonchuk, O., Bird, A., and Winge, D. R. (2007) Evidence for a pro-oxidant intermediate in the assembly of cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem.* 282, 17442–17449
17. Ott, M., Amunts, A., and Brown, A. (2016) Organization and regulation of mitochondrial protein synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 85, 77–101
18. Decoster, E., Simon, M., Hatat, D., and Faye, G. (1990) The MSS51 gene product is required for the translation of the COX1 mRNA in yeast mitochondria. *Mol. Gen. Genet.* 224, 111–118
19. Manthey, G. M., and McEwen, J. E. (1995) The product of the nuclear gene PET309 is required for translation of mature mRNA and stability or production of intron-containing RNAs derived from the mitochondrial COX1 locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14, 4031–4043
20. Perez-Martinez, X., Broadley, S. A., and Fox, T. D. (2003) Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. *EMBO J.* 22, 5951–5961
21. Perez-Martinez, X., Butler, C. A., Shingu-Vazquez, M., and Fox, T. D. (2009) Dual functions of Mss51 couple synthesis of Cox1 to assembly of cytochrome *c* oxidase in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Mol. Biol. Cell* 20, 4371–4380
22. Zamudio-Ochoa, A., Camacho-Villasana, Y., García-Guerrero, A. E., and Pérez-Martínez, X. (2014) The Pet309 pentatricopeptide repeat motifs mediate efficient binding to the mitochondrial COX1 transcript in yeast. *RNA Biol.* 11, 953–967
23. Bareth, B., Dennerlein, S., Mick, D. U., Nikolov, M., Urlaub, H., and Rehling, P. (2013) The heme a synthase Cox15 associates with cytochrome *c* oxidase assembly intermediates during Cox1 maturation. *Mol. Cell Biol.* 33, 4128–4137
24. Fontanesi, F., Soto, I. C., Horn, D., and Barrientos, A. (2010) Mss1 and Ssc1 facilitate translational regulation of cytochrome *c* oxidase biogenesis. *Mol. Cell Biol.* 30, 245–259
25. Mick, D. U., Wagner, K., van der Laan, M., Frazier, A. E., Perschil, I., Pawlas, M., Meyer, H. E., Warscheid, B., and Rehling, P. (2007) Shy1 couples Cox1 translational regulation to cytochrome *c* oxidase assembly. *EMBO J.* 26, 4347–4358
26. Barrientos, A., Zambrano, A., and Tzagoloff, A. (2004) Mss51p and Cox14p jointly regulate mitochondrial Cox1p expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 23, 3472–3482
27. Mayorga, J. P., Camacho-Villasana, Y., Shingú-Vázquez, M., García-Villagas, R., Zamudio-Ochoa, A., García-Guerrero, A. E., Hernández, G., and Pérez-Martínez, X. (2016) A novel function of Pet54 in regulation of Cox1 synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *J. Biol. Chem.* 291, 9343–9355
28. Fontanesi, F., Clemente, P., and Barrientos, A. (2011) Cox25 teams up with Mss51, Ssc1, and Cox14 to regulate mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 expression and assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 286, 555–566
29. Mick, D. U., Vukotic, M., Piechura, H., Meyer, H. E., Warscheid, B., Deckers, M., and Rehling, P. (2010) Coa3 and Cox14 are essential for negative feedback regulation of COX1 translation in mitochondria. *J. Cell Biol.* 191, 141–154
30. Shingú-Vázquez, M., Camacho-Villasana, Y., Sandoval-Romero, L., Butler, C. A., Fox, T. D., and Pérez-Martínez, X. (2010) The carboxyl-terminal end of Cox1 is required for feedback assembly regulation of Cox1 synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *J. Biol. Chem.* 285, 34382–34389
31. Poutre, C. G., and Fox, T. D. (1987) PET111, a *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene required for translation of the mitochondrial mRNA encoding cytochrome *c* oxidase subunit II. *Genetics* 115, 637–647
32. Khalimonchuk, O., Kim, H., Watts, T., Perez-Martinez, X., and Winge, D. R. (2012) Oligomerization of heme o synthase in cytochrome oxidase biogenesis is mediated by cytochrome oxidase assembly factor Coa2. *J. Biol. Chem.* 287, 26715–26726
33. Khalimonchuk, O., Bestwick, M., Meunier, B., Watts, T. C., and Winge, D. R. (2010) Formation of the redox cofactor centers during Cox1 maturation in yeast cytochrome oxidase. *Mol. Cell Biol.* 30, 1004–1017
34. Pierrel, F., Bestwick, M. L., Cobine, P. A., Khalimonchuk, O., Cricco, J. A., and Winge, D. R. (2007) Coa1 links the Mss51 post-translational function to Cox1 cofactor insertion in cytochrome *c* oxidase assembly. *EMBO J.* 26, 4335–4346
35. Rödel, G. (1986) Two yeast nuclear genes, CBS1 and CBS2, are required for translation of mitochondrial transcripts bearing the 5'-untranslated COB leader. *Curr. Genet.* 11, 41–45
36. Dunstan, H. M., Green-Willms, N. S., and Fox, T. D. (1997) *In vivo* analysis of *Saccharomyces cerevisiae* COX2 mRNA 5'-untranslated leader functions in mitochondrial translation initiation and translational activation. *Genetics* 147, 87–100
37. Kloeckener-Gruissem, B., McEwen, J. E., and Poyton, R. O. (1988) Identification of a third nuclear protein-coding gene required specifically for posttranscriptional expression of the mitochondrial COX3 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 170, 1399–1402
38. Brown, N. G., Costanzo, M. C., and Fox, T. D. (1994) Interactions among three proteins that specifically activate translation of the mitochondrial COX3 mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 14, 1045–1053
39. Barros, M. H., Carlson, C. G., Glerum, D. M., and Tzagoloff, A. (2001) Involvement of mitochondrial ferredoxin and Cox15p in hydroxylation of heme O. *FEBS Lett.* 492, 133–138
40. Glerum, D. M., Muroff, I., Jin, C., and Tzagoloff, A. (1997) COX15 codes for a mitochondrial protein essential for the assembly of yeast cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem.* 272, 19088–19094
41. Fontanesi, F., Soto, I. C., and Barrientos, A. (2008) Cytochrome *c* oxidase biogenesis: new levels of regulation. *IUBMB Life* 60, 557–568
42. Chaban, Y., Boekema, E. J., and Dudkina, N. V. (2014) Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation. *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 418–426
43. Kay, B. K., Williamson, M. P., and Sudol, M. (2000) The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J.* 14, 231–241
44. Cui, T. Z., Conte, A., Fox, J. L., Zara, V., and Winge, D. R. (2014) Modulation of the respiratory supercomplexes in yeast: enhanced formation of cytochrome oxidase increases the stability and abundance of respiratory supercomplexes. *J. Biol. Chem.* 289, 6133–6141
45. Hornig-Do, H. T., Tatsuta, T., Buckermann, A., Bust, M., Kollberg, G., Rötig, A., Hellmich, M., Nijtmans, L., and Wiesner, R. J. (2012) Nonsense mutations in the COX1 subunit impair the stability of respiratory chain complexes rather than their assembly. *EMBO J.* 31, 1293–1307
46. Burke, D., Dawson, D., and Stearns, T. (2000) *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
47. Guthrie, C., and Fink, G. R. (eds) (2002) *Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology*, Vol. 350, Academic Press, Inc., San Diego
48. Bonnefoy, N., Remacle, C., and Fox, T. D. (2007) Genetic transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Chlamydomonas reinhardtii* mitochondria. *Methods Cell Biol.* 80, 525–548
49. Meunier, B., Lemarre, P., and Colson, A. M. (1993) Genetic screening in *Saccharomyces cerevisiae* for large numbers of mitochondrial point mutations which affect structure and function of catalytic subunits of cytochrome-*c* oxidase. *Eur. J. Biochem.* 213, 129–135

