



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Estudio de la regulación que ejerce el extremo carboxilo terminal de Cox1
en la función mitocondrial de levadura**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Ana Paulina Gutiérrez Alejandre

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Xochitl Pérez Martínez

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Oscar Flores Herrera

Facultad de Medicina, UNAM

Dr. Salvador Uribe Carvajal

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Ciudad de México. Septiembre, 2020



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.

Agradecimientos

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 204 oriente del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Autónoma de México bajo la asesoría de la Dra. Xochitl Pérez Martínez.

Se agradece infinitamente por su enseñanza, apoyo, paciencia, consejos y guía de mi tutora la Dra. Xochitl Pérez Martínez.

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

Se agradece la asesoría, apoyo, consejos y comentarios a este proyecto del comité tutorial conformado por:

Dr. Oscar Flores Herrera

Facultad de Medicina

Dr. Salvador Uribe Carvajal

Instituto de Fisiología Celular

Se agradece al Dr. Alfredo Cabrera Orefice y al Dr. Ulrich Brandt de la Universidad de Radboud, Holanda.

Al Dr. Christian Cortés Rojo de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Al Dr. Diego González Halphen y a Miriam Vázquez Acevedo del Instituto de Fisiología Celular.

Se agradece la enseñanza, asistencia técnica y apoyo en mi estancia de investigación en su laboratorio al Dr. Oscar Flores Herrera, a la M. en C. Mercedes Esparza Perrusquía y a mis amigos de su laboratorio.

Este proyecto fue apoyado por:

UNAM - PAPIIT-IN209217 y 202720; CONACYT-284514.

Durante los estudios de maestría conté con una beca otorgada por CONACYT.

Se agradece el apoyo otorgado por el PAEP para asistir a los congresos de la Sociedad Mexicana de Bioquímica (XXXII Congreso Nacional de Bioquímica y XIII Congreso de Biología Molecular y Celular de hongos).

Se agradece por sus comentarios y consejos al jurado integrado por:

Dra. Alicia Manjarrez González

Dr. Leonardo Peraza Reyes

Dr. Ricardo Jasso Chávez

Dra. Sobeida Sánchez Nieto

Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar

Dedicatorias

A Dios, a mis papás Fernando y Ana Bertha sin su apoyo incondicional, guía de vida, consejos amor no estaría donde estoy.

A mi hermano Fernando, de quien su vida es una fuente de inspiración para mí y un gran ejemplo a seguir.

A mi prima Lala, sin su apoyo y cariño mi vida sería difícil.

A mi abuelita y mis demás tíos, por su gran apoyo y ánimos durante mis años de estudio.

A mis amigos de toda la vida Priscila, Joss, Dennis, Ximena, Jacobo y Alison, gracias a ustedes es que mi vida ha estado llena de apoyo, comprensión risas y diversión.

A mis amigos del laboratorio Yola, Itzel, Dani, Aldo y Ali, por hacer de la maestría una época llena de risas, apoyo y ambiente de amistad.

Por último, pero no menos importantes a Lucky y Molly, quienes me han enseñado el gran valor de la amistad y que hay que valorar cada segundo al lado de los seres que amamos.

Abreviaturas.....	7
Listado de figuras.....	9
Resumen.....	11
Abstract.....	12
Introducción.....	13
• La mitocondria y su papel en la célula.....	13
• <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como herramienta para el estudio de la mitocondria.....	15
• Metabolismo de <i>S. cerevisiae</i> en diferentes fuentes de carbono.....	16
• El genoma mitocondrial de <i>S. cerevisiae</i>	18
• La cadena respiratoria de las levaduras.....	19
• Complejo IV o citocromo c oxidasa (CcO).....	25
• La subunidad 1 de la Citocromo c oxidasa (Cox1).....	27
• El extremo carboxilo terminal de Cox1 regula su síntesis, su estabilidad y la formación de supercomplejos.....	28
Justificación.....	32
Pregunta de investigación.....	34
Hipótesis.....	34
Objetivo general y objetivos particulares.....	34
Materiales y métodos.....	35

Resultados.....	52
• El envejecimiento cronológico prematuro no está asociado a una formación de especies prooxidantes.....	53
• La mutante Cox1ΔC15 es sensible a temperatura en medios respiratorios.....	55
• Los niveles basales de Cox1 no se afectan en condiciones aerobias, en cepas incapaces de regular su síntesis.....	57
• La actividad de la CcO es menor en la cepa Cox1ΔC15, aunque sí hay presencia de Cox1 en complejos y supercomplejos.....	59
• La actividad de las NADH deshidrogenasas alternas mitocondriales es mayor en la cepa Cox1ΔC15.....	61
• La velocidad de síntesis de ATP mitocondrial por minuto en la mutante CoxΔ1C15 es ligeramente menor que en la cepa WT.....	63
Discusión.....	65
Conclusiones.....	76
Perspectivas.....	77
Lista de cepas.....	78
Referencias.....	79

Abreviaturas

ρ^+	Cepas con DNA mitocondrial
ρ^0	Cepas sin DNA mitocondrial
3'-UTR	Región no traducida del extremo 3' del mRNA
5'-UTR	Región no traducida del extremo 5' del mRNA
ADP	Adenosil difosfato
APS	Siglas en inglés de persulfato de amonio
ATP	Adenosil trifosfato
Bis-tris	1,3-bis(tri(hidroximetil)metilamino)propano
BN-PAGE	Geles azules nativos o de acrilamida-bisacrilamida no desnaturalizante
BSA	Siglas en inglés de albumina de suero bovino
CcO (CIV)	Citocromo <i>c</i> oxidasa o complejo IV
COX1	Gen que codifica para la subunidad 1 de la CcO
COX2	Gen que codifica para la subunidad 2 de la CcO
COX3	Gen que codifica para la subunidad 3 de la CcO
C-ter	Extremo carboxilo terminal de una proteína
Cyt c	Citocromo <i>c</i>
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
dH₂O	Agua destilada
DTT	Siglas en inglés de ditioneitol
EDTA	Siglas en inglés de ácido etilendiaminotetraacético etanosulfónico

FAD⁺	Flavín adenin nucleótido oxidado
FADH₂	Flavín adenin nucleótido reducido
HEPES	Siglas en inglés de ácido 2-[4-(2-dihroxietil)-1-piperaciniil-(1)]
MEM	Membrana externa mitocondrial
MIM	Membrana interna mitocondrial
mRNA	RNA mensajero de un gen
mtDNA	DNA mitocondrial
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
PMSF	Siglas en inglés de floururo de fenilmetilsulfonilo
PVDF	Siglas en inglés de floururo de polivinilideno
ROS	Siglas en inglés de especies reactivas de oxígeno
SC	Supercomplejos
SDS	Siglas en inglés de sodio dodecil sulfato
SDS-PAGE	Gel de acrilamida-bisacrilamida desnaturalizante, con SDS.
TEMED	Siglas en inglés de N,N,N,N-tetrametil-etanol-1,2-diamina
TCA	Ciclo de los ácidos tricarbóxicos
TLCK	Siglas en inglés de hidrocLOURURO de Na-Tosil-Lys Clorometil cetona
TMPD	Siglas en inglés de N,N,N,N-tetrametil- <i>p</i> -fenilendiamina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
WT	Siglas en inglés de grupo silvestrecontrol

Figura 1. Organización del ADN circular de la mitocondria de *Saccharomyces cerevisiae*.

Figura 2. Modelo de la cadena respiratoria mitocondrial de *S. cerevisiae*.

Figura 3. Modelo cristalográfico de los supercomplejos de *S. cerevisiae*.

Figura 4. Modelo cristalográfico de la citocromo *c* oxidasa (complejo IV) de *S. cerevisiae*.

Figura 5. Modelo cristalográfico de la subunidad 1 de la CcO de *S. cerevisiae* (Cox1).

Figura 6. Los últimos 15 aminoácidos de Cox 1 regulan la síntesis de Cox1.

Figura 7. La cepa Cox1 Δ C15 forma supercomplejos no funcionales en mutantes con defectos en el ensamblaje de la CcO en galactosa.

Figura 8. Las mutaciones del extremo C-ter de Cox1 no afectan el crecimiento de las cepas en medios respiratorios.

Figura 9. Envejecimiento cronológico de las cepas mutantes Cox1 Δ C15 y P521A/P522A a comparación de la cepa Cox1 WT.

Figura 10. Las cepas mutantes del extremo C-ter de Cox1 no se afectan por especies prooxidantes en glucosa.

Figura 11. Las cepas que no regulan la síntesis de Cox1 no se afectan por especies prooxidantes en galactosa.

Figura 12. Las cepas mutantes en el extremo C-terminal de Cox1 no son sensibles a temperatura en medios fermentativos.

Figura 13. La cepa con Cox1 Δ C15 es sensible a altas temperaturas en medios respiratorios.

Figura 14. Los niveles basales de Cox1 no se afectaron en fuentes de carbono respiratorias en las cepas mutantes del extremo C-ter de Cox1.

Figura 15. La actividad de la CcO es menor en la cepa Cox1 Δ C15 aunque sí hay presencia de Cox1 en complejos y supercomplejos.

Figura 16. La mutante Cox1 Δ C15 presenta una mayor actividad de NADH deshidrogenasas alternas.

Figura 17. La mutante Cox1 Δ C15 tiene una menor velocidad de la síntesis de ATP que la cepa Cox1 WT.

Figura 18. Alineamiento de los aminoácidos 451 a 500 de Cox1 de *S. cerevisiae* vs. *S. uvarum*.

Figura 19. Metabolismo de fuentes de carbono respiratorias (etanol, glicerol y lactato).

El genoma mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae* codifica para Cox1, Cox2 y Cox3, tres de las 12 subunidades que forman la citocromo *c* oxidasa (CcO). El resto de las subunidades están codificadas en el genoma nuclear y se importan del citosol a las mitocondrias. Esta enzima es el último complejo aceptor de electrones en la cadena respiratoria, en donde estos se transfieren del citocromo *c* al O₂. Cox1 es una subunidad grande y altamente hidrofóbica que tiene 12 dominios que cruzan la membrana interna mitocondrial y es parte del centro catalítico de la CcO. Su extremo carboxilo terminal (C-ter) está orientado hacia la matriz mitocondrial. Nuestro laboratorio ha demostrado que el extremo C-ter de Cox1 es responsable de estabilizar a Cox1, regulando su síntesis y la formación de supercomplejos. Nuestra pregunta central es: ¿Cómo la pérdida de este mecanismo de regulación afecta a la célula? Por lo tanto, en el presente proyecto se llevó a cabo una caracterización de los efectos sobre el fenotipo celular y función mitocondrial de dos mutaciones en las que las cepas de levadura han perdido la capacidad de regular la síntesis y formación de supercomplejos. Una en la que se eliminaron los últimos 15 aminoácidos del extremo C-terminal de Cox1 (Cox1ΔC15), y otra donde se reemplazaron las prolinas 521 y 522 por alaninas (P521A/P522A). Por un lado, la mutación Cox1ΔC15 es sensible a altas temperaturas cuando se crece en un medio respiratorio, mientras que a temperatura ambiente la actividad de la CcO en geles disminuye y la cantidad de supercomplejos aumenta. Por otro lado, la mutante P521A/P522A no ha mostrado hasta el momento ningún fenotipo en respuesta a diversas condiciones de crecimiento o de estrés. Por lo tanto, hasta el momento no sabemos para que sirve le sirve a la célula tener una regulación tan compleja de Cox1, pero encontramos que el C-ter de Cox1 es importante para mantener la actividad óptima de la CcO y la formación de supercomplejos, afectando la sensibilidad de la célula a altas temperaturas.

Abstract

The *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial genome codes for Cox1, Cox2 and Cox3, three of the 12 subunits that form cytochrome *c* oxidase (CcO). This enzyme is the last electron acceptor complex in the respiratory chain, where these are transferred from cytochrome *c* to O₂. The rest of the subunits are encoded in the nuclear genome and imported from the cytosol into the mitochondria. Our laboratory has shown that the C-ter end of Cox1 is responsible for stabilizing Cox1, regulating its synthesis and the formation of supercomplexes. Our central question is: How does the loss of this regulatory mechanism affect the cell? Therefore, in the present project, a characterization of the effects on cellular phenotype and mitochondrial function of two mutations in which yeast strains have lost the ability to regulate the synthesis and formation of supercomplexes was carried out. One in which the last 15 amino acids were removed from the C-terminus of Cox1 (Cox1ΔC15), and another where prolines 521 and 522 were replaced by alanines (P521A / P522A). On one hand, the Cox1ΔC15 mutation is sensitive to high temperatures when grown in a respiratory environment, while at room temperature the activity of CcO in gels decreases and the amount of supercomplexes increases. On the other hand, the P521A / P522A mutant has so far not shown any phenotype in response to various growth or stress conditions. Therefore, until now we do not know what it is for the cell to have such a complex regulation of Cox1 but we found that the C-ter of Cox1 is important to maintain the optimal activity of CcO and the formation of supercomplexes, affecting the sensitivity of the cell to high temperatures.

La mitocondria y su papel en la célula

Las mitocondrias son organelos exclusivos de células eucariotas, los cuales poseen su propio DNA. Son mejor conocidas por su papel en el metabolismo energético, ya que dentro de ellas se lleva a cabo la producción de energía química para la célula en forma de ATP, energía que proviene de la oxidación de sustratos como: carbohidratos, ácidos grasos, aminoácidos, etc. Sin embargo, también se encargan de otros procesos metabólicos importantes como la síntesis de grupos hemo, centros fierro-azufre, catabolismo de ácidos grasos y la inducción de la apoptosis, entre otras (Jiménez y Merchant, 2003).

La organización de las mitocondrias dentro de la célula es dinámica y usualmente constituye una red que presenta fenómenos de fusión y fisión, según los requerimientos energéticos de la célula (Benard *et al.*, 2007). Está compuesta por una membrana externa que es permeable a moléculas pequeñas, así como a iones, los cuales la cruzan a través de porinas relativamente no selectivas. Presenta una membrana interna que es impermeable a casi todas las moléculas. Esta membrana forma pliegues o invaginaciones hacia la matriz mitocondrial denominados crestas, las cuales pueden adquirir las formas ortodoxa o condensada. En estas crestas se encuentran los complejos que conforman a la cadena transportadora de electrones y la ATP sintasa, la cual se encarga de llevar a cabo la fosforilación oxidativa utilizando los protones bombeados por los complejos respiratorios (Nicholls y Ferguson, 2013). Además, comprende 2 compartimentos: el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial (la cual contiene las enzimas necesarias para algunas rutas metabólicas) (Alberts *et al.*, 2008).

En cuanto al origen de la mitocondria, se ha propuesto que ocurrió a través de un evento de endosimbiosis y de la transferencia de genes del endosimbionte al huésped (Martin *et al.*, 2015). Existen teorías acerca de la forma en que se originó este evento, por ejemplo: una teoría propone que el beneficio de la simbiosis podría haberse debido a la capacidad

del endosimbionte para desintoxicar de O₂ al huésped anaerobio (Martin y Mentel, 2010). Esta teoría postula que la mitocondria era una α -arqueobacteria facultativamente anaeróbica y estaba en sintrofia con un anaerobio que consumía hidrógeno. En condiciones de poco O₂, la α -arqueobacteria fermentaría, generaría H₂ y acetato que sería consumido por el organismo anaerobio. A mayores concentraciones de O₂, la α -arqueobacteria respiraría aeróbicamente. Bajo este escenario, a medida que los dos socios se volvieron más integrados metabólicamente, el organismo anaerobio llegó a engullir a la α -arqueobacteria y, esta última se especializó como un orgánulo bioenergético (Martin y Mentel, 2010; Martin *et al.*, 2015; Roger *et al.*, 2017).

A lo largo de los años se ha ido comprendiendo el impacto que tiene la mitocondria en la célula y cómo es que este organelo hace para llevar a cabo sus funciones de manera correcta. Para mantener la homeostasis celular, la mitocondria debe responder a diversas señales y poseer una comunicación o bien, señalización continua con otros organelos celulares. Mediante esta señalización se regula la expresión de diversos genes, dependiendo de las condiciones nutricionales y ambientales de la célula. Por ejemplo, desde 1987 existe evidencia en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* de mecanismos de señalización entre la mitocondria y otros organelos (Parikh *et al.*, 1987). Estos mecanismos son clasificados en: señalización anterógrada (del núcleo a la mitocondria), en donde se coordina la expresión de los genes y la función mitocondriales en respuesta a alteraciones homeostáticas endógenas y ambientales, principalmente detectadas en el citosol y por el núcleo (Ng *et al.*, 2014). Por otro lado, la señalización retrograda (de la mitocondria al núcleo), monitorea diversas señales emitidas por la mitocondria que permiten comunicar su estado funcional con otros organelos celulares (Butow y Avadhani, 2004; Picard *et al.*, 2013). Existen algunos grupos de señales moleculares que regulan las respuestas retrógradas, por ejemplo: los precursores o productos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos o TCA (acetil coenzima A, succinato, fumarato), nucleótidos derivados de mitocondrias (AMP, ADP, ATP, NAD⁺, NADH, especies reactivas de oxígeno (ROS) y señalización a través de proteínas, péptidos, lípidos e iones (Schieber y Chandel, 2014; Bohovych y Khalimonchuk 2016).

En estas vías ocurren cambios en la expresión de los genes nucleares a nivel transcripcional, cambios que dependen del metabolismo celular, actividad y calidad mitocondrial. Estos cambios tienen el fin de mantener la homeostasis mitocondrial. Esta regulación no solo es a nivel de las proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo, sino que también involucra cambios globales en la expresión de los genes nucleares (Cagin y Enríquez, 2015). Por lo anterior, adquiere una gran importancia el estudio de cómo es que los diversos procesos mitocondriales, entre ellos la traducción, afectan a otros niveles en la célula.

***S. cerevisiae* como herramienta para el estudio de la mitocondria**

La levadura *S. cerevisiae*, es uno de los organismos más utilizados como modelo en la investigación de diversos procesos biológicos. Posee un metabolismo anaerobio facultativo (puede crecer en medios fermentativos o no fermentativos (respiratorios), su tiempo generacional es relativamente corto (\approx 90 minutos) y como herramienta en la ingeniería genética es muy eficiente, ya que tanto su genoma nuclear como mitocondrial pueden manipularse por recombinación homóloga y generar mutantes *knockout*, *knockin* u otras mutaciones en los genes o secuencias de DNA de interés. La secuencia del genoma completo de *S. cerevisiae* se conoce desde 1996 (fue el primer organismo eucariote en que se obtuvo su genoma secuenciado) (Engel *et al.*, 2013), y existe evidencia científica que indica que cerca del 30% de los genes que están implicados en enfermedades humanas tienen genes ortólogos que codifican para el proteoma de la levadura, por lo que, la biogénesis y diversas funciones mitocondriales pueden ser analizadas al generar cepas mutantes de los genes que codifican para las proteínas que conforman los complejos de la cadena respiratoria y chaperonas de ensamblaje en la mitocondria de *S. cerevisiae* (Foury *et al.*, 1998; Simon y Bedalov, 2004; Altmann *et al.*, 2007; Karathia *et al.*, 2011).

Metabolismo de *S. cerevisiae* en diferentes fuentes de carbono

Fuentes de carbono fermentativas

- **Glucosa**

La glucosa es un carbohidrato que induce represión sobre la expresión de genes involucrados en el metabolismo de otras fuentes de carbono, mitocondriales o relacionados a la respiración celular, de la gluconeogénesis y de mecanismos de respuesta a estrés. Su principal vía de degradación es la glucólisis. En la levadura, la vía más notable de represión es mediante la proteína cinasa Snf1 (homólogo de AMPK de humano), y la proteína cinasa A (PKA). La represión de la respiración mitocondrial en cultivos de levadura que crecen en glucosa es conocida como efecto Crabtree (Pérez-Samper *et al.*, 2018).

- **Galactosa**

La galactosa también es una fuente de carbono fermentativa, pero que no ejerce represión sobre la expresión de los genes mitocondriales. Las enzimas involucradas en el metabolismo de la galactosa, o vía de Leloir, catalizan la conversión de galactosa a glucosa-6-fosfato. En la mayoría de los organismos, incluida *S. cerevisiae*, se requieren cinco enzimas para catalizar esta conversión: una galactosa mutarotasa, una galactocinasa, una galactosa-1-fosfato uridiltransferasa, una UDP-galactosa-4-epimerasa y una fosfoglucomutasa. En la levadura, los genes *GAL*, que codifican estas enzimas están estrechamente controlados a nivel de transcripción (Sellick *et al.*, 2008).

Fuentes de carbono no fermentativas

- **Etanol**

El metabolismo o degradación del etanol requiere de 3 pasos: Primero se necesita que el etanol sea oxidado a acetaldehído por de la alcohol deshidrogenasa. En segundo lugar, se requiere que el acetaldehído sea convertido a acetato por la acetaldehído deshidrogenasa. Finalmente, la acetil-CoA sintetasa liga al acetato a una coenzima A para formar acetil-CoA que posteriormente puede ingresar a la cadena respiratoria mediante en ciclo de los ácidos tricarboxílicos o TCA (Wills, 1990; de Smidt *et al.*, 2008).

