



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Estudio de la función del complejo Cbp3-Cbp6 y del extremo carboxilo terminal de citocromo *b* sobre la biogénesis del complejo *bc₁* en mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

Daniel Flores Mireles

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Xochitl Pérez Martínez
Instituto de Fisiología Celular

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Emma Berta Gutiérrez Cirlos Madrid
FES Iztacala

Dr. Diego González Halphen
Instituto de Fisiología Celular

Ciudad de México. Enero, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Xochitl Pérez Martínez en el laboratorio 204 oriente, del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se agradece al comité tutorial formado por:

- Dra. Xochitl Pérez Martínez del instituto de Fisiología Celular
- Dra. Emma Berta Gutiérrez Cirlos Madrid de la FES Iztacala
- Dr. Diego González Halphen del instituto de Fisiología Celular

por la asesoría, apoyo y valiosos comentarios a este trabajo.

Se extiende un agradecimiento especial a la Dra. Yolanda Camacho Villasana del Instituto de Fisiología Celular, por la asesoría y participación en este trabajo.

Se agradece al Dr. Gabriel del Río y a la Dra. María Teresa Lara Ortiz del Instituto de Fisiología Celular, por la donación de cepas de levadura proporcionadas de la colección KYO.

Se agradece la asesoría técnica de la Dra. Soledad Funes, Dra. Ariann Elizabeth Mendoza Martinez, Dr. Enrique Chávez Jiménez, Q.B.P. Miriam Vázquez Acevedo del Instituto de Fisiología Celular.

Se agradece a la Dra. Laura Ongay Larios, a la Biol. María Guadalupe Códiz, M.C. Minerva Mora Cabrera de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, por su asistencia técnica.

Se agradece a la M.C. Tecili Cabellos Avelar, de la FES- Iztacala, por su asesoría técnica.

Agradecimiento especial al por el soporte técnico y apoyo al Dr. Ulrich Brandt y Alfredo Cabrera Orefice de Radboud Institute for Molecular Life Sciences, Radboud University Medical Center, Nijmegen, Holanda.

Agradecimiento por el soporte técnico y apoyo al Dr. Martin Ott y Andreas Carlström de Stockholm University y Gothenburg University, Suecia.

Agradecimiento por el soporte técnico y apoyo al Dr. Marcelino Arciniega Castro del Instituto de Fisiología Celular.

Este trabajo fue apoyado por PAPIIT (IN209217) y CONACyT (47514). Durante la realización de este trabajo conté con una beca de doctorado por parte de CONACYT (777444). Agradecimiento al “Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado” (PAEP) por el apoyo para asistir a congreso nacional y en el extranjero, y una estancia en el extranjero.

Índice

Abreviaturas	7
Resumen	9
Abstract	10
Introducción	11
Mitocondria	11
<i>S. cerevisiae</i> como modelo de estudio	12
Genoma mitocondrial de <i>S. cerevisiae</i>	12
Cadena respiratoria mitocondrial	13
Complejo III o complejo <i>bc₁</i>	19
Citocromo <i>b</i> (<i>Cytb</i>)	20
RNA mensajero (mRNA) de <i>COB</i>	21
Traducción del mRNA de <i>COB</i> y ensamblaje de <i>Cytb</i>	23
Ensamblaje del complejo <i>bc₁</i>	24
Cbp3 y Cbp6	26
El extremo C-ter de <i>Cytb</i>	26
Regulación de la síntesis de <i>Cytb</i>	28
Justificación	29
Hipótesis	31
Objetivo general	31
Objetivos particulares	31
Materiales y métodos	32
Diluciones seriadas	32
Ensayo de traducción mitocondrial <i>In vivo</i>	33
Obtención de la fracción mitocondrial cruda	36
Método rápido de extracción de mitocondrias	41
Cuantificación de proteínas por método de lowry	41
Western blot (inmunodetección)	42
Cuantificación de hemo <i>b</i> por HPLC	45

Espectros de hemocromos mitocondriales	46
Ensayo de traducción <i>in organello</i>	47
Ensayo de traducción <i>in organello</i> y co-inmunoprecipitación de Cbp3-HA	48
Segunda dimensión	50
BN-PAGE	50
Actividad <i>in gel</i> de la CcO	52
Aislamiento de membranas de mitocondrias de levadura para análisis por perfil complexómico	53
Perfil complexómico	54
Photo-Cross linking (entrecruzamiento fotoreactivo)	56
Generación de mutantes nucleares de <i>S. cerevisiae</i>	60
Transformación de levadura	60
Purificación de DNA total de levadura método rápido	61
Extracción de proteína total método rápido.	62
Resultados	63
El extremo carboxilo es esencial para el funcionamiento del complejo <i>bc₁</i>	63
El extremo carboxilo terminal de <i>Cytb</i> probablemente favorezca la hemilación de <i>Cytb</i>	66
El extremo carboxilo terminal de <i>Cytb</i> es esencial para el ensamblaje del complejo <i>bc₁</i>	69
El extremo C-ter de <i>Cytb</i> es indispensable en el ensamblaje del complejo <i>bc₁</i>	72
El extremo C-ter de <i>Cytb</i> participa en la regulación de la síntesis de <i>Cytb</i>	75
La ausencia del extremo C-ter de <i>Cytb</i> genera una mayor cantidad de Cbp3-Cbp6 libres	78
El extremo C-ter de <i>Cytb</i> fomenta el ensamblaje de los primeros intermediarios	82
Los aminoácidos de Cbp3 que analizamos no interactúan con el extremo C-ter de <i>Cytb</i>	87

Discusión	90
Conclusiones	95
Perspectivas	95
Bibliografía	98
Publicaciones derivadas de mi trabajo de Doctorado	105
Apéndice 1	106
Apéndice 2	111
Apéndice 3	113
Publicaciones	119

Abreviaturas

APS	Persulfato de amonio
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
C-ter	Carboxilo terminal
CcO	Citocromo <i>c</i> oxidasa
COB	Gen que codifica para Citocromo <i>b</i>
Cryo-EM	La criomicroscopía electrónica
Cyt <i>c</i> ₁	Citocromo <i>c</i> ₁
Cyt <i>b</i>	Citocromo <i>b</i>
Cyt <i>b</i> Δ <i>C</i> 13	Mutante de Cyt <i>b</i> que carece de los últimos 13 aminoácidos
Cyt <i>b</i> Δ <i>C</i> 8	Mutante de Cyt <i>b</i> que carece de los últimos 8 aminoácidos
DO	Densidad óptica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido egtazico
FA	Ácido fórmico
Fe-S	Hierro- Azufre
GLU	Ácido Glutámico
GTP	Guanosín trifosfato
HCL	Ácido clorhidrico
HEPES	Ácido 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
iBAQ	Intensidad de la cuantificación absoluta
Kb	Kilobase
KDa	KiloDalton
LC	Cromatografía de líquidos
MELAS	Miopatía, encefalopatía, acidosis láctica
mRNA	Ácido ribonucle3ico mensajero

MS	Espectrometría de masas
mtDNA	DNA mitocondrial
N-ter	Amino terminal
N-ter	Región amino terminal
NAD ⁺	Nicotin adenin dinucleótido (oxidado)
NADH	Nicotin adenin dinucleótido (reducido)
OXPPOS	Fosforilación oxidativa
Pb	Pares de bases
PBD	Protein Data Bank
pBpa	p-benzoil-L-fenilalanina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
Pet ⁻	No tiene la capacidad de crecer en medio respiratorio
Pet ⁺	Tiene la capacidad de crecer en medio respiratorio
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
Q	Ubiquinona
QH ₂	Ubiquinol
Rip1	Proteína de Rieske
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDS	Dodecilsulfato sódico
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
TIM	Traslocasa de la membrana interna
TOM	Traslocasa de la membrana externa
UTR	Región no traducida del RNA mensajero

Resumen

El Complejo bc_1 o complejo III está insertado en la membrana interna mitocondrial como un dímero obligado y cada monómero está formado por 10 subunidades diferentes (Zara *et al*, 2009). Nueve de las subunidades están codificadas en el genoma nuclear; y sólo Citocromo *b* (Cyt*b*) está codificada en el genoma mitocondrial. Cyt*b* es una proteína de 8 alfa hélices transmembranales y contiene dos grupos hemo tipo *b* importantes para su actividad catalítica (Zara *et al*, 2009), es sintetizada en la matriz mitocondrial y es la primera subunidad del complejo bc_1 en ensamblarse (Ott *et al*, 2016).

En la estructura cristalográfica del complejo bc_1 , el extremo carboxilo terminal (C-ter) de Cyt*b* está expuesto hacia la matriz mitocondrial e interactúa con la subunidad Qcr7 (PBD/1KYO, Lange y Hunte, 2002). Para la síntesis del Cyt*b* se requiere activadores traduccionales específicos y del complejo de chaperonas llamadas Cbp3 y Cbp6 (Cbp3-Cbp6). Además, estas chaperonas interactúan con el recién sintetizado Cyt*b* para favorecer su ensamblaje y hemilación (Gruschke *et al*, 2012; Hildenbeutel *et al*, 2014). Cyt*b* junto con Qcr7 y Qcr8 forma uno de los primeros intermediarios de ensamblaje para que el resto de las subunidades se ensamblen y se forme el complejo bc_1 .

Al afectar el ensamblaje del complejo bc_1 o la hemilación de Cyt*b*, las chaperonas Cbp3-Cbp6 se secuestran en un intermediario junto con Cyt*b*, reprimiendo nuevas rondas de síntesis de Cyt*b* como mecanismo de regulación (Gruschke *et al*, 2012; Hildenbeutel *et al*, 2014; García-Guerrero *et al*, 2018). En este trabajo encontramos que el extremo C-ter de Cyt*b* es necesario para el ensamblaje del complejo bc_1 , y es importante para la interacción de Cyt*b* con Cbp3-Cbp6, nuestros datos sugieren que podría favorecer el proceso de hemilación de Cyt*b* y está involucrado en el mecanismo de regulación de la síntesis de Cyt*b*.

Abstract

The *bc₁* complex or complex III is inserted into the mitochondrial inner membrane as a dimer and each monomer is formed by 10 different subunits (Zara *et al*, 2009). Nine of the subunits are encoded in the nuclear genome; and only Cytochrome b (Cytb) is encoded in the mitochondrial genome. Cytb is a protein with 8 alpha transmembrane helices and contains two heme *b* groups important for its catalytic activity (Zara *et al*, 2009), is synthesized in the mitochondrial matrix and is the first subunit of the *bc₁* complex to assemble (Ott *et al*, 2016).

In *bc₁* complex crystallographic structure, the Cytb carboxyl-terminal (C-ter) end is toward to mitochondrial matrix and interacts with Qcr7 subunit (PBD/1KYO, Lange y Hunte, 2002). For Cytb synthesis is required of the specific translational activators and the chaperone complex of the Cbp3 and Cbp6 (Cbp3-Cbp6). In addition, these chaperones interact with the newly synthesized Cytb to promote its assembly and hemylation (Gruschke *et al*, 2012; Hildenbeutel *et al*, 2014). Cytb together with Qcr7 and Qcr8 form one of the first assembly intermediates for the remaining subunits to assemble and form the *bc₁* complex.

By affecting the *bc₁* complex assembly or Cytb hemylation, chaperones Cbp3-Cbp6 are sequestered in an intermediate along with Cytb, suppressing new rounds of Cytb synthesis as a regulating mechanism (Gruschke *et al*, 2012; Hildenbeutel *et al*, 2014; García-Guerrero *et al*, 2018). In this work we found that Cytb C-ter end is required for *bc₁* complex assembly, and also is important for Cytb interaction with Cbp3-Cbp6, our data suggest that it could favor the Cytb hemylation process and is involved Cytb synthesis regulatory mechanism.

Introducción

Mitocondria

Las células eucariontes necesitan ATP para vivir. El ATP se produce en bajas cantidades en el citosol por la glucólisis. La mayoría de ATP es producido en la mitocondria por la fosforilación oxidativa (OXPHOS) (Gilea *et al*, 2021; Popov, 2020).

En la mitocondria ocurren procesos metabólicos esenciales para la célula como: el ciclo de Krebs, la beta-oxidación, la síntesis de hemos y de centros Fe-S, y la síntesis de aminoácidos, entre otras (Roger *et al*, 2017; Popov, 2020).

Las mitocondrias se localizan en el citosol de las células y forman redes mitocondriales que llevan a cabo los procesos de fusión y fisión para mantener la herencia genética entre ellas (Youle *et al*, 2012). Su origen fue por un evento endosimbionte donde un alfa-proteobacteria se integró en una célula hospedera y formó un organelo esencial para las células (Margulis, 1967; Kehrein *et al*, 2013; Issac *et al*, 2018, Roger *et al*, 2017). Muchos genes del alfa-proteobacteria migraron al núcleo de la célula hospedera y sólo un limitado número de genes se mantuvieron en el genoma mitocondrial (Kehrein *et al*, 2013).

Existen alrededor de 1500 a 2000 proteínas mitocondriales, la mayoría están codificadas en el genoma nuclear, sintetizadas en el citosol e importadas hacia la mitocondria (Gilea *et al*, 2021; Kehrein *et al*, 2013). Sólo un limitado número de proteínas están codificadas en el genoma mitocondrial. En la levadura *Sacharomyces cerevisiae* el genoma mitocondrial codifica para 8 proteínas y en humano para 13 proteínas (Gilea *et al*, 2021).

La mitocondria está formada por una membrana externa donde se localiza el complejo de importación de proteínas llamado TOM, un espacio intermembranal, una membrana interna donde se localizan los complejos de la cadena respiratoria y el complejo de importación TIM, la matriz mitocondrial donde se encuentra el DNA

mitocondrial y la maquinaria para la síntesis de proteínas mitocondriales (Gelgon *et al*, 2021; Roger *et al*, 2017).

En humano, hay fallas en la función mitocondrial que producen síndromes que pueden ser letales, como; encefalopatía, miopatía, MELAS, cardiomiopatía, etc. Se desconocen las causas de muchas de estas patologías así como sus mecanismos moleculares. Estudiar la función mitocondrial podría ayudar a prevenir o curar enfermedades (Gilea *et al*, 2021).

S. cerevisiae como modelo de estudio

S. cerevisiae es un excelente modelo de estudio para la biogénesis de complejos respiratorios; tiene la capacidad de fermentar diferentes fuentes de carbono como; glucosa, galactosa, entre otras. Gracias a eso podemos eliminar genes que codifican para proteínas de los complejos respiratorios sin afectar la viabilidad de las células (Gilea *et al*, 2021), porque pueden sobrevivir sin la fosforilación oxidativa. Además es uno de los pocos organismos en los que se pueden generar mutantes mitocondriales por biobalística (Bonney and Fox, 2007)

S. cerevisiae puede reproducirse de forma sexual (meiosis) y asexual (mitosis). Tiene su propio genoma mitocondrial que es fácil de manipular porque posee un mecanismo de recombinación homóloga que permite hacer mutaciones (Gilea *et al*, 2021). Una ventaja de la levadura es que contiene genes homólogos al humano, estudiarlos es relativamente más fácil y rápido en comparación a otros modelos de estudio.

Genoma mitocondrial de S. cerevisiae

El genoma mitocondrial tiene un tamaño de 85.8 Kb y interactúa con algunas proteínas para formar los nucleoides mitocondriales, donde ocurren los procesos de replicación y transcripción (Isaac *et al*, 2018).

El genoma mitocondrial codifica para 8 proteínas, 7 son subunidades de los complejos respiratorios; Cox1, Cox2, Cox3 son subunidades de la citocromo *c* oxidasa; Atp6, Atp8, Atp9 son subunidades de la ATP sintasa y Cytb del complejo

bc₁. Además, codifica para una proteína de la subunidad ribosomal pequeña llamada Var1. También codifica los RNAs ribosomales de la subunidad grande (21S rRNA LSU) y la subunidad pequeña (15S rRNA SSU); y para 24 tRNAs (Ott *et al*, 2016) (Figura 1).

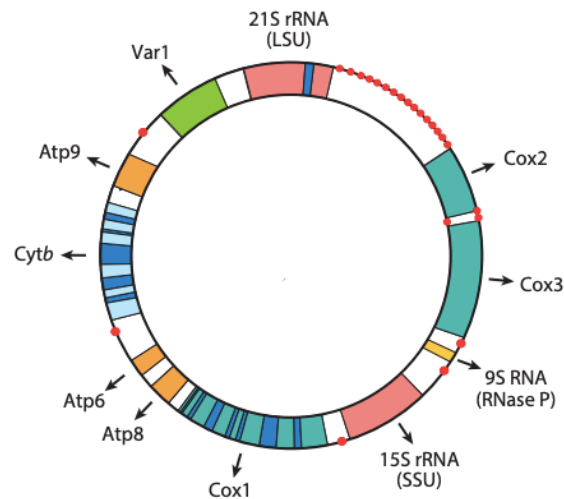


Figura 1. Genoma mitocondrial de *S. cerevisiae*. Las subunidades ribosomales se representan en color ROSA. RNAs de transferencia PUNTOS ROJOS, intrones AZUL MARINO. Var1 es una proteína de la subunidad pequeña ribosomal VERDE. Las subunidades del complejo IV VERDE AGUA, subunidades de la ATP sintasa NARANJA, la única subunidad del complejo III AZUL CLARO (Modificado de Ott *et al*, 2016).

Cadena respiratoria mitocondrial

La cadena respiratoria está formada por complejos proteicos insertados en la membrana interna mitocondrial. En *S. cerevisiae* está formada por el complejo II (succinato deshidrogenasa), el complejo III₂ en forma de dímero (complejo *bc₁*), el complejo IV (citocromo *c* oxidasa) y no tiene complejo I (NADH: ubiquinona oxidoreductasa) (Figura 2).

La función de la cadena respiratoria es transferir electrones mediante reacciones redox desde el NADH hasta su aceptor final el oxígeno, para formar agua, esto genera un potencial electroquímico en el espacio intermembranal que se utiliza por la ATP sintasa en la síntesis de ATP (Sousa *et al*, 2018).

Complejo I y NADH deshidrogenasas alternas

S. cerevisiae no tiene complejo I (NADH-ubiquinona oxidoreductasa) en su lugar tiene tres NADH deshidrogenasas alternas, una en la cara interna de la membrana interna mitocondrial (Nd1) y dos en la cara externa (Nde1 y Nde2) (Kehrein *et al*, 2013; Brzezinski *et al*, 2021). Las deshidrogenasas alternas como el complejo I tienen como principal función oxidar el NADH que se produce durante otras rutas metabólicas como el ciclo de Krebs y la beta-oxidación. Simultáneamente se encargan de reducir a la ubiquinona (Q); sin embargo sólo el complejo I transporta protones a través de la membrana interna contribuyendo a la generación del un gradiente electroquímico (Brzezinski *et al*, 2021).

Las NADH deshidrogenasas alternas son monoméricas y se codifican en el genoma nuclear, así mismo tienen un grupo FAD unido covalentemente necesario para su función catalítica (Kehrein *et al*, 2013). Por otro lado, el complejo I está formado por, 14 subunidades centrales, 7 componen el brazo periférico y 7 el brazo membranal. Adicionalmente tiene subunidades accesorias que varían entre diferentes organismos, por ejemplo en los mamíferos tienen 31 subunidades accesorias, mientras que *Yarrowia lipolytica* tiene 28 (Barros MH y McStay GP, 2020). Las siete subunidades centrales del brazo membranal están codificadas en el genoma mitocondrial, mientras que el resto se codifican en el genoma nuclear. El complejo I tiene forma de L con dos dominios; un brazo membranal responsable del bombeo de protones y un brazo periférico donde se lleva a cabo la transferencia de electrones del NADH a la quinona (Hirst J, 2013; Parey *et al*, 2020; Cabrera-Orefice *et al*, 2018).

El NADH se une en la parte superior del dominio hidrofóbico, reduciendo el flavin mononucleótido FMN. El FMN reducido transfiere los electrones a lo largo de los siete centros Fe-S, hasta el sitio de unión de la ubiquinona para reducirla a ubiquinol (QH₂) (Hirst J, 2013; Parey *et al*, 2020). La ubiquinona se une en el dominio membranal y es reducido por un proceso de dos pasos: primero recibe un electrón para formar un intermediario de semiquinona y posteriormente recibe el segundo electrón para formar el QH₂ (Hirst J, 2013; Parey *et al*, 2020; Cabrera-Orefice *et al*, 2018). Se translocan 4 protones hacia el espacio intermembranal, siendo el complejo que mayor contribuye al gradiente electroquímico (Barros MH y McStay GP, 2020).

Complejo II

Complejo II o succinato deshidrogenasa, participa en el ciclo de Krebs catalizando la oxidación del succinato a fumarato. La enzima se compone de 4 subunidades codificadas en el genoma nuclear: dos hidrofóbicas (Sdh3, Sdh4) y dos hidrofílicas (Sdh1 y Sdh2). La subunidad Sdh1 tiene unido covalentemente al FAD (flavín-adenín-dinucleótido), mientras que la subunidad Sdh2 contiene 3 centros Fe-S. Entre las subunidades Sdh3 y Sdh4 se forma el sitio de unión a ubiquinona, y contienen un grupo heme *b* que se desconoce su función. Complejo II oxida el succinato a fumarato, reduciendo el FAD a FADH₂, posteriormente los electrones son transportados por los centros Fe-S al Q para reducirlo y formar QH₂ (Barros MH y McStay GP, 2020). Este complejo respiratorio no contribuye directamente a la generación del potencial transmembranal.

Complejo III

Complejo III es un dímero formado por 10 subunidades diferentes en cada monómero, de las cuales sólo Cytb es codificado en el genoma mitocondrial. Sólo tres subunidades tienen actividad catalítica: Cytb tiene dos grupos hemos *b*, un

hemo de bajo potencial b_L y hemo de alto potencial b_H , y dos sitios de unión a quinona (Q_P y Q_N); citocromo c_1 (Cyt c_1) tiene un hemo tipo c y Rip1 tiene un grupo Fe-S. Su principal función es oxidar a QH_2 , reducir al citocromo c y pasar 4 H^+ hacia el espacio intermembranal (Zara *et al*, 2009; Brzezinski *et al*, 2021).

El complejo III acopla la transferencia de electrones al transporte de protones mediante el ciclo Q. Existe una poza de quinonas donde el Ubiquinol (QH_2) es oxidado y transporta sus electrones por dos vías. Un electrón es transportado en el sitio llamado Q_P al centro Fe-S de Rip1, posteriormente pasa al hemo c del Cyt c_1 y reduce al citocromo c para transportar el electrón al complejo IV; como resultado dos protones se liberan al espacio intermembranal por cada electrón transferido al citocromo c . El segundo electrón es transportado a través del hemo b_H y hemo b_L del Cytb, reduciendo la ubiquinona a semi-quinona (Q^*) en el sitio Q_N (Ndi *et al*, 2018). Después de la oxidación de QH_2 en el sitio Q_P , el producto Q es reemplazado por otro QH_2 , y se repite la transferencia de electrones y protones. La semi-quinona recibe el segundo electrón por la oxidación del segundo QH_2 y toma dos protones de la matriz mitocondrial para formar un nuevo QH_2 en el sitio Q_N . El QH_2 se libera del Q_N y puede unirse al sitio Q_P para repetir el ciclo (Ndi *et al*, 2018; Brzezinski *et al*, 2021).

Complejo IV

El complejo IV se forma por 12 subunidades. Contiene tres subunidades que forman el núcleo catalítico y se codifican en el genoma mitocondrial; Cox1, Cox2 y Cox3 (Franco *et al*, 2020). Cox1 contiene un grupo hemo a y a_3 unido a un ion cobre (Cu) Cu_B (a_3-Cu_B). Cox2 contiene un centro binuclear de Cu_A . Cox3 no tiene cofactores pero participa en la translocación de protones. El electrón es donado por el citocromo c al sitio Cu_A en Cox2; posteriormente es transferido al hemo a y luego al centro a_3-Cu_B de Cox1, en este sitio se une el oxígeno y es reducido a H_2O . Por cada electrón transferido al sitio catalítico se bombea un protón (Brzezinski *et al*, 2021; Franco *et al*, 2020).

ATP sintasa

La ATP sintasa o el complejo F_1-F_0 , se puede encontrar en su forma monomérica o dimérica, su principal función es utilizar el gradiente electroquímico para producir ATP del ADP y fosfato inorgánico (Barros MH y McStay GP, 2020). El complejo se forma por el dominio (hidrofóbico) F_0 o membranal que tiene la actividad de translocar protones y el dominio (hidrofilico) F_1 que cataliza la síntesis de ATP. El F_1 contiene los sitios catalíticos y se conforma de hexámero compuesto de dímeros de subunidades α y β , en cada dímero de α/β es donde se lleva la síntesis de ATP. La membrana interna mitocondrial es impermeable a los protones, por lo que los protones son transportados por la F_0 del espacio intermembranal a la matriz mitocondrial, generando una fuerza protón motriz que utiliza el módulo F_1 para generar el ATP (Barros MH y McStay GP, 2020; Franco *et al*, 2020).