AQ:N

The Cox1 C-terminal end regulates CcO biogenesis

50. Diekert, K., de Kroon, A. I., Kispal, G., and Lill, R. (2001) Isolation and subfractionation of mitochondria from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Cell Biol.* **65**, 37–51
51. Westermann, B., Herrmann, J. M., and Neupert, W. (2001) Analysis of mitochondrial translation products *in vivo* and *in organello* in yeast. *Methods Cell Biol.* **65**, 429–438
52. Wittig, I., Braun, H. P., and Schägger, H. (2006) Blue native PAGE. *Nat. Protoc.* **1**, 418–428
53. Wittig, I., Karas, M., and Schägger, H. (2007) High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Mol. Cell. Proteomics* **6**, 1215–1225
54. Spinazzi, M., Casarin, A., Pertegato, V., Salviati, L., and Angelini, C. (2012) Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nat. Protoc.* **7**, 1235–1246
55. Barrientos, A., Fontanesi, F., and Diaz, F. (2009) Evaluation of the mitochondrial respiratory chain and oxidative phosphorylation system using polarography and spectrophotometric enzyme assays. *Curr. Protoc. Hum. Genet. Genet.* 10.1002/0471142905.hg1903e63
56. Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M., Clamp, M., and Barton, G. J. (2009) Jalview version 2: a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **25**, 1189–1191
57. Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., and Peitsch, M. C. (2003) SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3381–3385
58. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., and Yoshikawa, S. (1996) The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* **272**, 1136–1144



2. Evolution of translation in mitochondria. García-Guerrero A.E., Zamudio-Ochoa A., Camacho-Villasana Y., **García-Villegas R.**, Reyes-Prieto A. and Pérez-Martínez X. *Evolution of the Protein Synthesis Machinery and Its Regulation* (pp. 109-142). Hernández, G., Jagus R. (Eds.) 2016. doi:10.1007/978-3-319-39468-8

3. Novel Function of Pet54 on Regulation of Cox1 Synthesis in Saccharomyces Cerevisiae Mitochondria. Mayorga, J. P., Camacho-Villasana, Y., Shingú-Vázquez, M., **García-Villegas, R.**, Zamudio-Ochoa, A., García-Guerrero, A. E., Hernandez, G., and Perez-Martinez, X. *J. Biol. Chem.* 2016 Apr 22;291(17):9343-55. doi: 10.1074/jbc.M116.721985

4. The cytosol-synthesized subunit II (Cox2) precursor with the point mutation W56R is correctly processed in yeast mitochondria to rescue cytochrome oxidase. Cruz-Torres V, Vázquez-Acevedo M, García-Villegas R, Pérez-Martínez X, Mendoza-Hernández G, González-Halphen D. *Biochim Biophys Acta.* 2012; Dec;1817(12):2128-39. doi: 10.1016/j.bbabi.2012.09.006

ANEXO 2

Listas de cepas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados.