- **Glicerol**

El metabolismo del glicerol consta de dos pasos: primero se requiere que el glicerol se fosforile en el citosol por medio de la glicerol cinasa y se forme glicerol-3-fosfato. El glicerol-3-fosfato (G3P) utiliza la lanzadera donde la enzima membranal glicerol-3-fosfato deshidrogenasa tiene su sitio catalítico ubicado hacía el citosol. Esta enzima convierte al G3P en dihidroxiacetona fosfato (DHAP). Es justo en este paso donde el glicerol-3-fosfato dona sus electrones a la altura de la ubiquinonas, reduciéndolas a ubiquinol (Klein *et al.*, 2017).

- **Lactato**

En cuanto al metabolismo del lactato, las levaduras poseen diversas lactato deshidrogenasas mitocondriales (Cyb2, Dld1, Dld2), y una citosólica (Dld3). Estas LDHs ayudan a que se oxide el lactato a piruvato y posteriormente este ingrese al ciclo de los ácidos tricarboxílicos alimentando a la cadena respiratoria a nivel de las Ndi1 y Nde1-2. Esto ocurre al tiempo que también se alimenta a la cadena respiratoria de *S. cerevisiae* a nivel del complejo IV o CcO, ya que la Cyb2 y la Dld1 pueden donar electrones directamente al citocromo c y este a la CcO (Pajot y Claisse, 1974; Lodi *et al.*, 2002; Grad *et al.*, 2005; Passarella *et al.*, 2008).

El genoma mitocondrial de *S. cerevisiae*

Como se había mencionado anteriormente, las mitocondrias poseen su propio genoma en la matriz mitocondrial y han logrado mantener a lo largo de la evolución su propia maquinaria para expresarlo (replicación, transcripción y traducción). Como parte del proceso de evolución y adquisición de nuevas funciones, la mayor parte del material genético del endosimbionte se perdió o bien, se transfirió de manera incompleta al genoma nuclear del huésped, lo que dejó al genoma mitocondrial como vestigial (Friedman y Nunnari, 2014; Ott *et al.*, 2016).

Dentro de las características del genoma mitocondrial (mtDNA), se encuentran: Su pequeño tamaño, ya que codifica para un reducido set de genes, entre los que se incluyen: mRNA, rRNA y tRNA. También posee una forma circular y de doble cadena (Malina, Larsson y Nielsen, 2018). Dicho set de genes se encuentra altamente conservado entre especies (Taanman, 1999; Freel *et al.*, 2015), es esencial para el metabolismo bioenergético y conforma el 5% de las proteínas mitocondriales (Borst y Grivell, 1978). El mtDNA se encuentra empaquetado en agregados DNA-proteína, llamados nucleoides (Ott *et al.*, 2016).

El genoma mitocondrial de levadura comprende: 7 mRNA que codifican para subunidades de los complejos que conforman la cadena respiratoria (*COX1*, *COX2* y *COX3* de la citocromo *c* oxidasa o complejo IV, el gen *COB* del citocromo *bc₁* o complejo III, los genes *ATP6*, *ATP8* y *ATP9* de la ATP sintasa o complejo V), 1 mRNA (*VAR1*) que codifica para una proteína de la subunidad pequeña del ribosoma mitocondrial, 2 rRNA (*21S* y *15S*), 24 tRNA, 1 RNA 9S (que forma parte de la enzima RNasa P) y finalmente, varios marcos de lectura abiertos (ORFs) relacionados con intrones en *COX1* y *COB* (**Figura 1**). El resto de las subunidades que comprenden los diferentes complejos respiratorios, de los ribosomas mitocondriales, son codificados en el genoma nuclear, traducidos en el citosol e importados a la mitocondria con ayuda de translocasas de membrana externa e interna de la mitocondria (Foury *et al.*, 1998; Ott *et al.*, 2016).

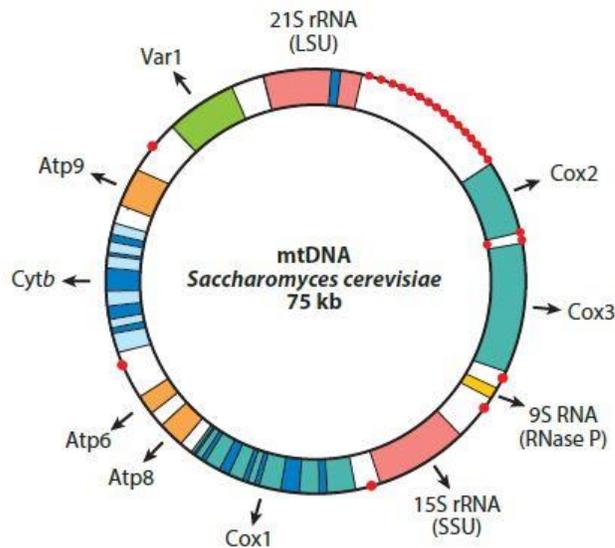


Figura 1. Organización del mtDNA de *S. cerevisiae*. El genoma mitocondrial de levadura consiste en: 8 mRNA, 2 rRNA, 24 tRNA (puntos rojos), 1 RNA 9S (componente de la RNasa P) y en color azul fuerte se ilustran intrones asociados a Cytb, Cox1 y el RNAr 21S (Ott *et al.*, 2016).

La cadena respiratoria de las levaduras

Dentro de la mitocondria ocurre la respiración aerobia, particularmente en las crestas de su membrana interna se encuentra el sistema con el cual se genera la energía necesaria para sintetizar ATP. Este sistema se denomina cadena respiratoria o cadena de transporte de electrones y consiste en diversos complejos enzimáticos que son capaces de oxidarse o reducirse. La reacción final en este proceso consiste en la reducción del O_2 a H_2O acoplada al traslocación de protones $[H^+]$ de la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana, generando un gradiente de protones y energía libre que se utilizan para sintetizar ATP en presencia de ADP y fosfato (**Figura 2**) (Lieberman y Ricer, 2014; Nelson y Cox, 2017).

1. Deshidrogenasas alternas

A diferencia de la cadena respiratoria típica de humano o bovino que presentan complejo I (NADH: CoQ oxidoreductasa), *S. cerevisiae* posee 3 NADH deshidrogenasas alternas, insensibles a rotenona, incapaces de bombear protones al espacio intermembrana y asociadas a la membrana mitocondrial interna (Nde1, Nde2 expuestas al espacio intermembrana y Ndi1 expuesta hacia la matriz mitocondrial). Algunos de los componentes enzimáticos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos o TCA (α -cetoglutarato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa) y de la β -oxidación (piruvato deshidrogenasa), son los principales donadores de electrones a la cadena respiratoria. Estos componentes se oxidan por la acción de deshidrogenasas que reducen el NAD^+ a NADH y con la ayuda de las NADH deshidrogenasas alternas donan sus electrones a la ubiquinona, reduciéndola a ubiquinol (Mourier *et al.*, 2008; Postmus *et al.*, 2011). Finalmente, las NADH deshidrogenasas son inhibidas con flavona (Kitajima-Ihara y Yagi, 1998).

2. Succinato deshidrogenasa

El complejo II (succinato:ubiquinol oxidoreductasa) forma parte del ciclo de los TCA. Esta enzima se encarga de oxidar el succinato a fumarato, donde el FAD es reducido a FADH_2 . Posteriormente el FADH_2 es reoxidado por la transferencia de electrones a través de centros Fe-S a la CoQ (ubiquinona), formando CoQH_2 (ubiquinol). Las 4 subunidades que conforman este complejo se encuentran codificadas en el genoma nuclear y posteriormente son importadas a la mitocondria. Pesa aproximadamente ≈ 100 kDa. Tiene diversos grupos prostéticos como: FAD, Cyt_{560} y 3 centros Fe-S. Cabe destacar que el complejo II tampoco transloca protones a través de la membrana mitocondrial interna (Nelson y Cox, 2017).

3. Citocromo bc₁

El ubiquinol entrega los electrones al complejo III (Citocromo bc₁ o CoQ-cit c reductasa), el cual a su vez transfiere los electrones al citocromo c. Este complejo acopla la transferencia de electrones de QH₂ al citocromo c con el transporte de 4 protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembrana. Este complejo es un dímero obligado en *S. cerevisiae*, del cual cada monómero comprende 10 subunidades: 9 origen nuclear y el cyt b de origen mitocondrial. En su forma monomérica pesa ≈240 kDa. Entre sus grupos prostéticos se encuentran: cyt b, cyt c₁ y un centro Fe-S (de Vries y Marres, 1987; Nelson y Cox, 2017).

4. Citocromo c oxidasa (CcO)

Finalmente, el citocromo c se oxida al transferir los electrones al complejo IV (citocromo c oxidasa), donde se cataliza la reducción del O₂ (aceptor final de electrones de la cadena respiratoria) a H₂O. La energía producida por esta transferencia de electrones también genera transporte de protones hacia el espacio intermembrana (de Vries y Marres, 1987; Macedo-Márquez, 2012). Cada que 2 electrones pasen a través de la CcO, se transfieren 2H⁺ al espacio intermembrana (Nelson y Cox, 2017).

5. F₀F₁-ATP sintasa

La traslocación de protones al espacio intermembrana acoplado a la transferencia de electrones en la cadena respiratoria genera un gradiente electroquímico que utiliza el complejo V (ATP sintasa) para producir ATP. Conforme los protones fluyen en favor de su gradiente de concentración hacia la matriz mitocondrial a través de este último complejo, se genera ATP (fosforilación oxidativa) (Macedo-Márquez, 2012; Lieberman y Ricer, 2014). Esta enzima es considerada un nanomotor encargado de proveer a la célula la energía química necesaria en forma de ATP. Está conformada por dos dominios, uno hidrofílico (F₁) y uno hidrofóbico o membranal (F₀). Es una enzima altamente conservada, en *S. cerevisiae*

comprende 14 subunidades en su forma monomérica y pesa ≈50 kDa, en su forma dimerica pesa ≈1200 kDa (Sánchez-Vásquez y González-Halphen, 2017; Nelson y Cox, 2017).

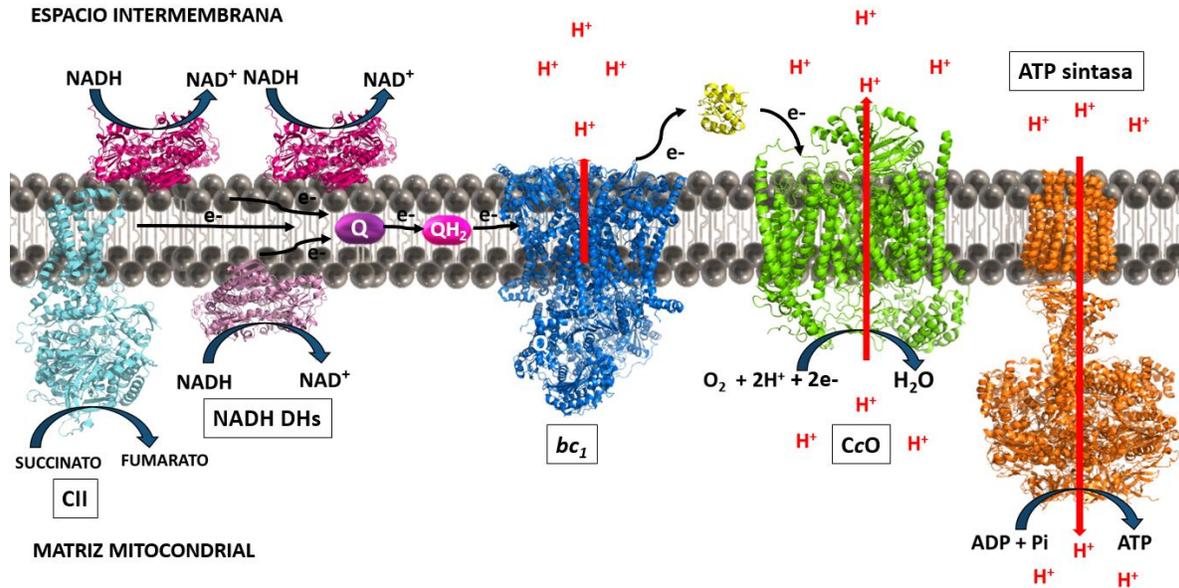


Figura 2. Modelo de la cadena respiratoria mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae*. MEM (membrana externa mitocondrial), MIM (membrana interna mitocondrial), NADH deshidrogenasas alternas o NADH DHs (externas Nde1 y Nde2, rosa fuerte PDB: 4G6G; interna NDI1, rosa claro PDB:4G6G), Complejo II (cyan PDB:1ZOY), Q (ubiquinona), QH₂ (ubiquinol), Complejo III (azul fuerte PDB: 6hu9), citocromo c (PDB:1KYO), Complejo IV o CcO (gris), subunidad Cox1 de la CcO (verde claro PDB:6hu9), Complejo V (naranja PDB:2XOK), la transferencia de electrones se ilustra con flechas negras y el transporte de protones a través de la MIM se ilustra con flechas rojas.

6. Supercomplejos respiratorios

Los diferentes complejos enzimáticos de la cadena respiratoria son capaces de asociarse entre sí y formar supercomplejos -también conocidos como respirasomas (**Figura 3**) - que varían en conformación dependiendo del tipo celular, necesidades metabólicas y de las condiciones fisiológicas, por ejemplo: I/III₂, I/III₂/IV, I/III₂/IV₂, III₂/IV, III₂/IV₂ (Vartak *et al.*, 2013).

En *S. cerevisiae* no hay complejo I por lo que solo existen conformaciones de supercomplejos como: III₂/IV o III₂/IV₂ (Hartley *et al.*, 2018). Sin embargo, evidencias previas sugieren que la NADH dehidrogenasa interna (Ndi1), también puede asociarse a estos supercomplejos (Matus-Ortega *et al.*, 2015).

En cuanto a las funciones de los supercomplejos, existen reportes que apuntan a que sirven para hacer más eficiente la transferencia de electrones entre los complejos de la cadena respiratoria y de esta manera reducir el estrés oxidante, al proteger sitios vulnerables a él, así como también evitar el escape de electrones entre complejos, que puedan formar especies reactivas de oxígeno (Vartak *et al.*, 2013; Acin-Perez y Enriquez, 2014; Milenkovic *et al.*, 2017; Fedor y Hirst, 2018). Alrededor del 0,2%-2% de los electrones en la cadena respiratoria no siguen el orden normal de transferencia y escapan para reaccionar con el O₂ y producir superóxido (O₂⁻) o peróxido de hidrogeno (H₂O₂) (Zhao *et al.*, 2019).

La formación de ROS en la cadena de transporte de electrones de levadura, sucede en diferentes complejos:

- Las NADH deshidrogenasas alternas que están del lado del espacio intermembrana son las que probablemente generen ROS, en lugar del complejo I (ya que en *S. cerevisiae* no existe dicho complejo) (Macedo-Márquez, 2012).
- El complejo II produce ROS en el sitio II_F y está asociado con la cantidad de flavoproteína reducida, cuyo FAD es potente sitio de fuga de electrones para generar ROS (Zhao *et al.*, 2019).
- En el complejo III, transfiere electrones a través del ciclo Q. En este proceso, la ubisemiquinona (QH⁻) del sitio Q_o que transporta un solo electrón, puede moverse

libremente en el CIII, liberando el único electrón al O_2 , formando ROS a través de una reacción no enzimática (Zhao *et al.*, 2019).

- El complejo IV o CcO, es menos propenso a producir ROS cuando el O_2 está ligado a Fe_{a3}^{2+} (grupo hemo a_3) o cuando el O^2 está polarizado negativamente (O^{2-}), y se espera que sufra un cambio estructural. Este cambio estructural permite que O^{2-} reciba tres equivalentes de electrones de Cu_B^{1+} , Fe_{a3}^{3+} y el grupo hidroxilo de Tyr244 (Tyr-OH), proporcionando la reducción completa de O^2 y minimizando la producción de ROS (Zhao *et al.*, 2019).

Por lo que la formación de supercomplejos ayudaría a mitigar la formación de ROS en los sitios antes mencionados.

Otra función que se les ha atribuido a los supercomplejos es que confieren estabilidad a los complejos respiratorios (Vartak, *et al.*, 2013)

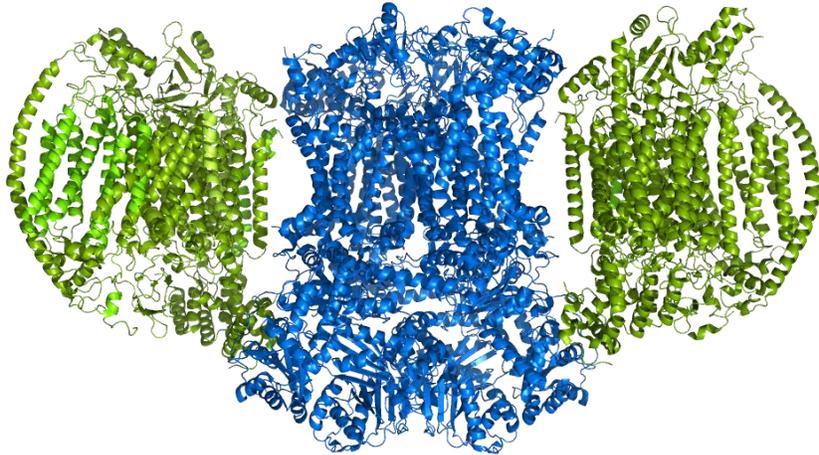


Figura 3. Modelo cristalográfico de los supercomplejos de *S. cerevisiae*. Dímero de la citocromo c oxidasa o complejo IV (verde). En azul se ilustra el dímero obligado del complejo III o citocromo bc_1 . PDB: 6hu9 (Hartley *et al.*, 2018)

Complejo IV o citocromo c oxidasa (CcO)

La citocromo c oxidasa es el último complejo aceptor de electrones en la cadena respiratoria, cataliza la transferencia de electrones del citocromo c reducido al O_2 . Por cada dos electrones que se transfieren a este complejo, utiliza $2 H^+$ para reducir $\frac{1}{2} O_2$ en H_2O . Este proceso está acoplado al transporte de $2 H^+$ desde la matriz mitocondrial hasta el espacio intermembrana (Nelson y Cox, 2017).

En mamíferos, la CcO está compuesta por 14 subunidades (Timón-Gómez *et al.*, 2018), mientras que en levaduras está compuesta por 12 subunidades y tiene un peso ≈ 240 kDa (**Figura 4**). Tres de ellas, Cox1, Cox2 y Cox3 (conforman el centro catalítico de la enzima y se han conservado durante la evolución), se encuentran codificadas en el genoma mitocondrial, son anfipáticas o altamente hidrofóbicas y se sintetizan en la matriz mitocondrial (Hartley *et al.*, 2018). Las subunidades restantes son codificadas en el genoma nuclear, se traducen en el citosol y posteriormente son importadas a la mitocondria. Éstas son necesarias para brindar estabilidad y ensamblar el complejo (Fontanesí, Soto y Barrientos, 2008). Las subunidades Cox1 y Cox2 contienen los centros metálicos activos (iones de Cu). Cox2 posee 2 iones de Cu^{2+} con los grupos -SH (tiol) de 2 cisteínas, que en conjunto forman el centro binuclear denominado Cu_A . Por otro lado, la subunidad Cox1 contiene dos grupos hemo (α - a_3) y otro ion Cu^+ (Cu_B). El grupo hemo a_3 y el Cu_B forman el segundo centro Fe-Cu catalítico binuclear. Se sugiere que la subunidad Cox3 es esencial para el movimiento de protones a través de la subunidad 2. Los electrones pasan del citocromo c reducido al centro Cu_A en Cox2, posteriormente se transfieren al grupo hemo α , y luego al centro hemo a_3 - Cu_B de Cox1, que es donde finalmente se transfieren los electrones al O_2 (Soto *et al.*, 2012; Nelson y Cox, 2017; Zee y Glerum, 2006).

La CcO es una enzima altamente regulada y esencial en la cadena respiratoria, por lo que su actividad afecta de manera importante a la función mitocondrial. Una gran actividad de la CcO, así como disfunción, promueven la generación de estrés oxidante en diversas enfermedades, por ejemplo, la enfermedad de Leigh (Srinivasan y Avadhani, 2012; Lee *et al.*, 2012).

Algunos de los mecanismos que influyen en una CcO con actividad disfuncional, incluyen: defectos en su ensamblaje, modificaciones o pérdida de las subunidades que la conforman e inhibiciones directas a su actividad. Esto se ve reflejado en una disminución en la formación de ATP y un incremento en la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) dentro de la mitocondria, como es el caso del anión superóxido (el cual se convierte a H_2O_2 por la superóxido dismutasa en la matriz mitocondrial). Cabe destacar que la mitocondria es el sitio celular que funciona como la mayor fuente de ROS, las cuales se forman debido a las múltiples reacciones redox por el transporte de electrones (Srinivasan y Avadhani, 2012).