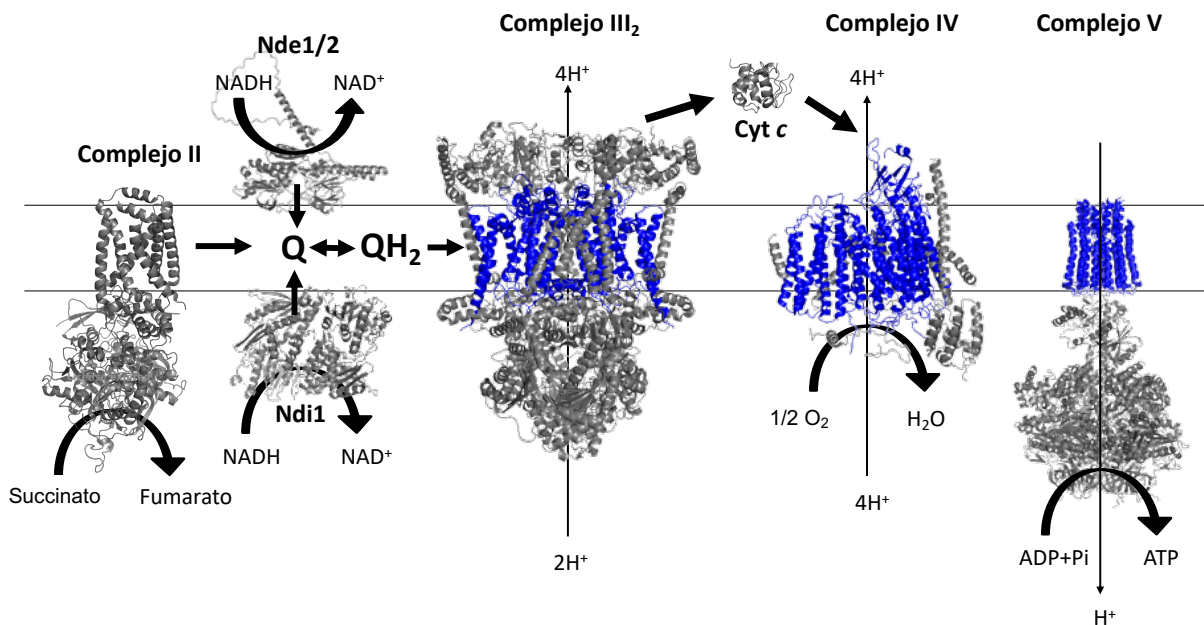


Figura 2. La cadena respiratoria de *S. cerevisiae*. La NADH deshidrogenasa interna (Ndi1 PBD: 4G6G), y las NADH deshidrogenasas externas (Nde1 y Nde2, base de datos de estructuras de proteínas AlphaFold); catalizan la reacción de la ubiquinona (Q) a ubiquinol (QH₂) (Luttik *et al*, 1998).

Complejo II o succinato deshidrogenasa (PBD: 3SFD) participa en el ciclo de Krebs catalizando la reacción del succinato a fumarato y transfiere electrones para formar QH₂. Complejo III o complejo *bc₁* (PBD: 6GIQ modificado) oxida a QH₂ pasando un electrón al citocromo *c* (PBD: 1KYO) mediante el ciclo Q y transfiere 2 protones (H⁺) al espacio intermembranal. El citocromo *c* transfiere un electrón al complejo IV o citocromo *c* oxidasa (PBD: 6GIQ modificado) hasta el Oxígeno (O₂) reduciéndolo para formar H₂O. Complejo IV bombea 2H⁺ al espacio intermembranal para generar el gradiente electroquímico que se utiliza en la síntesis de ATP por el complejo V (PBD: 2XOK) (Modificado de Nelson and Cox, 2005; Sousa *et al*, 2018).

Los complejos respiratorios pueden asociarse en supercomplejos, en levadura los supercomplejos están formados por el dímero del complejo III y uno o dos monómeros del complejo IV (III₂-IV₁, III₂-IV₂) (Stuart, 2008; Brzezinski *et al*, 2021) (Figura 3). La función de los supercomplejos no se conoce, pero se propone que sirven para: hacer más eficiente el flujo de electrones, favorecer la estabilidad de los complejos y evitar la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Sousa *et al*, 2018).

Este trabajo se enfoca en la biogénesis del complejo III₂ (Zara *et al*, 2009).

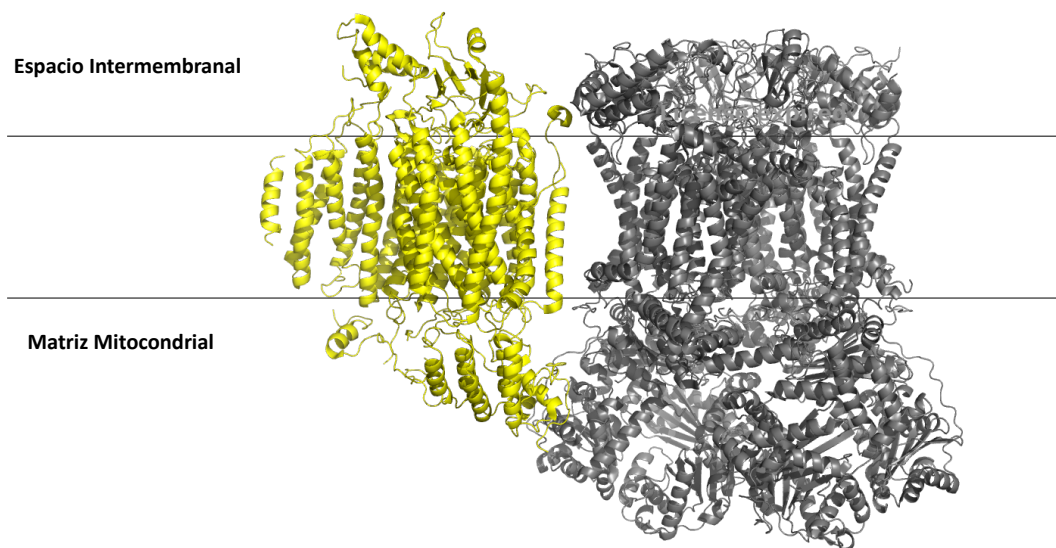


Figura 3. Supercomplejos de *S. cerevisiae*. El supercomplejo está formado por el dímero del complejo III representado en color GRIS y un monómero del complejo IV representado en color AMARILLO (III₂-IV₁) (PBD: 6GIQ, (Rathore *et al*, 2018).

Complejo III o complejo *bc*₁

El complejo *bc*₁ es un dímero obligado (III₂) formado por 10 subunidades diferentes, tres subunidades participan en las reacción catalítica; citocromo *b* (*Cytb*), Citocromo *c*₁ (*Cytc*₁) y Rip1; el resto de las subunidades (7 subunidades) son estructurales: Cor1, Cor2, Qcr6, Qcr7, Qcr8, Qcr9 y Qcr10 y son esenciales para la formación del complejo *bc*₁ (Figura 4) (Zara *et al*, 2009). *Cytb* es la única subunidad del complejo *bc*₁ codificada en el genoma mitocondrial, el resto de la subunidades están codificadas en el genoma nuclear y son importadas hacia la mitocondria (Ndi *et al*, 2018).

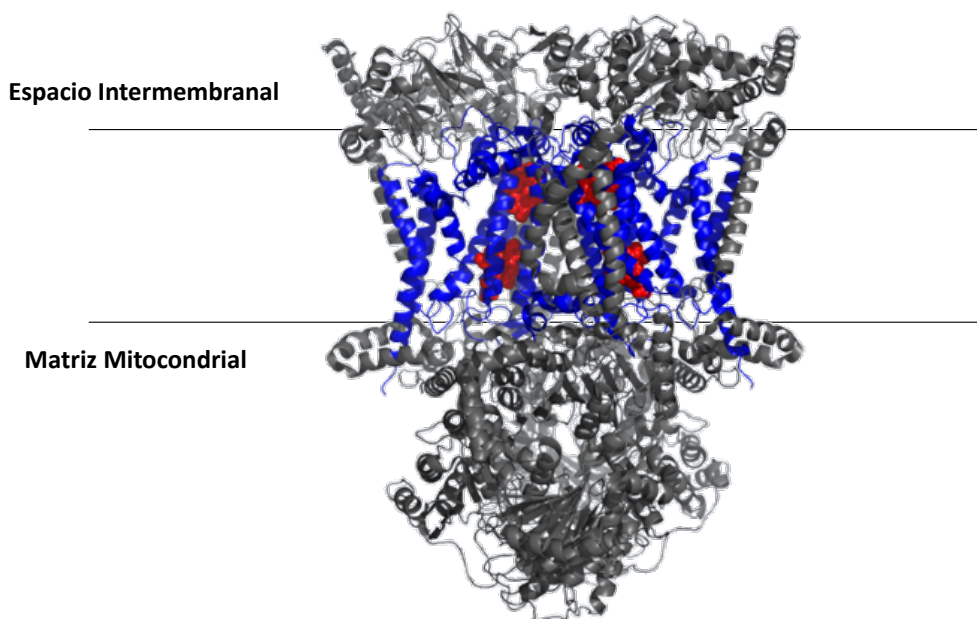


Figura 4. Complejo III (complejo *bc*₁). Se encuentra como dímero obligado (PBD: 1KY0, Lange and Hunte, 2002). Cada monómero está constituido por 10 subunidades, las subunidades del complejo *bc*₁ codificadas en el núcleo están representadas en color gris GRIS, *Cytb* está representada en color AZUL con sus dos grupos hemo tipo *b* en color ROJO.

Este trabajo se centra en la biogénesis del citocromo *b* (*Cytb*) que es la única subunidad del complejo *bc₁* codificada en el genoma mitocondrial y es sintetizada por los ribosomas mitocondriales (Ndi *et al*, 2018).

Citocromo *b* (*Cytb*)

Cytb es una proteína hidrofóbica, formada por 8 alfa hélices transmembranales y contiene dos grupos hemo tipo *b* importantes para su función catalítica (PBD/1KYO, Lange y Hunte, 2002) (Figura 5). Es la primera subunidad del complejo en ensamblarse en la membrana interna mitocondrial (Ndi *et al*, 2018). *Cytb* está formada por 385 aminoácidos y su peso molecular es de 43.6 kDa (Smith *et al*, 2012).

El extremo carboxilo terminal (C-ter) de *Cytb* es una región localizada hacia la matriz mitocondrial y en la estructura cristalográfica se observa que interactúa con el amino terminal de la subunidad Qcr7 (PBD/1KYO, Lange y Hunte, 2002) (Figura 9).

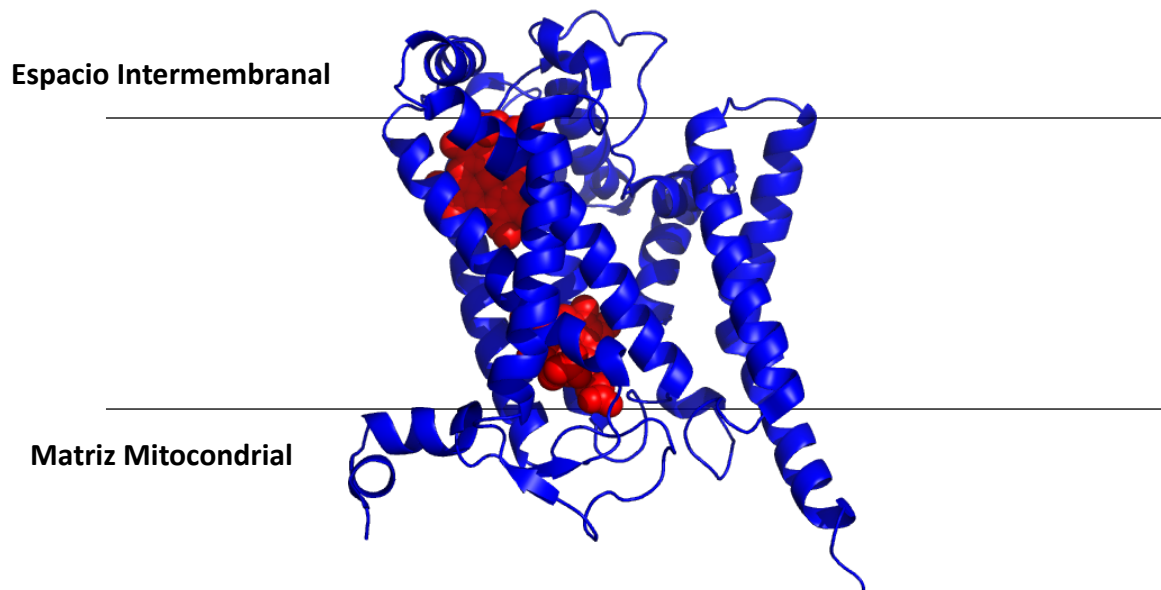


Figura 5. *Cytb*. Está formada por 8 alfa hélices transmembranales, su extremo amino y carboxilo terminal se encuentran hacia la matriz mitocondrial. Sus dos grupos hemo tipo *b* están representados en color ROJO (PBD: 1KYO modificado).

RNA mensajero (mRNA) de *COB*

El mRNA de *COB* se transcribe como un RNA bicistrónico que tiene río arriba el tRNA^{GLU} y posteriormente el mRNA de *COB* (7108pb) (Ndi *et al*, 2018). El mRNA se corta por la RNasa Pet127 (Fekete *et al*, 2008), en la posición -954 río arriba del AUG con ayuda de la proteína llamada Cbp1; para liberar el tRNA^{GLU}. Además, Cbp1 ayuda a la estabilidad del transcrito y promueve la traducción del mRNA de *COB* (Tsuboi *et al*, 2015).

El mRNA de *COB* contiene 6 exones (B1, B2, B3, B4, B5 y B6) y 5 intrones (al1, al2, al3, al4 y al5) que se eliminan por mecanismos de splicing (procesamiento) tipo I y II (Dieckmann y Staples, 1994). Para el procesamiento de algunos intrones se requieren proteínas llamadas madurasas (Dieckmann y Staples, 1994). Las madurasas contienen parte del exón junto con su intrón, forman una proteína que ayuda al procesamiento de su propio intrón. Algunos intrones requieren de otras proteínas codificadas en el núcleo para su procesamiento (Dieckmann y Staples, 1994).

El intrón bl1 (splicing tipo II) y el intrón bl5 (splicing tipo I), son secuencias no codificantes que son cortados por un mecanismo llamado self-splicing (no necesitan proteínas para el corte y empalme de los exones). Los intrones bl2, bl3 y bl4 (splicing tipo I) contienen marcos de lectura que codifican para madurasas que son necesarias para su escisión respectivamente (Dieckmann y Staples, 1994; Tabak *et al*, 1983) (Figura 6).

Los intrones son removidos para generar el mRNA maduro de *COB* con 1158 pb en la región codificante, con sus regiones no codificantes 5'UTR (954 pb) y 3'UTR (109 pb) (Dieckmann y Staples, 1994).

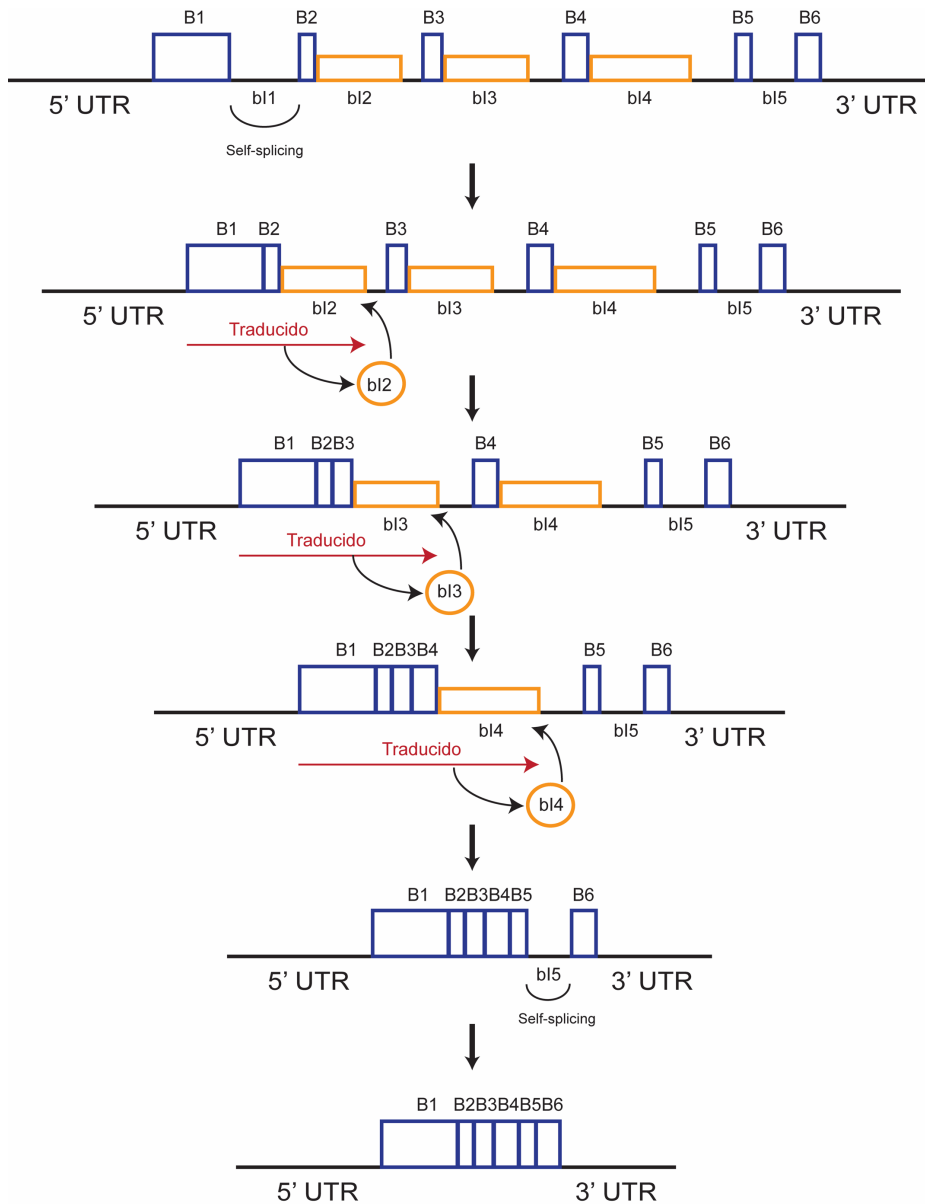


Figura 6. Splicing del mRNA de COB. En mayúsculas y cajas AZULES (B1 a B6) se representa los exones de COB. En minúsculas (b1 a b5) los intrones. Las cajas ANARANJADAS son las regiones intrónicas que codifican para madurasas (bl2, bl3 y bl4). La maduración del mRNA comienza con el procesamiento del intrón b1 y se juntan los exones B1 y B2 en una reacción que no requiere madurasa (self-splicing) (Dieckmann y Staples, 1994). Los exones B1 y B2 se traducen junto con la región que codifica para madurasa en el intrón b2 como una proteína de fusión y forman la madurasa bl2 que es esencial para el procesamiento de su propio intrón (bl2) (Lazowska *et al*, 1980). Este mismo proceso ocurre para los intrones bl3 y bl4 que contienen regiones codificantes para madurasas (Lazowska *et al*, 1989; Weiss-Brummer *et al*, 1982). El intrón b5 se elimina por self-splicing para completar la maduración del mRNA de COB (Dieckmann y Staples, 1994).

Para el procesamiento del mRNA de *COB* se requiere otras proteínas, posiblemente para estabilizar el mRNA y promover estructuras secundarias (Dieckmann y Staples, 1994).

Cuando el mRNA de *COB* está maduro, está listo para su traducción por los mitorribosomas.

Traducción del mRNA de *COB* y ensamblaje de *Cytb*

El inicio de la traducción de los genes codificados en el genoma mitocondrial es un proceso desconocido, porque los mRNAs no tienen secuencia Shine-Dalgarno como en bacterias y no se circularizan como los mRNAs citosólicos para el inicio de la traducción (Ott *et al*, 2016; Dieckmann y Staples, 1994). En levadura existen activadores traduccionales específicos para cada gen mitocondrial, que ayudan a posicionar el ribosoma en el codón de inicio para la síntesis de proteínas.

Para *Cytb* se necesitan dos activadores traduccionales específicos llamados Cbs1 y Cbs2 (Krause-Buchholz *et al*, 2005; Krause-Buchholz *et al*, 2004; Salvatori *et al*, 2020) y de un complejo de chaperonas Cbp3 y Cbp6 (Cbp3-Cbp6) (Gruschke *et al*, 2011). Cbs1 y Cbs2 interactúan con el mitorribosoma y con el extremo 5'UTR el mRNA de *COB*. Recientes estudios sugieren que Cbp3-Cbp6 desplazan a Cbs1 del ribosoma para que ocurra la síntesis de *Cytb* (Salvatori *et al*, 2020).

Cytb recién sintetizado se ensambla en la membrana interna mitocondrial por un proceso acoplado (Ndi *et al*, 2018). Cbp3-Cbp6 interactúan con el recién sintetizado *Cytb* para favorecer la llegada de sus grupos hemo tipo *b*. Además, Cbp3-Cbp6 están involucradas en la regulación de la síntesis de *Cytb* (Gruschke *et al*, 2011; Gruschke *et al*, 2012; Hildenbeutel *et al*, 2014; García-Guerrero *et al*, 2018).

Cbp3-Cbp6 favorecen la síntesis de *Cytb*, posteriormente Cbp3-Cbp6 interactúan con el recién sintetizado *Cytb* para que adquiera su primer grupo hemo *b_L*, esto provoca la llegada de la chaperona llamada Cbp4 y favorece que *Cytb* adquiera su segundo grupo hemo *b_h*. En este momento *Cytb* ya está maduro y libera a Cbp3-Cbp6 para activar la síntesis de *Cytb* (Hildenbeutel *et al*, 2014). *Cytb* maduro

interactúa con las subunidad Qcr7 y Qcr8 para formar un intermediario de ensamblaje que sirve como andamio para que el resto de las subunidades se ensamblen y formen el complejo bc_1 (Gruschke *et al*, 2012; Hildenbeutel *et al*, 2014; Ott *et al*, 2016) (Figura 7).

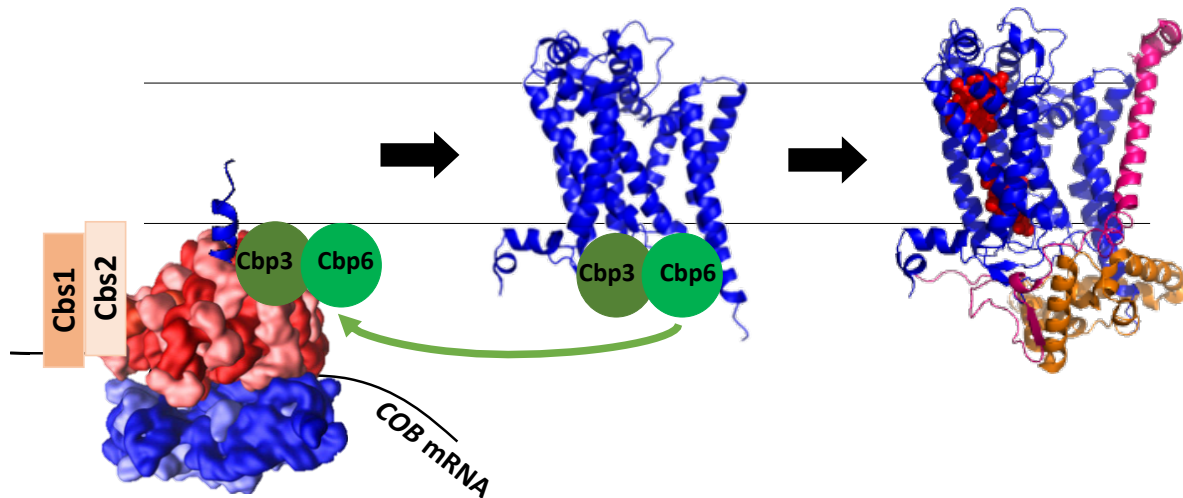


Figura 7. Activación traduccional de *Cytb* y primera etapa de ensamblaje del complejo bc_1 . Activadores traduccionales Cbs1 y Cbs2 y las chaperonas Cbp3-Cbp6 (VERDE) interactúan con el ribosoma para activar la traducción de *Cytb*. Cbp3-Cbp6 interactúa con el recién sintetizado *Cytb* (AZUL) para favorecer el proceso de maduración (hemilación) (hemos tipo *b* en ROJO). Cuando *Cytb* ya está hemilado Cbp3-Cbp6 se liberan para asistir una nueva ronda de traducción. Posteriormente se incorpora la subunidad Qcr7 (ANARANJADO) y Qcr8 (ROSA) para formar uno de los primeros intermediarios de ensamblaje (Ott *et al*, 2016; Gruschke *et al*, 2011; PBD/1KY0 modificado, Lange y Hunte, 2002).

Ensamblaje del complejo bc_1

Para el ensamblaje de complejo bc_1 se sugiere la formación de diferentes intermediarios o módulos de ensamblaje (Smith *et al*, 2012).