Lista de cepas.

Nombre	Genotipo nuclear (mitocondrial)	Referencia
LSR2	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, cox4Δ::LEU2 (ρ⁺, ΔΣai, COX1ΔC15)</i>	(Shingú-Vázquez, 2010)
TF258	<i>Mata, lys2, ura3-52 or Δ, his4-519, leu2-3, 112, MSS51::3xHA, COX14::3xMYC. (ρ⁺, ΔΣai)</i>	(Pérez-Martínez, 2009)
TF272	<i>Mata, lys2, ura3-52 or Δ, his4-519, leu2-3, 112, MSS51::3xHA, COX14::3xMYC. (ρ⁺, ΔΣai, COX1ΔC15)</i>	(Pérez-Martínez, 2009)
JPM49	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, pet122Δ::KANMX (ρ⁺, ΔΣai)</i>	(Mayorga, 2016)
JPM57	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, pet122Δ::KANMX (ρ⁺, ΔΣai, COX1ΔC15)</i>	(Mayorga, 2016)
YC146	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, cox4Δ::LEU2. (ρ⁺, ΔΣai)</i>	Este trabajo
YC151	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, cox4Δ::LEU2. (ρ⁺, ΔΣai, COX1ΔC15)</i>	Este trabajo
XPM51	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, cox4Δ::LEU2 (ρ⁺, ΔΣai)</i>	(Shingú-Vázquez, 2010)
XPM201	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, (ρ⁺, ΔΣai^β)</i>	(Shingú-Vázquez, 2010)
XPM209	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, (ρ⁺, ΔΣai, COX1ΔC15)</i>	(Shingú-Vázquez, 2010)
XPM295	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, (ρ⁺, ΔΣai)</i>	(Shingú-Vázquez, 2010)
XPM298	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, (ρ⁺, ΔΣai, COX1ΔC15)</i>	(Shingú-Vázquez, 2010)
MS62	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, (ρ⁺, ΔΣai, COX1-P521A/P522A)</i>	Este trabajo
MS63	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, (ρ⁺, ΔΣai, COX1-V524E)</i>	Este trabajo
MS64	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, (ρ⁺, ΔΣai, COX1-H525A)</i>	Este trabajo
MS65	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, (ρ⁺, ΔΣai, COX1-F527A)</i>	Este trabajo
MS66	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, (ρ⁺, ΔΣai, COX1-P530A)</i>	Este trabajo
RGV22	<i>Mata, lys2, ura3-52 or Δ, his4-519, leu2-3, 112, MSS51::3xHA, COX14::3xMYC. (ρ⁺, ΔΣai, COX1-P521A/P522A)</i>	Este trabajo

RGV23	<i>Mata, lys2, ura3-52 or Δ, his4-519, leu2-3, 112, MSS51::3xHA, COX14::3xMYC. (o⁺. ΔΣai. COX1-V524E)</i>	Este trabajo
RGV24	<i>Mata, lys2, ura3-52 or Δ, his4-519, leu2-3, 112, MSS51::3xHA, COX14::3xMYC. (o⁺. ΔΣai. COX1-H525A)</i>	Este trabajo
RGV73	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, pet111Δ::URA3. (o⁺. ΔΣai)</i>	Este trabajo
RGV74	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, pet111Δ::URA3. (o⁺. ΔΣai. COX1ΔC15)</i>	Este trabajo
RGV75	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, (ρ⁺, ΔΣai. COX1-H525A)</i>	Este trabajo
RGV77	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, (ρ⁺, ΔΣai. COX1-P521A/P522A)</i>	Este trabajo
RGV78	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, (ρ⁺, ΔΣai. COX1-V524E)</i>	Este trabajo
RGV79	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, (ρ⁺, ΔΣai. COX1-F527A)</i>	Este trabajo
RGV80	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, (ρ⁺, ΔΣai. COX1-P530A)</i>	Este trabajo
RGV95	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, cox4Δ::LEU2, (ρ⁺, ΔΣai. COX1-P521A/P522A)</i>	Este trabajo
RGV96	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, cox4Δ::LEU2, (ρ⁺, ΔΣai. COX1-H525A)</i>	Este trabajo
RGV97	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, cox4Δ::LEU2, (ρ⁺, ΔΣai. COX1-F527A)</i>	Este trabajo
RGV98	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, cox4Δ::LEU2, (ρ⁺, ΔΣai. COX1-P530A)</i>	Este trabajo
RGV99	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, cox4Δ::LEU2, (ρ⁺, ΔΣai. COX1-V524E)</i>	Este trabajo
RGV101	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, pet111Δ::URA3, (ρ⁺, ΔΣai)</i>	Este trabajo
RGV102	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, pet111Δ::URA3, (ρ⁺, ΔΣai. COX1ΔC15)</i>	Este trabajo
RGV103	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, pet111Δ::URA3, (ρ⁺, ΔΣai. COX1-P521A/P522A)</i>	Este trabajo
RGV104	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, pet111Δ::URA3, (ρ⁺, ΔΣai. COX1-V524E)</i>	Este trabajo
RGV105	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, pet111Δ::URA3, (ρ⁺, ΔΣai. COX1-H525A)</i>	Este trabajo
RGV106	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, pet111Δ::URA3, (ρ⁺, ΔΣai. COX1-F527A)</i>	Este trabajo
RGV107	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, pet111Δ::URA3, (ρ⁺, ΔΣai. COX1-P530A)</i>	Este trabajo
RGV108	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, pet111Δ::URA3. (o⁺. ΔΣai. COX1-V524E)</i>	Este trabajo