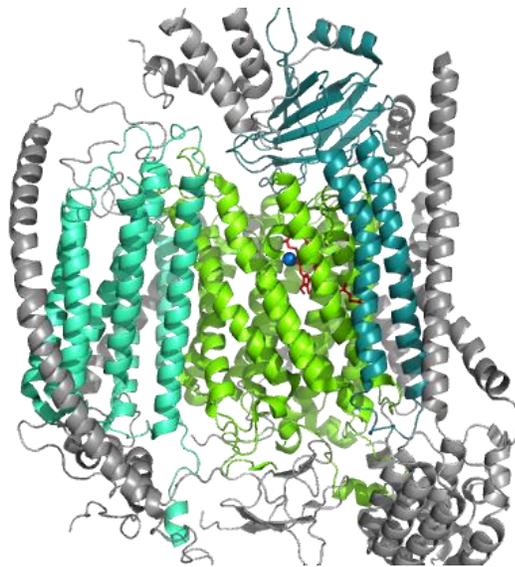


Figura 4. Modelo cristalográfico de la citocromo c oxidasa (complejo IV) de *S. cerevisiae*. En gris se ilustran las subunidades codificadas en el genoma nuclear. En verde, las subunidades codificadas en el genoma mitocondrial: Cox2 (verde fuerte), Cox1 (verde claro) y Cox3 (verde agua). En rojo se ilustran los grupos hemo a y hemo a_3 . En azul, los centros Cu_A y Cu_B . PDB: 6hu9.

(Hartley *et al.*, 2018)

La subunidad 1 de la Citocromo c Oxidasa (Cox1)

Cox1 es la subunidad más grande de la CcO (su estructura la conforman 534 aminoácidos en levadura). Junto con Cox2 y Cox3 conforman el centro catalítico de dicho complejo. Es una subunidad altamente hidrofóbica, se encuentra embebida en la membrana interna mitocondrial, a la cual atraviesa 12 veces. Cabe destacar que su extremo carboxilo terminal (C-ter) es hidrofílico, soluble en la matriz mitocondrial y en *S. cerevisiae* lo conforman 54 aminoácidos. Posee los grupos hemo *a* y hemo a_3 -Cu_B donde se lleva a cabo la reducción de O₂ (**Figura 5**), a través de ella se translocan protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana (Tsukihara *et al.*, 1996; Timón-Gómez *et al.*, 2018).

La traducción del mRNA de *COX1* se lleva a cabo en la matriz mitocondrial por ribosomas adosados a la membrana interna e involucra una gran cantidad de proteínas. La activación traduccional del mRNA de *COX1* se lleva a cabo específicamente por Pet309, Mss51 y Pet54 (la cual ayuda a cambiar a una conformación activa a Mss51), al interaccionar con su extremo 5'UTR (no traducible). Posteriormente, con ayuda de la traslocasa Oxa1, se facilita su inserción de Cox1 manera cotraduccional en la membrana interna (Bonney *et al.*, 2009). Mss51 ejerce una segunda función sobre Cox1 recién sintetizada como chaperona de su ensamblaje en la membrana interna (Pérez-Martínez, 2003). Mss51 y Cox1 recién sintetizada forman intermediarios de ensamblaje de alto peso molecular (complejos COA) junto con chaperonas como Cox14 y Coa3. Durante el proceso inicial de ensamblaje de la CcO, Mss51 se mantiene secuestrada en estos complejos COA. Si esta etapa temprana de ensamblaje procede correctamente, entonces Mss51 se libera para activar una nueva ronda de traducción del mRNA de *COX1* (García-Guerrero, *et al.*, 2018; Mick *et al.*, 2011; Ott *et al.*, 2016). Cabe destacar que cuando existen mutantes de ensamblaje de la CcO, Mss51 queda secuestrada en estos complejos COA y por lo tanto no puede activar de nuevo la traducción del mRNA de *COX1*. Esto se refleja en que la síntesis de Cox1 disminuye (Barrientos, Zambrano y Tzagoloff, 2004). Finalmente, la CcO forma supercomplejos con el complejo III o *bc₁*, (Mick *et al.*, 2011; Ott *et al.*, 2016; García-Villegas *et al.*, 2017; Timón-Gómez *et al.*, 2018).

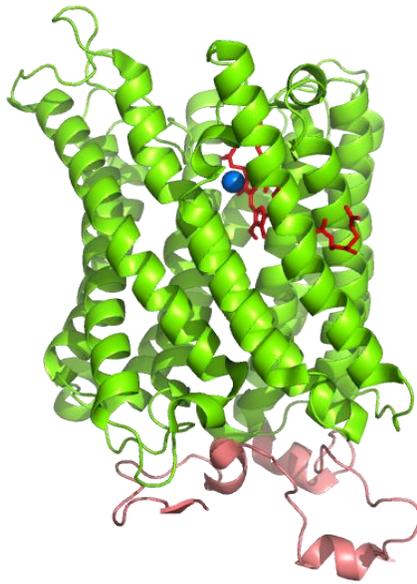


Figura 5. Modelo cristalográfico de la subunidad 1 de la CcO de *S. cerevisiae* (Cox1). Se ilustra el centro catalítico conformado por: en rojo los grupos hemo a y hemo a_3 , en azul el centro Cu_B . En rosa se señala el extremo carboxilo terminal. PDB: 6hu9. (Hartley *et al.*, 2018).

El extremo carboxilo terminal de Cox1 regula su síntesis, su estabilidad y la formación de supercomplejos

Estudios previos en el laboratorio, indican que el extremo carboxilo terminal de Cox1 tiene un papel importante en la biogénesis de Cox1 y de la CcO a diferentes niveles. Por un lado, participa en la regulación negativa de la síntesis de Cox1. Cuando existen defectos en el ensamblaje de la CcO, en una cepa silvestre (WT) la síntesis de Cox1 disminuye. Sin embargo, al generar una mutante carente de los últimos 15 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de Cox1 (Cox1 Δ C15) o mutar puntualmente aminoácidos altamente conservados como las prolinas de las posiciones 521 y 522 por alaninas (P521A/P22A), la síntesis de Cox1 se restablece, aunque la CcO no se ensamble de manera correcta. Se propone que esta región de Cox1 es importante para la interacción entre Mss51 y Cox14 (Shingú-Vázquez *et al.*, 2010; García-Villegas *et al.*, 2017). En mutantes Cox1 Δ C15 esta

interacción se pierde y Mss51 queda libre para sintetizar más Cox1, aunque no se ensamble, y por lo tanto hay una síntesis desregulada de Cox1. En un análisis de secuencias del extremo carboxilo terminal de Cox1 en varias especies se observó que existen aminoácidos conservados, entre ellos las dos prolinas que se mutaron a alaninas (**Figura 6**) (Shingú-Vázquez *et al.*, 2010).

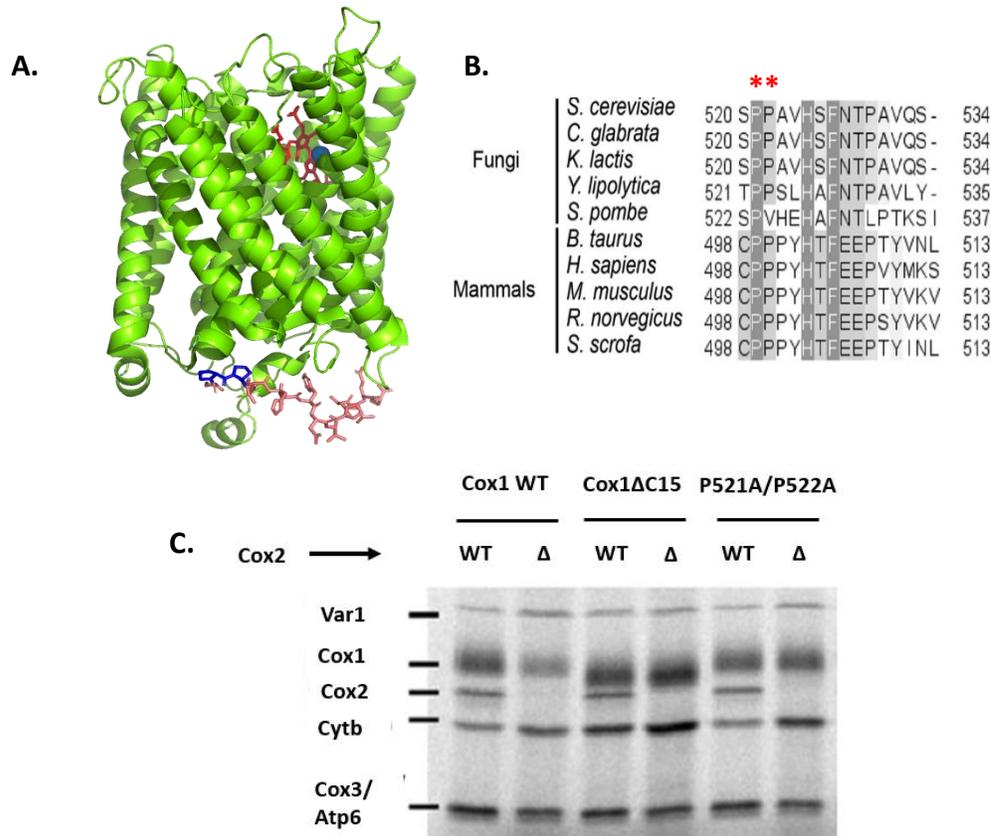


Figura 6. Los últimos 15 aminoácidos de Cox 1 regulan la síntesis de Cox1. **A.** En verde se ilustra a la subunidad Cox1 y en rosa se remarcan los últimos 15 aminoácidos de su extremo carboxilo terminal, solubles en la matriz mitocondrial. En azul, se remarcan las prolinas que fueron mutadas puntualmente por alaninas (PDB: 6hu9). **B.** Alineamiento de los últimos 15 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de Cox1 en diversas especies de mamíferos y hongos (en gris fuerte se remarcan los aminoácidos altamente conservados, en gris claro los conservados medianamente y en * los aminoácidos que fueron mutados de manera puntual). **C.** Ensayo de traducción mitocondrial. Las células se incubaron con [³⁵S] metionina en presencia de cicloheximida y las proteínas mitocondriales se analizaron por SDS-PAGE y autoradiografía. Se muestran las proteínas codificadas en el genoma mitocondrial (modificado de: Shingú-Vázquez *et al.*, 2010).

Por otro lado, en el laboratorio demostramos que cuando la CcO no se ensambla correctamente, entonces no hay formación de supercomplejos (García-Villegas *et al.*, 2017). Sin embargo, en una cepa con Cox1 Δ C15 y con defectos en el ensamblaje de la CcO, se forman supercomplejos, aunque éstos no son funcionales (supercomplejos III₂/IV y III₂/IV₂) (**Figura 7A**). Esto sugiere que el extremo C-ter de Cox1 modula la acumulación/estabilidad de supercomplejos. Este fenómeno podría deberse a que la cepa Cox1 Δ C15 es más estable o menos propenso a la degradación que Cox1 WT, propiciando la formación de estos supercomplejos no funcionales (**Figura 7B**) (García-Villegas *et al.*, 2017; García-Villegas, 2018). Estos resultados indican que el extremo C-ter de Cox1 es una señal que da estabilidad a Cox1 y que regula la formación/acumulación de supercomplejos. Al no estar presente, se forman supercomplejos no funcionales y la proteína Cox1 gana estabilidad (**Figura 7C**), aún en casos en que la CcO no se ensamble.

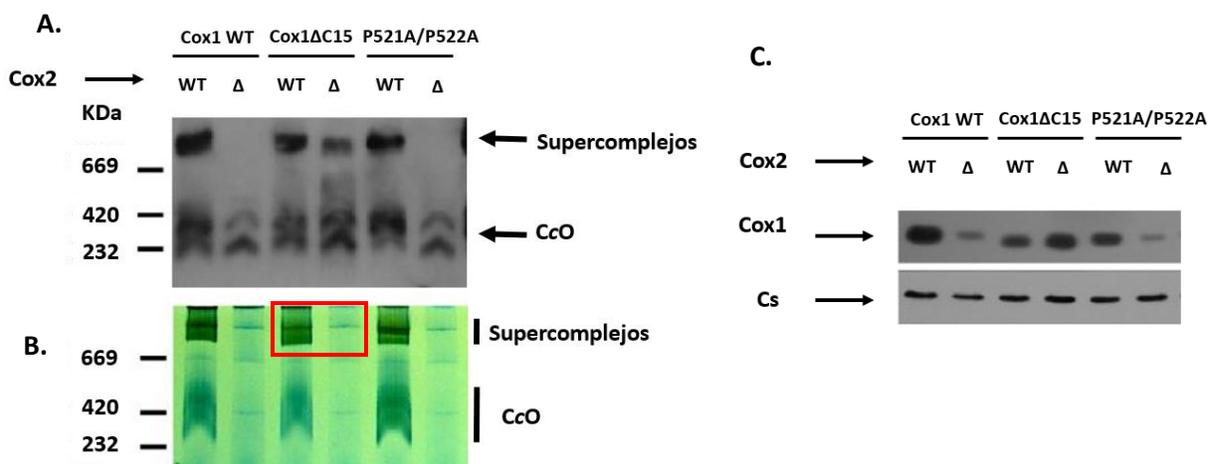


Figura 7. La cepa Cox1 Δ C15 forma supercomplejos no funcionales en mutantes con defectos en el ensamblaje de la CcO en galactosa. **A.** Electroforesis en gel azul nativo (BN-PAGE) de mitocondrias solubilizadas con digitonina 1%. Un gel se transfirió a una membrana de PVDF y se analizó por western blot usando anticuerpos contra Cox1. Se observan las bandas correspondientes a supercomplejos y a la CcO. **B.** Al Otro gel se le adicionó Cytocromo c de caballo y diaminobencidina, las bandas cafés reflejan la actividad de la CcO. La región de supercomplejos no funcionales se indica con un recuadro rojo. **C.** Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS de mitocondrias de cepas mutantes y detección por western blot con anticuerpos específicos: α -Cox1 y como control de carga α -citrato sintasa (Cs) (Modificado de: García-Villegas *et al.*, 2017).

Cabe mencionar que, aunque la cepa con Cox1 Δ C15 perdió el mecanismo de regulación de la síntesis de Cox1, de acumulación/formación de supercomplejos y de estabilidad de Cox1, la cepa aún puede crecer en medios respiratorios (**Figura 8**).

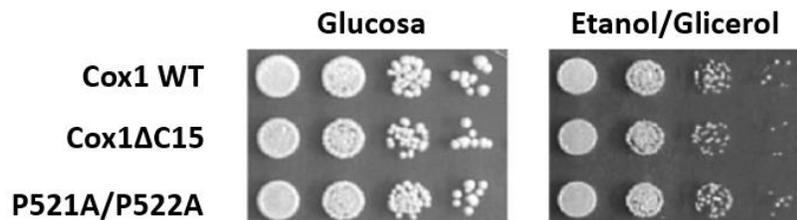


Figura 8. Las mutaciones del extremo C-ter de Cox1 no afectan el crecimiento de las cepas en medios respiratorios. Diluciones seriadas 1/10 de las cepas Cox1 WT, las mutantes del extremo C-ter de Cox1 crecidas en el medio fermentativo (glucosa) y en el medio respiratorio (etanol/glicerol) (García-Villegas *et al.*, 2017).

En este trabajo nos preguntamos si las células presentan algún defecto en la función mitocondrial y en su crecimiento en diferentes condiciones derivado de la falta de regulación de la biogénesis de Cox1 por mutaciones en el extremo C-ter de Cox1.

Justificación

La subunidad 1 de la CcO es una proteína cuya síntesis en el interior de la mitocondria es altamente regulada, en la cual participan al menos 10 diferentes proteínas específicas (Ott *et al.*, 2016). Cox1 está sujeta a un control traduccional muy importante, incluso en humanos, donde existen diversos reportes sobre esto, un caso es el de la proteína Taco1. En pacientes humanos que presentaban el síndrome de Leigh, se observó que una inserción de 1pb resulta en un codón de paro prematuro en *CCDC44*, el homólogo de *TACO1*. Esto generó una reducción en los niveles basales de Cox1 y, por lo tanto, una deficiencia en la CcO (Weraarpachai *et al.*, 2009). Muchas de las chaperonas involucradas en el proceso de síntesis de Cox1 están conservadas en humanos y en algunos casos mutaciones se asocian a patologías en humanos (Mick *et al.*, 2011; Hornig-Do *et al.*, 2012; Rak *et al.*, 2016). Incluso defectos en el citocromo *c* y en la ATP sintasa también afectan la síntesis de Cox1, indicando que éste es un proceso muy sensible a las condiciones celulares (Barrientos *et al.*, 2003; Soto *et al.*, 2009). El extremo carboxilo terminal tiene un papel importante en la regulación de la síntesis de Cox1, en su estabilidad y en la formación de supercomplejos (Shingú-Vázquez *et al.*, 2010; García-Villegas *et al.*, 2017). Por ello, el extremo C-ter de Cox1 es un regulador central de la biogénesis de Cox1 y de la CcO. En este trabajo nos interesa encontrar condiciones en que las células mutantes de esta región de Cox1 tengan defectos en su crecimiento, así como en la función de sus mitocondrias, para tratar de encontrar cuál es la función de tan intrincada regulación de la biogénesis de Cox1.

Previamente en el laboratorio y con la colaboración de los doctores Alexander de Luna (LANGEBIO) y Rodolfo García Villegas (nuestro laboratorio) pudimos detectar que la cepa con Cox1 Δ C15 presentaba una edad cronológica disminuida, no así la mutante P521A/P522A (**Figura 9**).

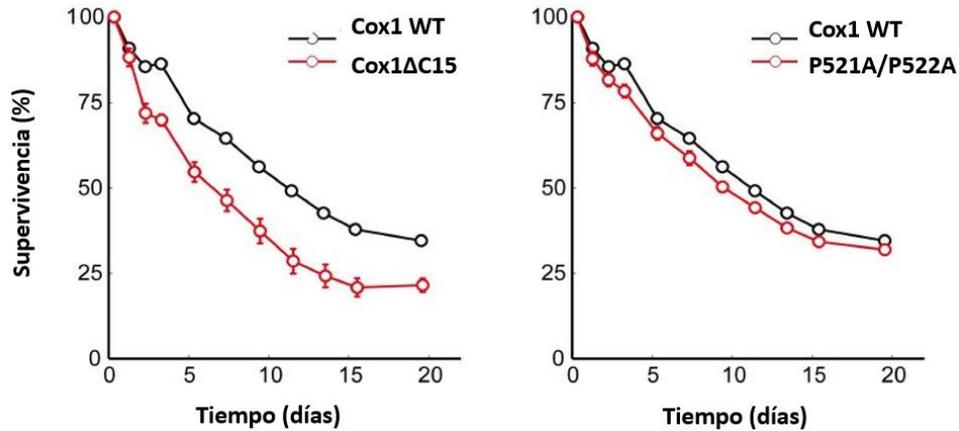


Figura 9. Envejecimiento cronológico de las cepas mutantes Cox1ΔC15 y P521A/P522A (PP521AA) a comparación de la cepa Cox1 WT. Líneas negras (WT) y líneas rojas (cepas mutantes), indican porcentaje de supervivencia (No publicado, modificado de: García-Villegas, 2018)

Este dato nos indica que a pesar de que las mutantes son capaces de respirar, la falta de regulación de la biogénesis de la CcO tiene consecuencias en la supervivencia de las células.

Además, se ha propuesto que cuando ocurren mutaciones que generan defectos en el ensamblaje de la CcO (por ejemplo, una Cox1 mal ensamblada), particularmente que involucren al grupo hemo α , éste adquirirá actividad de peroxidasa. Esto sugiere que se pueden producir especies prooxidantes al interactuar el grupo hemo α con el H_2O_2 y generar una mayor sensibilidad a estrés en las células (Khalimonchuk *et al.*, 2007). Pensamos que las mutantes que no regulan la síntesis de Cox1 y formación/acumulación de supercomplejos podrían tener este tipo de defecto. En este trabajo nos interesa caracterizar cómo crecen las mutantes en diferentes fuentes de carbono y de temperatura, si su resistencia a estrés oxidante por H_2O_2 cambia respecto a una cepa silvestre, y si la actividad y función de la cadena respiratoria se afecta por mutaciones en el extremo C-ter de Cox1.

Pregunta de investigación

¿De qué manera se afecta la función mitocondrial y el crecimiento de cepas de levadura que perdieron el mecanismo de regulación de la biogénesis de Cox1?

Hipótesis

Dado que la síntesis y ensamblaje de Cox1 son procesos altamente regulados, esperamos que, al perderse esta capacidad de regulación mediante las mutaciones Cox1 Δ C15 y P521A/P522A, las células de *S. cerevisiae* presenten algún defecto en su crecimiento en diferentes condiciones de estrés o en su función mitocondrial.