El modelo actual propone que *Cytb* interactúa con Cbp3-Cbp6 y forman el intermediario 0; se incorpora la chaperona de ensamblaje Cbp4 y se forma el intermediario I. Cuando *Cytb* ya está hemilado, pierde afinidad por Cbp3-Cbp6, esto

favorece que llegada de las subunidades Qcr7 y Qcr8 para formar el intermediario II (Conte *et al*, 2015; Gruschke *et al*, 2012; Zara *et al*, 2009) (Figura 8). Después se incorporan las subunidades Cor1 y Cor2, se libera Cbp4 y se forma el dímero del pre-complejo bc_1 llamado intermediario III (Stephan y Ott, 2020). Posteriormente se agregan las subunidades Citocromo c_1 y Qcr6 formando el intermediario IV de aproximadamente 500 kDa (Conte *et al*, 2015; Gruschke *et al*, 2012; Zara *et al*, 2009; Stephan y Ott, 2020). Finalmente se incorporan las subunidades Rip1, Qcr9 y Qcr10 para formar el complejo bc_1 de 750 kDa (Conte *et al*, 2015; Gruschke *et al*, 2012; Zara *et al*, 2009).

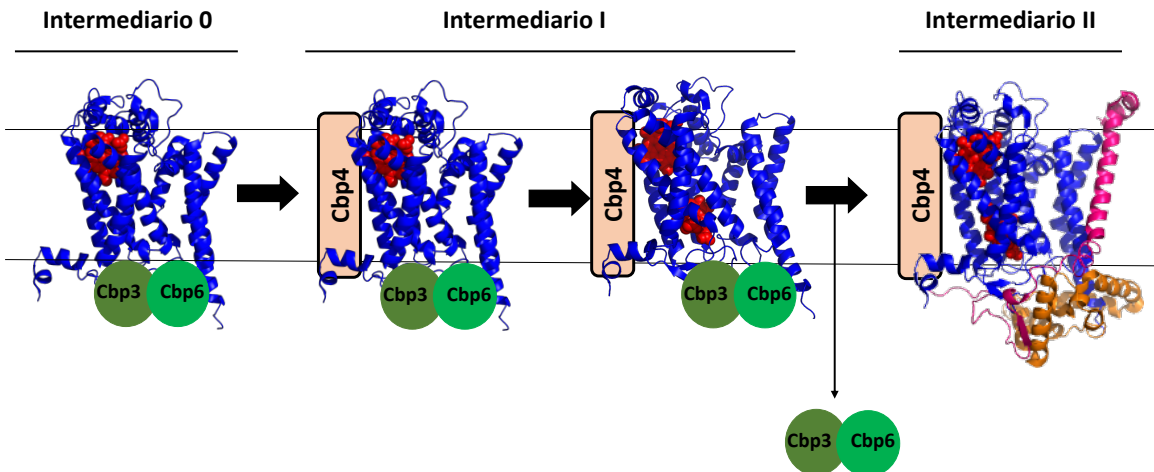


Figura 8. Ensamblaje del complejo bc_1 . Se forma el intermediario de ensamblaje 0 donde se encuentra Cytb (AZUL) con Cbp3-Cbp6 (VERDE) y Cytb adquiere su primer grupo hemo b_L (ROJO). Se incorpora Cbp4 (SALMON) y Cytb adquiere su segundo grupo hemo b_h (ROJO) y forma el intermediario I. Cytb pierde afinidad por Cbp3-Cbp6 y se incorporan las subunidades Qcr7 (ANARANJADO) y Qcr8 (ROSA) para formar el intermediario II (Conte *et al*, 2015; Gruschke *et al*, 2012; Zara *et al*, 2009; PBD/1KYO modificado, Lange y Hunte, 2002).

Para el ensamblaje del complejo bc_1 , se requieren de algunos factores como: Cbp4 que ayuda a estabilizar a Cytb y favorece su hemilación (Hildenbeutel *et al*, 2014); Bcs1 y Mzm1 están involucradas en la maduración y ensamblaje de Rip1 (Conte *et*

al, 2015). Bca1 ayuda al ensamblaje del complejo *bc₁* (Mathieu *et al*, 2011) y posiblemente existen más factores involucrados en el ensamblaje del complejo *bc₁*.

Cbp3 y Cbp6

Cbp3 y Cbp6 son proteínas de 35 kDa y 18 kDa codificadas en el genoma nuclear, e interactúan entre ellas (Cbp3-Cbp6) para cumplir su función en la biogénesis del complejo *bc₁* (Gruschke *et al*, 2011). Se han encontrado en diferentes organismos que tienen a *Cytb*, por lo tanto su función podría estar conservada (Hildenbeutel *et al*, 2014, Ndi *et al*, 2019).

Son chaperonas requeridas para activar la traducción de *Cytb* y se unen a Mrpl4 una proteína del túnel de salida ribosomal (Gruschke *et al*, 2011). Interactúan con el mRNA de *COB* para activar su traducción (García-Guerrero *et al*, 2018). Posteriormente interactúan con el recién sintetizado *Cytb* para favorecer su liberación del ribosoma y protegerlo de la degradación (Gruschke *et al*, 2011). La principal función de Cbp3-Cbp6 es favorecer el proceso de hemilación de *Cytb* por un mecanismo desconocido (García-Guerrero *et al*, 2018). Además, funcionan como sensores para modular la traducción de *Cytb* con el ensamblaje del complejo *bc₁* (Hildenbeutel *et al*, 2014; Gruschke *et al*, 2012).

Recientemente se obtuvo la estructura del extremo C-ter de Cbp3 por Cryo-EM de la bacteria *Brucella abortus*, este C-ter está muy conservado y sirvió para generar un modelo estructural de Cbp3 en levadura. El grupo del Dr. Martin Ott mediante una técnica llamada entrecruzamiento fotoreactivo encontró algunos aminoácidos específicos de Cbp3 que interactúan con Cbp6 y *Cytb* (Ndi *et al*, 2019).

El extremo C-ter de *Cytb*

En el modelo cristalográfico del complejo *bc₁* se observa que el extremo C-ter de *Cytb* es una región soluble que se localiza hacia la matriz mitocondrial, e interactúa

con el N-ter de la subunidad Qcr7 (PBD/1KYO modificado, Lange y Hunte, 2002) (Figura 9). Curiosamente los últimos aminoácidos en la posición -13 y -12 del extremo C-ter están conservados, sin embargo los últimos 8 aminoácidos no están conservados (Figura 12). Pensamos que el extremo C-ter de Cytb podría ser esencial para la biogénesis del complejo bc_1 .

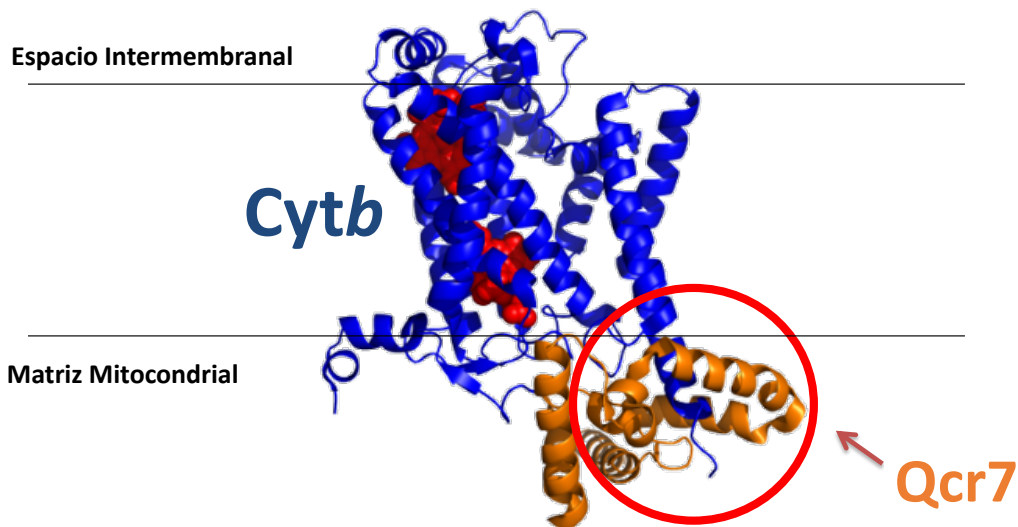


Figura 9. El extremo C-ter de Cytb interactúa con el N-ter de Qcr7 (7). En la estructura cristalográfica se observa que el extremo carboxilo terminal de Cytb AZUL interactúa con el N-ter de la subunidad Qcr7 ANARANJADO representada dentro del círculo ROJO (PBD/1KYO modificado, Lange y Hunte, 2002).

Qcr7 una proteína de 14 kDa codificada en el genoma nuclear (Lee *et al*, 2001). En el modelo cristalográfico (PBD/1KYO, Lange y Hunte, 2002) se observa que Qcr7 interactúa con Cyt c_1 , Cor1 y con el extremo carboxilo terminal de Cytb.

Algunos aminoácidos del N-ter de Qcr7 interactúan con Cytb para favorecer el ensamblaje del complejo bc_1 (Smith *et al*, 2012; Kronekova and Rödel, 2005). Los aminoácidos del 8 al 13 del extremo N-terminal de Qcr7 interactúan con el extremo C-ter de Cytb por interacciones débiles como: fuerzas de van Der-Waals,

interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno (Young Lee *et al*, 2001) (Figura 9).

Regulación de la síntesis de *Cytb*

Al eliminar las subunidades Qcr7 o Qcr8 del ensamblaje temprano, o al afectar el proceso de hemilación; se regula la síntesis de *Cytb* inhibiéndola (Gruschke *et al*, 2012; Hildenbeutel *et al*, 2014). Cbp3-Cbp6 se quedan secuestradas en el intermediario 0 o I junto con *Cytb*, impidiendo que Cbp3-Cbp6 permanezcan libres para activar nuevas rondas de síntesis de *Cytb* (Hildenbeutel *et al*, 2014) (Figura 10).

Reportes previos indican que Cbp3-Cbp6 son los encargados de regular la síntesis de *Cytb* (Gruschke *et al*, 2012; Hildenbeutel *et al*, 2014). Sin embargo, se propone la existencia de dos factores desconocidos (X y Y) y en conjunto con Cbp3-Cbp6 reprimen la síntesis de *Cytb*, como mecanismo de regulación (García-Guerrero *et al*, 2018).

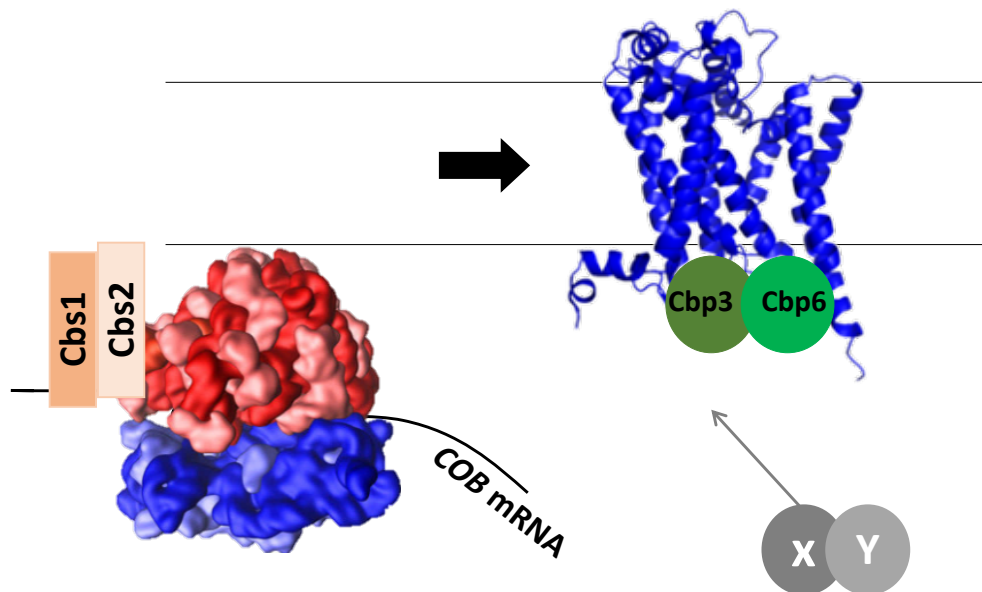


Figura 10. Modelo de la regulación de la síntesis de *Cytb*. Al afectar el proceso de ensamblaje o hemilación de *Cytb*, Cbp3-Cbp6 (VERDE) se quedan secuestradas junto con *Cytb* (AZUL), impidiendo que se activen nuevas rondas de traducción de *Cytb* como mecanismo de regulación. Se propone que existen dos factores desconocidos (X y Y) involucrados en este mecanismo.

Justificación

En la estructura cristalográfica del complejo bc_1 el extremo C-ter de *Cytb* interactúa con el N-ter de Qcr7. Pensamos que el extremo C-ter de *Cytb* podría ser el sitio donde interactúan Cbp3-Cbp6 para favorecer el ensamblaje y hemilación de *Cytb*. Porque cuando Cbp3-Cbp6 son liberados se ensambla la subunidad Qcr7, posiblemente ocupando el mismo sitio que podría ser el extremo C-ter de *Cytb*. Creemos que el extremo C-ter de *Cytb* es necesario para la hemilación de *Cytb* y el ensamblaje del complejo bc_1 , porque interactúa con el N-ter de Qcr7 (Figura 11).

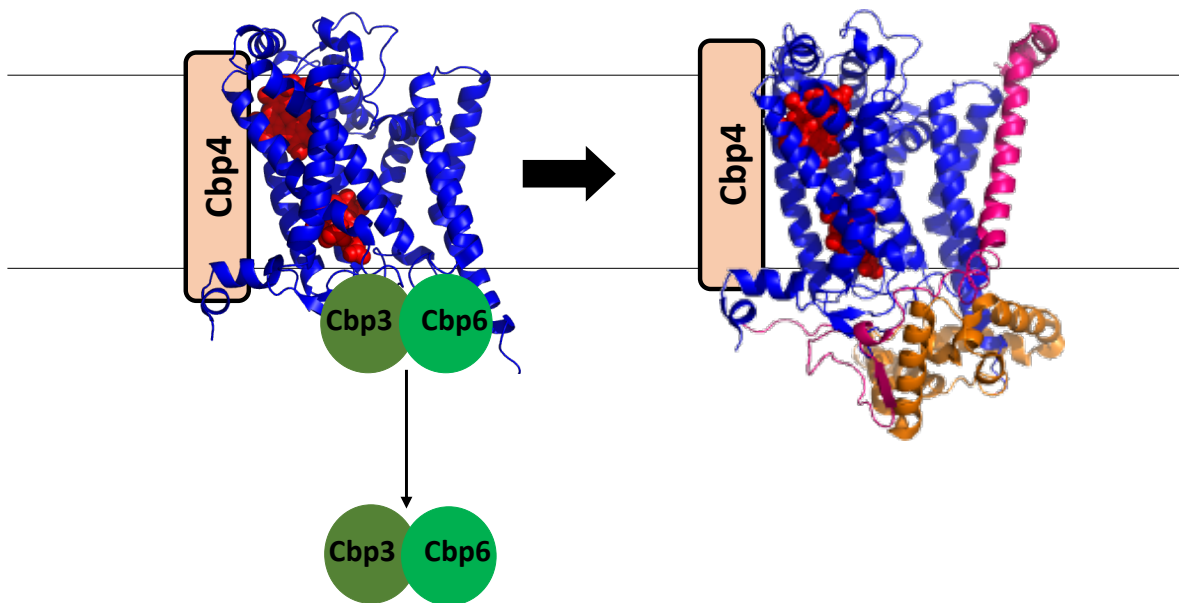


Figura 11. Funciones del extremo C-ter de *Cytb*. El extremo C-ter de *Cytb* (AZUL) sería el sitio donde interactúan Cbp3-Cbp6 (VERDE) para favorecer el ensamblaje y la hemilación de *Cytb* (hemo b en ROJO). Cuando *Cytb* está maduro (hemilado), Cbp3-Cbp6 salen para activar nuevas de rondas

de traducción y el extremo C-ter podría estar libre para que se ensamble la subunidad Qcr7 (NARANJA).

En mi trabajo de maestría generé dos mutantes eliminando 13 y 8 aminoácidos del extremo C-ter de *Cytb* (*Cytb* Δ *C13* y *Cytb* Δ *C8*), mediante biobalística en el genoma mitocondrial. Eliminamos 13 porque los aminoácidos en la posición -13, -12 del extremo C-ter están conservados y los últimos 8 aminoácidos no lo están (Figura 12). Al eliminar 13 y/u 8 aminoácidos de *Cytb* las células pierden la capacidad de crecer en un medio respiratorio, indicándonos que el extremo C-ter de *Cytb* es esencial para la biogénesis del complejo *bc*₁ (Figura 13). Sin embargo, no se afecta la síntesis de *Cytb* y la proteína es parcialmente estable en las mutantes del extremo C-ter (Figura 14, 15).

El extremo C-ter de *Cytb* regula su propia síntesis, porque al eliminarlo la síntesis de *Cytb* se hace constitutiva (Figura 22A). Pensamos que en las mutantes del C-ter (*Cytb* Δ *C13* y *Cytb* Δ *C8*), Cbp3-Cbp6 no interactúan con *Cytb* y estarían libres activando constitutivamente la síntesis de *Cytb*.

Analizamos por inmunodetección algunas subunidades del complejo *bc*₁ (*Cytb*, *Cit c*₁, *Cor1* y *Rip1*), observamos que los niveles basales de *Cytb* y *Rip1* bajan en las mutantes del extremo C-ter (Figura 17). Esto indica que en las mutantes existen problemas con el ensamblaje del complejo *bc*₁. Pensamos que al eliminar el extremo C-ter, se podrían formar algunos intermediarios, pero no se llega a formar el complejo *bc*₁ y de los supercomplejos; por eso se pierde la capacidad respiratoria de las células. O quizás sólo se ensamblan algunas subunidades de las primeras etapas que le confieren cierta estabilidad a *Cytb*.

Proponemos que el extremo C-ter de *Cytb* es un sitio esencial para su interacción con Cbp3-Cbp6 para inducir la hemilación y regular de la síntesis de *Cytb*. En posiciones específicas de Cbp3 se integró un aminoácido modificado, para identificar aminoácidos de Cbp3 que interactúan con *Cytb* y Cbp6 (Ndi *et al*, 2019).

Creemos que alguno de estos aminoácidos identificados interactúa con algún aminoácido del extremo C-ter de *Cytb*.

Hipótesis

- El extremo C-ter de *Cytb* interactúa directamente con Cbp3-Cbp6, para inducir la hemilación y regula la síntesis de *Cytb* y por lo tanto la unión a Cbp3-Cbp6. Además, el C-ter interactúa con Qcr7 formando los primeros intermediarios de ensamblaje del complejo *bc₁*.

Objetivo general

- Comprobar que el extremo C-ter de *Cytb* interactúa directamente con Cbp3-Cbp6, y esta interacción induce la hemilación de *Cytb* y regula la síntesis de *Cytb*. Analizar la formación de los primeros intermediarios de ensamblaje, del complejo *bc₁*.

Objetivos particulares

1. Analizar la interacción entre Cbp3 y *Cytb*.
 - Realizar ensayos de co-inmunoprecipitación de Cbp3 en las mutantes del C-ter (*Cytb* Δ C13 y *Cytb* Δ C8).
2. Determinar la influencia de la mutación del C-ter de *Cytb* en la formación de los supercomplejos y del complejo *bc₁*.
 - Hacer ensayos de BN-PAGE lisando con digitonina y dodecil-maltosido en las mutantes del C-ter (*Cytb* Δ C13 y *Cytb* Δ C8), posteriormente analizar mediante inmunodetección a *Cytb*, Cor1 y Rip1.
3. Determinar si la mutación en el C-ter de *Cytb* influye en la formación de intermediarios de ensamblaje y en la cantidad de Cbp3 libre.

- Elaborar ensayos de segunda dimensión BN/SDS-PAGE, posteriormente inmunodetección contra *Cytb*, *Cbp3* y *Cox1* en la mutante *CytbΔC13*.
 - Realizar un perfil complexómico de la mutante del C-ter de *Cytb* (*CytbΔC13*).
4. Determinar el efecto de la mutación en el carboxilo terminal de *Cytb* en la hemilación.
 - Analizar la cantidad de hemo *b* por HPLC en la mutante *CytbΔC13*.
 - Analizar los hemos *a*, *b* y *c* en la mutante *CytbΔC13* mediante espectrometría.
 5. Evaluar los aminoácidos de *Cbp3* que interactúan con el C-ter de *Cytb*.
 - Analizar la interacción de los aminoácidos de *Cbp3* que interactúan con *Cytb* mediante entrecruzamiento fotoreactivo en la mutante *CytbΔC13*.

Materiales y métodos

Las cepas que se utilizaron de *S. cerevisiae* y los plásmidos, se encuentran descritos en el apéndice 1A. Las cepas carentes de los 13 y 8 aminoácidos del extremo C-ter (*CytbΔC13* y *CytbΔC8*), las mutantes *Δcbp3*, *Δqcr7*, *Δcbs1*, *Δcbp6*, están descritas en Flores Mireles D. Tesis de maestría (2018, no publicada) y en el apéndice 1A.

Los medios para cultivos de levaduras y bacterias utilizados se encuentran descritos en el apéndice 2A.

Diluciones seriadas

1. Se cultivaron 2 ml de YPD de cada cepa a 30°C, toda la noche con agitación constante.
2. Al día siguiente se pesó los microtubos (1.5 ml) en balanza analítica.
3. Se centrifugó 1 ml de cada cultivo a 13200 x g por 1 min y se eliminó todo el sobrenadante.
4. Se pesó nuevamente los microtubos y se obtuvo el peso del botón celular.

5. Se resuspendió el botón con H₂O estéril y se llevó a una concentración de 0.02 g ww/ml.
6. En una micro placa de 96 pozos estéril, se colocó 135 µl de H₂O estéril en los pozos (B1, B2, B3... C1, C2, C3...) con pipeta multicanal hasta la columna número 6.
7. En el primer pozo de cada fila se colocó 150 µl de cada cepa a analizar.
8. Con la pipeta multicanal, se tomó 15 µl del pozo de la primera fila y se transfirió al siguiente pozo (A2, B2, C2...) (subir y bajar para homogenizar). Se repitió hasta la columna 6 (A3, B3, C3...) (A4, B4, C4...) etc.
9. Se esterilizó el replicador sumergiéndolo en etanol en una caja Petri de vidrio. Se colocó en la flama de un mechero y se dejó enfriar.
10. Se sumergió cuidadosamente el replicador en los pozos de la placa.
11. Se imprimió en cajas de YPD, YPEG y medios de selección para auxotrofías.
12. Se incubaron las cajas a diferentes temperaturas: 25, 30 y 37 °C.

Se monitorearon durante 5 días, se tomaron fotos del crecimiento cada día.

Ensayo de traducción mitocondrial *In vivo* (Colby *et al*, 1998)

Se evaluó la síntesis de proteínas mitocondriales en las mutantes del extremo C-ter (*Cytb*ΔC13 y *Cytb*ΔC8), marcando radioactivamente con ³⁵S-metionina mediante un ensayo de traducción *in vivo*.

1. Se cultivó una colonia en 2 ml de YPGal a 30°C por 2 noches, con agitación contante.
2. Se diluyó 1 ml de las cepas *Pet*⁻ y 0.5 ml de las cepas *Pet*⁺ en 10 ml de YPGal. Se cultivaron a 30°C por 3 hrs en agitación constante.
3. Se leyó la DO a 600 nm.
4. Se centrifugó 7.5 (para las cepas *Pet*⁺) y 10 ml (para las cepas *Pet*⁻) a 3000 x g durante 5 min a temperatura ambiente.
5. Se pesó el botón celular y se lavó 2 veces con H₂O estéril.

6. Se resuspendió en 500 µl de medio Gal/-met, se incubó 30 min a 30°C con agitación constante.
7. Se agregó 5 µl de cicloheximida (10 mg/ml, disuelto en etanol), se incubó 5 min a 30°C con agitación constante.
8. Se agregó 7 µCi de ³⁵S-metionina, se incubó 15 min a 30°C con agitación constante.
9. Se puso a enfriar en hielo/agua durante 5 min.
10. Se centrifugó a 13200 x g a 4°C por 1 min y se eliminó el sobrenadante.
11. Se lavó el botón celular con 200 µl de SHP frío con inhibidor de proteasas (Sigma 3.3 µL/10 ml, se preparó en el momento).
12. Se centrifugó a 13200 x g a 4°C por 1 min y se eliminó el sobrenadante.
13. Se resuspendió el botón con 200 µl de SHP frío.
14. Se agregó 1 volumen de perlas de vidrio previamente enfriadas a -20°C.
15. Se mezcló en vórtex 30 segundos a velocidad máxima, se incubó 30 segundos en hielo (repetir este paso 3 veces).
16. Se centrifugó a 600 x g a 4°C por 5 min y se recuperó el sobrenadante en un microtubo previamente enfriado en hielo.
17. Se agregó 200 µl de SHP frío a las perlas y se repitió el ciclo vórtex/hielo (repetir este paso 3 veces).
18. Se centrifugó a 600 x g a 4°C por 5 min. Se recuperó el sobrenadante y se combinaron.
19. Se centrifugó a 13200 x g a 4°C durante 12 min y se eliminó el sobrenadante.
20. Se agregó 40 µl de amortiguador Laemmli 1X (5% β-mercaptoetanol).
21. Se tomó 5 µl de cada muestra y se agregó 15 µl amortiguador Laemmli 1X (5% β-mercaptoetanol). Se calentaron a 65°C durante 5 min. El resto se guardó a -70 °C.
22. Se separaron las proteínas mitocondriales por SDS-PAGE al 16% (gel grande).
23. Se transfirieron a una membrana (PVDF o nitrocelulosa), se expusieron a autorradiografía toda la noche.
24. Se escanearon en el equipo Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare).