RGV109	Mata, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, pet111Δ::URA3. (ρ⁺. ΔΣai. COX1-P521A/P522A)</i>	Este trabajo
RGV112	Mata, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, pet111Δ::URA3. cbs2Δ::KanMX4. (ρ⁺. ΔΣai)</i>	Este trabajo
RGV113	Mata, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, pet111Δ::URA3. cbs2Δ::KanMX4. (ρ⁺. ΔΣai. COX1ΔC15)</i>	Este trabajo
YCV164	Mata, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, cox15Δ::LEU2, (ρ⁺. ΔΣai)</i>	Este trabajo
YCV165	Mata, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, cox15Δ::LEU2, (ρ⁺. ΔΣai. COX1ΔC15)</i>	Este trabajo
YCV163	Mata, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, cox15Δ::LEU2, , (ρ⁺. ΔΣai. COX1-P521A/P522A)</i>	Este trabajo

Lista de plásmidos.

Todos los plásmidos contienen un gen de resistencia a ampicilina.

Nombre	Esqueleto	Inserto
pXPM57	pGEM T-Easy	COX1 flanqueado por sus extremos UTRs
pXP132	pGEM T-Easy	Región 3' UTR de COX1 con la mutación P521A/P522A
pXP133	pGEM T-Easy	Región 3' UTR de COX1 con la mutación V524E
pXP134	pGEM T-Easy	Región 3' UTR de COX1 con la mutación H525A
pXP135	pGEM T-Easy	Región 3' UTR de COX1 con la mutación F527A
pXP136	pGEM T-Easy	Región 3' UTR de COX1 con la mutación P530A
pXP139	pBlueScript +	COX1-P521A/P522A flanqueado por sus extremos UTRs
pXP140	pBlueScript +	COX1-V524E flanqueado por sus extremos UTRs
pXP141	pBlueScript +	COX1-H525A flanqueado por sus extremos UTRs
pXP142	pBlueScript +	COX1-F527A flanqueado por sus extremos UTRs
pXP143	pBlueScript +	COX1-P530A flanqueado por sus extremos UTRs
YEp352	pUC18	URA3, 2μ

Lista de oligonucleótidos.

En negro se indica el sitio de restricción para *AflII*.

Nombre	Secuencia 5'- 3'
CO1NdeF	GTATGATCACATCATATGTATATTGTAGG
CO1-521R	ACTTAAG ATTGTACAGCTGGTGTATTAATGAGTGTACAGCTGCTGCAGAAGTTAATAAG
CO1-524R	ACTTAAG ATTGTACAGCTGGTGTATTAATGAGTGTTTCAGCTGGTGG
CO1-525R	ACTTAAG ATTGTACAGCTGGTGTATTAATGAAGCTACAGCTGGTG
CO1-527R	ACTTAAG ATTGTACAGCTGGTGTATTAGCTGAAGCTACAGC
CO1-530R	ACTTAAG ATTGTACAGCTGCTGTATTAATGAG

Referencias

- Aldridge, P., Hughes, K.T., 2002. Regulation of flagellar assembly. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 160–5.
- B Alberts, A Johnson, J Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P.W., 2015. *Molecular biology of the cell*, 6th edition by B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, in: *Biochemistry and Molecular Biology Education*. p. 171. doi:10.1002/bmb.20192
- Barrientos, A., Zambrano, A., Tzagoloff, A., 2004. Mss51p and Cox14p jointly regulate mitochondrial Cox1p expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 23, 3472–3482. doi:10.1038/sj.emboj.7600358
- Barros, M.H., Carlson, C.G., Glerum, D.M., Tzagoloff, a, 2001. Involvement of mitochondrial ferredoxin and Cox15p in hydroxylation of heme O. *FEBS Lett.* 492, 133–8.
- Bonnefoy, N., Bsat, N., Fox, T.D., 2001. Mitochondrial translation of *Saccharomyces cerevisiae* COX2 mRNA is controlled by the nucleotide sequence specifying the pre-Cox2p leader peptide. *Mol. Cell. Biol.* 21, 2359–72. doi:10.1128/MCB.21.7.2359-2372.2001
- Bonnefoy, N., Remacle, C., Fox, T.D., 2007. Genetic transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Chlamydomonas reinhardtii* mitochondria. *Methods Cell Biol.* 80, 525–48. doi:10.1016/S0091-679X(06)80026-9
- Chen, Y.C., Taylor, E.B., Dephoure, N., Heo, J.M., Tonhato, A., Papandreou, I., Nath, N., Denko, N.C., Gygi, S.P., Rutter, J., 2012. Identification of a protein mediating respiratory supercomplex stability. *Cell Metab.* 15, 348–360. doi:10.1016/j.cmet.2012.02.006
- Choquet, Y., Stern, D.B., Wostrickoff, K., Kuras, R., Girard-Bascou, J., Wollman, F.-A., 1998. Translation of cytochrome f is autoregulated through the 5' untranslated region of petA mRNA in *Chlamydomonas* chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 4380–4385. doi:10.1073/pnas.95.8.4380
- Choquet, Y., Wollman, F.A., 2009. The CES Process, in: *The Chlamydomonas Sourcebook 3-Vol Set*. pp. 1027–1063. doi:10.1016/B978-0-12-370873-1.00037-X