Objetivo general

El objetivo de este proyecto es caracterizar el fenotipo y la función mitocondrial en diversas cepas mutantes de *S. cerevisiae* que no regulan la síntesis de Cox1, ni la formación de supercomplejos de la cadena respiratoria. Nos concentramos en 2 mutantes: una que elimina los últimos 15 aminoácidos de Cox1 (Cox1 Δ C15), y otra que tiene dos mutaciones puntuales en el extremo C-ter de Cox1, P521A y P522A (P521A/P522A).

Objetivos particulares

1. Determinar la sensibilidad al estrés oxidante de las cepas Cox1 Δ C15 y P521A/P522A mediante los compuestos prooxidantes, como el H₂O₂.
2. Observar el efecto que el estrés térmico (a 37°C) tiene sobre el crecimiento de las cepas mutantes en comparación con el de la cepa WT.
3. Analizar cualitativamente la actividad de las NADH deshidrogenasas alternas y citocromo c oxidasa (CcO), mediante electroforesis en geles azules nativos.
4. Cuantificar espectrofotométricamente la síntesis de ATP de las cepas WT y mutantes del extremo C-ter de Cox1.

Cepas y medios

Para la elaboración de este trabajo se utilizaron cepas isogénicas al fondo genético nuclear D273-10B. En el apartado de la lista de cepas se anexa el genotipo de cada cepa WT y mutante utilizada. Las células se incubaron tanto en medios fermentativos: YPD (glucosa), YPGal (galactosa), CSM + glucosa (medio completo sintético con glucosa), como respiratorios: YPEG (etanol-glicerol) y YPLac (lactato).

<u>YPD</u>	
Extracto de levadura	1%
Bacto-peptona	2%
Dextrosa	2%
Adenina	30 mg/L
Medio sólido	
Bacto agar	2%

<u>YPGal</u>	
Extracto de levadura	1%
Bacto-peptona	2%
Galactosa	2%
Adenina	30 mg/L
Medio sólido	
Bacto agar	2%

<u>YPLac</u>	
Extracto de levadura	1%
Bacto-Peptona	1%
NH ₄ SO ₄	0.12%
KH ₂ PO ₄	0.1%
Lactato	2%
*Ajustar a un pH 5.5 con NaOH	
Medio sólido	
Bacto agar	2%

<u>YPEG</u>	
Extracto de levadura	1%
Bacto-peptona	2%
Glicerol	3%
Etanol	3%
Adenina	30mg/L
Medio sólido	
Bacto agar	2%

<u>CSM + dextrosa</u> <u>(Medio mínimo)</u>	
Base nitrogenada sin aminoácidos	0.67%
Dextrosa	2%
Medio sólido	
Bacto agar	2%

Obtención de la fracción mitocondrial cruda

1. Se creció una colonia de levadura en 2mL de medio YPGal o YPLac toda la noche a 30°C.
 - Si era medio rico con 2mL fue suficiente para inocular el matraz de 1L.
 - Si era medio mínimo se siguió el siguiente paso.
2. Se sembraron los 2mL de precultivo en 50 mL del mismo medio y se incubó a 30°C toda la noche.
3. El cultivo anterior se sembró en 1L del mismo medio y se incubó toda la noche ≈15 a 18 h a 30°C hasta una A_{600} entre D.O.=1.0 ± 0.1 (fase exponencial de crecimiento). Para este paso se consideró la curva de crecimiento para que el cultivo no se pasara de una densidad óptica (D.O.) = 1.0
4. Se centrifugaron a 4,000rpm por 5min a 4°C en el rotor JA-10 (Beckman).
5. Se lavó el botón con H₂O destilada (dH₂O) y fría, se juntó todo el botón en un tubo de centrifuga previamente pesado.
6. Se centrifugaron a 4,000rpm por 5min a 4°C en un rotor JA-10. Se eliminó el sobrenadante y se pesó el botón.
7. Se resuspendió el botón en amortiguador TD (2 mL/g de peso húmedo).
8. Se agitó durante 10min a 30°C.
9. Se centrifugó durante 5min a 3,300rpm en un rotor JA-10.
10. Se lavó el botón con amortiguador MPZ (7 mL/g de peso húmedo).

11. Se centrifugó durante 5min a 3,300rpm en rotor un JA-10.
12. Se resuspendió el botón en amortiguador MPZ (7 mL/g peso húmedo), y se adicionó zimoliasa-20T (marca Sigma Aldrich) 3 mg/g peso húmedo.
13. Se agitó de 30-60min a 30°C.
14. Se centrifugó a 2,500rpm por 5min a 4°C en rotor JA-10.
15. Se resuspendió en $\frac{1}{4}$ del volumen requerido de amortiguador Dounce (13.4mL/g de peso húmedo). (70 mL por cepa)
16. Se homogeneizó 10 veces en 70mL de amortiguador usando un homogeneizador y pistilo de vidrio (Estrecho).
17. Se centrifugó durante 5min a 3,300rpm a 4°C en un rotor JA-10. Se recuperó el sobrenadante.
18. Se centrifugó durante 5min a 3,300rpm a 4°C en un rotor un JA-10. Se recuperó el sobrenadante.
19. Se centrifugó durante 12min a 12,000rpm a 4°C en rotor un JA 25.5 y se desechó el sobrenadante.
20. Se resuspendió suavemente el botón en 2mL de amortiguador SEH (se utilizó una punta de la micropipeta cortada), después se resuspendió el botón completamente y se le agregaron 8mL de amortiguador SEH.
21. Se centrifugó durante 12 min a 12,000rp, a 4°C en rotor un JA 25.5 y se desechó el sobrenadante (en el botón se encontraban las mitocondrias crudas).
22. Se cuantificó por espectrofotometría la proteína (método de Lowry) de la siguiente manera: llevar 10 μ L de mitocondrias crudas a 1000 μ L con SDS al 0.6%, agitar en vórtex.
23. Finalmente, se congeló en nitrógeno líquido y se guardó a -70°C en alícuotas de 20 μ L.

- **Amortiguadores para la purificación de mitocondrias**

TD (Tris-DTT)

Tris-SO ₄ pH 9.4	0.1 M
DTT	10 mM

MPZ

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

Homogeización (Dounce)

Tris pH7.4	10 mM
EDTA	1 mM
BSA	0.2% p/v
TLCK	50 µg/ml
Sorbitol	0.6 M o 1.2 M
PMSF	1 mM

Sorbitol/EDTA/HEPES (SEH)

HEPES	20 mM
Sorbitol	0,6 M o 1,2 M
EDTA	1 mM

Cuantificación de proteínas por el método de Lowry modificado

Solución A	
Na ₂ CO ₃	2%
NaOH	0.4%
Na ₂ tartrato	0.16%
SDS	1%

Solución B
Cu ₂ SO ₄ .5H ₂ O 4%

Solución C
Se mezclaron 100 volúmenes A + 1 volumen de B

Solución D
Se mezcló 1 volumen de reactivo de Folin con 1 volumen de agua

1. Se ajustó la muestra con agua a 1 mL.
2. Se adicionaron 3 mL de la solución C y se mezclaron en vórtex. Se incubó 10 min a TA.
3. Se adicionaron 300 µL de la solución D, se mezcló en vórtex y se incubó 30 min a TA.
4. Se midió la absorbancia a 740 nm.

- **Preparación de la curva de calibración:**

Se utilizó una solución de albúmina de 1 mg/mL. Guardada en alícuotas a -20°C.

Se utilizaron 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 µL de albúmina. Posteriormente, se llevó a 1 mL con agua, como indica el paso #1.

- **Preparación de la muestra:**

Se diluyó la muestra 1:10 con dH₂O. Se agregaron los volúmenes indicados y se llevó a 1 mL con agua, como lo indica el paso #1.

1. 5 µL
2. 5 µL
3. 10 µL
4. 10 µL
5. 20 µL
6. 20 µL

Geles de acrilamida desnaturalizantes 12% (SDS-PAGE)

Preparación del gel:

	Gel separador 12%	Gel apilador 4%
Acrilamida 30% Bisacrilamida 0.8%	3mL	488µL
Tris 2M pH 8.8	1.4mL	-
Tris 2M pH 6.8	-	234µL
SDS 20%	75µL	19µL
dH₂O	3mL	3mL
APS 10%	38µL	38µL
TEMED	3.8µL	3.8µL

-Grosor del gel: 0.75 mm y 10 pozos.

- Agua destilada (dH₂O)

1. Se corrió el gel a 80V hasta que el azul de bromofenol llegara a la fase separadora y a 200V hasta que este saliera del gel.

Amortiguador de carga 2X (SB)	
Tris-HCl pH 6.8	100mM
Glicerol	20%
SDS	4%
β-mercaptoetanol	5%
Azul de bromofenol	0.2%
PMSF*	2mM

Amortiguador de corrida 10X	
Tris-HCl pH 8.3	0.25M
Glicina	2.5M
SDS	1%

(*Solo si es necesario, agregar al momento con SB 1X)

Geles azules nativos y solubilización de la proteína mitocondrial (BN-PAGE)

1. Se descongeló en hielo 250 μ g de proteína mitocondrial.
2. Se resuspendió en 250 μ L de amortiguador de lavado.
3. Se centrifugó a las mitocondrias a 12 000rpm por 2min y se eliminó el sobrenadante.
4. Se centrifugó nuevamente y se eliminó el sobrenadante que quedó.
5. Se homogeneizó completamente las mitocondrias en 45 μ L de amortiguador de muestra.
6. Se agregó 5 μ l de digitonina al 10% (p/V) y se dejó solubilizar en hielo por 30min.
7. Se centrifugó nuevamente durante 12min a 13200rpm a 4°C.
8. Se rescató el sobrenadante (50 μ L aproximadamente), y se agregó 2.5 μ L de solución de coomassie al 5% (p/V).
9. Finalmente, se cargaron 10 μ L de proteína (\approx 50 μ g de proteína mitocondrial) en un gel de SDS-PAGE.
10. Se dejó correr el gel 25min a 15mA con el amortiguador del cátodo al 0.02% de coomassie (se dejó correr aproximadamente un tercio del gel)
11. Se cambió el amortiguador del cátodo por el de 0.002% de coomassie y se dejó correr a 6mA hasta que se salió el frente del gel, aproximadamente en 2hr.
12. Para los ensayos de inmunoréplica tipo western blot se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de PVDF por 2 horas a 1.5mA por cm² de membrana.
13. Las membranas se lavaron con metanol 100% por 3min para eliminar el colorante azul de coomasie.
14. Se bloqueó la membrana por 1hr con solución de bloqueo
15. Para determinar la actividad de los complejos en el gel se incubó el gel con la solución indicada en la página 44.

- **Amortiguador de lavado**

Sorbitol	250 mM
Bis-tris	50 mM
Imidazol	75 mM

*Ajustar el pH a 7.0 con HCl

- **Amortiguador de muestra**

Ácido aminocaproico	750mM
Bis-tris	50mM
Imidazol	75mM

*Ajustar el pH a 7.0 con HCl

1. Preparación del gel azul nativo:

	Acrilamida 4%	Acrilamida al 5%	Acrilamida al 12%
Acrilamida 48.5% Bisacrilamida 1.5%	250µL	0.51mL	1.34mL
Amortiguador de gel 3X	1mL	1.69mL	1.69mL
Glicerol (80%)	-	0.32mL	1.28mL
Agua	1.73mL	2.5mL	0.72mL
APS 10%	16µL	13.5µL	13.5µL
TEMED	5µL	4.9µL	4.9µL
Volumen total	3mL	9mL	9mL

*Apilador -Grosor del gel: 1.5mm y contenía 10 pozos.

- **Solución de coomassie Serva Blue G**

Azul de coomassie Serva G 5%

Se disolvió en 100µL de amortiguador de muestra

- **Amortiguador del gel 3X**

Bis-tris 150 mM

Ácido aminocapróico 1.5 M

Imidazol 75 mM

Ajustar el pH a 7.0 con HCl

- **Amortiguador del cátodo (superior)**

Tricina 50 mM

Bis-tris 15 mM

Imidazol 75 mM

Azul de coomassie Serva G 0.002%

- **Amortiguador de ánodo (inferior)**

Bis-tris 50 mM

Imidazol 75 mM

Ajustar el pH a 7.0 con HCl

Actividades de los complejos en geles (BN-PAGE o azules nativos)

1. Actividad de las NADH deshidrogenasas alternas

La actividad de las NADH deshidrogenasas alternas (Nde1, Nde2 y Ndi1), se observó como bandas de tono morado en los geles azules nativos. Cada gel se incubó en una solución con un amortiguador Tris 10mM-HCl pH7.4, bromuro de metiltiazolildifenil tetrazolio (MTT) 1.2mM y NADH 0.56mM, a temperatura ambiente, en agitación constante durante 10 -20min. Finalmente, se desechó la solución y se eliminó el exceso de azul coomassie con una solución de metanol al 50% y ácido acético al 10%.

2. Actividad de la CcO

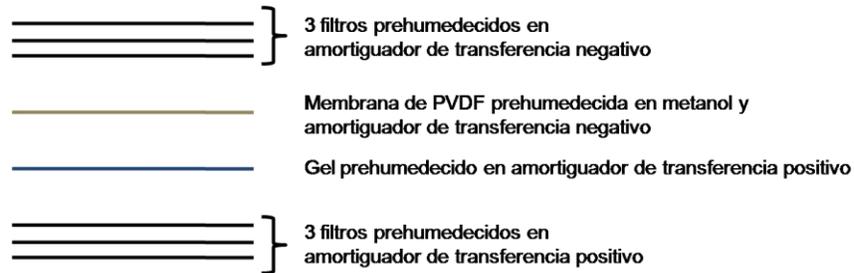
La actividad de la citocromo c oxidasa (CcO) se reveló en los geles azules nativos, incubando el gel en amortiguador de fosfatos 50mM pH7.4, diaminobencidina al 0.04% y citocromo c de corazón de caballo al 0.02%. Los geles se incubaron por dos horas en agitación constante a TA (temperatura ambiente). La actividad de la CcO se observa como bandas color café (oxidado). Finalmente, se desechó la solución, se fijaron las proteínas al gel y se eliminó el exceso de coomassie con una solución de metanol al 50% y ácido acético al 10%.

3. Tinción en azul de coomassie

Como control de carga se tiñeron con azul de coomassie los geles para poder observar las de proteínas de cada muestra. Se incubaron los geles durante una noche a temperatura ambiente en agitación constante en una solución de azul de coomassie Serva G al 0.25%, metanol al 45% y, ácido acético al 10%. Finalmente, se desechó la solución, se fijaron las proteínas al gel y se eliminó el exceso de coomassie con una solución de metanol al 50% y ácido acético al 10%.

Western blot

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a membranas de PVDF (marca Millipore) mediante el método semi-seco usando la cámara de electrotransferencia de FisherBiotech, de la siguiente manera:



1. Se electrotransfirió durante 1.5 horas a 1.5 mA/cm^2 , cuidando que no se excediera los 10V.
2. La membrana se secó después de sumergirla en metanol 100% por 10seg y se dejó en papel por 10min.
3. Se incubó la membrana en amortiguador de lavado hasta que se humedeció totalmente.
4. Si era necesario, la membrana se bloqueó con solución de bloqueo toda la noche a 4°C .
5. Se incubó la membrana con la solución de anticuerpo, la cual contuvo al anticuerpo primario (acoplado o no acoplado a peroxidasa). Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.
6. Se lavó la membrana en solución de lavado por 10 min, se repitió el lavado 2 veces más.
7. Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa.
8. Se lavó la membrana en solución de lavado por 10 min, y se repitió el lavado 2 veces más.

9. Se reveló la presencia del anticuerpo unido a la proteína deseado (siguiendo las indicaciones del proveedor ECL Pierce).
10. Se tomó una autoradiografía con la película BioMax Film (Kodak) exponiendo el tiempo necesario según fuera el caso para cada anticuerpo.
11. Se eliminó el anticuerpo unido a las proteínas de la membrana al incubar con la solución de eliminación de anticuerpo por 30 min a 50°C. Se lavó 3 veces con amortiguador de lavado hasta quitar olor a β -mercaptoetanol. Finalmente, se lavó con amortiguador de lavado por 10min a temperatura ambiente.
12. Si era necesario, se bloqueó nuevamente durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C.
13. Se repitieron los pasos de incubación de los anticuerpos para revelar la presencia de una proteína distinta.

- **Solución de bloqueo**

Leche en polvo descremada (Svelty)	5 g
Tris 1 M pH 7.6	2.5 mL
NaCl 5 M	1.5 mL
H ₂ O	a 50 mL

- **Solución de anticuerpo**

Leche en polvo descremada (Svelty)	0.1 g
Tris 1 M pH 7.6	100 μ L
NaCl 5 M	200 μ L
EDTA 500 mM	20 μ L
Tween-20 al 1% o 0.1%	200 μ L
H ₂ O	a 10 mL
Anticuerpo	Adicionar según el título de anticuerpo apropiado

Anticuerpo	Dilución	Donador
anti-Cox1	1:40,000	Rodolfo García Villegas
anti-Cs (citrato sintasa)	1:1000	Thomas D. Fox
anti-ATPasa	1:30,000	Diego González Halphen

- **Solución de lavado**

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

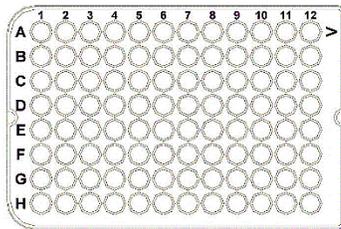
- **Solución de eliminación**

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

Diluciones seriadas 1:10 de cultivos celulares

1. Se crecieron cultivos de 2mL de medio deseado 8 colonias ρ^+ de la cepa deseada a 30°C durante una noche.
2. Al día siguiente se pesaron microtubos de 1.5mL en balanza analítica.
3. Se centrifugó 1mL de cada cultivo a 14,000rpm en microcentrífuga por 1min y se eliminó todo el sobrenadante.
4. Se pesaron nuevamente los tubos para estimar el peso del botón celular.
5. Se diluyó con H₂O destilada estéril para que quedasen las células en una concentración de 0.02g/mL.

Caja de pozos:



6. Se colocaron en los pozos (A2, A3, A4... B2, B3, B4... C2, C3, C4...) 135µL de H₂O destilada estéril con una pipeta multicanal hasta la columna número 6.
7. En el primer pozo de cada fila (A1, B1, C1...) se agregaron 150µL de la solución celular.
8. Con pipeta multicanal, se tomaron 15µL de cada primer pozo (A1, B1, C1, ...) y se transfirieron al siguiente pozo (A2, B2, C2...) (subir y bajar para homogeneizar). Se repitió este paso hasta la columna 6.
9. Para esterilizar el replicador, se le sumergió en etanol en la caja de petri de vidrio. Se flameo con el mechero rápidamente y se le dejó enfriar por unos segundos.
10. Se sumergió cuidadosamente el replicador en los pozos.
11. Finalmente, se imprimió en el medio a analizar, se dejaron creciendo las células a la temperatura deseada (25°C, 30°C y 37°C) y se fotodocumentó.

Ensayo de sensibilidad a H₂O₂

1. Se inocularon 20 mL de medio fresco con 15µL de precultivo saturado de 2 mL.
 - Se utilizó el mismo medio para el precultivo y para el cultivo.
2. Se incubó a 30°C con una agitación orbital de 250 rpm hasta que se obtuvo una densidad óptica (D.O.) de 0.5 a 1 (fase exponencial), leída en el espectrofotómetro a 600 nm.
 - No dejar pasar de una D.O. de 1.
3. Se ajustó el peso húmedo de cada cepa a 0.02g en microtubos de 1.5 mL,
 - Se centrifugó entre 1.5 mL-2mL de cultivo a máxima velocidad en microcentrífuga durante 60s hasta obtener el peso deseado.
 - Se etiquetó cada tubo, se pesó en balanza analítica y se anotó el peso.
 - Se ajustó el peso a 0.02g, cuidando que no variaran mucho los pesos de los botones celulares entre cada tubo.
4. Se resuspendió el botón celular en 2 mL de medio fresco.
 - Primero se resuspendió el pellet en 1 mL de medio fresco en el microtubo, después se pasó a tubo de ensayo de vidrio estéril y se agregó el otro mL de medio fresco.
 - Se etiquetó correctamente el tubo de vidrio estéril de acuerdo con la cepa y a la [H₂O₂] que contendría.
5. Se adicionó H₂O₂ [3 y 6 mM] y el control sin H₂O₂ se marcó con 0 mM.
6. Se incubó durante 2 hr a 30°C con agitación constante.
7. Se centrifugó 1 mL de cada tubo, en microtubos nuevos de 1.5 mL etiquetados a máxima velocidad durante 60 seg.
 - Se eliminó el sobrenadante
8. Se lavó el pellet con 1 mL de H₂O destilada y estéril.
 - Se centrifugó de nuevo a máxima velocidad durante 60 seg.
9. Se resuspendió el pellet en 1 mL nuevo de H₂O destilada y estéril.
10. Finalmente, se realizaron diluciones seriadas y se replicó en medios deseados.