Amortiguador SHP

HEPES pH 7.4 20 mM

Sorbitol 0.6 M

Inhibidor de proteasas sigma (3.3 µL/10 mL preparado en el momento)

Geles SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

Para separar las proteínas totales y mitocondriales se utilizó el sistema de geles de poliacrilamida desnaturizante SDS-PAGE.

Componentes	Gel separador 12%	Gel apilador 4%
Acrilamida 30% Bisacrilamida 0.8%	3 ml	488 µl
Tris 2M pH 8.8	1.4 ml	-
Tris 2M pH 6.8	-	234 µl
SDS 20%	75 µl	19 µl
H₂O	3 ml	3 ml
APS 10%	38 µl	38 µl
TEMED	3.8 µl	3.8 µl

Tabla 1. Preparación de geles SDS-PAGE (Laemmli) (Gel chico)

Componentes	Gel separador 16%	Gel apilador 4%
Acrilamida 30% Bisacrilamida 0.3%	9 ml	830 µl
Tris 2M pH 8.8	3.28 ml	-
Tris 2M pH 6.8	-	150 µl
SDS 20%	83.5 µl	25 µl
H₂O	4.5 ml	4 ml
APS 10%	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	5 µl

Tabla 2. Preparación de geles SDS-PAGE para ivTL (Laemmli) (Gel grande)

La separación electroforética se llevó a cabo:

- Para geles chicos se corrieron a 100V.
- Para geles grandes se corrieron a 28mA hasta el separador, posteriormente se subió a 30 mA.

Amortiguador de corrida 5X

Tris-HCl pH 8.3: 0.125 M

Glicina: 1.25 M

SDS: 0.5

Amortiguador de carga 2X (Amortiguador de Laemmli)

Tris-HCl pH 6.8: 100 mM

Glicerol: 20 %

SDS: 4 %

Azul de bromofenol: 0.2 %

β -mercaptoetanol: 5 % (agregado al momento de utilizar)

Obtención de la fracción mitocondrial cruda (método clásico modificado de Diekert *et al*, 2001)

Para conocer los niveles basales de *Cytb* en las mutantes del extremo C-ter (*Cytb Δ C13* y *Cytb Δ C8*), se obtuvo la fracción mitocondrial cruda de cada cepa por el método clásico y por el método modificado por Daniel Flores-Mireles (2022). Se cuantificó la proteína mitocondrial mediante el método de Lowry modificado, posteriormente se separaron las proteínas por SDS-PAGE del 12%, se transfirió a una membrana de PVDF y se realizó la inmunodetección.

1. Se cultivó una colonia de levadura en 2 ml de medio YPGal toda la noche a 30°C con agitación constante.

2. Se resembró los 2 ml en 25 ml del mismo medio y se incubó a 30°C toda la noche con agitación constante.
3. Del cultivo anterior se resembró en 1 L del mismo medio y se incubó toda la noche a 30°C hasta una DO en fase exponencial de crecimiento.
4. Se centrifugó a 2800 x g por 5 min a 4°C.
5. Se lavó el botón con H₂O fría, se juntó todo el botón en un tubo de centrifuga previamente pesado.
6. Se centrifugó a 2800 x g por 5 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se pesó.
7. Se resuspendió el botón en amortiguador TD (2 ml/g de peso húmedo).
8. Se agitó 10 min a 30°C.
9. Se centrifugó 5 min a 2000 x g a 4°C.
10. Se lavó el botón con amortiguador MP (7 ml/g de peso húmedo).
11. Se centrifugó 5 min a 2000 x g a 4°C.
12. Se resuspendió el botón en amortiguador MPZ (7 m/g peso húmedo), adicionar zimoliasa-20T (3 mg/g peso húmedo).

Se agitó de 30 a 60 min a 30°C, hasta que los esferoplastos se formaron (revisar la formación de esferoplastos a los 30, 45 y 60 min). Para revisar la formación de esferoplastos:

Se compararon 2 ml de H₂O contra 2 ml de sorbitol 1.2 M, se adicionaron a cada uno 50 µL de células, se agitó en vórtex. Cuando se formaron los esferoplastos el tubo con agua se vio claro comparado con el tubo con sorbitol el cual se vio turbio, esto es debido a que la diferencia de osmolaridad rompió a los esferoplastos.

A partir de este punto todo se realizó a 4°C

13. Se centrifugó a 1100 x g por 5 min a 4°C.
14. Se resuspendió el botón con el amortiguador DOUNCE (50 ml por cepa).
15. Se homogenizaron 10 veces usando un homogenizador y pistilo de vidrio (Estrecho).
16. Se centrifugó 5 min a 2000 x g a 4°C. Se recuperó el sobrenadante.

17. Se centrifugó 5 min a 2000 x g a 4°C. Se recuperó el sobrenadante.
18. Se centrifugó 12 min a 17400 x g a 4°C. Se desechó el sobrenadante (en el botón se encontraron las mitocondrias crudas).
19. Se resuspendió suavemente el botón en 2 ml de amortiguador SEH (punta de la micropipeta cortada), después se resuspendió el botón completamente y se agregó 8 ml de amortiguador SEH.
20. Se centrifugó 12 min a 17400 x g a 4°C. Se desechó el sobrenadante.
21. Para mitocondrias aisladas. Se agregó 200-300 µl de SEH, se alicuotaron y se congelaron en N₂ líquido. Se guardaron a -70°C en alícuotas de 20 µl.
22. Se cuantificó la proteína por el método de Lowry modificado.

Purificación de mitocondrias crudas en gradiente de Nicodenz

1. Se prepararon 10 ml de cada una de las siguientes soluciones de Nicodenz en amortiguador SEH 2X.

25% = 5 ml de Nicodenz 50% (w/v) + 5 ml de SEH 2X.

20% = 4 ml de Nicodenz al 50% (w/v) + 5 ml de SEH 2X + 1 ml de dH₂O.

15% = 3 ml de Nicodenz al 50% (w/v) + 5 ml de SEH 2X + 2 ml de dH₂O.

10% = 2 ml de Nicodenz al 50% (w/v) + 5 ml de SEH 2X + 3 ml de dH₂O.

5% = 1 ml de Nicodenz al 50% (w/v) + 5 ml de SEH 2X + 4 ml de dH₂O.

2. Se prepararon dos gradientes por cultivo (1 L de cultivo), se colocaron 2 ml de cada una de las soluciones de Nicodenz en el siguiente orden: 25, 20, 15, 10 y 5% (se utilizó punta para micropipeta cortada en el extremo).
3. Se colocaron 0.5 ml del extracto crudo de mitocondrias en cada gradiente (usar punta cortada).
4. Se centrifugó a 10000 x g por 39 min en un rotor SW40Ti (Beckman). Al finalizar la centrifugación se observaron cuatro bandas.
5. Se removieron las bandas de mitocondrias y mitoplastos con una aguja y jeringa. Se colocaron en tubos diferentes.

6. Se diluyeron las mitocondrias y los mitoplastos en 25 ml de amortiguador SEH.
7. Se centrifugaron 10 min a 17400 x g a 4°C.
8. Para eliminar completamente el Nicodenz, se resuspendió el botón en 20 ml de SEH.
9. Se centrifugó 10 min a 17400 x g a 4°C.
10. Se resuspendió el botón en 250 µl de amortiguador SEH, con punta para micropipeta cortada en el extremo.
11. Se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -70°C en alícuotas de 20 µl.
12. Se cuantificaron por método de Lowry modificado.

Amortiguadores para la purificación de mitocondrias

Amortiguador TD (Tris-DTT)

Tris-SO₄ pH 9.4: 0.1 M

DTT: 10 mM

Amortiguador MPZ

Sorbitol: 1.2 M

Amortiguador de fosfatos (KH₂PO₄/K₂HPO₄) pH 7.4: 20 mM

Zimoliasa 20T (Accurate Chemical and Scientific Corporation): 3 mg/g peso húmedo

Amortiguador de homogeneización (Dounce)

Tris pH 7.4: 10 mM

EDTA pH 8.0: 1 mM

BSA: 0.2% p/v

TLCK: 50 µg/ml

Sorbitol: 0.6 M o 1.2 M (para purificación de mitocondrias)

PMSF (se preparó al momento en etanol) : 1 mM

Amortiguador SEH

HEPES: 20 mM

Sorbitol: 0.6 M o 1.2 M (para purificación de mitocondrias)

EDTA pH 8.0: 1 mM

Método rápido de extracción de mitocondrias (modificado por Flores-Mireles, 2022; basado en Diekert *et al*, 2001)

Se desarrolló un método de extracción de mitocondrias rápido para facilitar la inmunodetección al tener múltiples cepas para analizar.

1. Se cultivar 5 ml en YPGal de cada cepa, dos noches a 30°C con agitación constante.
2. Se leyó la DO a 600 nm y se tomó el equivalente a 10 DO. Se centrifugó a 13200 x g por 5 min y se eliminó todo el sobrenadante.
3. Se lavó con 1 ml de H₂O. Se centrifugó a 13200 x g por 1 min y se eliminó todo el sobrenadante.
4. Se agregaron 2 ml de amortiguador MPZ. Se incubaron 1 hora a 30°C en agitación constante.
5. Se centrifugó a 2000 x g por 5 min a 4°C. Se eliminó todo el sobrenadante.
6. Se resuspendió el botón en 300 µl de SHP frío.
7. Se agregó 1 volumen de perlas de vidrio (Thomas scientific cat. 5663R50) previamente enfriadas a -20°C.
8. Se mezcló en vórtex 30 segundos a velocidad máxima y se incubó en hielo 30 segundos (repetir 3 veces).
9. Se centrifugó a 600 g por 5 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante en un microtubo previamente enfriado.

10. Se agregó 300 µl de SHP frío a las perlas y se repitió el ciclo vórtex/hielo (repetir 3 veces).
11. Se centrifugó los microtubos con perlas de vidrio a 600 x g por 5 min a 4°C. Se recuperó y se combinó los sobrenadantes.
12. Se centrifugó a 13200 x g por 12 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante.
13. Se resuspendió en 100 µl de SHP y se cuantificaron por el método de Lowry modificado.
14. Las muestras se pueden guardarse a -20 °C.
15. Se tomó de 50 a 100 µg de proteína mitocondrial. Se centrifugó a 13200 x g por 5 min y se eliminó todo el sobrenadante.
16. Se resuspendió el botón con 15 µl amortiguador Laemmli 1X (5% β-mercaptoetanol).
17. Se calentaron a 65°C durante 5 min.
18. Se separaron las proteínas mitocondriales por SDS-PAGE al 12%.
19. Se transfirieron a una membrana de PVDF o nitrocelulosa.

Amortiguador SHP

HEPES pH 7.4 20mM

Sorbitol 0.6M

Inhibidor de proteasas sigma (3.3 µL/10 mL se prepara al momento)

Cuantificación de proteínas por método de Lowry (Markwell *et al*, 1978)

Curva de calibración: se utilizó una solución de albúmina a 1 mg/ml

1. Se tomó en tubos de ensaye 0, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 µl de la solución de albúmina.
2. Para cada muestra se tomó 10 µl de las mitocondrias y 90 µl de H₂O, de esta dilución se colocaron 10, 20 y 40 µl en otros tubos.
3. Se agregó a cada tubo H₂O hasta llevar a un volumen de 1 ml.

4. Se agregó 3 ml de Solución C, se mezcló con vórtex. Se incubó 10 min a temperatura ambiente.
5. Se agregó 300 μ l de Solución D, se mezcló con vórtex. Se incubó 30 min a temperatura ambiente.
6. Se midió la absorbancia a 740nm

Solución A

Na₃CO₃: 2% (p/v)

NaOH: 0.4% (p/v)

Na₂tartrato: 0.16% (p/v)

SDS: 1% (p/v)

Solución B

Cu₂SO₄·5H₂O: 4% (p/v)

Solución C

Solución A / Solución B: 100/1

Solución D

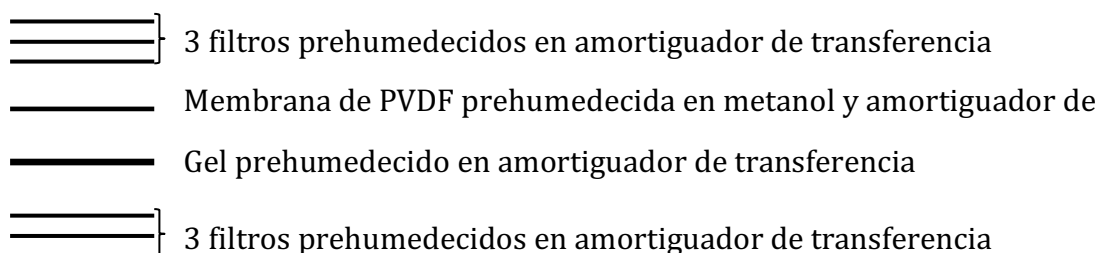
Reactivo de Folin / H₂O: 1/1

Western blot (inmunodetección)

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore), mediante el método semi-seco usando la cámara de electrotransferencia de FisherBiotech y se realizó la inmunodetección usando los anticuerpos que se indican en la Tabla 3 con el siguiente protocolo:

Protocolo de transferencia con el método semi-seco a una membrana de PVDF y inmunodetección.

1. Se colocaron 3 filtros pre humedecidos en amortiguador de transferencia, se colocó el gel pre humedecido en amortiguador de transferencia, posteriormente se colocó la membrana de PVDF pre humedecido en etanol y amortiguador de transferencia, y al final se colocaron 3 filtros pre humedecidos en amortiguador de transferencia.



2. Se transfiere durante 1.5 horas a 1.5 mA/cm^2 , cuidando que no exceda los 10 V.
3. Se secó la membrana con metanol al 100% por 10 segundos y se dejó sobre un papel por 10 min.
4. Se mojó completamente la membrana en amortiguador de lavado.
5. Se bloqueó la membrana con solución de bloqueo toda la noche a 4°C o 1 hora a temperatura ambiente.
6. Se incubó la membrana con la solución de blot, la cual contiene al anticuerpo primario (Tabla 3) durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C .
7. Se lavó la membrana con solución de lavado por 10 min (se repitió
8. 3 veces este paso).
9. Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa en solución de blot.
10. Se lavó la membrana en solución de lavado por 10 min (se repitió 3 veces este paso).
11. Se reveló la presencia del anticuerpo por quimioluminiscencia con el kit ECL plus o Millipore. Se expuso a una película Biomax Film (Kodak).

12. Se eliminó el anticuerpo unido a las proteínas incubando con solución de eliminación por 30 min a 50°C. Se lavó tres veces con amortiguador de lavado hasta quitar olor a β-mercaptoetanol.
13. Para incubar con otro anticuerpo se repitió a partir del paso número 5.

Anticuerpo	Dilución	Referencia
Anti-citrato sintasa	1:1000	Donado por el Dr. Thomas D. Fox, Universidad de Cornell, EUA.
Anti-Cytb	1:10000	Elaborado por Aldo García Guerrero en nuestro laboratorio.
Anti-Cytb	1:1000	Donado por Rosemary Stuart, Universidad de Marquette, EUA.
Anti-Cbp3	1:10000	Donado por Martin Ott, Universidad de Estocolmo, Suecia.
Anti-Cor1	1:1000	Donado por Rosemary Stuart, Universidad de Marquette, EUA.
Anti-Cit c ₁	1:1000	Donado por Rosemary Stuart, Universidad de Marquette, EUA.
Anti-Rip1	1:1000	Donado por Rosemary Stuart, Universidad de Marquette, EUA.
Anti-Cox1	1:10000	Elaborado por Rodolfo García Villegas en nuestro laboratorio.
Anti-Arg8	1:10000	Donado por el Dr. Thomas D. Fox, Universidad de Cornell, EUA.
Anti-Cox3	1:1000	Mitosciences
Anti-Conejo acoplado a peroxidasa	1:5000	Jackson

Tabla 3. Tabla de anticuerpos utilizados.

Amortiguador de transferencia

Amortiguador de electroforesis 1X: 80 %

Metanol: 20 %

Solución de bloqueo

Leche en polvo descremada (Svelty): 10% (p/v)

Tris-HCl pH 7.6: 50 mM

NaCl: 150 mM

Solución de blot

Leche en polvo descremada (Svelty): 0.1% (p/v)

Tris-HCl pH 7.6: 10 mM

NaCl: 100 mM

EDTA pH 8.0: 1 mM

Tween-20: 0.1% ó 1% (v/v)

Anticuerpo: Adicionar según el título de anticuerpo

Solución de lavado

Tris-HCl pH 7.6: 10 mM

NaCl: 100 mM

EDTA pH 8.0: 1 mM

Tween-20: 0.1% (v/v)

Solución de eliminación

β -mercaptoetanol: 0.7% (v/v)

Tris-HCl pH 6.8: 62.5 mM

SDS: 2%

Cuantificación de hemo *b* por HPLC (Barros y Tzagoloff, 2002; Bestwick *et al*, 2010)

Extracción de hemos totales

1. A partir de mitocondrias purificadas por gradiente de Nycodenz, se tomó 1 mg de proteína total.

2. Se centrifugó a 16100 x g por 5 min. Se descartó el sobrenadante.
3. Se agregó 300 µl de solución de extracción (Acetona/ 3% de HCL).
4. Se incubó a temperatura ambiente por 5 min.
5. Se centrifugó a 16100 x g por 5 min. Se recuperó el sobrenadante.
6. Se agregó 300 µl de Solución A/B 1:1
7. Se centrifugó a 16100 x g por 5 min. Se recuperó el sobrenadante y se ajustó el pH a 3.5 con hidróxido de amonio 10 M.
8. Se inyectó la muestra en el HPLC (Knauer HPLC system UV detector Model 2500, Isocratic Pump Model 1000 and Manager Model 5000).

Condiciones para HPLC

Columna: 250 x 4.6 nm Luna® C18 column (phenomenex).

- Se calibró la columna con solución A/B (50%/50%) por 5 min con una velocidad de flujo de 1 ml/min.
- Se inyectó la muestra.
- Condición de corrida: Gradiente del 0-100% de solución A/B.
- Se calculó el área bajo la curva del pico correspondiente al hemo *b*.

Solución A:

Ácido trifluoroacético (SIGMA): 1%

Solución B:

Acetonitrilo (JT Baker): 100%

Ácido trifluoroacético: 1%

Espectros de hemocromos mitocondriales (Yonetani, 1960)

1. Se tomaron 1.5 mg de proteína total de mitocondrias aisladas.
2. Se completó el volumen de las mitocondrias con amortiguador de fosfatos pH 6.6 a 1 ml de volumen total.

3. Se leyó con el espectrofotómetro en un intervalo de 450-650 nm (este espectro corresponde al estado oxidado) en el espectro (Aminco DW2a™ UV-visible spectrophotometer).
4. Se agregó a las mitocondrias 1 mg de ditionita (estado reducido), se repitió la lectura en el espectrofotómetro.
5. Se realizó la resta de absorbancias del estado reducido menos el oxidado.

Ensayo de traducción *in organello*

1. Se preparó 1 ml de amortiguador ioTL con 0.2% de piruvato cinasa.
2. Se descongelaron en hielo 50 µg de proteína mitocondrial.
3. Se ajustó el volumen mitocondrial a 25 µl con amortiguador SH.
4. Se agregó 55 µl de amortiguador ioTL.
5. Se incubó durante 5 min a 30°C. Se mezcló cada minuto.
6. Se agregó 25 µCi de ³⁵S-metionina a cada muestra.
7. Se incubó durante 20 min a 30°C. Se mezcló cada 5 min.
8. Se agregó 1 ml de amortiguador SH.
9. Se centrifugó a 16100 x g durante 12 min y se retiró el sobrenadante.
10. Se agregó 20 µl amortiguador Laemmli 1X con β-mercaptoetanol al 5%.
11. Se cargaron en gel desnaturizante SDS-PAGE al 16%.
12. Se transfirieron a una membrana (PVDF o nitrocelulosa), se expusieron a autorradiografía toda la noche.
13. Se escanean en el equipo Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare).

Amortiguador ioTL (1mL)

Sorbitol 2.4M	375 µl
KCl 1M	225 µl
Amortiguador de fosfatos pH 7.2 1M	22.5 µl
Tris-HCl pH 7.4 1M	30 µl
MgSO4 1M	19 µl

Albumina 100mg/ml	45 μ l
ATP 200mM ^{&}	30 μ l
GTP 50mM ^{&}	15 μ l
Aminoácidos (-met, -tyr, -cys) 2mg/ml	9.1 μ l
Cisteína 10mM	10 μ l
Tirosina 1mg/ml	18.2 μ l
Ácido α -cetoglutarico	1.7 mg
Fosfoenol piruvato	3.5 mg
Piruvato cinasa ^{&}	2 μ l

Nota: [&] Se agregaron al final

Amortiguador SH

HEPES pH 7.4 20mM

Sorbitol 0.6M

Ensayo de traducción *in organello* y co-inmunoprecipitación de Cbp3-HA

1. Se preparó 1 ml de amortiguador ioTL.
2. Se descongelaron 250 μ g de proteína mitocondrial en hielo.
3. Se centrifugaron a 16100 x g por 5 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante.
4. Se agregaron 25 μ l de SH y 55 μ l de ioTL amortiguador.
5. Se incubaron 5 min a 30°C.
6. Se agregaron 25 μ Ci de ³⁵S-metionina.
7. Se incubaron a 20 min a 30°C.
8. Se tomó 4 μ l de la reacción (Total).
 - a) Se agregó 1 ml de SH.
 - b) Se centrifugó 10 min a 16100 x g a 4°C. Se eliminó el sobrenadante.

- c) Al total se agregó 15 µl de amortiguador Laemmli 1X y se guardaron a -70°C.
9. Se agregó 1 ml de amortiguador de lisis. Se resuspendió con punta cortada.
 10. Se incubó 10 min en hielo.
 11. Se centrifugó por 10 min a 16100 x g a 4°C. Se recuperó el sobrenadante.
 12. Se agregó 40 µl de perlas de A-sefarosa (punta cortada) + 5 µl de anti-HA (Roche) al sobrenadante. Se agitaron a 4°C por 2 hrs en agitador circular.
 13. Se centrifugó a 16100 x g. Se eliminó el sobrenadante.
 14. Se lavó 2 veces con 500 µl de amortiguador de lisis. Se centrifugó por 1 min a 16100 x g a 4°C. Se eliminó sobrenadante.
 15. Se lavó las perlas con 1 ml de Tris-HCl pH 7.4 20 mM y se centrifugó a 16100 x g por 1 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante con microjeringa.
 16. Se agregó 15 µl de amortiguador Laemmli 1X y se incubó a 65°C por 5min.
 17. Se centrifugó 15 seg a 16100 x g. Se tomó el sobrenadante con microjeringa.
 18. Se cargaron en gel desnaturalizante SDS-PAGE al 16%.
 19. Se transfirieron a una membrana (PVDF o nitrocelulosa), se expusieron a autorradiografía toda la noche.
 20. Se escanearon en el equipo Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare).
 21. Se realizó la inmunodetección.

Amortiguador de lisis

Digitonina: 1%

NaCl: 100 mM

Tris-HCl pH 7.4: 20 mM

Amortiguador SH

Sorbitol: 0.6 M

HEPES pH 7.4: 20 mM

Segunda dimensión

Para el ensayo de segunda dimensión se cortó un carril del BN-PAGE y se incubó por 30 min en amortiguador de eliminación. Posteriormente, el carril se colocó directamente con el gel de SDS-PAGE. Es importante dejar libre de burbujas la interface entre los geles. La electroforesis se inició a 50 V, una vez que la muestra entró al gel separador el voltaje se incrementó a 100 V. Al finalizar se transfirió a una membrana de PVDF y se realiza la inmunodetección.

Amortiguador de eliminación

Tris 1M pH6.8 12 mL

SDS 10%

3% β -Mercaptoetanol

Llevar a 50 mL con agua

Geles para BN-PAGE (Wittig *et al*, 2006)

Componentes	Acrilamida 4%	Acrilamida 5%	Acrilamida al 13%
Acrilamida 48.5% Bisacrilamida 1.5%	125 μ l	510 μ l	1.34 ml
Amortiguador de gel 3X	500 μ l	1.69 ml	1.69 ml
Glicerol 80%	-	320 μ l	1.28 ml
H ₂ O	860 μ l	2.5 ml	720 μ l
APS 10%	8 μ l	13.5 μ l	13.5 μ l
TEMED	2.25 μ l	4.9 μ l	4.9 μ l
Volumen total	2.25 ml	9 ml	9 ml

Tabla 4. Cantidades para preparar geles nativos (BN-PAGE).