- Choquet, Y., Zito, F., Wostrikoff, K., Wollman, F.-A., 2003. Cytochrome f translation in *Chlamydomonas* chloroplast is autoregulated by its carboxyl-terminal domain. *Plant Cell* 15, 1443–54. doi:10.1105/TPC.011692
- Conde, J., Fink, G.R., 1976. A mutant of *Saccharomyces cerevisiae* defective for nuclear fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73, 3651–5.
- Contamine, V., Picard, M., 2000. Maintenance and integrity of the mitochondrial genome: a plethora of nuclear genes in the budding yeast. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 281–315.
- Costanzo, M.C., Fox, T.D., 1986. Product of *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene PET494 activates translation of a specific mitochondrial mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 6, 3694–703.
- Costanzo, M.C., Fox, T.D., 1990. Control of Mitochondrial Gene Expression in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* 24, 91–108. doi:10.1146/annurev.ge.24.120190.000515
- Costanzo, M.C., Seaver, E.C., Fox, T.D., 1986. At least two nuclear gene products are specifically required for translation of a single yeast mitochondrial mRNA. *EMBO J* 5, 3637–3641.
- Cruciat, C.M., Brunner, S., Baumann, F., Neupert, W., Stuart, R. a., 2000. The cytochrome bc1 and cytochrome c oxidase complexes associate to form a single supracomplex in yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* 275, 18093–18098. doi:10.1074/jbc.M001901200
- Cui, T.Z., Conte, A., Fox, J.L., Zara, V., Winge, D.R., 2014. Modulation of the respiratory supercomplexes in yeast: Enhanced formation of cytochrome oxidase increases the stability and abundance of respiratory supercomplexes. *J. Biol. Chem.* 289, 6133–6141. doi:10.1074/jbc.M113.523688
- Decoster, E., Simon, M., Hatat, D., Faye, G.G., Curie, I., Biologic, S. De, Universitaire, C., Orsay, C., 1990. The MSS51 gene product is required for the translation of the COX1 mRNA in yeast mitochondria. *MGG Mol. Gen. Genet.* 224, 111–118. doi:10.1007/BF00259457
- Diekert, K., I.P.M. de Kroon, A., Kispal, G., Lill, R., 2001. Mitochondria, *Methods in Cell Biology*, *Methods in Cell Biology*. Elsevier. doi:10.1016/S0091-679X(01)65003-9
- Finnegan, P.M., Payne, M.J., Keramidaris, E., Lukins, H.B., 1991. Characterization of a yeast nuclear gene, AEP2, required for accumulation of mitochondrial mRNA encoding subunit 9 of the ATP synthase. *Curr. Genet.* 20, 53–61. doi:10.1007/BF00312765
- Fontanesi, F., Soto, I.C., Horn, D., Barrientos, A., 2010. Mss51 and Ssc1 facilitate translational regulation of cytochrome c oxidase biogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 30, 245–259. doi:10.1128/MCB.00983-09
- Garay, E., Campos, S.E., González de la Cruz, J., Gaspar, A.P., Jinich, A., DeLuna, A., 2014. High-Resolution Profiling of Stationary-Phase Survival Reveals Yeast Longevity Factors and Their Genetic Interactions. *PLoS Genet.* 10. doi:10.1371/journal.pgen.1004168
- García-Guerrero, A.E., Zamudio-Ochoa, A., Camacho-Villasana, Y., García-Villegas, R., Pérez-Martínez, X., Reyes-Prieto, A., 2016. Evolution of translation in mitochondria, in: *Evolution of the Protein Synthesis Machinery and Its Regulation*. pp. 109–142. doi:10.1007/978-3-319-39468-8_6