Ensayo enzimático acoplado a la síntesis de ATP

Se determinó cuantitativamente la velocidad de síntesis de ATP específica por la F_0F_1 -ATP sintasa en mitocondrias aisladas se llevó a cabo un ensayo enzimático acoplado a la reducción del $NADP^+$. Para esto se realizó un registro espectrofotométrico de la reducción de $NADP^+$ a $NADPH$ ($\epsilon_{340nm} = 6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). En donde se consideró que 1 ATP es sintetizado por cada $NADPH$ producido.

El medio de reacción contuvo: 900 μl de medio de respiración 2x pH7.3 (500 mM sacarosa, 20 mM succinato, 20 mM MgCl_2 , 20 mM H_3PO_4 , 2 mM EGTA y 0.1% BSA), 10 mM glucosa, 540 nm Cyt c y H_2O MiliQ.

Posteriormente se agregó por celda: Hexocinasa 16UI (marca Sigma Aldrich), Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 6UI (marca Sigma Aldrich), P^{15} adenosina 10 μM (marca Sigma Aldrich), 50 μg de proteína mitocondrial y 500 μM $NADP^+$ (marca Sigma Aldrich). Se homogeneizó y se colocó la celda en el espectrofotómetro. Para iniciar la reacción se agregó ADP 5 mM, se homogeneizó y finalmente, se procedió a monitorear la absorbancia a 340 nm y se realizaron lecturas cada 0.5s durante ≈ 150 -200s en un espectrofotómetro (marca Hewlett Packard, modelo 8453).

Los resultados se analizaron tomando en cuenta el coeficiente de extinción molar del $NADPH$ ($\epsilon_{340nm} = 6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La velocidad de síntesis de ATP para la se calculó mediante la siguiente ecuación con base en la pendiente obtenida en los trazos espectrofotométricos, se utiliza el coeficiente de extinción molar, la cantidad de mg de proteína y factores de conversión matemáticos para obtener los mol de ATP sintetizado por unidad de tiempo.

$$\text{pendiente} \left(\frac{1 \mu\text{mol de ATP sintetizado}}{6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}} \right) \left(\frac{1}{1 \text{ s}} \right) \left(\frac{60 \text{ s}}{1 \text{ min}} \right) \left(\frac{1}{50 \mu\text{g de proteína}} \right) \left(\frac{1000 \mu\text{g}}{1 \text{ mg}} \right)$$

Análisis estadístico

El método estadístico utilizado para comparar la velocidad de síntesis de ATP específica DS± (n=3 por su duplicado técnico). Se realizó en el programa GraphPad Prism5 la estadística al aplicar un ANOVA de una vía y posteriormente una prueba Post Hoc de Tuckey con una P < 0.05 de significancia. Donde resulto que la cepa Cox1ΔC15 sintetiza menos ATP que la cepa WT con diferencias significativas (coeficiente de extinción molar del NADP⁺ ($\epsilon_{340nm} = 6.22 \text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)).

Resultados

Las proteínas codificadas en el genoma mitocondrial tienen un mecanismo de síntesis altamente regulado en diversos casos requieren de más de 1 activador traduccional, chaperonas de ensamblaje, entre otros (Fox, 2012; Ott *et al.*, 2016). Cox1 es el mejor ejemplo ya que requiere de múltiples activadores traduccionales y se ha observado anteriormente en el laboratorio que incluso su propio extremo C-ter puede regular la síntesis de esta proteína (Shingú-Vázquez *et al.*, 2010; García-Villegas *et al.*, 2017). Por lo que Cox1 un buen candidato para estudiar la importancia de porque estos mecanismos de regulación sean tan complejos. Este trabajo se dividió en dos apartados de estudio: el primero, en donde se evaluó en diferentes condiciones cómo se afecta el crecimiento de levaduras que no tienen la capacidad de regular la síntesis de Cox1 y como segundo apartado, evaluamos cómo se afecta la función mitocondrial de estas mismas células.

El envejecimiento cronológico prematuro no está asociado a una formación de especies prooxidantes

Nuestro primer objetivo fue determinar la sensibilidad a estrés oxidante de las cepas mutantes que no pueden regular la síntesis de Cox1. Como antecedente, sabemos que el envejecimiento cronológico de levaduras es una medida de la supervivencia de una población de células de levadura que no se divide y, por lo tanto, puede modelar el envejecimiento de las células de mamíferos que no se dividen, pero también de organismos eucariotas superiores (Parrella y Longo, 2008). En ensayos de envejecimiento cronológico realizados a las 2 cepas mutantes de este proyecto, se observó que la cepa Cox1 Δ C15 tiene un menor porcentaje de sobrevivencia en comparación con las cepas Cox1 WT y P521/P522A (García-Villegas, sin publicar, **figura 9**). Por lo que se determinó cualitativamente si una muerte cronológica prematura se asocia a una mayor producción de especies prooxidantes o radicales libres. Oleh Khalimonchuk de la Universidad de Nebraska observó que cuando se tiene una CcO mal ensamblada, las células presentan sensibilidad a H₂O₂. Esto es debido a que se acumulan intermediarios prooxidantes del grupo hemo α 3 de Cox1 que generan actividad de peroxidasa y daño por estrés oxidante. Estos intermediarios afectan el crecimiento y viabilidad celular de las levaduras (Khalimonchuk *et al.*, 2007).

Para probar el efecto de las mutaciones Cox1 Δ C15 y P521/P522A en la sensibilidad ante la tensión oxidante, las células se incubaron por 2 horas con 2 diferentes concentraciones de H₂O₂ y sin H₂O₂. Posteriormente se hicieron diluciones seriadas en medios fermentativos represores de los genes mitocondriales como glucosa y no represores como la galactosa.

Nuestros resultados mostraron que no hay diferencias en cuanto al crecimiento en diferentes fuentes de carbono fermentativas entre las cepas mutantes del extremo carboxilo terminal de Cox1 a comparación de la cepa Cox1 WT (**Figuras 10 y 11**). Esto indica que las mutantes con Cox1 Δ C15 y P521A/P522A no muestran mayor sensibilidad a H₂O₂ que la cepa silvestre. Como control negativo usamos una cepa sensible a H₂O₂ ya que tiene eliminados los aminoácidos que van del 2-62 de la proteína Cox2 (Δ Cox2) (Green-Willms *et*

al., 2000), por lo que el grupo hemo α de Cox1 puede generar especies prooxidantes al contacto con peróxido y presentar un decremento en su crecimiento celular. Este ensayo no se realizó en medios respiratorios ya que nuestra cepa utilizada como control negativo solo crece en medio fermentativos (**Figuras 10 y 11**).

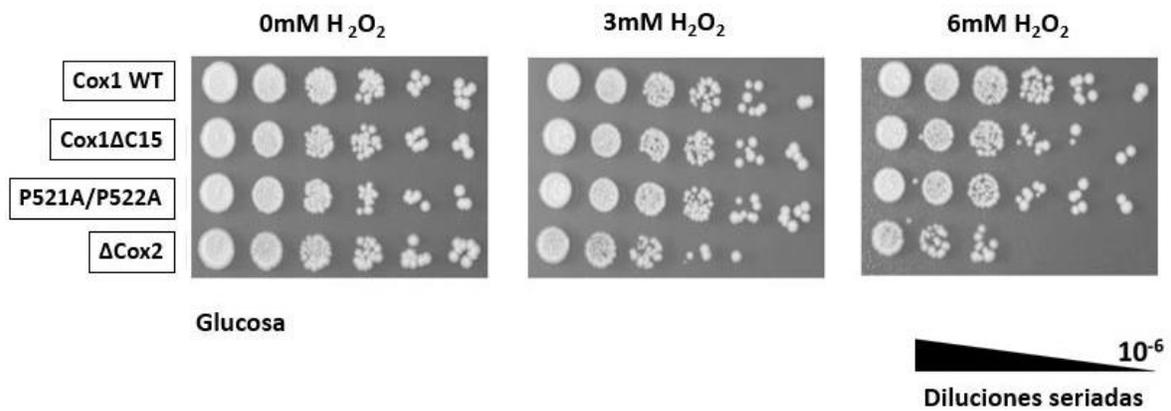


Figura 10. Las cepas mutantes del extremo C-ter de Cox1 no se afectan por especies prooxidantes en **glucosa**. Diluciones seriadas 1/10 de las cepas Cox1 WT, las mutantes del extremo C-ter de Cox1 y el control negativo, la cepa Δ Cox2 (Δ cox2-62). La incubación con H_2O_2 se llevó a cabo durante 2 horas ($n=3$ por su duplicado técnico).

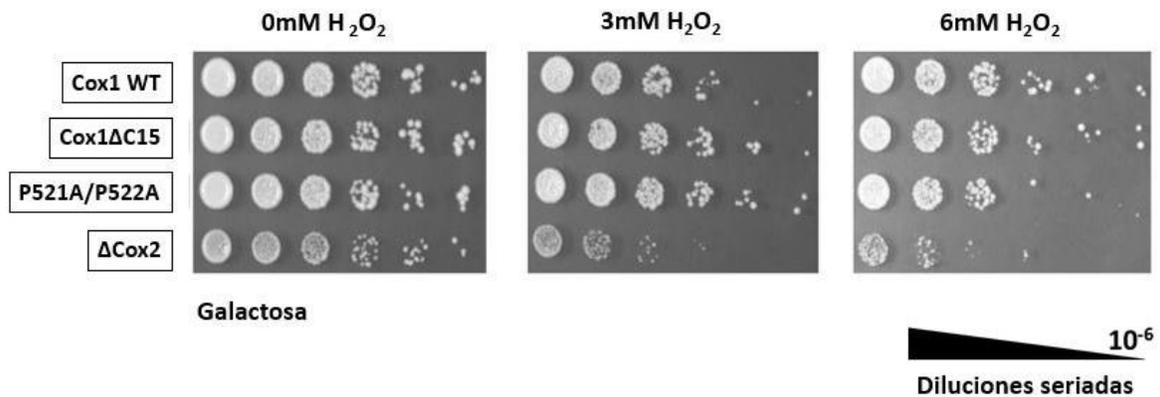


Figura 11. Las cepas que no regulan la síntesis de Cox1 no se afectan por especies prooxidantes en galactosa. Diluciones seriadas 1/10 de las cepas Cox1 WT, las mutantes del extremo C-ter de Cox1 y el control negativo, la cepa Δ Cox2 (Δ cox2-62). La incubación con H_2O_2 se llevó a cabo durante 2 horas (n=3 por su duplicado técnico).

La mutante Cox1 Δ C15 es sensible a temperatura en medios respiratorios

Posteriormente quisimos determinar si la pérdida de regulación en la síntesis de Cox1 y la formación de supercomplejos afectaba al crecimiento en diversas fuentes de carbono. Para estos ensayos se decidió evaluar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de las células. Se realizaron diluciones seriadas 1/10 en H_2O y se replicó en fuentes fermentativas como glucosa (medio rico y mínimo) y galactosa (medio rico). En experimentos paralelos se determinó el crecimiento en fuentes de carbono respiratorias con lactato y etanol-glicerol. Posteriormente se dejaron crecer a 30°C o 37°C, durante 3 a 5 días.

Observamos que en fuentes de carbono fermentativas (glucosa y galactosa), no se afectó el crecimiento de ninguna de las cepas mutantes en altas temperaturas (37°C), aunque hubo un muy discreto efecto en la cepa con Cox1 Δ C15 en galactosa (**Figura 12**). Por el contrario, en fuentes de carbono respiratorias, se encontró que la cepa Cox1 Δ C15 mostro sensibilidad

a 37°C. Se observó que esta mutante presentaba colonias más pequeñas en comparación con la cepa WT y la doble mutante de las prolinas. Este efecto se vio más marcado a 37°C en medio con lactato. En cuanto a la cepa con P521A/P522A no se observó ningún defecto en su crecimiento den las diferentes temperaturas y en diferentes fuentes de carbono probadas, sugiriendo que al menos en estas condiciones dicha mutación en Cox1 no parece afectar el crecimiento celular (**Figura 13**).

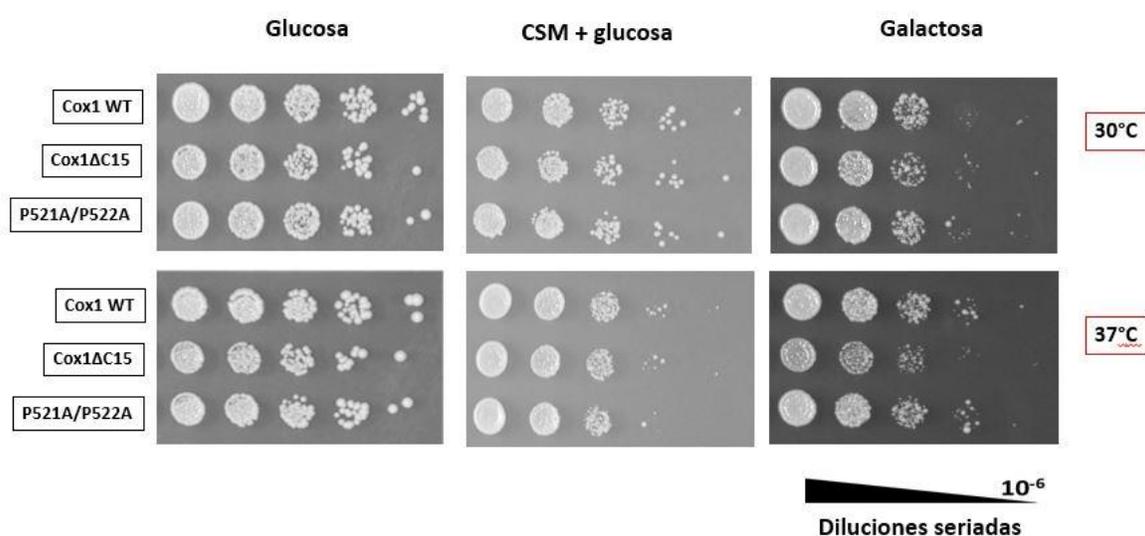


Figura 12. Las cepas mutantes en el extremo C-terminal de Cox1 no son sensibles a temperatura en medios fermentativos. Diluciones seriadas 1/10 de las cepas Cox1 WT, las mutantes del extremo C-ter de Cox1 crecidas a diferentes temperaturas en medios fermentativos represores y no represores. La fuente de carbono se menciona, así como las diferentes temperaturas de crecimiento. Se fotodocumentó el día 3 del experimento (n=3 por su duplicado técnico).

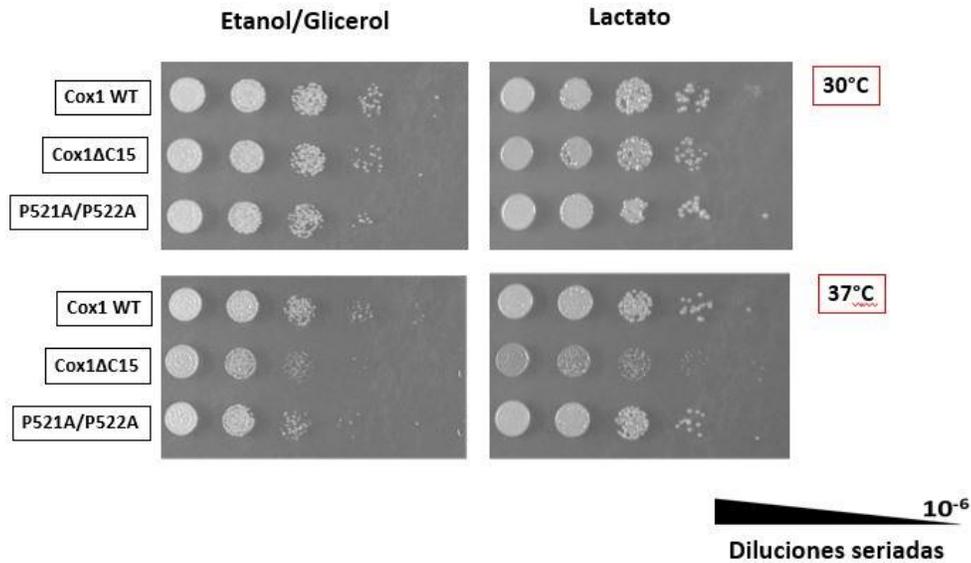


Figura 13. La cepa con Cox1ΔC15 es sensible a altas temperaturas en medios respiratorios. Diluciones seriadas 1/10 de las cepas con Cox1 WT y las mutantes del extremo C-ter de Cox1 crecidas a diferentes temperaturas en medios respiratorios. La fuente de carbono se menciona, así como las diferentes temperaturas de crecimiento. Se fotodocumentó al día 3 del experimento (n=3 por su duplicado técnico).

Los niveles basales de Cox1 no se afectan en condiciones aerobias, en cepas incapaces de regular su síntesis

A continuación, nos preguntamos cómo se afecta la función mitocondrial de las cepas mutantes que no regulan la síntesis de Cox1. En esta sección sólo se utilizó como fuente de carbono al lactato (en una mezcla racémica que contiene a las dos isoformas del lactato, D y L), y este experimento se realizó bajo las condiciones de temperatura de 30°C. El objetivo es que las levaduras crecieran en una fuente de carbono respiratoria para poder analizar con más eficiencia la función mitocondrial.

Para contestar la pregunta de si los niveles basales de Cox1 cambiaban en las mutantes cuando las células se crecían en lactato, se realizaron cultivos de las cepas mutantes del

extremo C-ter de Cox1, se aislaron mitocondrias y posteriormente se separaron las proteínas mitocondriales mediante electroforesis en geles desnaturizantes de SDS (SDS-PAGE). Se corrieron dos geles bajo las mismas condiciones con una carga de proteína mitocondrial de 20 µg y 50 µg respectivamente. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF y se analizó la presencia de Cox1 y la citrato sintasa con anticuerpos específicos. La citrato sintasa es una proteína de la matriz mitocondrial que se utilizó como control de carga (Figura 14).

Se observa que en ningún caso hay diferencias cualitativas en los niveles basales de Cox1 a diferentes µg de proteína de mitocondrial. En la membrana se observa un cargado de muestra equivalente en cada caso, ya que la intensidad de las bandas de citrato sintasa fue muy similar.

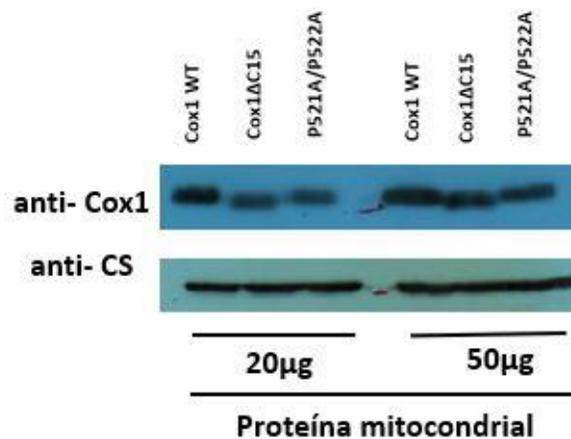


Figura 14. Los niveles basales de Cox1 no se afectaron en fuentes de carbono respiratorias en las cepas mutantes del extremo C-ter de Cox1. Las proteínas mitocondriales se separaron por SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de PVDF y se les detectó usando los anticuerpos anti-Cox1 y anti-citrato sintasa (CS) como control de carga. La carga de proteína mitocondrial se indica. Cepas crecidas en fuente de carbono lactato. Los pesos moleculares se determinaron con ayuda de un marcador de proteínas comercial (PM) (n=3).

La actividad de la CcO es menor en la cepa Cox1ΔC15 aunque sí hay presencia de Cox1 en complejos y supercomplejos

Debido a que se determinó anteriormente un menor crecimiento de la cepa Cox1ΔC15 en fuentes de carbono respiratorias, nos preguntamos si este defecto en el crecimiento era debido a una actividad de la CcO deficiente. Se decidió evaluar la actividad de CcO mediante electroforesis de acrilamida en geles de azules nativos (BN-PAGE). Para ello se aislaron mitocondrias de cultivos crecidos en lactato a 30°C, y se solubilizaron con digitonina a una concentración final de 1% (p/V). Los extractos se separaron mediante BN-PAGE en un gradiente de acrilamida del 5% al 12%. Posteriormente, se realizaron tinciones de la actividad de la CcO. Finalmente, una copia del gel se transfirió a una membrana de PVDF y se le detectó mediante anticuerpos específicos a las proteínas Cox1 y a la ATPasa, esta última fue utilizada como control de carga (**Figura 15**).