Amortiguador del gel 3X

Bis-tris: 150 mM

Ácido aminocaproico: 1.5 mM

Ajustar pH a 7.0 con HCl

Solubilización de complejos proteicos

1. Se descongelaron en hielo 250 μg de proteína mitocondrial.
2. Se resuspendieron en 250 μl de amortiguador de lavado.
3. Se centrifugaron por 2 min a 16100 x g a 4°C. Se eliminó el sobrenadante.
4. Se centrifugó nuevamente y se eliminó el sobrenadante que haya quedado.
5. Se homogenizaron las mitocondrias con 45 μl de amortiguador de muestra con punta cortada.
6. Se agregó 5 μl de digitonina al 10% ó dodecil-maltósido al 10 %. Subir y bajar para mezclar con la micropipeta.
7. Se incubó la digitonina por 30 min en hielo.
8. Se incubó con dodecil-maltósido por 15 min en hielo.
9. Se clarificó el lisado centrifugando por 12 min a 16100 x g (4°C).
10. Se rescató el sobrenadante en un tubo nuevo (~50 μl). Se agregó 2.5 μl de la solución de coomassie (amortiguador de muestra + 5% Serva-G).
11. Se cargaron 20 μl de la muestra en el gel (100 μg).
12. Se corrió el gel a 15 mA con el amortiguador del cátodo (azul de coomasie 0.02%) por 30 min (Aproximadamente 1/3 del gel) a 4°C.
13. Se cambió el amortiguador de cátodo (azul de coomasie 0.002%) y se corrió a 6mA hasta que se salga el frente del gel (~2 horas).
14. Si se quieren observar proteínas que no migran en complejos de alto peso molecular no se dejó que se salga el frente.
15. Se transfirieron el gel en membrana de PVDF por 2 horas a 1.5 mA/cm².
16. Se lavó la membrana con metanol 100% hasta quitar el azul de coomasie.
17. Se secó la membrana por 10 min.
18. Se lavó con amortiguador de lavado hasta que la membrana se mojó.
19. Se incubó con amortiguador de bloqueo por 1hr o toda la noche a 4°C.
20. Se incubó con anticuerpo primario por 1hr o toda la noche a 4°C.
21. Se realizó 3 lavados de 20 min cada uno.
22. Se incubó con el anticuerpo secundario por 1 hr a temperatura ambiente.

23. Se realizó 3 lavados de 20 min cada uno.

24. Se reveló la presencia del anticuerpo por quimioluminiscencia.

Amortiguador de lavado (50ml)

Sorbitol 250 mM

Bis-tris 50 mM

Ajustar pH a 7.0 con HCl

Amortiguador de muestra

Ácido aminocaproico 750 mM

Bis-tris 50 mM

Ajustar el pH a 7.0 con HCl

Actividad *in gel* de la CcO (Wittig *et al*, 2007)

Para la actividad en gel, después de correr las muestras en gel para BN-PAGE, se tomó foto del gel con azul de coomasie, se colocó el gel en un recipiente y se agregó 50 ml de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4.

1. Se agregó 5 mg de citocromo *c* de caballo.
2. Se agregó 10 mg de 3'-5'-diaminobencidina.
3. Se incubó en agitación constante a temperatura ambiente por 2 horas y se tomó foto.
4. Se colocó el gel en solución desteñidora y en agitación constante hasta que se destiñó, o se dejó toda la noche en la mesa a temperatura ambiente.
5. El gel generalmente se encoge por deshidratación. Se agregó H₂O estéril hasta que recuperó su tamaño original. Se tomó foto.

Aislamiento de membranas de mitocondrias de levadura para el perfil complexómico

El aislamiento de las membranas mitocondriales es a pequeña escala.

1. Se tomó aproximadamente 10 g de peso húmedo de cada una de las cepas.
2. Se resuspendió en 10 ml de mitobuffer.
3. Se agregó 10 g de perlas de vidrio, previamente estériles.
4. Se rompieron las células mediante agitación con vórtex a alta velocidad; pulsos de 10 x 1 min con intervalos de reposo de 1 min en hielo.
5. Se centrifugaron a 3300 x g durante 20 minutos a 4°C.
6. Se transfirieron el sobrenadante a un tubo nuevo.
7. Se lavó el botón celular con las perlas de vidrio con 10 ml de mitobuffer.
8. Se centrifugó a 3300 x g durante 20 minutos a 4°C y se juntaron los sobrenadantes.
9. Se centrifugó a 40000 x g durante 60 minutos a 4 °C, para obtener las membranas mitocondriales.
10. Se eliminó el sobrenadante.
11. Se resuspendió el botón en 500 µl de mitobuffer.
12. Se homogenizó cuidadosamente, se realizaron alícuotas de 50 µl, se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80 °C.
13. Se determinó la concentración de proteína por el método (Bio-Rad DC protein assay).

Mitobuffer

D-manitol 600 mM

EGTA 2 mM

PMSF 2 mM

Tris / HCl 10 mM pH 6,8

Perfil complexómico (Guerrero-Castillo *et al*, 2017)

1. Se solubilizaron membranas mitocondriales (100 µg) con digitonina (3 mg / mg de proteína).
2. Se separaron mediante BN-PAGE usando un gel en gradiente de poliacrilamida al 4-16% como describe (Wittig *et al*, 2006).
3. Al finalizar el corrimiento, se fijaron las proteínas durante toda la noche con metanol al 50%, ácido acético al 10% y acetato de amonio 100 mM.
4. Se tiñó el gel con azul de Coomassie G-250 al 0,025% (Serva G) en ácido acético al 10% durante 45 min.
5. Se decoloró el gel con ácido acético al 10% y se mantuvo el gel en agua desionizada hasta la recuperación del tamaño.
6. Se escaneó el gel, la imagen fue en tamaño real para utilizar como plantilla para cortar el gel.
7. Se cortó cada carril del gel en 60 fracciones uniformes comenzando por la parte inferior.
8. Cada fracción se transfirió a una placa de filtro de 96 pocillos (Millipore®, MABVN1250) adaptada manualmente a una placa de 96 pocillos (MaxiSorp™ Nunc) para recolector los residuos.
9. Se incubó cada fracción con 50% de metanol y 50 mM de bicarbonato de amonio con agitación moderada; hasta que se eliminó todo el color azul de coomassie.
10. Se eliminó la solución mediante centrifugación a 1000 x g por 20 seg.
11. Se incubó con ditioneitol 10 mM con 50 mM de bicarbonato de amonio, durante 1h.
12. Se eliminó el exceso de solución, se agregó 30 mM de cloroacetamida con 50 mM de bicarbonato de amonio a cada pocillo, se incubó en la oscuridad durante 45 min y se retiró la solución.
13. Se incubó 15 min con metanol al 50% y 50 mM de bicarbonato de amonio para deshidratar las fracciones de gel.
14. Se eliminó el exceso de solución y se dejó secando las fracciones durante 30-45 min a temperatura ambiente.

15. Se Agregó 20 μ l de 5 ng/ μ l de tripsina (grado de secuenciación, Promega®) en 50 mM de bicarbonato de amonio, 1 mM de CaCl_2 a cada pocillo, se incubó durante 20 min a 4°C.
16. Se cubrió totalmente las fracciones de gel añadiendo 50 μ l de 50 mM de bicarbonato de amonio, se incubó durante toda noche a 37 °C.
17. En el sobrenadante se encuentran los péptidos. Se recolectaron los péptidos mediante centrifugación (1000 x g por 60 s) en placas de PCR limpias de 96 pocillos (Axygen®).
18. Se incubó las fracciones con 50 μ l de acetonitrilo (ACN) al 30%, ácido fórmico (FA) al 3% durante ~ 20 min para la elución de los péptidos restantes.
19. Se secaron los péptidos en un SpeedVac Concentrator Plus (Eppendorf) durante 3 horas, se resuspendió en 30 μ l de acetonitrilo al 5%, FA al 0,5% y se almacenaron a -20°C hasta su análisis por espectrometría de masas (MS).

Las proteínas se identificaron mediante espectrometría de masas (MS) en tándem después de la digestión con tripsina, siguiendo el procedimiento descrito en (Heide *et al*, 2012).

20. Se descongelaron y se agitaron suavemente para resuspender los péptidos durante 20 min, se cargó cada fracción y se separó mediante cromatografía líquidos en fase inversa (LC). Se analizaron en tándem mediante MS / MS en un espectrómetro de masas llamado Q Exactive orbitrap mass spectrometer a nano-flow ultra-HPLC system (Easy nLC-1000, Thermo Fisher Scientific).

Condiciones del LC/MS-MS

Para separar los péptidos se utilizaron columnas PicoTip™ EMITTER de 100 μ m de DI \times 15 cm de longitud, llenas de perlas de fase inversa ReproSil-Pur C18-AQ (3 μ m, 120Å) (Dr. Maisch GmbH, Alemania). Se utilizaron gradientes lineales de 5% - 35% ACN, 0,1% FA (30 min) con un flujo de 300 nl min⁻¹, seguido de 35% -80% ACN, 0,1% FA (5 min) a 600 nl min⁻¹ y un lavado final de la columna con ACN al

80% (5 min) a 600 nl min^{-1} . Todos los ajustes para la operación del espectrómetro de masas fueron los mismos que los detallados en Guerrero-Castillo *et al.* (2017).

Los archivos de los datos en bruto de la MS de todas las fracciones individuales se analizaron usando MaxQuant (v1.5.0.25), se compararon con el proteoma de *S. cerevisiae* de Uniprot (revisado, 25.09.2019).

Las abundancias de proteínas individuales se determinaron mediante cuantificación libre utilizando los valores obtenidos de intensidad de la cuantificación absoluta (iBAQ), estos valores se corrigieron con la cantidad de proteína cargada y las variaciones de sensibilidad de MS utilizando la suma de los valores totales de iBAQ de cada muestra.

Para cada grupo de proteínas, se generaron perfiles de migración y se normalizaron a la abundancia máxima a través de todas las fracciones. La agrupación jerárquica de los patrones de migración de todas las proteínas identificadas se aplicó utilizando un algoritmo de vinculación promedio con medidas de distancia de correlación centradas de Pearson.

El resultado del perfil complexómico consiste en una lista de proteínas organizadas de acuerdo con la similitud de sus patrones de migración en BN-PAGE, se visualizaron como mapas de calor que representan la abundancia normalizada en cada rebanada de gel mediante un gradiente de tres colores (negro / amarillo / rojo) y se procesaron en Microsoft Excel 2019 para su análisis.

La calibración de masa para el gel BN se realizó utilizando las masas moleculares aparentes de proteínas solubles y de membrana conocidas de *S. cerevisiae* y mitocondrias de corazón de bovino.

Photo-Cross linking (Entrecruzamiento fotoreactivo) (Ndi *et al.*, 2019)

1. Se cultivó una colonia en 5 ml en medio mínimo -Leu/Gal a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, toda la noche.
2. Se diluyó cada cepa a una DO 0.5 en 50 ml en medio -Leu/Gal.

3. Se agregó ~ 1,5 mM pBpa (p-benzoyl-L-phenylalanine), 25 µl de 200 mM pBpa en oscuridad.

Nota: la preparación del pBpa (269,3 g / mol) a 200 mM se realizó justo antes de utilizar. Se pesó 0.035 g de pBpa en un microtubo cubierto con papel de aluminio para evitar exponerlo a la luz. Se agregó 0,5 ml de NaOH 1 M en el tubo y se agitó hasta disolver completamente.

4. Se cultivaron las células durante 16 h, en completa oscuridad.
5. Se midió la DO final y se tomó el equivalente a 30 DO.
6. Se centrifugó a 4400 x g durante 5 min a temperatura ambiente.

Marcaje radioactivo de las proteínas mitocondriales

7. Se diluyó las células a una DO de 1 en 30 ml de medio -Leu/Gal.
8. Se cultivaron 3 horas a 30 °C hasta una DO ~ 0.5 -1 en fase exponencial en completa oscuridad.
9. Se centrifugó los 30 ml y se lavó las células con 5 ml de H₂O.
10. Se resuspendió en 1 ml de medio Gal sin aminoácidos.
11. Se agregó :
 - a) 67.5 µl de mezcla aminoácidos sin metionina (stock 2 mg / ml)
 - b) 135 µl de tirosina (stock 1 mg / ml)
 - c) 72 µl de cisteína (stock 10 mM)
11. Se incubó durante 15 min a 30 °C.
12. Se agregó 300 µl de cicloheximida (stock 7,5 mg / ml en H₂O).
13. Se incubó 5 min a 30 °C.
14. Se agregó 25 µCi de ³⁵S-metionina.
15. Se incubó 40 min para marcar radiactivamente las proteínas mitocondriales.
16. Se detuvo la síntesis agregando 80 µl de metionina fría 0.2 M.

Entrecruzamiento fotoreactivo

17. Se centrifugaron las células a 13 000 x g durante 2 min.
18. Se resuspendieron las células en 1 ml de -Leu/Gal y se transfirieron a una placa de 6 pocillos.
19. Se colocó la placa sobre un plato con hielo.
20. Se quitó la cubierta de plástico de la placa, se irradiaron las células a 360 nm con luz UV durante 1 hora, se resuspendió con pipeta cada 10 min para evitar que se sedimenten.
21. Se recuperó las células irradiadas en un microtubo nuevo.
22. Se centrifugó las células a 13000 x g durante 1 minuto a temperatura ambiente.

Extracción de proteínas con el protocolo de Cold Spring Harbor

23. Se agregó 1 ml de NaOH 0.1 M.
24. Se incubó durante 5 min a temperatura ambiente.
25. Se centrifugó durante 2 min a 13000 x g a temperatura ambiente.
26. Se eliminó el sobrenadante.
27. Se resuspendió en 140 µl de SDS al 4%, DTT 100 mM.
28. Se calentaron las muestras a 95 ° C durante 5 min.
29. Se centrifugaron durante 2 min a 13000 x g a temperatura ambiente.
30. Se tomó 5% (7 µl) de muestra total (T) y se precipitaron las proteínas con TCA al 72%, se dejaron las muestras en hielo.
31. Se pasó el sobrenadante a un tubo falcón de 15 ml y se agregó 14 ml de amortiguador de lisis.

Purificación con Ni-NTA

32. Se tomó 40 µl de perlas de Ni-NTA y se centrifugó a 3000 x g durante 1 min, a temperatura ambiente.

33. Se lavó las perlas con 1 ml de H₂O desionizada, se centrifugó a 3000 x g durante 1 min, a temperatura ambiente.
34. Se agregó 1 ml de amortiguador de lisis.
35. Se agregó la Ni-NTA con el amortiguador de lisis al falcón de 15 ml.
36. Se incubó durante 2 horas a 4 °C en agitador circular.
37. Se centrifugó el tubo falcón a 4400 rpm durante 5 min y se tomó el 5% (700 µl) del sobrenadante (NB).
38. Se lavaron las perlas tres veces con 1 ml de amortiguador de lisis (con 50 mM de imidazol).
39. Se eluyeron las proteínas pegadas a las perlas con 2 x 200 µl de amortiguador de lisis de elución (con 500 nM de imidazol) (E).
40. Se precipitó la fracción NB, E y T con TCA al 72%.

Protocolo de precipitación con TCA

41. Se llenó cada tubo hasta 1000 µl con H₂O.
42. Se agregó 200 µl de TCA al 72% y se mezcló en vórtex.
43. Se incubó 30 min en hielo.
44. Se centrifugó durante 15 min a 25 000 x g a 4 °C.
45. Se eliminó todo el sobrenadante.
46. Se lavó el botón con 1 ml de acetona fría.
47. Se centrifugó durante 15 min a 25 000 g a 4 °C.
48. Se dejó secar el botón a 50 °C durante 10 min.
49. Se resuspendió con amortiguador Laemmli 1X: eluido con 50 µl; el NB con 100 µl y el T con 100 µl.
50. Se separaron las proteínas por SDS-PAGE al 16%.
51. Se agitaron las muestras a 37 °C durante 30 min, se calentaron durante 3 min a 95 °C.
52. Se cargaron en gel 15 µl de T y NB, y 50 µl del eluido.
53. Se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF.
54. Se realizó la inmunodetección de Cbp3.

55. Se expuso a autorradiografía toda la noche.

56. Se escaneó en el equipo Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare).

Amortiguador de lisis

	Stock	Cantidad
Kpi pH 7.4	1M	20 mM
KCl	2.5M	250 mM
Imidazol	2M	20 mM
Tritón	20%	0.5 %

Generación de mutantes nucleares de *S. cerevisiae*

La generación de mutantes nulas de los genes nucleares de interés se realizó mediante la integración y sustitución del *orf* completo por cassette de resistencia a G418 (*KANMX4*) o por marcadores de auxotrofias como *LEU2*, *URA3* y *HIS3*.

Se diseñaron oligonucleótidos ~300 nt río arriba y ~300nt río abajo de cada gen, mediante PCR se amplificaron los cassettes para transformar a la levadura.

Transformación de levadura (protocolo del laboratorio del Dr. Martin Ott)

1. Se cultivó una colonia de levadura en 2 ml de medio YPD, toda la noche a 30°C con agitación constante.
2. Se tomó 1 ml y se agregó 4 ml de YPD fresco. Se incubaron a 30°C durante 2 hr con agitación constante.
3. Se tomó 1 ml del cultivo. Se centrifugó 1 min a 16100 x g a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante.

4. Se lavó el botón celular con 1 ml de H₂O estéril. Se centrifugó 1 min a 16100 x g a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante.
5. Se agregó 1 ml de acetato de litio 0.1M, se incubó máximo 10 min a 30°C con agitación constante.
6. Se centrifugó 1 min a 16100 x g a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante.
7. Se agregó :

● PEG 50%	240 µl
● Acetato de Litio 1M	36 µl
● Esperma de salmón (Invitrogen) 10mg/ml	5 µl
● DNA a transformar	100 ng de DNA o
● H ₂ O	97 µl

8. Se agitó en vórtex a máxima velocidad por 1 min.
9. Se incubó 45 min a 42 °C.
10. Se centrifugó 1 min a 16100 x g a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante.
11. Se agregó 1 ml de YPD y se incubó a 30°C durante 45 min.
12. Se centrifugaron los tubos 1 min a 16100 x g a temperatura ambiente.
13. Se resuspendió el botón celular en 100 µl de H₂O.
14. Se plaqueó la mezcla en el medio de selección necesario.

Purificación de DNA total de levadura método rápido (protocolo del laboratorio del Dr. Martin Ott)

1. Se cultivó una colonia de levadura en 2 ml de medio YPD, toda la noche a 30 °C.
2. Se centrifugó 1.5 ml de cultivos durante 1 min a 16100 x g a temperatura ambiente.

3. Se resuspendió el botón celular con 100 μ l de (200 mM de acetato de litio, 1% SDS).
4. Se incubó durante 5 min a 70 $^{\circ}$ C.
5. Se agregó 300 μ l de etanol al 100 % y se mezcló con vórtex.
6. Se centrifugó a 16100 x g durante 3 min. Se eliminó todo el sobrenadante.
7. Se lavó el botón con 300 μ l de etanol al 70%.
8. Se centrifugó 1 min a 16100 x g. Se eliminó completamente el etanol, se dejó secar las muestras al aire por 10 min.
9. Se resuspendió en 100 μ l de H₂O.
10. Se centrifugó a 16100 x g durante 3 min.
11. Se tomó 70 μ l y se transfirió a un tubo nuevo.
12. Se guardaron a -20 $^{\circ}$ C o se utilizaron para PCR. Para una reacción de 50 μ l se utilizó 2 μ l de DNA.

Extracción de proteína total método rápido (protocolo del laboratorio del Dr. Martin Ott)

1. Se cultivó una colonia en medio apropiado de 5 ml, dos noches con agitación constante.
 2. Se midió la DO a 600 nm.
 3. Se tomó el equivalente a 2.5 DO.
 4. Se centrifugó a 16100 x g durante 1 min. Se eliminó todo el sobrenadante.
 5. Se resuspendió el botón celular en 150 μ l de H₂O.
 6. Se agregó 50 μ l de NaOH (0.4 M).
 7. Se incubó 5 min a temperatura ambiente.
 8. Se centrifugó a 16100 x g durante 2 min. Se eliminó todo el sobrenadante.
 9. Se resuspendió con 50 μ l de amortiguador Laemmli 1X.
 10. Se calentaron las muestras a 65 $^{\circ}$ C por 5 min.
- Se centrifugaron a 16100 x g durante 1 min. Se tomó 25 μ l de cada muestra para cargar en un gel de SDS-PAGE.

Resultados

El extremo carboxilo es esencial para el funcionamiento del complejo *bc*₁

El Citocromo *b* (Cyt*b*) tiene expuesto su extremo carboxilo terminal (C-ter) hacia la matriz mitocondrial el cual interactúa con la subunidad Qcr7 para formar un intermediario de ensamblaje del complejo *bc*₁ (Gruschke *et al*, 2012; Lee *et al*, 2001; Zara *et al*, 2009). La pregunta a resolver fue si la región del extremo C-ter tiene un papel en la biogénesis del complejo *bc*₁.

Se realizó un alineamiento de la secuencia proteica del C-ter de Cyt*b* entre diferentes especies de hongos y mamíferos, se observó que los residuos en la posición -13Ile y -12Glu están altamente conservados, los últimos 8 residuos muestran una mayor variabilidad (Figura 12). La interacción del C-ter de Cyt*b* con Qcr7, así como la relativa conservación de los residuos -13 y -12 es sugerente de que esa región del carboxilo es importante para la biogénesis de Cyt*b*. En un estudio previo se generaron dos mutantes en el genoma mitocondrial por biobalística (Flores Mireles D. Tesis de maestría, 2018, no publicada), en donde se eliminaron los últimos 13 y 8 aminoácidos del extremo C-ter de Cyt*b* (Cyt*b*ΔC13 y Cyt*b*ΔC8), y se evaluó la función del C-ter de Cyt*b* en la biogénesis del complejo *bc*₁.

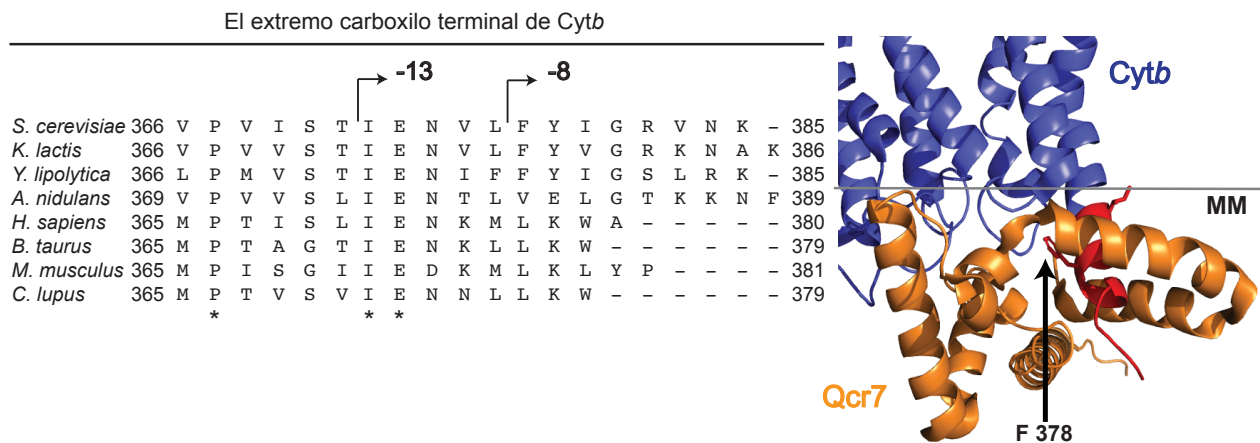


Figura 12. Alineamiento de la región del extremo C-ter de *Cytb*. Se realizó un alineamiento en T-COFFE versión 11.00.d62526. El (*) representa aminoácidos conservados. Se eliminaron los últimos 13 y 8 aminoácidos del extremo C-ter de *Cytb*. Del lado derecho el modelo cristalográfico del extremo C-ter de *Cytb* en ROJO, se marcan los aminoácidos -13 (I 373) y el aminoácido -8 (F 378), en color ANARANJADO se representa la subunidad Qcr7 (Modificado en PYMOL, PBD: 1KY0, Lange y Hunte, 2002). MM (matriz mitocondrial).

Datos previos en donde se evaluó el crecimiento de las mutantes *Cytb* Δ C13 y *Cytb* Δ C8 en un medio respiratorio (Etanol/Glicerol) (Figura 13). Demostraron que ambas mutantes perdieron la capacidad respiratoria de las células, al igual que el control negativo donde no hay *Cytb* (Δ *cbs1*). Esto indica que el extremo C-ter es esencial para la capacidad respiratoria y para el funcionamiento del complejo *bc*₁.

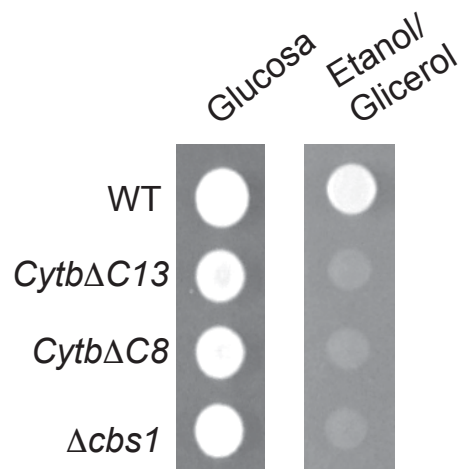


Figura 13. El extremo C-ter de *Cytb* se necesita para la respiración celular. Diluciones seriadas en medio fermentativo (glucosa) y medio respiratorio (etanol /glicerol) de la cepa WT, las mutantes del extremo C-ter de *Cytb* (*Cytb* Δ C13 y *Cytb* Δ C8) y el control negativo (Δ *cbs1*). Las placas se incubaron a 30 °C durante 3 días.