- Glerum, D.M., Muroff, I., Jin, C., Tzagoloff, A., 1997. COX15 codes for a mitochondrial protein essential for the assembly of yeast cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem.* 272, 19088–19094. doi:10.1074/jbc.272.30.19088
- Gray, M.W., 2014. The pre-endosymbiont hypothesis: A new perspective on the origin and evolution of mitochondria. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6. doi:10.1101/cshperspect.a016097
- Gruschke, S., Römler, K., Hildenbeutel, M., Kehrein, K., Köhl, I., Bonnefoy, N., Ott, M., 2012. The Cbp3-Cbp6 complex coordinates cytochrome b synthesis with bc(1) complex assembly in yeast mitochondria. *J. Cell Biol.* 199, 137–50. doi:10.1083/jcb.201206040
- Helfenbein, K.G., Ellis, T.P., Dieckmann, C.L., Tzagoloff, A., 2003. ATP22, a nuclear gene required for expression of the F0 sector of mitochondrial ATPase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 278, 19751–19756. doi:10.1074/jbc.M301679200
- Herrmann, J.M., Woellhaf, M.W., Bonnefoy, N., 2013. Control of protein synthesis in yeast mitochondria: The concept of translational activators. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1833, 286–294. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.03.007
- Hornig-Do, H.-T., Tatsuta, T., Buckermann, A., Bust, M., Kollberg, G., Rötig, A., Hellmich, M., Nijtmans, L., Wiesner, R.J., 2012. Nonsense mutations in the COX1 subunit impair the stability of respiratory chain complexes rather than their assembly. *EMBO J* 31, 1293–1307. doi:10.1038/emboj.2011.477
- Islas-Osuna, M.A., Ellis, T.P., Marnell, L.L., Mittelmeier, T.M., Dieckmann, C.L., 2002. Cbp1 is required for translation of the mitochondrial cytochrome b mRNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 277, 37987–37990. doi:10.1074/jbc.M206132200
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., Kimura, A., 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153, 163–168. doi:10.1271/bbb1961.48.341
- Jacobs, H.T., 2001. Making mitochondrial mutants. *Trends Genet.* doi:10.1016/S0168-9525(01)02480-5
- Jazwinski, S.M., 2005. Yeast longevity and aging - The mitochondrial connection. *Ageing Dev.* 126, 243–248. doi:10.1016/j.mad.2004.08.016
- Joseph-Horne, T., Hollomon, D.W., Wood, P.M., 2001. Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochim. Biophys. Acta* 1504, 179–95.
- Kay, B.K., Williamson, M.P., Sudol, M., 2000. The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J.* 14, 231–241. doi:10.1016/j.actamat.2004.11.026
- Khalimonchuk, O., Bestwick, M., Meunier, B., Watts, T.C., Winge, D.R., 2010. Formation of the redox cofactor centers during Cox1 maturation in yeast cytochrome oxidase. *Mol. Cell. Biol.* 30, 1004–1017. doi:10.1128/mcb.00640-09
- Khalimonchuk, O., Bird, A., Winge, D.R., 2007. Evidence for a pro-oxidant intermediate in the assembly of cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem.* 282, 17442–17449. doi:10.1074/jbc.M702379200

- Kloeckener-Gruissem, B., McEwen, J.E., Poyton, R.O., 1988. Identification of a third nuclear protein-coding gene required specifically for posttranscriptional expression of the mitochondrial COX3 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 170, 1399–1402.
- Kühl, I., Fox, T.D., Bonnefoy, N., 2012. *Schizosaccharomyces pombe* homologs of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial proteins Cbp6 and Mss51 function at a post-translational step of respiratory complex biogenesis. *Mitochondrion* 12, 381–390. doi:10.1016/j.mito.2012.02.002
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. doi:10.1038/227680a0
- Levchenko, M., Wuttke, J.M., Römpler, K., Schmidt, B., Neifer, K., Juris, L., Wissel, M., Rehling, P., Deckers, M., 2016. Cox26 is a novel stoichiometric subunit of the yeast cytochrome c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1863, 1624–1632. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.04.007
- Lipinski, K. a, Kaniak-Golik, A., Golik, P., 2010. Maintenance and expression of the *S. cerevisiae* mitochondrial genome—from genetics to evolution and systems biology. *Biochim. Biophys. Acta* 1797, 1086–98. doi:10.1016/j.bbabi.2009.12.019
- Longo, V.D., Shadel, G.S., Kaerberlein, M., Kennedy, B., 2012. Replicative and chronological aging in *saccharomyces cerevisiae*. *Cell Metab.* doi:10.1016/j.cmet.2012.06.002
- Maarse, A.C., Van Loon, A.P., Riezman, H., Gregor, I., Schatz, G., Grivell, L.A., 1984. Subunit IV of yeast cytochrome c oxidase: cloning and nucleotide sequencing of the gene and partial amino acid sequencing of the mature protein. *EMBO J.* 3, 2831–7.
- Manthey, G.M., McEwen, J.E., 1995. The product of the nuclear gene PET309 is required for translation of mature mRNA and stability or production of intron-containing RNAs derived from the mitochondrial COX1 locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14, 4031–4043.
- Markwell, M.A.K., Haas, S.M., Bieber, L.L., Tolbert, N.E., 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 87, 206–210. doi:10.1016/0003-2697(78)90586-9
- Mayorga, J.P., Camacho-Villasana, Y., Shingú-Vázquez, M., García-Villegas, R., Zamudio-Ochoa, A., García-Guerrero, A.E., Hernández, G., Pérez-Martínez, X., 2016. A novel function of Pet54 in regulation of Cox1 synthesis in *saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *J. Biol. Chem.* 291. doi:10.1074/jbc.M116.721985
- McStay, G.P., Su, C.H., Thomas, S.M., Xu, J.T., Tzagoloff, A., 2013. Characterization of assembly intermediates containing subunit 1 of yeast cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem.* 288, 26546–26556. doi:10.1074/jbc.M113.498592
- McStay, G.P., Su, C.H., Tzagoloff, A., 2013. Modular assembly of yeast cytochrome oxidase. *Mol. Biol. Cell* 24, 440–52. doi:10.1091/mbc.E12-10-0749
- Meunier, B., Lemarre, P., Colson, A.-M., 1993. Genetic screening in *Saccharomyces cerevisiae* for large numbers of mitochondrial point mutations which affect structure and function of catalytic subunits of cytochrome-c oxidase. *Eur. J. Biochem.* 213, 129–135. doi:10.1111/j.1432-1033.1993.tb17742.x