Los geles azules nativos o BN-PAGE, son en su mayor parte utilizados para analizar complejos y supercomplejos proteicos de la cadena de transporte de electrones de las mitocondrias de diversos organismos (en este caso de *S. cerevisiae*). Estos geles permiten separar proteínas hidrofóbicas de alto peso molecular conservando su forma nativa y su actividad enzimática. Mediante la combinación de un detergente suave y no iónico, como la digitonina, se puede solubilizar a las proteínas de la membrana interna mitocondrial. Posteriormente, el colorante azul de coomasie va a aportar las cargas negativas a las proteínas solubilizadas. Finalmente, las proteínas se corren en geles formados por un gradiente de acrilamida del 4 al 12% (Schägger y von Jagow, 1991; Eubel *et al.*, 2005).

La actividad de la CcO en los geles azules nativos de la cepa silvestre proviene de los supercomplejos asociados al complejo IV (pesos moleculares de alrededor de 750-1000 KDa), así como la CcO libre (peso molecular de ≈250 kDa) (**Figura 15**). De igual forma estas bandas se observan en la mutante P521A/P522A. Sin embargo, en la mutante Cox1ΔC15 hubo un decremento en dicha actividad a nivel de supercomplejos (SC) pero sobre todo a nivel de la CcO libre, la cual fue prácticamente indetectable. Lo anterior podría corresponder a que hubiera menos proteína Cox1 en dicha mutante y por eso había menos

actividad. Por lo anterior se hicieron las inmunoréplicas tipo western de las proteínas separadas en los geles azules nativos y se detectó a Cox1 usando anticuerpos específicos. Sorpresivamente, en la mutante Cox1 Δ C15 se detecta una mayor señal de Cox1, incluso a nivel de complejo CIV libre. En contraste, la mutante P521A/P522A mostró menor cantidad de Cox1, incluso que la cepa silvestre. Estos datos nos indican que al menos en la mutante Cox1 Δ C15 hay un exceso de Cox1 sintetizado asociado a complejos y supercomplejos, aunque no son tan funcionales como en la cepa silvestre o en la mutante P521A/P522A (Figura 15).

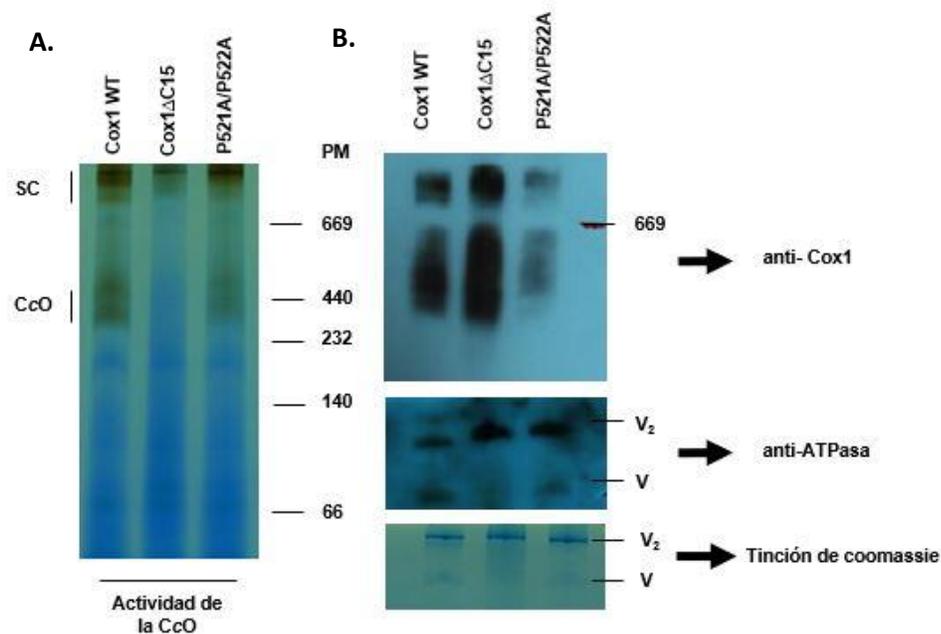


Figura 15. La mutante Cox1 Δ C15 presenta una menor actividad de la CcO aunque hay presencia de Cox1.

Se solubilizaron mitocondrias de las cepas mutantes de Cox1, así como su WT con digitonina a una concentración final de 1% (p/V). Se corrieron 3 geles azules nativos (BN-Page) 5% -12% de acrilamida bajo las mismas condiciones con 50 μ g de proteína mitocondrial solubilizada por pozo, por cepa. Posteriormente se expusieron los geles a una tinción por la actividad de la citocromo c oxidasa (CcO). **A.** Tinción de actividad de la citocromo c oxidasa (CcO). **B.** western blot de gel azul nativo transferido a membrana de PVDF de las proteínas: anti-Cox1 y como control de carga anticuerpo anti-ATPasa (que detecta el dímero y monómero de la enzima), y finalmente, tinción de azul de coomassie en el gel. Las células fueron crecidas en una fuente de carbono respiratoria (lactato) a 30°C. Los pesos moleculares se determinaron con ayuda de un marcador comercial de proteínas de alto peso molecular (PM) (n=3).

La actividad de las NADH deshidrogenasas alternas mitocondriales es mayor en la cepa Cox1ΔC15

En otro juego de geles azules nativos que se corrieron bajo las mismas condiciones que los anteriormente presentados, se evaluó la actividad de las NADH deshidrogenasas alternas (interna-Ndi1 y externas-Nde1-2). Como sabemos, *S. cerevisiae* no posee complejo I que se una a supercomplejos, pero existe evidencia que la NADH interna (Ndi1) se puede asociar también a los supercomplejos conformados por la CcO y el dímero obligado del complejo III de la cadena respiratoria (Matus-Ortega et al., 2015). En los geles presentados a continuación, se incluyó una cepa $\Delta pet309$, la cual es incapaz de sintetizar a Cox1 dado que Pet309 es su activador traduccional (Manthey y McEwen, 1995; Tavares-Carreón et al., 2007). Esta cepa fue cultivada en galactosa, ya que en lactato no crece porque no respira. Esto se hizo con el fin de incluirla como control negativo de la actividad de la CcO, ya que esta cepa no tiene CcO funcional (**Figura 16**).

Al analizar los geles azules nativos, se observa que fueron cargados de manera muy similar ya que en el gel que se utilizó para teñir con azul de coomasie se ven homogéneas las bandas de proteína mitocondrial en cada carril. También se puede observar que en la mutante Cox1ΔC15, la tinción de la actividad de las NADH deshidrogenasas alternas de *S. cerevisiae* es mayor, en particular se enriquece una banda de alrededor de 700 KDa, cuya identidad desconocemos. Esto podría indicar que hay mayor presencia de NADH deshidrogenasas alternas mitocondriales en la mutante que en la cepa silvestre. Nuevamente, se realizó la tinción de la actividad de la CcO para verificar que, en este experimento, el fenotipo previamente reportado sea reproducible. En este ensayo podemos observar de nueva cuenta que la actividad de la CcO está disminuida sobre todo a nivel del complejo IV en sus formas más libres (≈ 240 kDa) (**Figura 16**).

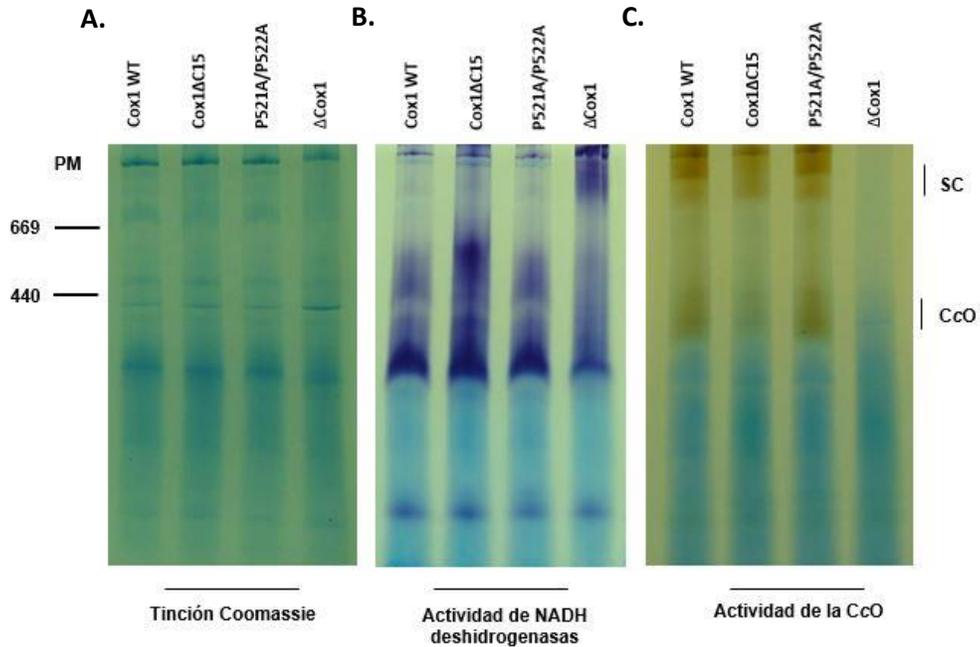


Figura 16. La mutante Cox1ΔC15 presenta una mayor actividad de NADH deshidrogenasas alternas. Se solubilizaron mitocondrias de las cepas indicadas con digitonina a una concentración final de 1% (p/V). Se corrieron 3 geles azules nativos (BN-Page) 5% -12% de acrilamida bajo las mismas condiciones con 50μg de proteína mitocondrial por carril. Posteriormente se expusieron los geles a reacciones de tinción de los complejos. **A.** Se muestra un gel teñido con azul de coomassie como control de carga, **B.** tinción de la actividad de las NADHdeshidrogenasas alternas (Ndi1, Nde1-2) y finalmente, **C.** tinción de actividad de la citocromo c oxidasa (CcO). Las células fueron cultivadas en una fuente de carbono respiratoria (lactato) a 30°C. Los pesos moleculares se determinaron con ayuda de un marcador de proteínas comercial (PM) (n=3)

La velocidad de síntesis de ATP mitocondrial por minuto en la mutante CoxΔ1C15 es ligeramente menor que en la cepa WT

El objetivo final de este trabajo fue determinar cuantitativamente si perder la capacidad de regular la síntesis de proteínas mitocondriales afectaba la producción de ATP en la mitocondrial.

La síntesis de ATP se determinó cuantitativamente mediante ensayos acoplados a la reducción del NADP⁺ ($\epsilon_{340nm} = 6.22mM^{-1}cm^{-1}$) en el espectrofotómetro (Cortés *et al.*, 2000), y se emplearon mitocondrias provenientes de las levaduras WT y mutantes del extremo C-ter de Cox1 cultivadas en lactato a 30°C (**Figura 17**).

En este ensayo se puede evaluar cuantitativamente la velocidad de síntesis de ATP por mg de proteína mitocondrial en 1 minuto. Después de hacer la estadística, se determinó que la única cepa que presenta una disminución modesta pero significativa en la velocidad de síntesis de ATP con respecto a la cepa WT, es la mutante Cox1ΔC15. A pesar de esto, todo indica que para esta cepa la síntesis de ATP medida es suficiente para crecer de forma similar a la cepa WT en lactato a 30°C (**Figura 17**). Cabe mencionar que en *S. cerevisiae*, aunque la actividad de la CcO se vea afectada, ésta no es la enzima limitante de la cadena respiratoria mitocondrial (Genova *et al.*, 2008) (**Figura 15**), y probablemente por eso impacta menos en la síntesis de ATP del organelo.

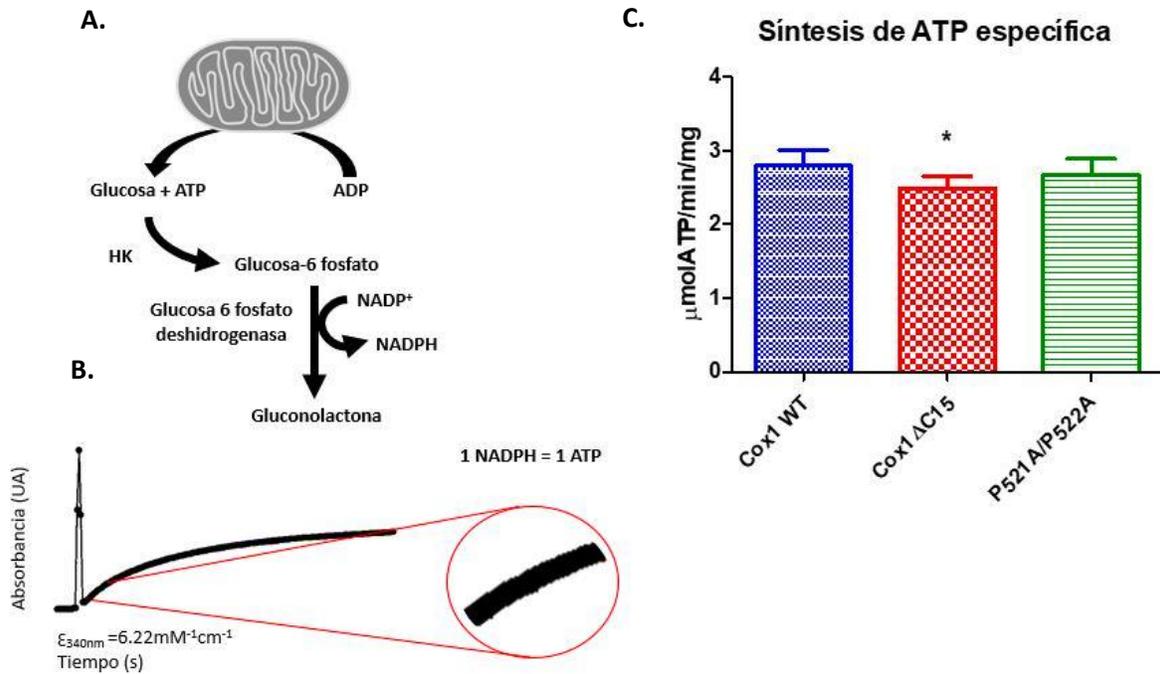


Figura 17. La mutante Cox1ΔC15 sintetiza menos ATP que la cepa Cox1 WT. Se determinó la actividad de la ATPasa en un ensayo acoplado al cuantificar la reducción de NADP a 340 nm. A. Esquema de la reacción llevada a cabo en el espectrofotómetro donde por cada NADPH producido habrá una molécula de ATP sintetizada. B. Ilustración del trazo realizado en el espectrofotómetro en donde la pendiente tomada en cuenta para calcular el ATP sintetizado es la que comprende los valores iniciales de NADP reducido

C. Síntesis de ATP específica ±DS (n=3 por su duplicado técnico).

La síntesis de subunidades de complejos respiratorios que están codificadas en el genoma mitocondrial es altamente regulada. Además, este proceso está acoplado al ensamblaje del péptido naciente tanto en el complejo respiratorio como en los supercomplejos. De hecho, los supercomplejos se van ensamblando a la par que se ensamblan los complejos respiratorios que los conforman (García-Villegas *et al.*, 2017; García-Guerrero *et al.*, 2018). Como ejemplo tenemos al citocromo b, única subunidad de origen mitocondrial del complejo III, cuya biogénesis depende de varias chaperonas como Cbp3, Cbp6, Cbp4 (Ott *et al.*, 2016), e incluso depende de su propio extremo C terminal (Flores-Mireles, manuscrito en preparación). Este trabajo se enfocó en el estudio de la subunidad Cox1 de la citocromo c oxidasa. Esta subunidad se codifica en el genoma mitocondrial, y su biogénesis depende de varias chaperonas y es un proceso altamente regulado. En este trabajo se emplearon dos mutantes de Cox1: una que carece de los últimos 15 aminoácidos de Cox1 (Cox1 Δ C15) y otra que tiene dos mutaciones puntuales en esta región (P521A/P522A). La mutación Cox1 Δ C15 desregula la síntesis de Cox1, de tal forma que en casos en que la CcO no se puede ensamblar, la síntesis de Cox1 Δ C15 es elevada, en vez de disminuir como se esperaría (Shingú-Vázquez *et al.*, 2010). Esta mutación promueve una mayor acumulación de Cox1 y la formación de supercomplejos que no deberían producirse cuando hay problemas de ensamblaje de la enzima (García-Villegas *et al.*, 2017). Esto indica que el extremo carboxilo terminal de Cox1 contiene señales que modulan la formación/acumulación de supercomplejos. Por otro lado, la mutación P521A/P522A sólo afecta la regulación de la síntesis de Cox1, de tal forma que, al igual que la mutación Cox1 Δ C15, induce una elevada síntesis de Cox1, aunque la CcO no se pueda ensamblar (García-Villegas *et al.*, 2017). Sin embargo, los niveles de Cox1 como proteína y la formación/acumulación de supercomplejos ocurre como en una cepa silvestre (García-Villegas *et al.*, 2017).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar cuáles son los efectos sobre la fisiología de la célula y de la mitocondria cuando se altera la biogénesis de Cox1. En principio no se

observan de manera general mayores alteraciones fenotípicas, ya que las cepas con Cox1 Δ C15 y P521A/P522A son capaces de respirar, indicando que tienen una CcO funcional (García-Villegas *et al.*, 2017). Sin embargo, se buscó si las cepas mutantes presentaban algún cambio en su fenotipo en los dos siguientes aspectos: crecimiento celular de levaduras en diferentes fuentes de carbono y con diversas condiciones, y función mitocondrial en condiciones exclusivamente aerobias. Este último análisis es importante porque previamente sólo se habían reportado la presencia de Cox1 y de supercomplejos en fuentes de carbono fermentables (García-Villegas *et al.*, 2017). Sin embargo, la demanda de una mayor función mitocondrial ocurre cuando las células se crecen en medios respiratorios. En las condiciones descritas un fenotipo en particular en las dos cepas mutantes del extremo C-ter de Cox1, daría una respuesta del porque es importante para la célula regular la biogénesis de proteínas codificadas en la mitocondria, en este caso, de Cox1. Sin embargo, descubrimos que sólo la mutación Cox1 Δ C15 nos daba fenotipos, tanto a nivel celular como a nivel mitocondrial, mientras que la mutación P521A/P522A se comportó más similar a la cepa con Cox1 silvestre. Esto nos sugiere que probablemente afecta más a la célula la desregulación en la formación/acumulación de supercomplejos que la desregulación de la síntesis de Cox1. Aún quedan más funciones celulares por explorar para identificar la importancia de desregular la síntesis de Cox1 en la cepa con P521A/P522A.

En este estudio se encontró que el extremo carboxilo terminal de Cox1 es importante para el crecimiento de las células de *S. cerevisiae* en medios respiratorios a altas temperaturas y para que la CcO lleve a cabo una correcta catálisis y esto conlleve a que la célula tenga una función mitocondrial eficiente. A continuación, se discutirán paso a paso los resultados obtenidos en los dos apartados de estudio.

A nivel celular, se tenía como antecedente en el laboratorio que la cepa Cox1 Δ C15 envejecía cronológicamente de manera prematura a comparación de la cepa Cox1 WT (DeLuna y García-Villegas, manuscrito en preparación) (**Figura 9**). En contraste, la doble mutante de las prolinas (P521A/P522A), presentaba un envejecimiento cronológico similar al de la cepa WT. Esto nos sugiere que romper la regulación de la síntesis de Cox1 no está involucrada en el envejecimiento cronológico, ya que, si fuera importante, sería un fenotipo que

observaríamos en ambas mutantes. Este resultado nos sugiere que es la ausencia de los últimos 15 aminoácidos del extremo C-ter de Cox1 la región importante involucrada en el envejecimiento de las células. En estudios previos se evaluó el envejecimiento cronológico de cepas mutantes de diversos genes, entre ellos de mutantes que no regulan la síntesis y ensamblaje de Cox1 en la CcO. Entre ellas se evaluó a cepas mutantes de las proteínas Mss51, Cox15 y Pet111. Estas cepas presentaron un mayor envejecimiento cronológico o menor supervivencia (Garay *et al.*, 2014). La función de Cox15 está relacionada a la biogénesis e inserción del grupo hemo A a la CcO (Timón-Gómez *et al.*, 2018), la función de Pet111 es activador traduccional de la subunidad Cox2 de la CcO (Green-Willms *et al.*, 2000) y la función de Mss51 es ser activador traduccional y chaperona de Cox1 (Mick *et al.*, 2011). Cabe destacar que estas cepas mutantes no respiran, mientras que nuestra mutante Cox1 Δ C15 que también tiene una menor supervivencia, sí tiene la capacidad de respirar, aunque no tiene la capacidad de regular la síntesis de Cox1. Con esta información podemos decir que las cepas que presentan algún defecto en su cadena respiratoria, en particular en proteínas involucradas con la función de la CcO, envejecen cronológicamente más rápido.

Ahora bien, este envejecimiento prematuro detectado en la mutante con Cox1 Δ C15 puede estar asociado a daños por estrés oxidante debido a que la CcO este mal ensamblada y su centro catalítico. En específico sus grupos hemo podrían interaccionar directamente con compuestos prooxidantes como el H₂O₂. Esta reacción generaría una menor viabilidad, crecimiento y envejecimiento prematuro en las cepas mutantes (Khalimonchuk *et al.*, 2007). Otro reporte que refuerza esta teoría indica que, en el modelo de levadura, defectos en el ensamblaje de la CcO pueden conducir a una mayor producción de H₂O₂, la cual es detectada en las células y bloquea la proliferación de estas mismas (Bode *et al.*, 2013).