La pérdida de la capacidad respiratoria de las mutantes *Cytb* Δ C13 y *Cytb* Δ C8 se puede deber a un efecto negativo sobre la síntesis de *Cytb*. Por esto, en la maestría se evaluó la síntesis de *Cytb* en las mutantes *Cytb* Δ C13 y *Cytb* Δ C8 por marcaje

radioactivo de las proteínas sintetizadas en la mitocondria con [³⁵S]-metionina en presencia de cicloheximida (Figura 14). Observamos que la síntesis de *Cytb* se mantiene en las mutantes del extremo C-ter *Cytb*ΔC13 y *Cytb*ΔC8 y aparentemente ninguna de las otras proteínas sintetizadas en la mitocondria cambia sus niveles, indicando que el extremo C-ter no se necesita para la traducción de *Cytb*. Sin embargo, en la inmunodetección se observó que la estabilidad de *Cytb* disminuyó en las mutantes *Cytb*ΔC13 y *Cytb*ΔC8 en comparación con la cepa WT, indicando que la región C-ter le da estabilidad a *Cytb* (Figura 15).

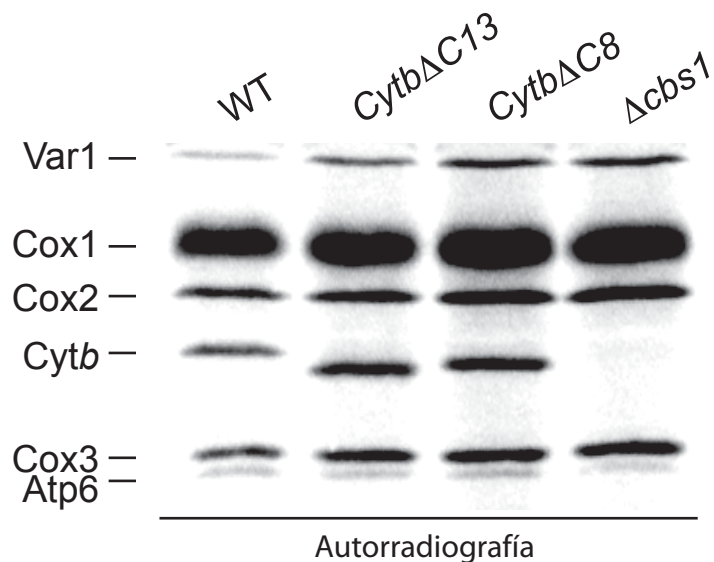


Figura 14. El extremo C-ter de *Cytb* no se necesita para la síntesis de *Cytb*. Se marcó radioactivamente la síntesis de proteínas mitocondriales de diferentes cepas, por un ensayo de traducción *in vivo* con ³⁵S-metionina en presencia de cicloheximida. El control negativo sin *Cytb* (*Δcbs1*). Se separaron mediante SDS-PAGE 16% los productos de traducción, se transfirieron a una membrana de PVDF y se analizaron por autorradiografía. Var1, subunidad de ribosoma; Cox1, subunidad 1 del citocromo c oxidasa; Cox2, subunidad 2 de la citocromo c oxidasa; *Cytb*, citocromo b; Cox3, subunidad 3 de la citocromo c oxidasa; Atp6, subunidad 6 de ATP sintasa.

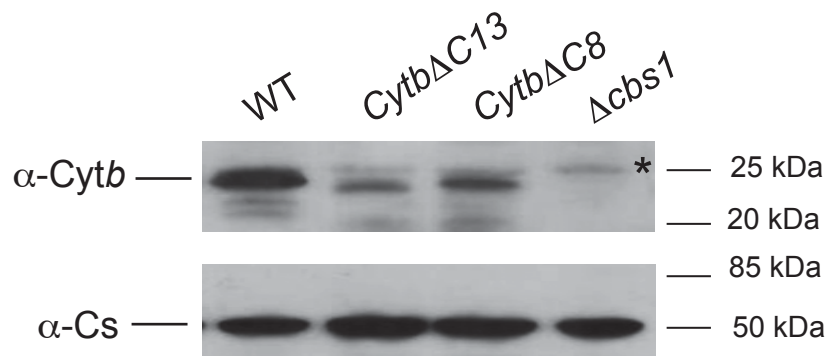


Figura 15. El extremo C-ter de *Cytb* le da estabilidad a *Cytb*. Se separó por SDS-PAGE 12% mitocondrias aisladas (20 μ g) de diferentes cepas y se transfirió a una membrana de PVDF. El control negativo sin *Cytb* ($\Delta cbs1$). Se analizó la inmunodetección contra *Cytb* (α -*Cytb*) y citrato sintasa (α -Cs) como control de carga. El asterisco (*) corresponde a una banda inespecífica.

El extremo carboxilo terminal de *Cytb* probablemente favorezca la hemilación de *Cytb*

La hemilación de *Cytb* depende de Cbp3-Cbp6 y Cbp4, todas ayudan a *Cytb* para que adquiera sus grupos hemo tipo b por un proceso desconocido (Gruschke *et al*, 2011; Hildenbeutel *et al*, 2014., García-Guerrero *et al*, 2018). Se evaluó si el extremo C-ter se necesita para la hemilación de *Cytb*, debido a que el extremo C-ter es esencial para la respiración celular (Figura 13).

Se determinó la cantidad de hemo *b* por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en fase reversa en mitocondrias purificadas por gradiente de Nicodenz de las diferentes cepas. Se realizó la extracción del hemo total con acetona ácida y se analizó por HPLC. Se determinó el pico de retención de hemo *b*, se utilizó hemina (1 μ g) como referencia y se graficó la cantidad de hemo *b* para cada una de las cepas (Figura 16A).

La cantidad de hemo *b* total en la mutante *Cytb* Δ *C13* disminuyó un 50% aproximadamente en comparación a la cepa WT, esta disminución fue similar a una cepa carente de *Cytb* (Δ *cbs1*), sugiriendo que *Cytb* no adquiere sus grupos hemo tipo *b* en la mutante del extremo C-ter *Cytb* Δ *C13*. Para corroborar la ausencia de hemo *b* en la mutante *Cytb* Δ *C13*, se analizó la diferencia del estado oxidado respecto al estado reducido de los diferentes grupos hemo (*a*, *b* y *c*) en mitocondrias aisladas por espectrometría (Figura 16B). La señal de hemo *b* se observó a 555 nm en la cepa WT y en la mutante *Cytb* Δ *C13* esta señal no fue detectable como en el control negativo (Δ *cbs1*). Los resultados indican que el extremo C-ter podría estar involucrado en la hemilación de *Cytb*.

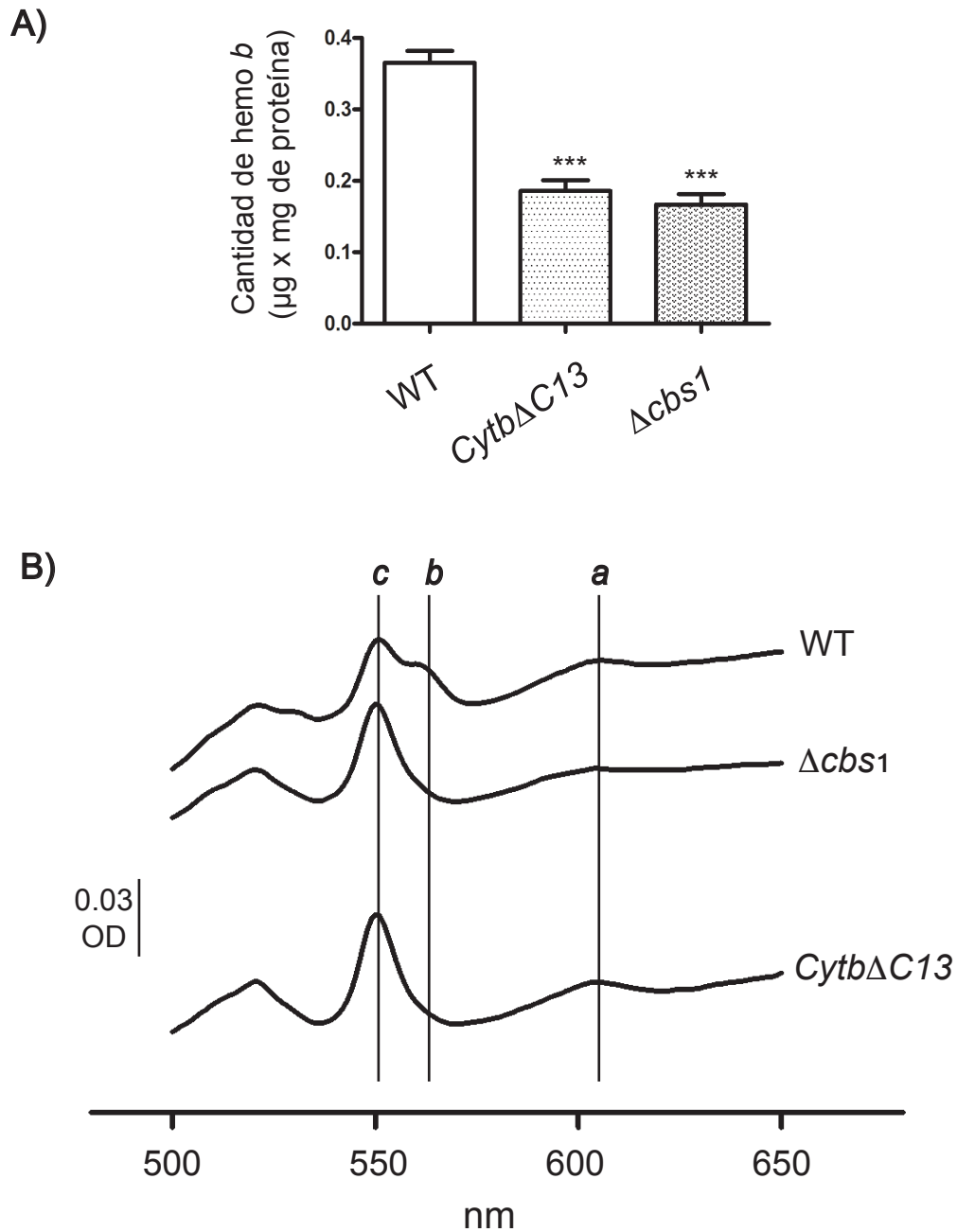


Figura 16. El extremo C-ter favorece que Cytb adquiera sus grupos hemo tipo *b*. A) Mitocondrias (1 mg) purificadas por gradiente de Nicodenz de las diferentes cepas, se analizaron por HPLC. Las muestras se trataron con acetona ácida (3% HCL) y se ajustó el pH 3,5 con hidróxido de amonio. La hemina se utilizó para conocer el tiempo de retención de hemo *b*. El área bajo la curva de la señal del hemo *b* se calculó como µg de hemo *b* por mg de proteína. Se cuantificaron tres muestras biológicas, cada una por duplicado (n= 3). ***, $p < 0,0001$ vs WT. B) El espectro de absorción de los diferentes hemos de 450 nm a 650 nm. Se analizó el estado oxidativo menos el

estado reducido de mitocondrias aisladas (1 mg) de las diferentes cepas. El hemo *c*, *b* y *a* (*c*, *b*, *a*). A 550 nm se observa el hemo *b*.

El extremo carboxilo terminal de *Cytb* es esencial para el ensamblaje del complejo *bc*₁

Cytb es la primera subunidad del complejo *bc*₁ en ensamblarse (Ndi *et al*, 2018; Zara *et al*, 2009). En la estructura cristalográfica se observa que el extremo C-ter de *Cytb* interactúa con el extremo N-ter de la subunidad Qcr7, curiosamente el N-ter de Qcr7 se requiere para el ensamblaje y función del complejo *bc*₁ (Lange and Hunte, 2002; Lee *et al*, 2001). Era probable que el extremo C-ter de *Cytb* se necesite para el ensamblaje del complejo *bc*₁.

Se evaluó la cantidad de proteína de algunas subunidades de los diferentes intermediarios de ensamblaje del complejo *bc*₁ mediante inmunodetección, en las mutantes *Cytb*Δ*C13* y *Cytb*Δ*C8*. Las proteínas mitocondriales se separaron por SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de PVDF y se realizó la inmunodetección contra: Qcr7 (α-Qcr7), Qcr8 (α-Qcr8), Cor1 (α-Cor1) y Rip1 (α-Rip1) (Figura 17). Qcr7 y Qcr8 son las primeras subunidades que interactúan con *Cytb*, en las mutantes del extremo C-ter la cantidad de Qcr7 y Qcr8 disminuyo, al igual que en ausencia de *Cytb* (Δ*cbs1*). Cor1 es una subunidad de la etapa intermedia del ensamblaje y en las mutantes del extremo C-ter no se afectó debido a que Cor1, Cor2 y Cyt1 pueden formar un intermediario estable cuando hay defectos en el ensamblaje del complejo *bc*₁ (Zara *et al*, 2009). Rip1 es de las últimas subunidades en ensamblarse al complejo (Ndi *et al*, 2018), en las mutantes del extremo C-ter y en el control negativo (Δ*cbs1*) casi no se detectó. Esto indica que se requiere del extremo C-ter de *Cytb* para el ensamblaje del complejo *bc*₁.

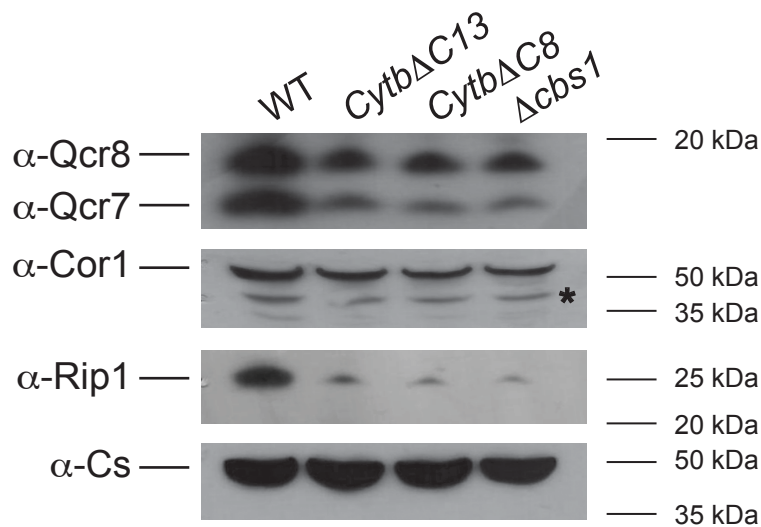


Figura 17. El extremo C-ter es esencial para el ensamblaje del complejo bc_1 . Se separó por SDS-PAGE mitocondrias aisladas (20 μ g) de las diferentes y se transfirió a una membrana de PVDF. Se analizó la inmunodetección de algunas subunidades de los diferentes intermediarios de ensamblaje del complejo bc_1 : dos subunidades de la primera etapa de ensamblaje Qcr7 (α -Qcr7) y Qcr8 (α -Qcr8), una subunidad del ensamblaje intermedio Cor1 (α -Cor1) y una subunidad del ensamblaje tardío Rip1 (α -Rip1). La citrato sintasa (α -Cs) se utilizó como control de carga. El asterisco (*) corresponde a una banda inespecífica.

Se analizó la posible formación de un complejo bc_1 en las mutantes del extremo C-ter $Cytb\Delta C13$ y $Cytb\Delta C8$. Se separaron por BN-PAGE mitocondrias solubilizadas con dodecil-maltósido para mantener al complejo bc_1 en su forma nativa, y se analizó el complejo bc_1 por inmunodetección contra $Cytb$ (α - $Cytb$) y Rip1 (α -Rip1) (Figura 18). El complejo bc_1 migra en aproximadamente 500 kDa, es claro que en las mutantes del extremo C-ter no hay formación del complejo bc_1 . Para asegurar que solo se afectó la formación de complejo bc_1 , se decidió analizar la actividad de CcO en gel en las mutantes $Cytb\Delta C13$ y $Cytb\Delta C8$; se observó que la ausencia del extremo C-ter no afectó la actividad de la CcO.

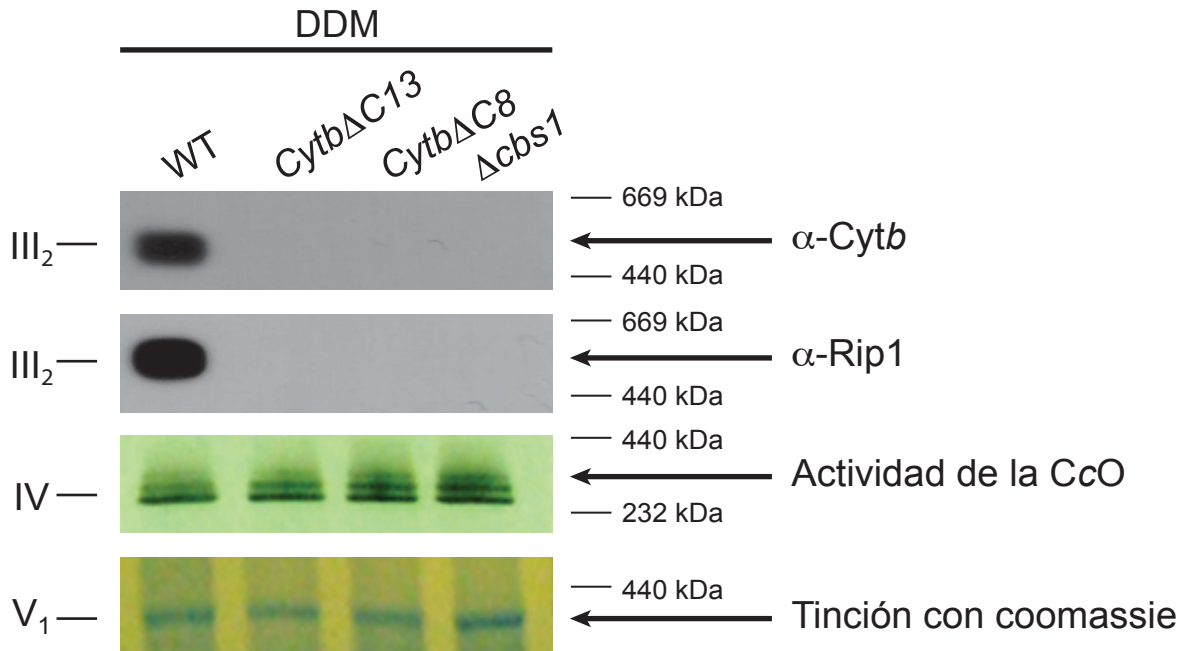


Figura 18. El complejo bc_1 no se forma en ausencia del extremo C-ter de *Cytb*. Se solubilizaron mitocondrias (100 μ g) de las diferentes cepas con n-Dodecil β -D-maltósido al 1%, se separaron por BN-PAGE, se transfirieron a una membrana de PVDF y se analizó la inmunodetección contra *Cytb* (α -*Cytb*) y Rip1 (α -Rip1). Se utilizó como control de carga la tinción en gel de coomassie del monómero de ATP sintasa (V_1). En otro gel, se separaron las mismas cepas con las mismas condiciones, se incubó el gel con 3-3' diaminobencidina y citocromo *c* de caballo reducido para analizar la actividad de CcO. El complejo bc_1 (III_2); la CcO (IV).

García-Guerrero *et al*, (2018) observó que un complejo bc_1 inestable e inactivo puede formar supercomplejos con ayuda de la CcO al solubilizar mitocondrias con un detergente suave como la digitonina que mantiene estable a los supercomplejos (III_2/IV_1 - III_2/IV_2). Se evaluó la formación de supercomplejos en las mutantes del extremo C-ter *Cytb*ΔC13 y *Cytb*ΔC8, se solubilizaron mitocondrias con digitonina, se separaron por BN-PAGE y se realizó la inmunodetección contra *Cytb* (α -*Cytb*), Cor1 (α -Cor1) y Rip1 (α -Rip1) (Figura 19). Al inmunodetectar a *Cytb*, Cor1 y Rip1 en las mutantes del extremo C-ter, no se observó formación de los supercomplejos III_2/IV_1 - III_2/IV_2 ; lo mismo ocurre cuando no hay *Cytb* en el control negativo ($\Delta cbs1$). Se observaron bandas entre 250 y 600 kDa al inmunodetectar a Cor1, esto se debe a que Cor1 puede formar intermediarios de ensamblaje estables con Cor2 y Cyt1, en

ausencia de *Cytb* (Zara *et al*, 2009). Estos resultados indican que el extremo C-ter de *Cytb* se necesita para el ensamblaje del complejo bc_1 y la formación de supercomplejos.

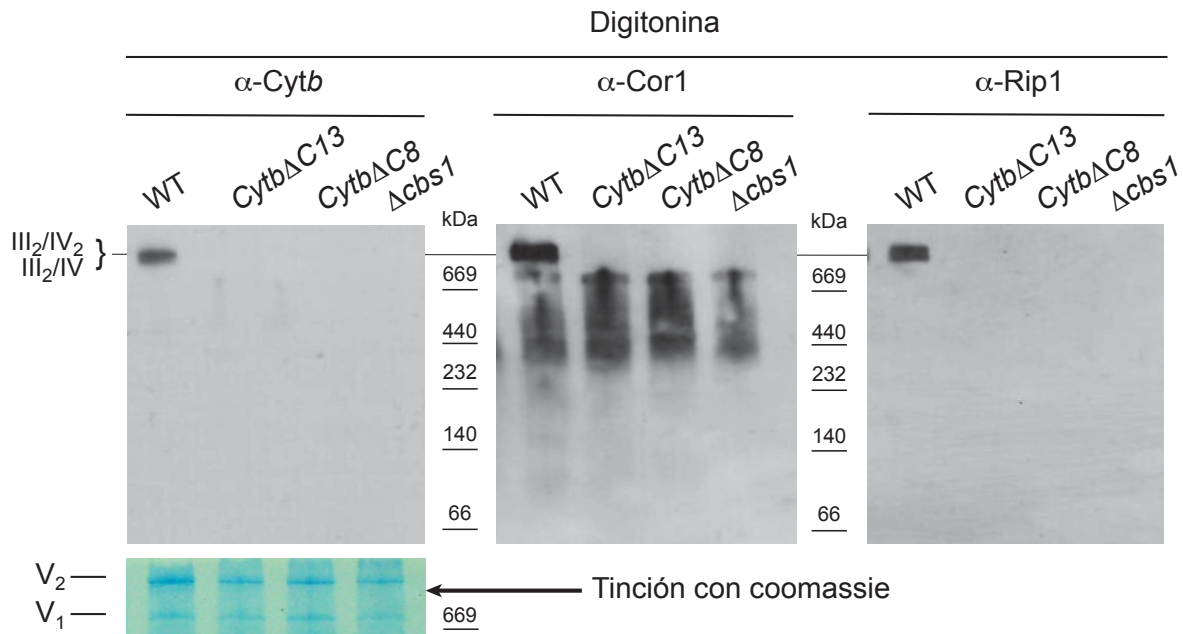


Figura 19. El extremo C-ter de *Cytb* se necesita para la formación de los supercomplejos. Mitocondrias aisladas (100 μ g) de las diferentes cepas se solubilizaron con digitonina al 1%, se separaron por BN-PAGE, se transfirieron a una membrana de PVDF y se analizaron por inmunodetección contra *Cytb* (α -*Cytb*), *Cor1* (α -*Cor1*) y *Rip1* (α -*Rip1*). Se utilizó como control de carga la tinción de coomassie del dímero y el monómero de ATP sintasa (V_2 - V_1). Supercomplejos, dímero del complejo bc_1 con un monómero de la CcO (III_2 / IV_1); dímero del complejo bc_1 con dos monómeros de la CcO (III_2 / IV_2).

El extremo C-ter de *Cytb* es indispensable en el ensamblaje del complejo bc_1

Cytb interactúa con *Qcr7* y *Qcr8* para la formación del intermediario II de ensamblaje, este funciona como andamio para el ensamblaje de las demás subunidades (*Cor1*, *Cor2*, *Cit c_1*, *Qcr6*, *Qcr9*, *Qcr10* y *Rip1*) para formar el complejo

bc₁ (Ndi *et al*, 2018). Se encontró que los niveles de Qcr7, Qcr8 y Rip1 disminuyeron en la mutante del extremo C-ter (Figura 17), por lo que es posible que se abata la formación del intermediario II y esto provocaría que no se ensamble el complejo *bc₁* en la mutante del C-ter.

Se analizó la presencia proteica de todas las subunidades y los intermediarios de ensamblaje del complejo *bc₁*, para ello se utilizó un perfil complexómico (complexome profiling). Para esta técnica se aislaron mitocondrias de la cepa WT y la mutante del extremo C-ter *CytbΔC13*, se solubilizaron con digitonina y se separaron por BN-PAGE. Cada carril se cortó en 60 fracciones, cada fracción se separó y digirió con tripsina; y fueron analizadas por cromatografía de líquidos y espectrometría de masas (LC MS/MS) (Guerrero-Castillo *et al*, 2017).