- Mick, D.U., Fox, T.D., Rehling, P., 2011. Inventory control: cytochrome c oxidase assembly regulates mitochondrial translation. *Nat. Publ. Gr.* 12, 14–20. doi:10.1038/nrm3029
- Mick, D.U., Vukotic, M., Piechura, H., Meyer, H.E., Warscheid, B., Deckers, M., Rehling, P., 2010. Coa3 and Cox14 are essential for negative feedback regulation of COX1 translation in mitochondria. *J. Cell Biol.* 191, 141–154. doi:10.1083/jcb.201007026
- Mick, D.U., Wagner, K., van der Laan, M., Frazier, A.E., Perschil, I., Pawlas, M., Meyer, H.E., Warscheid, B., Rehling, P., 2007. Shy1 couples Cox1 translational regulation to cytochrome c oxidase assembly. *EMBO J.* 26, 4347–4358. doi:10.1038/sj.emboj.7601862
- Moyer, A.L., Wagner, K.R., 2014. Mammalian Mss51 is a skeletal muscle-specific gene modulating cellular metabolism. *J. Neuromuscul. Dis.* 2, 371–385. doi:10.3233/JND-150119
- Murakami, C.J., Burtner, C.R., Kennedy, B.K., Kaeberlein, M., 2008. A Method for High-Throughput Quantitative Analysis of Yeast Chronological Life Span. *Journals Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* 63, 113–121. doi:10.1093/gerona/63.2.113
- Payne, M.J., Finnegan, P.M., Smooker, P.M., Lukins, H.B., 1993. Characterization of a second nuclear gene, AEP1, required for expression of the mitochondrial OLI1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 24, 126–135. doi:10.1007/BF00324676
- Perez-Martinez, X., Broadley, S.A., Fox, T.D., 2003. Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. *EMBO J.* 22, 5951–5961. doi:10.1093/emboj/cdg566
- Perez-Martinez, X., Butler, C.A., Shingu-Vazquez, M., Fox, T.D., 2009. Dual functions of Mss51 couple synthesis of Cox1 to assembly of cytochrome c oxidase in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Mol. Biol. Cell* 20, 4371–4380. doi:10.1091/mbc.E09-06-0522
- Pfeiffer, K., Gohil, V., Stuart, R. a., Hunte, C., Brandt, U., Greenberg, M.L., Sch??gger, H., 2003. Cardiolipin Stabilizes Respiratory Chain Supercomplexes. *J. Biol. Chem.* 278, 52873–52880. doi:10.1074/jbc.M308366200
- Pierrel, F., Bestwick, M.L., Cobine, P.A., Khalimonchuk, O., Cricco, J.A., Winge, D.R., 2007. Coa1 links the Mss51 post-translational function to Cox1 cofactor insertion in cytochrome c oxidase assembly. *EMBO J.* 26, 4335–4346. doi:10.1038/sj.emboj.7601861
- Pierrel, F., Khalimonchuk, O., Cobine, P.A., Bestwick, M., Winge, D.R., 2008. Coa2 is an assembly factor for yeast cytochrome c oxidase biogenesis that facilitates the maturation of Cox1. *Mol. Cell. Biol.* 28, 4927–4939. doi:10.1128/MCB.00057-08
- Poutre, C.G., Fox, T.D., 1987. PET111, a *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene required for translation of the mitochondrial mRNA encoding cytochrome c oxidase subunit II. *Genetics* 115, 637–47.
- Rödel, G., 1986. Two yeast nuclear genes, CBS1 and CBS2, are required for translation of mitochondrial transcripts bearing the 5'-untranslated COB leader. *Curr. Genet.* 11, 41–45. doi:10.1007/BF00389424
- Rak, M., Benit, P., Chretien, D., Bouchereau, J., Schiff, M., El-Khoury, R., Tzagoloff, A., Rustin, P., 2016. Mitochondrial cytochrome c oxidase deficiency. *Clin. Sci.* 130, 393–407. doi:10.1042/CS20150707