No obstante, al realizar ensayos de sensibilidad a H₂O₂ en nuestras cepas mutantes en medios fermentativos, no observamos algún defecto en el crecimiento y viabilidad celular en ninguna de las cepas en comparación con la cepa silvestre. Esto nos sugiere que el envejecimiento cronológico prematuro se ve relacionado a una mayor producción de especies prooxidantes, ni perder la capacidad de regulación de Cox1 mitocondrial conlleva a un mayor estrés oxidante (**Figuras 10 y 11**). En un medio fermentativo represor (glucosa),

podría esperarse que no haya cambios significativos en la sensibilidad a H₂O₂ de nuestras mutantes, ya que en dicho medio la levadura prefiere fermentar y se ejerce represión por catabolito sobre diversos genes, entre ellos genes mitocondriales (Pérez-Samper *et al.*, 2018). Por otro lado, una fuente de carbono fermentativa no represora, como lo es la galactosa, permite que los genes mitocondriales se expresen a más altos niveles. De esta manera se pueden disectar fenotipos de cepas con defectos en la cadena respiratoria con mayor facilidad. Sin embargo, no fue posible observar una mayor sensibilidad a H₂O₂ de ninguna de nuestras dos mutantes. Esto nos indica que las cepas Cox1ΔC15 y P521A/P522A no generan especies prooxidantes y no presentan sensibilidad mayor a H₂O₂. Probablemente, el hemo *a* de nuestras mutantes se encuentra ensamblado correctamente, explicando nuestras observaciones.

El envejecimiento celular está dado por la acumulación de daños a las células en su determinado tiempo de vida. Una de las teorías sobre el envejecimiento indica que los encargados de generar este daño son los ROS y el estrés oxidante que generan (Breitenbach *et al.*, 2014). El principal organelo que produce ROS es la mitocondria mediante la cadena respiratoria, en levadura especialmente las NADH deshidrogenasas alternas y el complejo III (Breitenbach *et al.*, 2014; Baccolo *et al.*, 2018). Sin embargo, existen otras teorías que proponen que en el envejecimiento se altera el metabolismo mitocondrial progresivamente como, por ejemplo, se acumulan defectos en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), alteraciones en el metabolismo piruvato/acetil coA, rutas de biosíntesis de aminoácidos, metabolismo del NAD⁺ (Baccolo *et al.*, 2018), por lo que quizá la cepa Cox1ΔC15 envejece prematuramente porque alguna de estas vías metabólicas antes mencionadas se encuentra alterada.

Posteriormente, se evaluó el crecimiento de las cepas mutantes a dos temperaturas: 30°C y 37°C, en medios fermentativos y medios respiratorios (condiciones aerobias). En ensayos de diluciones seriadas, no se observaron diferencias en el crecimiento de las mutantes con Cox1ΔC15 y P521A/P522A en medios con fuentes de carbono fermentables de glucosa y galactosa, ni a 30°C ni a 37°C (**Figura 12**). Esto nos indica que, para el crecimiento, metabolismo y viabilidad de las células de levadura que crecen en fuentes de carbono

fermentativas a altas temperaturas, no les es de vital importancia tener la capacidad de regular la biogénesis de Cox1 mitocondrial.

En contraste, en fuentes de carbono respiratorias, en donde se le obliga a las células a respirar, se observó que la mutante Cox1 Δ C15 presenta sensibilidad a altas temperaturas, ya que sus colonias son de menor tamaño en comparación con la cepa silvestre (**Figura 13**). Sin embargo, este fenotipo no se observó en la cepa con P521A/P522A. Esto nos sugiere que desregular la síntesis Cox1 en la mitocondria no afecta al crecimiento celular en medios respiratorios de etanol-glicerol o lactato. Tampoco se presenta sensibilidad a 37°C. Por otro lado, eliminar los últimos 15 aminoácidos de Cox1 sí afecta el crecimiento en medios respiratorios, y proporciona una sensibilidad a altas temperaturas a las células. Esto nos sugiere que la función que más controla dicha sensibilidad a temperatura es la formación/acumulación de supercomplejos, función desregulada en la cepa con Cox1 Δ C15.

Estudios recientes (Li *et al.*, 2019), muestran evidencias de que Cox1 es una de las proteínas que posiblemente se encuentran involucradas en conferir resistencia a altas temperaturas en el crecimiento a *S. cerevisiae* por encima de especies como *Saccharomyces uvarum* (que a altas temperaturas se muere, pero a bajas temperaturas crece bien). Curiosamente, al hacer un alineamiento en el programa ClustalW de Cox1, se encontró que existen dos diferencias significativas en el extremo C-ter de Cox1 (últimos 54 aminoácidos de Cox1) entre estas dos especies (**Figura 18**). Esto nos podría sugerir que el extremo C-ter es importante para el crecimiento a altas temperaturas cuando las células de levadura se encuentran creciendo en condiciones aerobias, es decir en medios respiratorios como lactato.

	451		500
<i>S. cerevisiae</i>		*	* * *
	NYVASIGSFIATLSLFLFIYILYDQLVNGLNNKVNKSVIYNKAPDFVES		
<i>S. uvarum</i>			
	NYVASIGSFIATISLFLFIYILYDQLVNGLNNKVTNKSVVYSKAPDFVES		

Figura 18. Alineamiento de los aminoácidos 451 a 500 de Cox1 de *S. cerevisiae* vs. *S. uvarum*.

El alineamiento se realizó con el programa ClustalW y las secuencias FASTA se obtuvieron de Uniprot. Los asteriscos en rojo señalan las mutaciones que existen entre las secuencias de las dos especies de levadura.

¿Por qué la mutante Cox1 Δ C15 presenta una sensibilidad a altas temperaturas, en particular cuando crece en lactato? Cuando existe un cambio en la temperatura de 30°C a 37°C, las levaduras entran en estrés. En el estrés por altas temperaturas se alteran los componentes de la fisiología celular como, por ejemplo: la composición de sus membranas lipídicas, el flujo metabólico de los carbohidratos, la dinámica de sus proteínas, cambios en la expresión de sus genes, entre otras. (Morano *et al.*, 2011). De igual forma, el estrés térmico induce cambios globales en el transcriptoma de *S. cerevisiae*. Específicamente, el activador Hsf1 de respuesta a estrés térmico, puede reestructurar dinámicamente el genoma de la levadura. Se demostró que Hsf1 conduce las interacciones entre el loci de genes HSP durante el estrés térmico e impulsa la fusión de estos genes (Chowdhary *et al.*, 2019). Sugerimos que la cepa Cox1 Δ C15 tiene una CcO deficiente, ya que al crecer en medios respiratorios en altas temperaturas crece menos que su WT. Para esto es necesario comprender el metabolismo de las fuentes de carbono respiratorias que se utilizaron en este trabajo. Por un lado, el glicerol alimenta la cadena de transporte de electrones a nivel de la poza de quinonas, el etanol a nivel de las NADH deshidrogenasas alternas, el lactato la alimenta por medios de las LDHs (lactato deshidrogenasas) a nivel del cyt c y generando piruvato que posteriormente será metabolizado en el ciclo de las TCA. **(Figura 19)** (Pajot y Claisse, 1974; Wills, 1990; Lodi, Fontanesi y Gulard, 2002; Grad, Sayles y Lemire, 2005; de Smidt, du Preez y Albertyn, 2008; Passarella *et al.*, 2008; Klein *et al.*, 2017).

Las células responden a una variedad de factores de estrés ambiental en donde reprograman la expresión de diversos genes. El estrés generado al someter a las células a

crecer en altas temperaturas afecta a diferentes procesos celulares, incluyendo arresto de la división celular, desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, acumulación de proteínas mal plegadas, daño a membranas, citoesqueleto, mayor producción de especies reactivas, entre otras (Jarolim *et al.*, 2013). Después de sufrir estrés por altas temperaturas, las células reprograman la síntesis de proteínas para enfocarse en sintetizar proteínas para sobrevivir y reparar el daño generado (Hendrick y Hartl, 1993).

En este trabajo se crecieron las cepas mutantes en condiciones y con diferentes fuentes de carbono. El lactato y el etanol/glicerol son fuentes de carbono respiratorias, lo que implica que su metabolismo está directamente relacionado a la mitocondria y a sus enzimas de la cadena de transporte de electrones.

Es posible que al ejercer un estrés a las levaduras a 37°C en presencia de lactato, el crecimiento de la mutante Cox1ΔC15 se afecta significativamente en comparación con las otras dos cepas debido a que el extremo carboxilo terminal es importante para la termorregulación o bien, es importante para un correcto funcionamiento de la CcO y al estar eliminado, dicha actividad comienza a ser deficiente pero suficiente para que la célula no muera altas temperaturas.

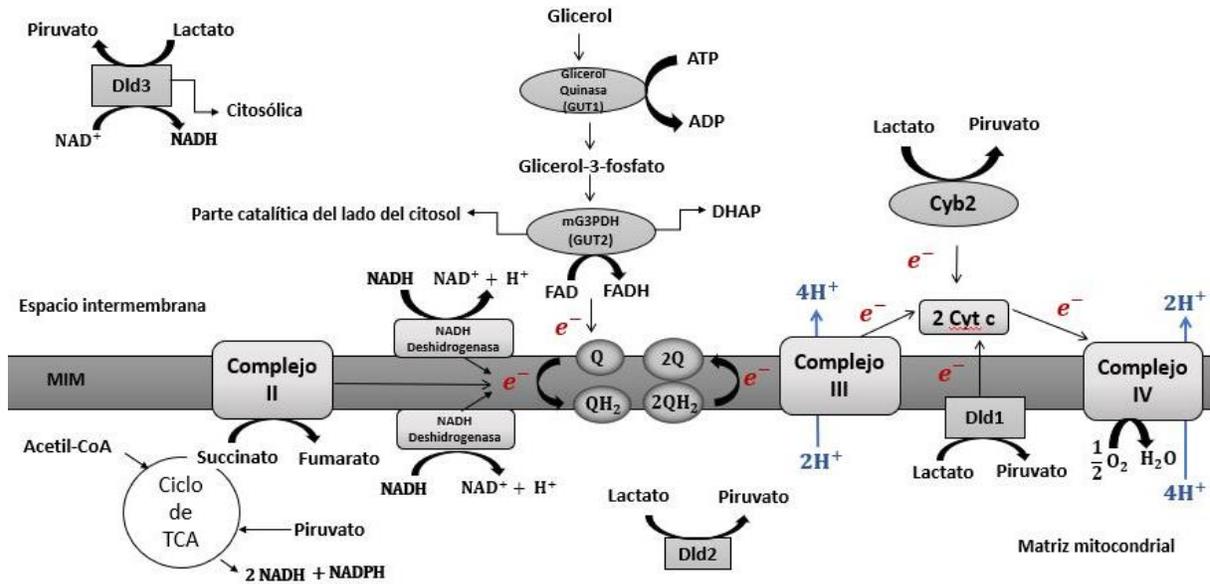


Figura 19. Metabolismo de fuentes de carbono respiratorias (etanol, glicerol y lactato). En mitocondrias de células de *S. cerevisiae* (Modificado de: García-Cordero, 2020).

La deficiencia de crecimiento de la mutante *Cox1ΔC15*, en particular a altas concentraciones y en fuentes de carbono respiratorias sugería que la actividad de la CcO estaba disminuída. Lo primero que investigó fue si los niveles basales de *Cox1* en células se alteraban en la mutante cuando ésta se crecía en lactato. Se encontró que tanto *Cox1* silvestre como *Cox1ΔC15* y *P521A/P522A* presentaron la misma acumulación cuando las células se crecieron en lactato (**Figura 14**). Este resultado indica que, aunque la mitocondria presente los mismos niveles de *Cox1*, la función de la CcO debe estar alterada. Es por esta razón que se determinó si la actividad de la CcO en cepas incapaces de regular la biogénesis de *Cox1*. El complejo IV o CcO es una enzima esencial para la función mitocondrial, aunque no es la enzima limitante de la cadena de transporte de electrones de *S. cerevisiae* (Genova *et al.*, 2008). Pensamos que la actividad de la CcO en la mutante *Cox1ΔC15* debe ser muy baja para que podamos explicar el crecimiento disminuido en etanol/glicerol y lactato.

Para analizar la actividad de la CcO se aislaron mitocondrias, se solubilizaron con digitonina y se separaron mediante electroforesis nativa BN-PAGE. En este sistema se preserva la

actividad de las enzimas y se preservan los supercomplejos, ya que la digitonina es un detergente muy suave (Wittig *et al.*, 2007). La tinción en gel de la actividad de la CcO muestra que la mutante con Cox1 Δ C15 presenta prácticamente niveles indetectables de actividad en el complejo IV monomérico. De igual manera la actividad de complejo IV en supercomplejos se ve muy disminuída. Al analizar la distribución de la proteína Cox1 Δ C15 mediante western blot encontramos que se acumula mucha más proteína en nuestra mutante que en la cepa silvestre (**Figura 15**). Este dato indica que la ausencia del extremo C-terminal de Cox1 induce una mayor cantidad de proteína Cox1, que sí se asocia a complejo IV y a supercomplejos, pero con funcionalidad baja. Esto podría deberse a que cuando se crecen las células de levadura en un medio respiratorio, se fuerza a que la cadena de transporte de electrones en la mitocondria funcione y el extremo C-ter de Cox1 actúa como un regulador de la biogénesis de Cox1. Sin embargo, cuando se eliminan los últimos 15 aminoácidos de Cox1 y se fuerza a que la levadura crezca en lactato, Cox1 defectuosa se acumula sin la necesidad de que haya una mutación adicional del ensamblaje de la CcO y genera complejos aberrantes o no funcionales. Por lo que en condiciones en que la célula no puede fermentar y solo puede respirar, el extremo C-ter de Cox1 es un autorregulador negativo muy importante. En conclusión, se acumula Cox1 defectuosa que genera una CcO que no es correctamente funcional, ya que el extremo C-ter de Cox1 tiene un papel importante en su eficiencia y además es su autorregulador negativo en condiciones aerobias.

Las NADH deshidrogenasas alternas se asocian a supercomplejos III₂/IV o III₂/IV₂ (Matus-Ortega *et al.*, 2015). Por lo que surgió la pregunta de si al haber una menor actividad de la CcO en la mutante Cox1 Δ C15, también se afectaba la actividad de las NADH deshidrogenasas asociadas a supercomplejos, en particular la Ndi1. Sin embargo, encontramos que las bandas de actividad en gel a la altura de supercomplejos no mostraba una diferencia significativa entre la cepa WT y mutantes. Adicionalmente y opuesto a lo esperado la cepa Cox1 Δ C15 mostró un incremento en la actividad, en particular de unos subcomplejos de menor peso molecular de \approx 440-669 kDa (**Figura 16**). Esto nos indica que en el metabolismo del lactato existe un fenómeno por el cual defectos en la biogénesis de

Cox1 (en este caso por la mutación Cox1 Δ C15) activan a las NADH deshidrogenasas alternas. Una posible explicación es que las lactato deshidrogenasas (Cyb2 y Dld1), que donan electrones directamente al citocromo *c* tengan un decremento en su actividad o en su abundancia cuando existen defectos en la función de la CcO. Entonces las lactato deshidrogenasas que no donan electrones directamente al citocromo *c*, como la Dld2 (la cual es soluble en la matriz mitocondrial) o Dld3 (la cual es soluble en el citosol), podrían tener un aumento ya sea en su abundancia o en su actividad (Pajot y Claisse, 1974; Lodi, Fontanesi y Gulard, 2002; Grad, Sayles y Lemire, 2005; Passarella *et al.*, 2008). Posteriormente, al oxidar el lactato a piruvato e ingresarlo al ciclo de Krebs, se podría favorecer el ingreso de electrones a la cadena respiratoria por medio de las Ndi1 y Nde1-2 (**Figura 19**). Es por esto por lo que posiblemente la abundancia de las NADH deshidrogenasas alternas pudo haber incrementado y, por lo tanto, su actividad en geles azules nativos es mayor.

Finalmente, en este trabajo encontramos que la cepa Cox1 Δ C15 tiene una velocidad ligeramente menor de síntesis de ATP que la cepa WT y la cepa P521A/P522A. Este resultado indica que sintetizar ATP a una menor velocidad no es una consecuencia de perder la capacidad de regular la síntesis de proteínas mitocondriales. Lo anterior se sugiere debido a que la cepa con P521A/P522A presentó una velocidad de síntesis de ATP similar a la cepa silvestre (**Figura 17**). En contraste, este resultado nos sugiere que una CcO que tiene una función deficiente (como es el caso de la CcO con la mutante Cox1 Δ C15) si presenta una menor velocidad de la síntesis de ATP. Esta menor producción permite la viabilidad de la mutante en medios respiratorios. En reportes sobre la longevidad de las células de *S. cerevisiae* y su metabolismo, encontraron que, la cantidad de ATP de cepas longevas presentaba cantidades de similares a la cepa silvestre. Sin embargo, una mutante, que aparte de ser longeva tenía su actividad bioenergética afectada, tenía un decremento significativo en cuanto a los niveles de ATP (Molon *et al.*, 2016). Esto significaría que una célula ajusta la concentración de ATP al estado metabólico celular o demanda de esta molécula. Por lo que es posible que la mutante Cox1 Δ C15 envejezca prematuramente ya que tiene un menor velocidad de producción de ATP porque su CcO tiene una menor

actividad debido a que su extremo C-ter es importante para el correcto funcionamiento de la enzima.

De todas las funciones estudiadas en este trabajo, se concluye que las células son mucho más sensibles a la ausencia del extremo carboxilo terminal de Cox1, más que a la mutación puntual de dos prolinas de esta misma región. Mientras que la mutante Cox1P5621A/P522A sólo afecta síntesis de Cox1 en la mitocondria, la mutante Cox1 Δ C15 afecta también la formación/acumulación de supercomplejos y la actividad de la CcO. Por lo tanto, es sugerente que los fenotipos encontrados se deben más al defecto en la actividad de la CcO y/o de la formación/acumulación de supercomplejos que de la desregulación de la síntesis de Cox1.

Existen diversos reportes que apuntan a que los extremos C-ter de las proteínas, en general, contienen señales de gran importancia para las enzimas a la que pertenecen (Sharma y Schiller, 2019). Los resultados de este trabajo apuntan a que el extremo C-ter de Cox1 participa tanto en la regulación del crecimiento de las cepas a altas temperaturas, así como en la función catalítica de enzimas que pertenecen a la cadena respiratoria. Como evidencia de la importancia evolutiva del extremo C-ter de Cox1, existen estudios en la ameba *Acanthamoeba castellanii*. Estos estudios indican que el gen *COX1* se encuentra dividido en dos partes. Curiosamente la sección que conforma al extremo C-ter de Cox1 de este microorganismo se encuentra codificado en el genoma nuclear y, por el contrario, la región de Cox1 hidrofóbica se encuentra codificado en el genoma mitocondrial. Más aún, la porción extremo carboxilo terminal tiene una presecuencia de importación a la mitocondria, sugiriendo que es un componente esencial para la actividad de la CcO de la ameba (Gawryluk and Gray, 2010). Es muy interesante ya que sugiere que la función del extremo C-ter es importante para la enzima porque, aunque se perdió esta sección en el genoma mitocondrial, en el genoma nuclear se retuvo y parece importarse. El extremo carboxilo terminal de Cox1 también es importante para oligomerizar a la enzima Cox10, esencial en la síntesis de hemos α (Khalimonchuk *et al.*, 2012).

Aunque hasta el momento no hemos observado un fenotipo asociado a que una célula de levadura no pueda regular la síntesis de proteínas mitocondriales y no hemos encontrado una respuesta a la pregunta de: ¿por qué los mecanismos de traducción en la mitocondria son tan altamente regulados? Sí podemos decir que, en el camino a resolver la anterior pregunta, encontramos que el extremo C-ter de Cox1 tiene un papel importante en la actividad catalítica de la CcO o complejo CIV en fuentes respiratorias como el lactato. Entonces finalmente concluimos que:

- El envejecimiento cronológico prematuro de la mutante Cox1 Δ C15 no parece asociarse a una mayor producción de especies prooxidantes asociadas a una Cox1 mal ensamblada.
- La actividad de la CcO está disminuida en la mutante Cox1 Δ C15 cuando las células se crecen en medios respiratorios.
- La mutante con Cox1 Δ C15 forma menos supercomplejos y CcO monomérica activos, aunque acumula una mayor cantidad de proteína Cox1 Δ C15.
- La actividad de las NADH deshidrogenasas alternas Ndi1, Nde1-2 se incrementan en la mutante Cox1 Δ C15.
- La mutante P521A/P522A presentó una discreta disminución en la actividad de la CcO tanto en su forma libre como en supercomplejos. Aparte de esta observación, la mutante no presentó defectos en los fenotipos estudiados en este trabajo.