Se observó que en la cepa WT la mayor abundancia relativa para cada subunidad se encuentra en los complejos de alto peso molecular que corresponden al complejo *bc₁* (III₂) y los supercomplejos (III₂/IV₁-III₂/IV₂) (Figura 20). Se observó en la mutante del extremo C-ter a Qcr7, Qcr8, Cyt1, Qcr9, Qcr10 y Rip1 en la región de muy bajo peso molecular, que corresponden a las subunidades sin ensamblarse. Para *Cytb*, Cor1, Cor2 y Qcr6 la abundancia relativa es muy baja. Estos datos indican que el extremo C-ter de *Cytb* es esencial para el ensamblaje de todas las subunidades que forman el complejo *bc₁*.

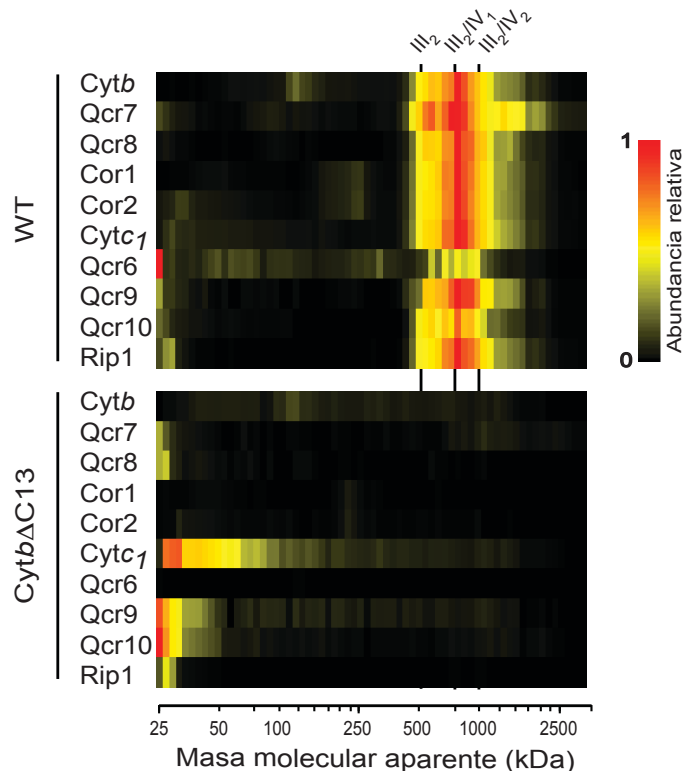


Figura 20. El extremo C-ter de *Cytb* es indispensable para el ensamblaje de las subunidades del complejo bc_1 . Perfil complexómico de cada una de las subunidades del complejo bc_1 en la cepa WT y *Cytb* Δ C13. Mitocondrias de las cepas WT y *Cytb* Δ C13 se solubilizaron con 3% de digitonina y se separaron por BN-PAGE, cada carril se cortó en 60 fracciones y cada fracción se digirió con tripsina para generar péptidos pequeños. Los péptidos se separaron mediante cromatografía líquida y se analizaron por espectrometría de masas (LC-MS/MS). Del lado derecho están las fracciones que corresponden a los complejos de alto peso molecular y del lado izquierdo las de bajo peso molecular. El mapa de calor representa la abundancia relativa para cada proteína. Cada una de las fracciones se calibró su masa molecular aparente de acuerdo a complejos conocidos (Complejos respiratorios de bovino).

Se graficó el promedio de las abundancias relativas de todas las subunidades que forman al complejo III y IV de la cepa WT y la mutante *Cytb* Δ C13 (Figura 21). Se observó en la cepa WT la mayor abundancia del promedio de las subunidades del complejo III y IV en los supercomplejos (III₂/IV₁-III₂/IV₂). En la mutante para el complejo III no se observó complejos de alto peso molecular, pero para el complejo IV se observa la formación del monómero (IV₁) en aproximadamente 250 kDa. Estos

resultados indican que el extremo C-ter de *Cytb* se necesita para el ensamblaje del complejo III y no para el ensamblaje del complejo IV.

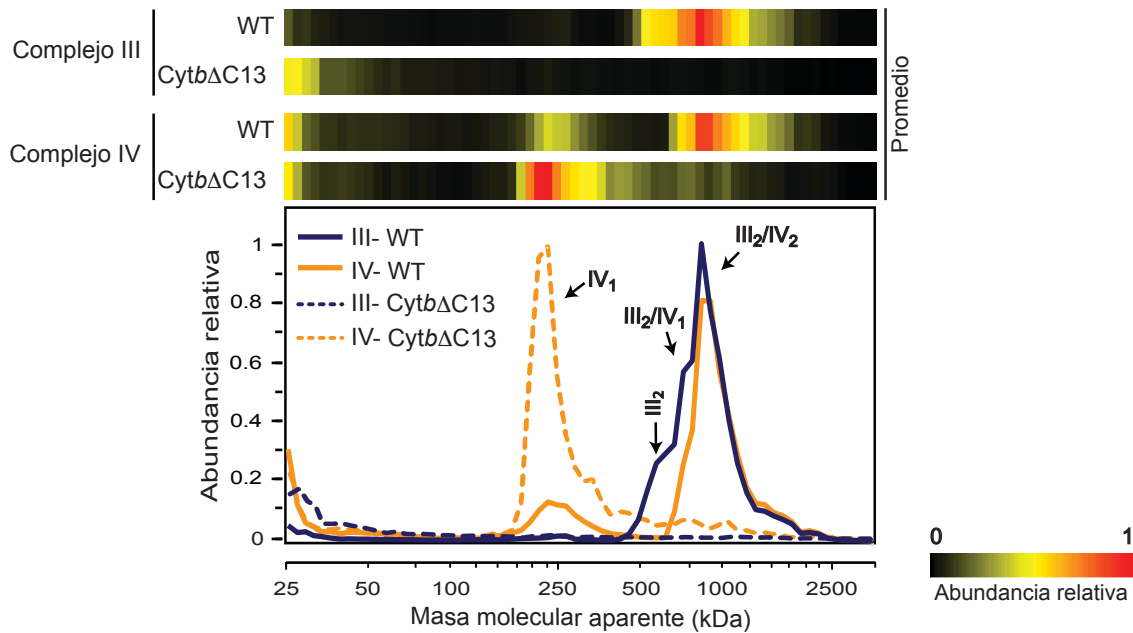


Figura 21. El extremo C-ter de *Cytb* es esencial para la formación del complejo bc_1 y de los supercomplejos. Se graficó el promedio de todas las subunidades del complejo bc_1 y de la CcO de la cepa WT y *Cytb* Δ C13. Complejo bc_1 (III₂); complejo bc_1 con un monómero de la CcO (III₂ / IV₁); complejo bc_1 con dos monómeros de la CcO (III₂ / IV₂). En línea sólida son los promedios para la cepa WT y en línea punteada los promedios de la mutante del C-ter. El mapa de calor representa la abundancia relativa para cada proteína.

El extremo C-ter de *Cytb* participa en la regulación de la síntesis de *Cytb*

Al afectar el ensamblaje temprano o la hemilación de *Cytb*, las chaperonas Cbp3-Cbp6 son secuestradas en un intermediario junto con *Cytb* como mecanismo de regulación, esto impide que se activen nuevas rondas de traducción de *Cytb* (Gruschke *et al*, 2012; Hildenbeutel *et al*, 2014). Nos preguntamos si el extremo C-ter de *Cytb* está involucrado en el mecanismo de regulación de su propia síntesis.

Durante la maestría se evaluó la regulación de la síntesis de *Cytb* por ensayos de traducción *in vivo*, en la cepa WT y la mutante *Cytb* Δ C13. Se realizaron mutantes dobles donde se eliminó a (Δ *cbp3* y Δ *cbp6*) porque son las encargadas de regular y activar la síntesis de *Cytb*; en cepas nulas de *Qcr7* (Δ *qcr7*) porque al eliminarla se abate el ensamblaje del complejo y se activa el mecanismo de regulación de la síntesis de *Cytb*, y como control negativo se eliminó la síntesis de *Cytb* (Δ *cbs1*). Se marcaron radiactivamente las proteínas mitocondriales de las diferentes cepas con ³⁵S-metionina, en presencia de cicloheximida. Las proteínas mitocondriales se separaron por SDS-PAGE y se analizaron por autorradiografía (Figura 22A).

Para la síntesis de *Cytb* se requiere de *Cbp3*, *Cbp6* o *Cbs1* en la cepa WT y en la mutante del extremo C-ter. En la cepa WT al eliminar a *Qcr7* la síntesis de *Cytb* disminuye porque *Cbp3*-*Cbp6* se quedan secuestradas con *Cytb* como mecanismo de regulación de su síntesis (Gruschke *et al*, 2012). Curiosamente, al eliminar a *Qcr7* (Δ *cbp7*) en la mutante del C-ter la síntesis de *Cytb* no se afecta. Estos resultados sugieren que el extremo C-ter de *Cytb* está involucrado en el mecanismo de regulación de su propia síntesis, indicando que *Cbp3*-*Cbp6* podrían no secuestrarse con *Cytb* por la ausencia del extremo C-ter y estarían libres activando constitutivamente la síntesis de *Cytb*.

Se evaluó la interacción de *Cbp3* y *Cbp6* con el extremo C-ter de *Cytb*. Para ello se realizó la inmunoprecipitación de *Cbp3* en las mutantes del extremo C-ter *Cytb* Δ C13 y *Cytb* Δ C8. Se purificaron mitocondrias de la cepa WT y las mutantes (*Cytb* Δ C13 y *Cytb* Δ C8) que expresan a *Cbp3* con una etiqueta (*CBP3*-HA). Como control negativo se utilizó una cepa con *Cbp3* sin etiqueta. Se realizó marcaje radioactivo durante la síntesis de proteínas mitocondriales con ³⁵S-metionina por un ensayo de traducción *in organello*. Se inmunoprecipitó (IP) a *Cbp3*-HA con perlas de proteína A-sepharosa acopladas con anti-HA. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE, se analizaron por autorradiografía a *Cytb* y por inmunodetección a *Cbp3*-HA con anticuerpos anti-HA (Figura 22B).

Cytb eluye con Cbp3-HA en la inmunoprecipitación de la cepa WT. En las mutantes del extremo C-ter, se observó una menor cantidad de *Cytb* que eluyó con Cbp3-HA en comparación con la cepa WT. Estos datos indican que el extremo C-ter ayuda a la interacción de *Cytb* con Cbp3.

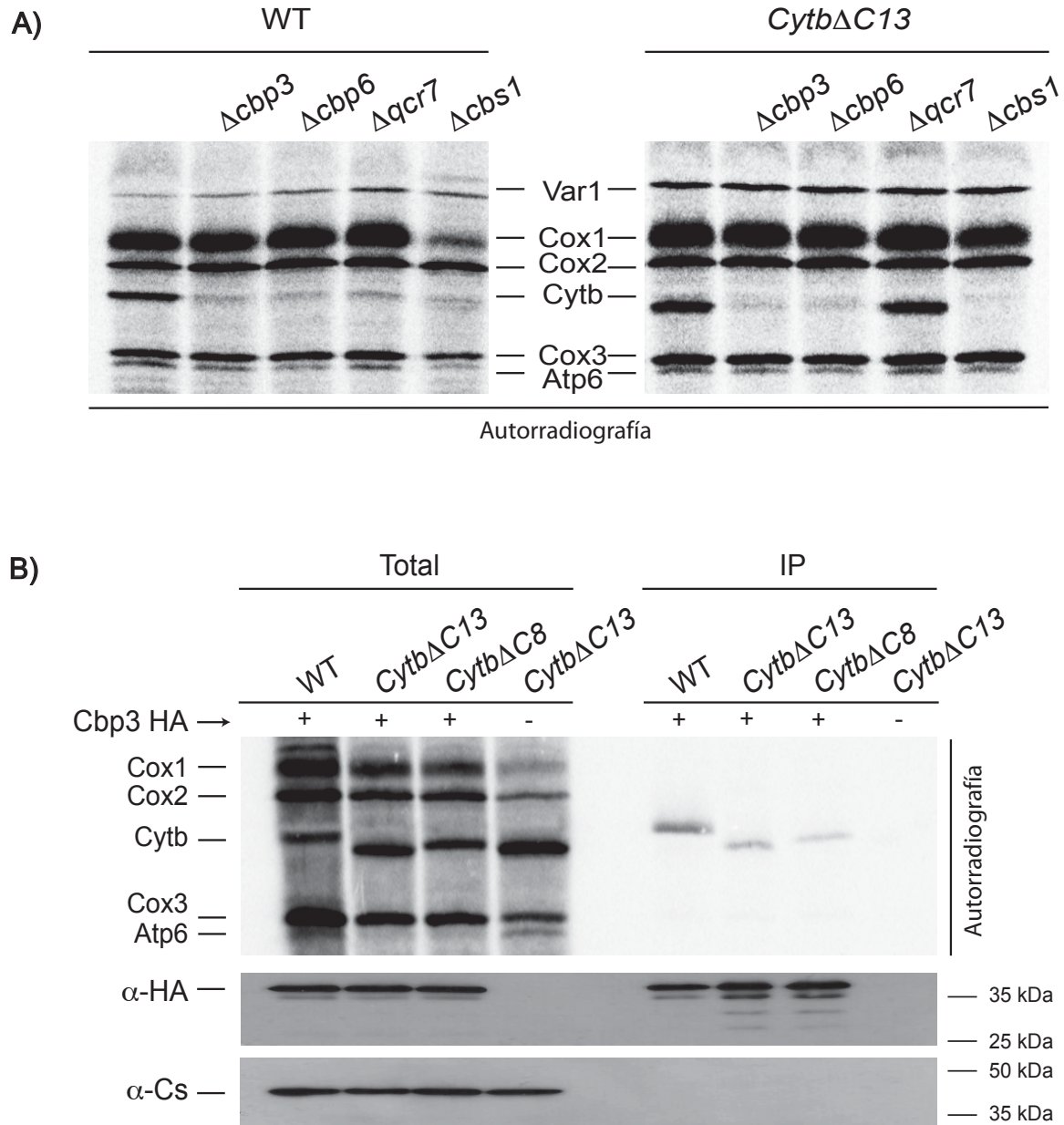


Figura 22. El extremo C-ter de *Cytb* está involucrado en el mecanismo de regulación de su síntesis y ayuda a la interacción de *Cytb* con Cbp3-Cbp6. A) En las cepas WT y *Cytb*ΔC13 se

eliminó a: Cbp3 ($\Delta cbp3$), Cbp6 ($\Delta cbp6$), la subunidad Qcr7 ($\Delta qcr7$) y Cbs1 ($\Delta cbs1$). Se marcó radioactivamente las proteínas mitocondriales mediante traducción *in vivo* con ^{35}S -metionina en presencia de cicloheximida. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de PVDF y se analizaron mediante autorradiografía. B) En la cepa WT y en las mutantes del extremo C-ter ($Cytb\Delta C13$ y $Cytb\Delta C8$) se expresó CBP3-HA a partir de un plásmido de bajo número de copias. La cepa $Cytb\Delta C13$ con Cbp3 sin etiqueta se utilizó como control negativo para la inmunoprecipitación. Se tomaron mitocondrias aisladas (500 μg) y se realizó un ensayo de traducción *in organello* para marcar radioactivamente con ^{35}S -metionina, posteriormente se solubilizaron con digitonina al 1%. Se inmunoprecipitó a Cbp3-HA con perlas de proteína A-sefarosa acopladas con anti-HA. Se separó la fracción total 10% y el inmunoprecipitado 90% (IP) mediante SDS-PAGE, se transfirió a una membrana de PVDF, se analizó mediante autorradiografía a *Cytb* y mediante inmunodetección a Cbp3 con anti-HA (α -HA), se utilizó a citrato sintasa (α -Cs) como control de carga mitocondrial.

La ausencia del extremo C-ter de *Cytb* genera una mayor cantidad de Cbp3-Cbp6 libres

En la figura 22B se observó una menor cantidad de *Cytb* que interactúa con Cbp3 en las mutantes del extremo C-ter. Nos preguntamos si el extremo C-ter de *Cytb* se necesita para la formación de los intermediarios 0 y I del ensamblaje del complejo *bc₁*. El intermediario 0 contiene a *Cytb*, Cbp3 y Cbp6, se forma para que *Cytb* adquiera su primer grupo hemo *b*, posteriormente se incorpora la chaperona Cbp4 y forma el intermediario I (*Cytb*, Cbp3, Cbp6 y Cbp4) para que *Cytb* adquiera su segundo grupo hemo *b* (Gruschke *et al*, 2012; Hildenbeutel *et al*, 2014).

Se evaluó la formación del intermediario 0 y I separando a las proteínas mediante electroforesis de 2 dimensiones (BN/SDS-PAGE). Para ello se solubilizaron mitocondrias aisladas con 2 % de digitonina de las cepas WT, $Cytb\Delta C13$ y $\Delta cbs1$. Primero se separaron por BN-PAGE para mantener los intermediarios en su forma nativa, se cortó cada carril y se separaron las proteínas que forman los intermediarios por SDS-PAGE. El gel se transfirió a una membrana de PVDF y se

analizó por inmunodetección a: *Cytb* (α -*Cytb*), *Cbp3* (α -*Cbp3*) y como control a *Cox1* (α -*Cox1*).

En la cepa WT se observó que la mayoría de *Cytb* migra a la altura de los supercomplejos junto con *Cox1*, solo una pequeña cantidad de *Cytb* migro junto con *Cbp3* en aproximadamente 130-170 kDa que corresponde al intermediario 0 y/o I de ensamblaje (Figura 23). En la mutante *Cytb* Δ *C13* no se observó a *Cytb* en complejos de alto peso molecular, pero se observó una banda discreta de *Cytb* en la región de los intermediarios de ensamblaje que comigró con *Cbp3*. Además, se observó una banda de *Cbp3*-*Cbp6* libre en la mutante *Cytb* Δ *C13*, como en el control negativo en ausencia de *Cytb* (Δ *cbs1*) donde solo se observó a *Cbp3* en su forma libre y con *Cbp6* (*Cbp3*-*Cbp6*).

Estos datos indican que el extremo C-ter de *Cytb* es primordial para la interacción de *Cytb* con *Cbp3*. Además, es fundamental para la correcta formación de los intermediarios de ensamblaje porque se observa un barrido donde comigran *Cytb* y *Cbp3*, que podría corresponder a intermediarios aberrantes.

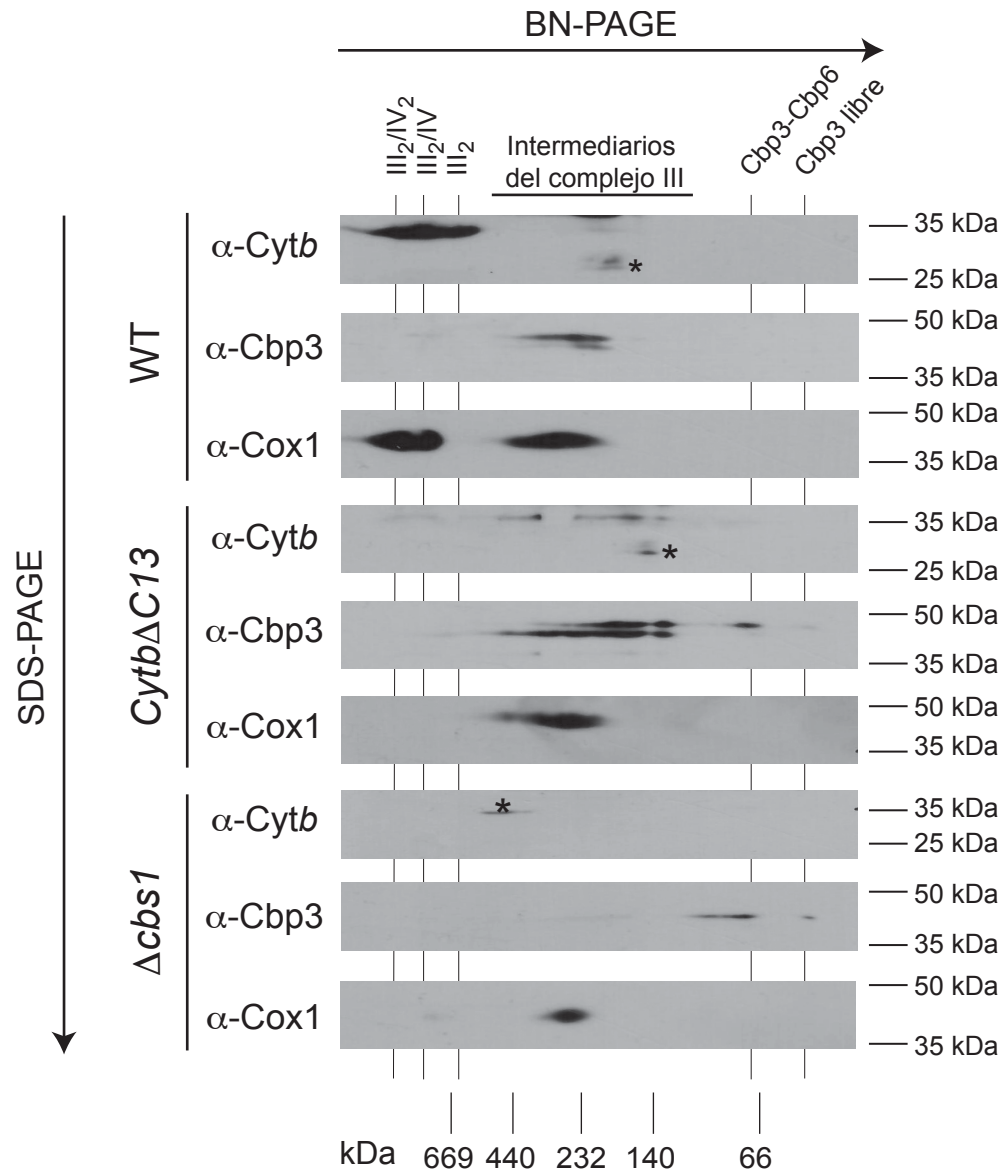


Figura 23. El extremo C-ter de Cytb contribuye a su interacción con Cbp3-Cbp6 para la formación de los intermediarios de ensamblaje. Mitocondrias aisladas (100 μ g) de las cepas WT, *Cytb Δ C13* y Δ *cbs1*, se solubilizaron con 2% de digitonina, se separaron mediante ensayo de electroforesis de segunda dimensión (BN / SDS-PAGE), se transfirieron a una membrana de PDVF y se analizaron mediante inmunodetección a Cytb (α -Cytb), Cbp3 (α -Cbp3) y Cox1 (α -Cox1). Complejo bc_1 (III₂); complejo bc_1 con uno o dos monómeros de la citocromo c oxidasa (III₂ / VI₁ y III₂ / VI₂). El asterisco (*) corresponde a una banda inespecífica.

Posteriormente se analizó el perfil complexómico de Cbp3 y Cbp6 en la mutante del extremo C-ter, porque una ventaja de esta técnica es que es más sensible y de mejor resolución que los ensayos de segunda dimensión.

En la cepa WT se observó que la mayor cantidad de Cbp3 y Cbp6 migro en los intermediarios 0 y I (~121 a 142 kDa) (Figura 24). En la mutante *Cytb* Δ C13 disminuyó la cantidad de Cbp3 y Cbp6 en los intermediarios 0 y I. También se observó en la mutante del extremo C-ter un incremento en la cantidad de Cbp3 y Cbp6 libres, y del complejo Cbp3-Cbp6 (~53 kDa) con respecto a la cantidad de la cepa WT. Estos datos indican que el extremo C-ter de *Cytb* ayuda a la formación de los intermediarios 0 y I. Además, regula la cantidad de Cbp3 y Cbp6 libre y lo que está interactuando con *Cytb* durante la ruta de ensamblaje.