- Rak, M., Tzagoloff, A., 2009. F1-dependent translation of mitochondrially encoded Atp6p and Atp8p subunits of yeast ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 18509–14. doi:10.1073/pnas.0910351106
- Roloff, G. a., Henry, M.F., Henry, M.F., University-som, R., 2015. Mam33 promotes cytochrome c oxidase subunit I translation in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Mol. Biol. Cell* 26, 2885–2894. doi:10.1091/mbc.E15-04-0222
- Sagan, L., 1967. On the origin of mitosing cells. *J. Theor. Biol.* 14, 225–IN6. doi:10.1016/0022-5193(67)90079-3
- Schägger, H., Pfeiffer, K., 2000. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* 19, 1777–1783. doi:10.1093/emboj/19.8.1777
- Sherman, F., 2002. *Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology - Part B, Methods in Enzymology, Methods in Enzymology.* Elsevier. doi:10.1016/S0076-6879(02)50954-X
- Shingú-Vázquez, M., Camacho-Villasana, Y., Sandoval-Romero, L., Butler, C.A., Fox, T.D., Pérez-Martínez, X., 2010. The carboxyl-terminal end of Cox1 is required for feedback assembly regulation of Cox1 synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *J. Biol. Chem.* 285, 34382–34389. doi:10.1074/jbc.M110.161976
- Smith, P.M., Fox, J.L., Winge, D.R., 2012. Biogenesis of the cytochrome bc(1) complex and role of assembly factors. *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 276–86. doi:10.1016/j.bbabi.2011.11.009
- Soto, I.C., Barrientos, A., 2015. Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Biogenesis Is Regulated by the Redox State of a Heme-Binding Translational Activator. *Antioxid. Redox Signal.* 0, ars.2015.6429. doi:10.1089/ars.2015.6429
- Soto, I.C., Fontanesi, F., Liu, J., Barrientos, A., 2012. Biogenesis and assembly of eukaryotic cytochrome c oxidase catalytic core. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* doi:10.1016/j.bbabi.2011.09.005
- Spinazzi, M., Casarin, A., Pertegato, V., Salviati, L., Angelini, C., 2012. Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nat. Protoc.* 7, 1235–1246. doi:10.1038/nprot.2012.058
- Strecker, V., Kadeer, Z., Heidler, J., Cruciat, C.M., Angerer, H., Giese, H., Pfeiffer, K., Stuart, R.A., Wittig, I., 2016. Supercomplex-associated Cox26 protein binds to cytochrome c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1863, 1643–1652. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.04.012
- Strogolova, V., Furness, A., Robb-mcgrath, M., Garlich, J., Stuart, R.A., 2012a. Rcf1 and Rcf2, members of the hypoxia-induced gene 1 protein family, are critical components of the mitochondrial cytochrome bc1-cytochrome c oxidase supercomplex. *Mol. Cell. Biol.* 32, 1363–73. doi:10.1128/MCB.06369-11
- Stuart, M.K.D. and R.A., 2008. The Yeast Aac2 Protein Exists in Physical Association with the Cytochrome bc1-COX Supercomplex and the TIM23 Machinery. *Mol. Biol. Cell* 19, 3934–3943.
- Su, C.-H., McStay, G.P., Tzagoloff, A., 2014. The Cox3p assembly module of yeast cytochrome oxidase. *Mol. Biol. Cell* 25, 965–76. doi:10.1091/mbc.E13-10-0575

- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yoshikawa, S., 1996. The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* 272, 1136–44.
- Tucker, E.J., Wanschers, B.F.J., Szklarczyk, R., Mountford, H.S., Wijeyeratne, X.W., van den Brand, M. a M., Leenders, A.M., Rodenburg, R.J., Relji??, B., Compton, A.G., Frazier, A.E., Bruno, D.L., Christodoulou, J., Endo, H., Ryan, M.T., Nijtmans, L.G., Huynen, M. a., Thorburn, D.R., 2013. Mutations in the UQCC1-Interacting Protein, UQCC2, Cause Human Complex III Deficiency Associated with Perturbed Cytochrome b Protein Expression. *PLoS Genet.* 9. doi:10.1371/journal.pgen.1004034
- Vukotic, M., Oeljeklaus, S., Wiese, S., Vögtle, F.N., Meisinger, C., Meyer, H.E., Zieseniss, A., Katschinski, D.M., Jans, D.C., Jakobs, S., Warscheid, B., Rehling, P., Deckers, M. 2011. Rcf1 Mediates Cytochrome Oxidase Assembly and Respirasome Formation, Revealing Heterogeneity of the Enzyme Complex. *Cell Metab.* 15, 336–347. doi:10.1016/j.cmet.2012.01.016
- Weraarpachai, W., Antonicka, H., Sasarman, F., Seeger, J., Schrank, B., Kolesar, J.E., Lochmüller, H., Chevrette, M., Kaufman, B.A., Horvath, R., Shoubridge, E.A., 2009. Mutation in TACO1, encoding a translational activator of COX I, results in cytochrome c oxidase deficiency and late-onset Leigh syndrome. *Nat. Genet.* 41, 833–837. doi:10.1038/ng.390
- Weraarpachai, W., Sasarman, F., Nishimura, T., Antonicka, H., Auré, K., Rötig, A., Lombès, A., Shoubridge, E.A., 2012. Mutations in C12orf62, a factor that couples COX i synthesis with cytochrome c oxidase assembly, cause fatal neonatal lactic acidosis. *Am. J. Hum. Genet.* 90, 142–151. doi:10.1016/j.ajhg.2011.11.027
- Wittig, I., Braun, H.-P., Schägger, H., 2006. Blue native PAGE. *Nat. Protoc.* 1, 418–28. doi:10.1038/nprot.2006.62
- Wittig, I., Karas, M., Schägger, H., 2007. High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Mol. Cell. Proteomics* 6, 1215–25. doi:10.1074/mcp.M700076-MCP200
- Zamudio-Ochoa, A., Camacho-Villasana, Y., García-Guerrero, A.E., Pérez-Martínez, X., 2014. The Pet309 pentatricopeptide repeat motifs mediate efficient binding to the mitochondrial COX1 transcript in yeast. *RNA Biol.* 11, 953–967. doi:10.4161/rna.29780
- Zara, V., Conte, L., Trumpower, B.L., 2009. Biogenesis of the yeast cytochrome bc1 complex. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 89–96. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.04.011