- Determinar cuantitativamente la actividad del complejo IV (CcO) en las cepas mutantes y WT del extremo C-ter de Cox1 en cultivos de levadura crecido en la fuente de carbono respiratoria lactato. Para determinar exactamente en qué porcentaje es menos activa la CcO de la cepa Cox1 Δ C15 a comparación de la WT y la doble mutante de prolinas.
- Cuantificar la actividad de las Ndi1 y Nde1-2 en las cepas mutantes y WT del extremo C-ter de Cox1 usando como fuente de carbono al lactato. Hacer estas cuantificaciones nos permitirá conocer cuál de las NADH deshidrogenasa alternas mitocondriales tiene su actividad incrementada en la cepa mutante Cox1 Δ C15.
- Realizar complexómica de proteínas mitocondriales de las cepas mutantes y WT para analizar la abundancia de diferentes proteínas y sus complejos relacionadas al metabolismo del lactato, NADH deshidrogenasas alternas, formación de supercomplejos, etc.
- Observar al microscopio a las cepas de levaduras mutantes del extremo C-terminal de Cox1 para determinar si su morfología mitocondrial se afecta.

Lista de cepas

Nombre de la cepa	Genotipo nuclear (mitocondrial)	Referencia
XPM201	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, (ρ^+,$\Delta\Sigma ai$)</i>	(Shingú-Vázquez <i>et al.</i> , 2010)
XPM209	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, (ρ^+,$\Delta\Sigma ai$,<i>COX1</i>$\Delta C15$)</i>	(Shingú-Vázquez <i>et al.</i> , 2010)
MS62a	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, (ρ^+,$\Delta\Sigma ai$,<i>COX-P521A/P522A</i>)</i>	(Shingú-Vázquez <i>et al.</i> , 2010)
XPM202	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, (ρ^+,$\Delta\Sigma ai$, <i>COX2-62</i>)</i>	(Shingú-Vázquez <i>et al.</i> , 2010)
XPM232	<i>Mata, ura3-52, leu2-3, 112 lys2, arg8::hisG, $\Delta PET309::LEU2$ (ρ^+,$\Delta\Sigma ai$)</i>	(Tavares-Carreón <i>et al.</i> , 2008)

Referencias

- Acin-Perez, R. y Enriquez, J. (2014). The function of the respiratory supercomplexes: The plasticity model. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1837(4), pp.444-450.
- Alberts, B., Wilson, J. y Hunt, T. (2008). *Molecular biology of the cell*. 5ta ed. Nueva York: Garland Science, pp.813-827.
- Altmann, K., Dürr, M. y Westermann, B. (2007). *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism to study mitochondrial biology. *Methods in Molecular Biology*, pp.81-90.
- Baccolo, G., Stamerra, G., Coppola, D., Orlandi, I. y Vai, M., 2018. Mitochondrial metabolism and aging in yeast. *International Review of Cell and Molecular Biology*, pp.1-33.
- Barrientos, A., Pierre, D., Lee, J. y Tzagoloff, A. (2003). Cytochrome oxidase assembly does not require catalytically active cytochrome c. *Journal of Biological Chemistry*, 278(11), pp.8881-8887.
- Barrientos, A., Zambrano, A. y Tzagoloff, A. (2004). Mss51p and Cox14p jointly regulate mitochondrial Cox1p expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 23(17), pp.3472-3482.
- Benard, G., Bellance, N., James, D., Parrone, P., Fernandez, H., Letellier, T. y Rossignol, R. (2007). Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *Journal of Cell Science*, 120(5), pp.838-848.
- Bode, M., Longen, S., Morgan, B., Peleh, V., Dick, T., Bihlmaier, K. y Herrmann, J., 2013. Inaccurately assembled cytochrome c oxidase can lead to oxidative stress-induced growth arrest. *Antioxidants y Redox Signaling*, 18(13), pp.1597-1612.
- Bohovych, I. y Khalimonchuk, O. (2016). Sending Out an SOS: Mitochondria as a Signaling Hub. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4, pp.1-15.

Bonnefoy, N., Fiumera, H., Dujardin, G. y Fox, T. (2009). Roles of Oxa1-related inner-membrane translocases in assembly of respiratory chain complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1793(1), pp.60-70.

Borst, P. y Grivell, L., 1978. The mitochondrial genome of yeast. *Cell*, 15(3), pp.705-723.
Breitenbach, M., Rinnerthaler, M., Hartl, J., Stincone, A., Vowinckel, J., Breitenbach-Koller, H. y Ralser, M., 2014. Mitochondria in ageing: there is metabolism beyond the ROS. *FEMS Yeast Research*, 14(1), pp.198-212.

Butow, R. y Avadhani, N. (2004). Mitochondrial signaling: The retrograde response. *Molecular Cell*, 14(1), pp.1-15.

Cagin, U. y Enriquez, J. (2015). The complex crosstalk between mitochondria and the nucleus: What goes in between? *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 63, pp.10-15.

Chowdhary, S., Kainth, A., Pincus, D. y Gross, D. (2019). Heat shock factor 1 drives intergenic association of its target gene loci upon heat shock. *Cell Reports*, 26(1), pp.18-28.

Cortés, P., Castrejón, V., Sampedro, J. and Uribe, S. (2000). Interactions of arsenate, sulfate, and phosphate with yeast mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1456(2-3), pp.67-76.

de Smidt, O., du Preez, J. y Albertyn, J. (2008). The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: a comprehensive review. *FEMS Yeast Research*, 8(7), pp.967-978.

de Vries, S. y Marres, C. (1987). The mitochondrial respiratory chain of yeast. Structure and biosynthesis and the role in cellular metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics*, 895(3), pp.205-239.

Engel, S., Dietrich, F., Fisk, D., Binkley, G., Balakrishnan, R., Costanzo, M., Dwight, S., Hitz, B., Karra, K., Nash, R., Weng, S., Wong, E., Lloyd, P., Skrzypek, M., Miyasato, S., Simison, M. y Cherry, J. (2013). The reference genome sequence of *Saccharomyces cerevisiae*: then and now. *Genes|Genomes|Genetics*, 4(3), pp.389-398.

- Eubel, H., Braun, H. y Millar, A. (2005). Blue-native PAGE in plants: a tool in analysis of protein-protein interactions. *Plant Methods*, 1(1), p.11.
- Fedor, J. y Hirst, J. (2018). Mitochondrial supercomplexes do not enhance catalysis by quinone channeling. *Cell Metabolism*, 28(3), pp.525-531.e4.
- Fontanesi, F., Soto, I. y Barrientos, A. (2008). Cytochrome c oxidase biogenesis: New levels of regulation. *IUBMB Life*, 60(9), pp.557-568.
- Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N. y Purnelle, B. (1998). The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 440(3), pp.325-331.
- Fox, T. (2012). Mitochondrial protein synthesis, import, and assembly. *Genetics*, 192(4), pp.1203-1234.
- Freel, K., Friedrich, A. and Schacherer, J., 2015. Mitochondrial genome evolution in yeasts: an all-encompassing view. *FEMS Yeast Research*, 15(4).
- Friedman, J. y Nunnari, J. (2014). Mitochondrial form and function. *Nature*, 505(7483), pp.335-343.
- Garay, E., Campos, S., González de la Cruz, J., Gaspar, A., Jinich, A. y DeLuna, A., 2014. High-resolution profiling of stationary-phase survival reveals yeast longevity factors and their genetic interactions. *PLoS Genetics*, 10(2), p.e1004168.
- García Villegas, R. (2018). Estudio de la función del extremo carboxilo terminal de Cox1 en la biogénesis de la citocromo c oxidasa en mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*. Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
- García-Guerrero, A., Camacho-Villasana, Y., Zamudio-Ochoa, A., Winge, D. y Pérez-Martínez, X., 2018. Cbp3 and Cbp6 are dispensable for synthesis regulation of cytochrome b in yeast mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 293(15), pp.5585-5599.
- García-Guerrero, A., Zamudio-Ochoa, A., Camacho-Villasana, Y., García-Villegas, R., Reyes-Prieto, A., y Pérez-Martínez, X. (2018). Evolution of the protein synthesis machinery and its regulation. *SPRINGER*, pp. 109-142.

García-Villegas, R., Camacho-Villasana, Y., Shingú-Vázquez, M., Cabrera-Orefice, A., Uribe-Carvajal, S., Fox, T. y Pérez-Martínez, X. (2017). The Cox1 C-terminal domain is a central regulator of cytochrome c oxidase biogenesis in yeast mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 292(26), pp.10912-10925.

Gawryluk, R. y Gray, M. (2010). An ancient fission of mitochondrial cox1. *Molecular Biology and Evolution*, 27(1), pp.7-10.

Genova, M., Baracca, A., Biondi, A., Casalena, G., Faccioli, M., Falasca, A., Formiggini, G., Sgarbi, G., Solaini, G. y Lenaz, G. (2008). Is supercomplex organization of the respiratory chain required for optimal electron transfer activity? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1777(7-8), pp.740-746.

Grad, L., Sayles, L. y Lemire, B. (2005). Introduction of an additional pathway for lactate oxidation in the treatment of lactic acidosis and mitochondrial dysfunction in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(51), pp.18367-18372.

Green-Willms, N., Butler, C., Dunstan, H. y Fox, T. (2000). Pet111p, an inner membrane-bound translational activator that limits expression of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial gene *COX2*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(9), pp.6392-6397.

Hartley, A., Lukoyanova, N., Zhang, Y., Cabrera-Orefice, A., Arnold, S., Meunier, B., Pinotsis, N. y Maréchal, A. (2018). Structure of yeast cytochrome c oxidase in a supercomplex with cytochrome bc1. *Nature Structural & Molecular Biology*, 26(1), pp.78-83.

Hendrick, J. y Hartl, F. (1993). Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 62(1), pp.349-384.

Hornig-Do, H., Tatsuta, T., Buckermann, A., Bust, M., Kollberg, G., Rötig, A., Hellmich, M., Nijtmans, L. y Wiesner, R. (2012). Nonsense mutations in the Cox1 subunit impair the stability of respiratory chain complexes rather than their assembly. *The EMBO Journal*, 31(5), pp.1293-1307.

Jarolim, S., Ayer, A., Pillay, B., Gee, A., Phrakaysone, A., Perrone, G., Breitenbach, M. y Dawes, I. (2013). *Saccharomyces cerevisiae* genes involved in survival of heat shock. *Genes|Genomes|Genetics*, 3(12), pp.2321-2333.

Jiménez, L. y Merchant, H. (2003). *Biología celular y molecular*. 1ra ed. México: PEARSON Educación, pp.295-313.

Karathia, H., Vilaprinyo, E., Sorribas, A. y Alves, R. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: a comparative study. *PLoS ONE*, 6(2), pp.1-10

Khalimonchuk, O., Bird, A. y Winge, D. (2007). Evidence for a pro-oxidant intermediate in the assembly of cytochrome oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 282(24), pp.442-449.

Khalimonchuk, O., Kim, H., Watts, T., Perez-Martinez, X. y Winge, D., 2012. Oligomerization of heme o synthase in cytochrome oxidase biogenesis is mediated by cytochrome oxidase assembly factor Coa2. *Journal of Biological Chemistry*, 287(32), pp.715-726.

Kitajima-Ihara, T. y Yagi, T., 1998. Rotenone-insensitive internal NADH-quinone oxidoreductase of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria: the enzyme expressed in *Escherichia coli* acts as a member of the respiratory chain in the host cells. *FEBS Letters*, 421(1), pp.37-40.

Klein, M., Swinnen, S., Thevelein, J. y Nevoigt, E. (2017). Glycerol metabolism and transport in yeast and fungi: established knowledge and ambiguities. *Environmental Microbiology*, 19(3), pp.878-893.

Li, X., Peris, D., Hittinger, C., Sia, E. y Fay, J. (2019). Mitochondria-encoded genes contribute to evolution of heat and cold tolerance in yeast. *Science Advances*, 5(1), pp.1-10.

Lieberman, M. y Ricer, R. (2014). *Bioquímica, biología molecular y genética*. 6ta ed. Barcelona: Wolters Kluwer Health, pp.159-163.

Lodi, T., Fontanesi, F. y Gulard, G. (2002). Co-ordinate regulation of lactate metabolism genes in yeast: the role of the lactate permease gene JEN1. *Molecular Genetics and Genomics*, 266(5), pp.838-847.

Macedo-Márquez, Alain. (2012). La producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 15(2), pp.97-103.

Malina, C., Larsson, C. y Nielsen, J. (2018). Yeast mitochondria: an overview of mitochondrial biology and the potential of mitochondrial systems biology. *FEMS Yeast Research*, 18(5), pp. 1-17.

Manthey, G. y McEwen, J. (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*. *The EMBO Journal*, 14(16), pp.31-43.

Martin, W., Garg, S. y Zimorski, V. (2015). Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1678), pp. 14-30.

Martin, W. y Mentel, M. (2010) The origin of mitochondria. *Nature Education* 3(9), pp.58.

Matus-Ortega, M., Cárdenas-Monroy, C., Flores-Herrera, O., Mendoza-Hernández, G., Miranda, M., González-Pedrajo, B., Vázquez-Meza, H. y Pardo, J. (2015). New complexes containing the internal alternative NADH dehydrogenase (Ndi1) in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 32(10), pp.629-641.

Mick, D., Fox, T. y Rehling, P. (2011). Inventory control: cytochrome *c* oxidase assembly regulates mitochondrial translation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(1), pp.14-20.

Milenkovic, D., Blaza, J., Larsson, N. y Hirst, J. (2017). The enigma of the respiratory chain supercomplex. *Cell Metabolism*, 25(4), pp.765-776.

Molon, M., Szajwaj, M., Tchorzewski, M., Skoczowski, A., Niewiadomska, E. y Zadrag-Tecza, R., 2016. The rate of metabolism as a factor determining longevity of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *AGE*, 38(1), pp. 1-14.

Morano, K., Grant, C. y Moye-Rowley, W. (2011). The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190(4), pp.1157-1195.

Mourier, A., Vallortigara, J., Yoboue, E., Rigoulet, M. y Devin, A. (2008). Kinetic activation of yeast mitochondrial d-lactate dehydrogenase by carboxylic acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1777(10), pp.1283-1288.

Nelson, D. y Cox, M. (2017). *Lehninger principles of biochemistry*. 7ma ed. Nueva York: W.H. Freeman, pp.711-754.

Ng, S., De Clercq, I., Van Aken, O., Law, S., Ivanova, A., Willems, P., Giraud, E., Van Breusegem, F. y Whelan, J. (2014). Anterograde and retrograde regulation of nuclear genes encoding mitochondrial proteins during growth, development, and stress. *Molecular Plant*, 7(7), pp.1075-1093.

Nicholls, D. y Ferguson, S., 2013. *Cellular Bioenergetics*. *Bioenergetics*, pp.255-302.

Ott, M., Amunts, A. y Brown, A. (2016). Organization and regulation of mitochondrial protein synthesis. *Annual Review of Biochemistry*, 85(1), pp.77-101.

Pajot, P. y Claisse, M. (1974). Utilization by yeast of D-lactate and L-lactate as sources of energy in the presence of antimycin A. *European Journal of Biochemistry*, 49(1), pp.275-285.

Parikh, V., Morgan, M., Scott, R., Clements, L. y Butow, R. (1987). The mitochondrial genotype can influence nuclear gene expression in yeast. *Science*, 235(4788), pp.576-580.

Parrella, E. y Longo, V. (2008). The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae* to study mitochondrial dysfunction and disease. *Methods*, 46(4), pp.256-262.

Passarella, S., de Bari, L., Valenti, D., Pizzuto, R., Paventi, G. y Atlante, A. (2008). Mitochondria and L-lactate metabolism. *FEBS Letters*, 582(25-26), pp.569-576.

Perez-Martinez, X. (2003). Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. *The EMBO Journal*, 22(21), pp.951-961.

Perez-Samper, G., Cerulus, B., Jariani, A., Vermeersch, L., Barrajon Simancas, N., Bisschops, M., van den Brink, J., Solis-Escalante, D., Gallone, B., De Maeyer, D., van Bael, E., Wenseleers, T., Michiels, J., Marchal, K., Daran-Lapujade, P. y Verstrepen, K. (2018). The crabtree effect shapes the *Saccharomyces cerevisiae* lag phase during the switch between different carbon sources. *mBio*, 9(5). pp.1-12.

Picard, M., Shirihai, O., Gentil, B. y Burelle, Y. (2013). Mitochondrial morphology transitions and functions: implications for retrograde signaling? *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 304(6), pp.393-406.

Postmus, J., Tuzun, I., Bekker, M., Muller, W., Teixeira de Mattos, M., Brul, S. y Smits, G. (2011). Dynamic regulation of mitochondrial respiratory chain efficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 157(12), pp.500-511.

Rak, M., Bénit, P., Chrétien, D., Bouchereau, J., Schiff, M., El-Khoury, R., Tzagoloff, A. y Rustin, P. (2016). Mitochondrial cytochrome *c* oxidase deficiency. *Clinical Science*, 130(6), pp.393-407.

Roger, A., Muñoz-Gómez, S. y Kamikawa, R. (2017). The origin and diversification of mitochondria. *Current Biology*, 27(21), pp. 1177-1192.

Sánchez-Vásquez, L. y González-Halphen, D., 2017. Topología y función de las subunidades intrínsecas de la membrana de las F₁F₀-ATP sintasa mitocondriales. *TIP*, 20(2), pp.29-47.

Schägger, H. y von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical Biochemistry*, 199(2), pp.223-231.

Schieber, M. y Chandel, N. (2014). ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology*, 24(10), pp.453-462.

Sellick, C., Campbell, R. y Reece, R. (2008). Chapter 3: Galactose Metabolism in Yeast Structure and Regulation of the Leloir pathway Enzymes and the genes encoding them. *International Review of Cell and Molecular Biology*, pp.111-150.

Sharma, S. y Schiller, M. (2019). The carboxy-terminus, a key regulator of protein function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 54(2), pp.85-102.

Shingú Vazquez, M. (2010). Caracterización del papel del extremo carboxilo terminal de la proteína Cox1 en la regulación negativa de su síntesis. Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.

Shingú-Vázquez, M., Camacho-Villasana, Y., Sandoval-Romero, L., Butler, C., Fox, T. y Pérez-Martínez, X. (2010). The carboxyl-terminal end of Cox1 is required for feedback assembly regulation of Cox1 synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 285(45), pp.382-389.

Simon, J. y Bedalov, A. (2004). Yeast as a model system for anticancer drug discovery. *Nature Reviews Cancer*, 4(6), pp.481-487.

Soto, I., Fontanesi, F., Liu, J. y Barrientos, A. (2012). Biogenesis and assembly of eukaryotic cytochrome c oxidase catalytic core. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1817(6), pp.883-897.

Soto, I., Fontanesi, F., Valledor, M., Horn, D., Singh, R. y Barrientos, A. (2009). Synthesis of cytochrome c oxidase subunit 1 is translationally downregulated in the absence of functional F₁F₀-ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1793(11), pp.1776-1786.

Srinivasan, S. y Avadhani, N. (2012). Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(6), pp.1252-1263.

Taanman, J., 1999. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation, and replication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1410(2), pp.103-123.

Tavares-Carreón, F., Camacho-Villasana, Y., Zamudio-Ochoa, A., Shingú-Vázquez, M., Torres-Larios, A. y Pérez-Martínez, X. (2007). The pentatricopeptide repeats present in

Pet309 are necessary for translation but not for stability of the mitochondrial *COX1* mRNA in Yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 283(3), pp.1472-1479.

Timón-Gómez, A., Nývltová, E., Abriata, L., Vila, A., Hosler, J. y Barrientos, A. (2018). Mitochondrial cytochrome c oxidase biogenesis: Recent developments. *Seminars in Cell y Developmental Biology*, 76, pp.163-178.

Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. y Yoshikawa, S. (1996). The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science*, 272(5265), pp.1136-1144.

Vartak, R., Porras, C. y Bai, Y. (2013). Respiratory supercomplexes: structure, function and assembly. *Protein & Cell*, 4(8), pp.582-590.

Weraarpachai, W., Antonicka, H., Sasarman, F., Seeger, J., Schrank, B., Kolesar, J., Lochmüller, H., Chevrette, M., Kaufman, B., Horvath, R. y Shoubbridge, E. (2009). Mutation in *TACO1*, encoding a translational activator of *COX1*, results in cytochrome c oxidase deficiency and late-onset Leigh syndrome. *Nature Genetics*, 41(7), pp.833-837.

Wills, C. (1990). Regulation of sugar and ethanol metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 25(4), pp.245-280.

Wittig, I., Karas, M. y Schägger, H., 2007. High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6(7), pp.1215-1225.

Zee, J. y Glerum, D. (2006). Defects in cytochrome oxidase assembly in humans: lessons from yeast. *Biochemistry and Cell Biology*, 84(6), pp.859-869.

Zhao, R., Jiang, S., Zhang, L. y Yu, Z., (2019). Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *International Journal of Molecular Medicine*.