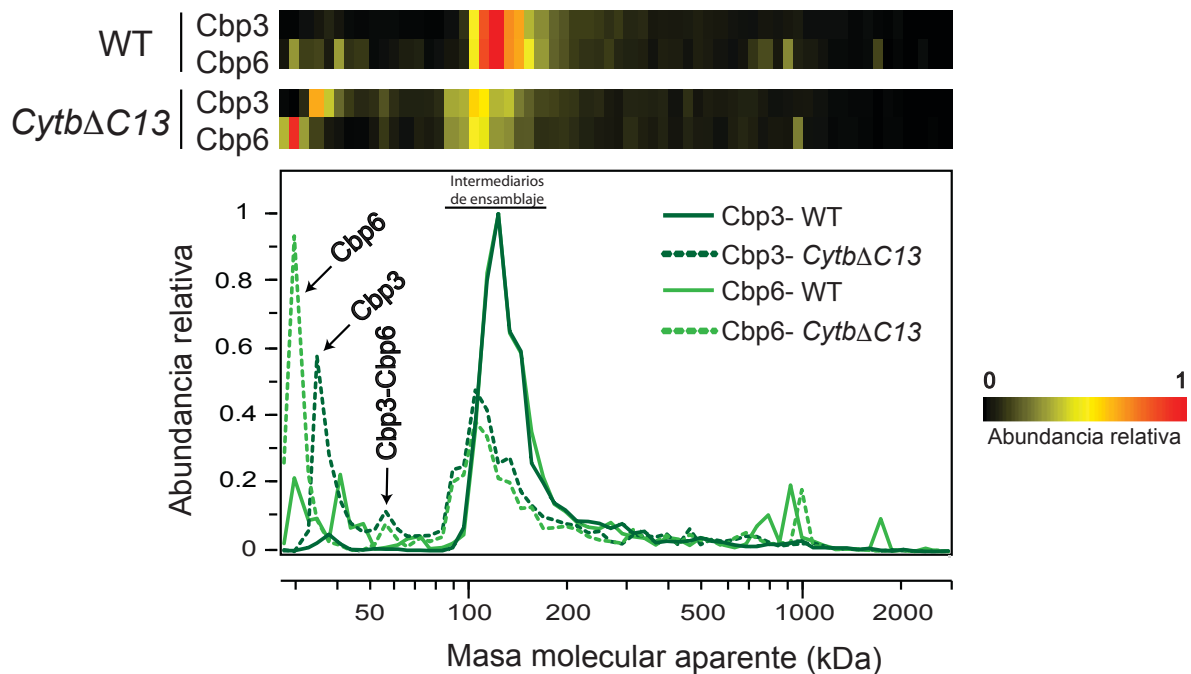


Figura 24. El extremo C-ter de *Cytb* favorece su interacción con Cbp3-Cbp6. Perfil complexómico de Cbp3 y Cbp6. Del lado derecho están las fracciones con complejos de alto peso molecular y del lado izquierdo las de bajo peso molecular. El mapa de calor representa la abundancia relativa para cada proteína. Con línea sólida se representan en la cepa WT y en línea punteada en la mutante del extremo C-ter. Cbp3, Cbp6 son las fracciones libres, Cbp3-Cbp6 es el complejo de

las dos chaperonas y los intermedios de ensamblaje es la región donde migran el intermediario 0 y I.

El extremo C-ter de *Cytb* fomenta el ensamblaje de los primeros intermediarios

Cytb es la primera subunidad en ensamblarse en la membrana interna e interactúa con Cbp3-Cbp6 y se forma el intermediario 0 para que *Cytb* adquiera su primer grupo hemo *b*. Posteriormente se incorpora Cbp4, se forma el intermediario I y *Cytb* adquiere su segundo grupo hemo *b*. Cuando *Cytb* está hemilado, pierde afinidad por Cbp3 y Cbp6, para que se incorporen las subunidades Qcr7 y Qcr8 y formen el intermediario II (Hildenbeutel *et al*, 2014).

Se observó en el perfil complexómico que *Cytb* tiene poca abundancia en la región de 40 a 400 kDa (Figura 20); en esa región se observó la mayor abundancia de Cbp3-Cbp6 que corresponden a los primeros intermediarios de ensamblaje (Figura 24). Nos preguntamos si las señales comigran y si es posible identificar cada uno de los diferentes intermediarios. Por lo tanto, se graficaron todas proteínas que forman los intermediarios 0, I y II (*Cytb*, Cbp3, Cbp6, Cbp4, Qcr7 y Qcr8) y se inspeccionó la región de 40 a 400 kDa, en la cepa WT y en la mutante *Cytb*ΔC13 (Figura 25).

En la cepa WT no se observó que comigren *Cytb*, Cbp3 y Cbp6 que corresponde al intermediario 0 en aproximadamente 97 kDa, esto puede deberse a su poca abundancia o está enmascarado por la señal vecina (Figura 25A; Tabla 5,6). El intermediario I se observó a 115 kDa donde comigraron *Cytb*, Cbp3, Cbp6 y Cbp4; para el intermediario II se observó a 91 kDa donde comigraron *Cytb*, Cbp4, Qcr7 y Qcr8.

En el perfil se observaron dos máximos de mayor peso molecular a 124 y 144 kD, uno donde comigraron *Cytb*, *Cbp3*, *Cbp6* y en otro *Cytb*, *Cbp4*, *Cbp3* y *Cbp6*; curiosamente se observó que *Qcr7* y *Qcr8* comigran con estos picos de mayor peso molecular, esto sugiere que se podrían estar formando los intermediarios que llamamos 0^{7,8} y I^{7,8} (Figura 25A; Tablas 5,6). Estos nuevos intermediarios no se habían reportado, pero gracias a la alta resolución del perfil complexómico se logró observar. Pensamos que son estados transitorios de ensamblaje entre los diferentes intermediarios reportados.

Proteínas	Peso Molecular Aprox. (kDa)
<i>Cytb</i>	43.7
<i>Cbp3</i>	34.4
<i>Cbp6</i>	18.5
<i>Cbp4</i>	17.5
<i>Qcr7</i>	14.6
<i>Qcr8</i>	11.0
<i>Cytb</i> ΔC13	42.1

Tabla 5. Pesos moleculares de las proteínas involucradas en los intermediarios de ensamblaje. Los pesos moleculares de las proteínas codificadas en el núcleo sin presecuencia mitocondrial (*Cbp3*, *Cbp6*, *Cbp4* y *Qcr8*).

Intermediario	Subunidades	Peso teórico (kDa)	Peso experimental (kDa)	Diferencia
0 ^{7,8}	<i>Cytb</i> , <i>Cbp3</i> , <i>Cbp6</i> , <i>Qcr7</i> , <i>Qcr8</i>	123	124	1
I	<i>Cytb</i> , <i>Cbp3</i> , <i>Cbp6</i> , <i>Cbp4</i>	115	115	0
I ^{7,8}	<i>Cytb</i> , <i>Cbp3</i> , <i>Cbp6</i> , <i>Cbp4</i> , <i>Qcr7</i> , <i>Qcr8</i>	141	144	3
II	<i>Cytb</i> , <i>Cbp4</i> , <i>Qcr7</i> , <i>Qcr8</i>	87	91	4

Tabla 6. Pesos moleculares de los intermediarios de ensamblaje en la cepa WT. Peso molecular teórico de los diferentes intermediarios. Peso experimental, corresponde a la masa molecular aparente donde comigran los intermediarios (Figura 25A). Cada una de las fracciones se calibró su masa molecular aparente de acuerdo a complejos conocidos, se considera significativa una variación de ± 10 kDa entre en peso teórico y el experimental, que corresponde al error experimental.

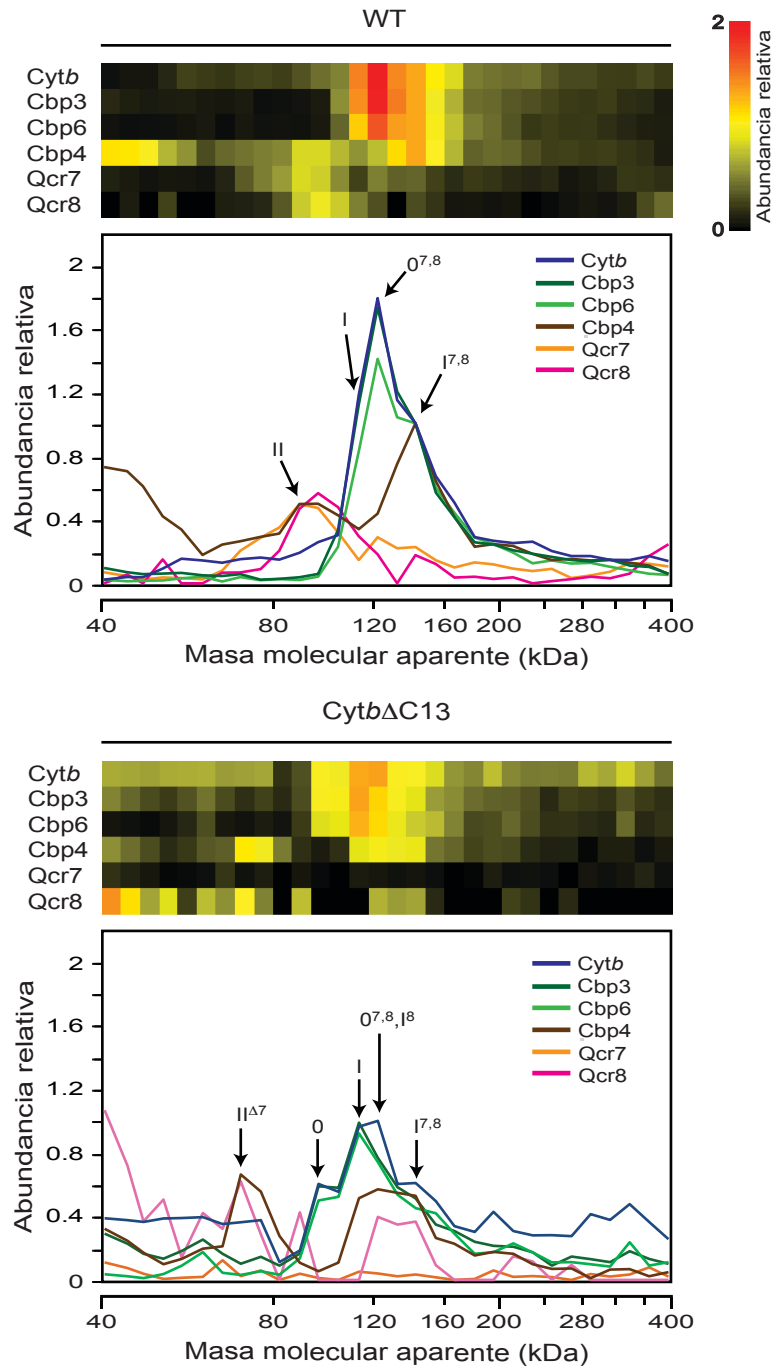


Figura 25. El extremo C-ter aumenta la formación de los primeros intermediarios de ensamblaje del complejo *bc₁*. A) Perfil complexómico de las proteínas que están involucradas en la formación de los primeros intermediarios de ensamblaje (Cytb, Cbp3, Cbp6, Cbp4, Qcr7 y Qcr8) en la cepa WT y B) en la mutante del extremo C-ter *Cytb Δ C13*.

Se observó en el perfil complexómico de la mutante *Cytb*ΔC13, los intermediarios 0 y I (Tabla 7), se ven los nuevos intermediarios 0^{7,8} y I^{7,8}. Todos los intermediarios tienen una menor abundancia en comparación a la cepa WT, indicando que el extremo C-ter aumenta la cantidad de cada uno de los intermediarios de ensamblaje.

En la mutante se formaron dos nuevos intermediarios sin Qcr7, el intermediario I⁸ (*Cytb*, Cbp3, Cbp6, Cbp4, Qcr8) y el intermediario II^{Δ7} (*Cytb*, Cbp4, Qcr8). Esta indica que el extremo C-ter de *Cytb* se necesita para que Qcr7 forme parte de los primeros intermediarios de ensamblaje (Tabla 7; Figura 25B).

Intermediario	Subunidades	Peso teórico (kDa)	Peso experimental (kDa)	Diferencia
0	<i>Cytb</i> , Cbp3, Cbp6	95	98	3
0 ^{7,8}	<i>Cytb</i> , Cbp3, Cbp6, Qcr7, Qcr8	121	124	3
I	<i>Cytb</i> , Cbp3, Cbp6, Cbp4	113	115	2
I ⁸	<i>Cytb</i> , Cbp3, Cbp6, Cbp4, Qcr8	124	124	0
I ^{7,8}	<i>Cytb</i> , Cbp3, Cbp6, Cbp4, Qcr7, Qcr8	139	144	5
II ^{Δ7}	<i>Cytb</i> , Cbp4, Qcr8	71	72	1

Tabla 7. Pesos moleculares de los intermediarios de ensamblaje en la mutante *Cytb*ΔC13.

Peso molecular teórico de los diferentes intermediarios. Peso experimental, corresponde a la masa molecular aparente donde comigran los intermediarios (Figura 25B).

El extremo C-ter de *Cytb* es útil para la formación de los intermediarios 0 y I, y es esencial en la formación del intermediario II. Estos datos sugieren que existen diferentes estados de ensamblaje donde podrían estar Qcr7 y Qcr8 en los intermediarios 0 y I. Sugerimos que el extremo C-ter regula: las diferentes etapas de ensamblaje, la liberación de Cbp3-Cbp6 y la llegada de Qcr7 y Qcr8. El extremo C-ter de *Cytb* es esencial para su interacción con Qcr7.

Los aminoácidos de Cbp3 que analizamos no interactúan con el extremo C-ter de *Cytb*

Los últimos 13 aminoácidos del extremo C-ter de *Cytb* ayudan a su interacción con Cbp3 para favorecer la maduración y regulación de la síntesis de *Cytb* (Figura 22A, 22B, 23 y 24). El grupo del Dr. Martin Ott encontró 5 aminoácidos de Cbp3 (Gln-183, Lys-185, Asp-188, Glu-195 y Lys-215) que interactúan con *Cytb* mediante ensayos de entrecruzamiento fotoreactivo (Ndi *et al*, 2019). Se encontraron aminoácidos con carga positiva y negativa que podrían interactuar con algún aminoácido cargado del extremo C-ter de *Cytb*.

Nos preguntamos si alguno de estos aminoácidos interactúa con el extremo C-ter de *Cytb*. Se decidió analizar la interacción de algunos aminoácidos de Cbp3 con *Cytb* en la mutante del extremo C-ter mediante entrecruzamiento fotoreactivo. La técnica consiste en agregar un aminoácido modificado llamado *para*-aminobezoilo fenilalanina (pBpa), en una posición específica de Cbp3. El codón de paro amber^{UAG} codifica para el pBpa. El grupo del Dr. Ott generó versiones de Cbp3 con el codón paro en diferentes posiciones. El pBpa en presencia de luz UV forma un enlace covalente con aminoácidos de proteínas cercanas (Ndi *et al*, 2019). En la cepa WT y *Cytb* Δ C13, se expresaron plásmidos de *CBP3HIS7* que contienen al codón de paro amber^{UAG} en la posición de la Lys-185, Asp-188 y Lys-215, como control negativo a *CBP3HIS7* (WT) sin codón de paro.

El primer paso fue integrar en el genoma nuclear al tRNA y la aminoacil-tRNA sintetasa específica para pBpa. Posteriormente, se expresó un plásmido que contiene a Cbp3-His7 con el codón de paro. Las células se crecieron en un medio con pBpa para que se integre en la posición del codón de paro amber^{UAG} y continúe la síntesis de Cbp3. Posteriormente, se marcó la síntesis de proteínas mitocondriales con ³⁵S-metionina en presencia de cicloheximida para aumentar la sensibilidad de detección de *Cytb*. Se incubaron las células con luz UV para generar el entrecruzamiento fotoreactivo. Se lisaron las células y los productos del entrecruzamiento fotoreactivo se purificaron con Ni-NiNta agarosa, posteriormente los productos se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF. Se analizó a *Cytb* por autorradiografía y a Cbp3His7 (α -Cbp3) por inmunodetección.

Previamente se reportó el producto del entrecruzamiento fotoreactivo de *Cytb* con Cbp3His7 en ~64 kDa (*Cytb*-Cbp3His7) (Ndi *et al*, 2019). Al expresar a Cbp3His7 sin codón de stop en ambas cepas, se observaron productos del entrecruzamiento fotoreactivo en la fracción del eluido y solo se detectaron algunas proteínas mitocondriales marcadas radiactivamente. En las diferentes versiones de Cbp3 (Lys-185, Asp-188 y Lys-215) tanto en la cepa WT y en la mutante *Cytb* Δ C13, se observó el producto del entrecruzamiento fotoreactivo por autorradiografía entre *Cytb* y Cbp3His7 en ~64 kDa (Figura 26A), como se reportó. Fue complicado detectar el producto del entrecruzamiento fotoreactivo entre *Cytb* y Cbp3His7 en la inmunodetección por las bandas inespecíficas del anticuerpo (Figura 26B). Además, Cbp3His7 formó un enlace covalente con otras proteínas durante el entrecruzamiento fotoreactivo. Sin embargo, estos resultados sugieren que el extremo carboxilo terminal de *Cytb* no es la región donde interactúan los aminoácidos de Cbp3 que analizamos.

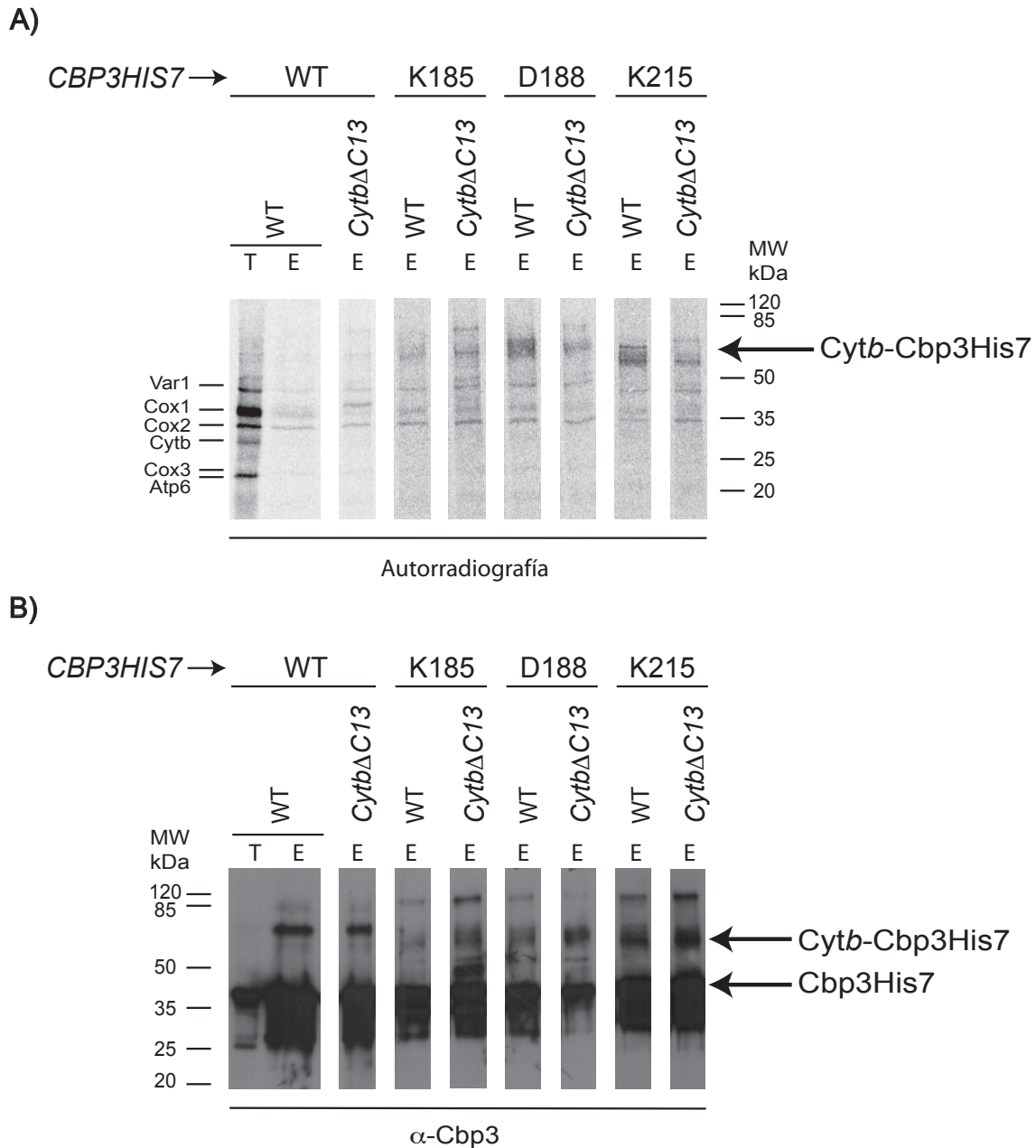


Figura 26. Los aminoácidos que analizamos de Cbp3 no interactúan con el extremo C-ter de *Cytb*. Cada cepa contiene las diferentes versiones de *CBP3-HIS7*. Las células se cultivaron en presencia de pBpa. Las proteínas mitocondrias se marcaron radiactivamente con ³⁵S-metionina en presencia de cicloheximida. Las células se expusieron a luz-UV para el entrecruzamiento fotoreactivo. Las células se lisaron y Cbp3-His7 se inmunoprecipitó con agarosa de Ni-NiNta. La fracción total 5% (T) y el inmunoprecipitado 95% (E) se trató con TCA (ácido tricloroacético). Los productos se separaron por SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de PVDF y se analizaron por autorradiografía y por inmunodetección a Cbp3 (α-Cbp3). *Cytb-Cbp3his7* corresponde a la interacción entre ambas proteínas.

Discusión

El extremo C-ter de *Cytb* regula la biogénesis del complejo bc_1 . Se encontró que el C-ter de *Cytb* es esencial para la interacción con Cbp3-Cbp6 para la hemilación y regulación de la síntesis de *Cytb*, además de ser vital para el ensamblaje del complejo bc_1 .

Para el proceso de hemilación de *Cytb* se necesita de Cbp3-Cbp6 y Cbp4 (Gruschke *et al*, 2011; Hildenbeutel *et al*, 2014; García-Guerrero *et al*, 2018), y los resultados de este trabajo sugieren que el extremo C-ter podría ayudar a que *Cytb* adquiriera sus grupos hemo tipo *b*. Proponemos que el extremo C-ter induce cambios conformacionales en todas sus hélices, esto podría provocar que las hélices 2 y 4 puedan estar cerca para que se ensamblen los grupos hemo tipo *b*.

Se propone que cuando *Cytb* se hemila adquiere la conformación correcta para que puedan ensamblarse las subunidades que forman el complejo bc_1 funcional (Stephan y Ott, 2020). Posiblemente al no hemilarse *Cytb* por la falta del extremo C-ter, se pueden ensamblar las subunidades Qcr7 y Qcr8, pero no se forma el complejo bc_1 .

La región N-ter de Qcr7 entre los 8 y 15 aminoácidos favorecen el ensamblaje y función del complejo bc_1 en levadura (Lee *et al*, 2001). En este trabajo los resultados indican que al menos los últimos 8 aminoácidos del extremo C-ter de *Cytb* son esenciales para la biogénesis del complejo bc_1 . El C-ter de *Cytb* es una región hidrofílica que se localiza hacia la matriz mitocondrial y necesita estar protegida en todo momento primero por Cbp3-Cbp6 y luego por Qcr7.

Curiosamente, el extremo C-ter de Citocromo *b* (MTYCB) en humano es 5 aminoácidos más pequeño, y también el extremo N-ter de Qcr7 (UQCRB) tiene aproximadamente 9 aminoácidos menos que en levadura, indicando que al ser más pequeño el C-ter necesita de menos aminoácidos de Qcr7 para estar protegido. En

la estructura cristalográfica del complejo bc_1 en humano (PDB 5XTE, Guo *et al*, 2017) observamos que el C-ter de *Cytb* y el N-ter de *Qcr7* interactúan, indicando que el extremo C-ter de *Cytb* necesita estar protegido por *Qcr7* para formar un intermediario de ensamblaje estable, para que se ensamblen el resto de las subunidades que forman el complejo bc_1 .

En humano los ortólogos de *Cbp3* y *Cbp6* (UQCC1 y UQCC2), sirven para la síntesis y estabilidad de Citocromo *b* (MTCYB), y para el ensamblaje del complejo bc_1 ; no se sabe si existe un mecanismo de regulación de la síntesis de Citocromo *b* como ocurre en levadura (Tucker *et al*, 2013). Posiblemente el extremo C-ter de Citocromo *b* en humano ayuda a su interacción con UQCC1 y UQCC2 para la biogénesis del complejo bc_1 .

El extremo C-ter de *Cytb* no es necesario para la síntesis de *Cytb*, pero sí para su estabilidad. Es probable que el ensamblaje se quede atascado porque una parte de *Cytb* se queda interactuando con *Cbp3*-*Cbp6*, por ello se logró detectar una menor cantidad de *Cytb* en las mutantes del C-ter. Sin embargo, en cierto punto las proteasas mitocondriales degradan a *Cytb*.

Una sugerencia es que el extremo C-ter de *Cytb* regula la cantidad de *Cbp3*-*Cbp6* que se encuentran formando los intermediarios y la cantidad *Cbp3*-*Cbp6* disponible para activar nuevas rondas de traducción porque al eliminarlo se pierde el equilibrio de *Cbp3*-*Cbp6* y se observa una mayor cantidad de *Cbp3*-*Cbp6* libre que está activando constitutivamente la síntesis de *Cytb*.

Cbp4 interactúa con *Cytb* después de adquirir su primer grupo hemo *b* (Hildenbeutel *et al*, 2014). En ausencia del extremo C-ter se forma un intermediario donde están: *Cytb* y *Cbp4*, y dos intermediarios donde están *Cytb*, *Cbp3*, *Cbp6* y *Cbp4*. Estos datos sugieren que el C-ter induce la correcta interacción de *Cbp4* con *Cytb*. En ausencia del extremo C-ter, *Cbp4* puede interactuar con *Cytb* aunque no tenga su primer grupo hemo *b*. Es posible que el intermediario de *Cytb* y *Cbp4* se pudiera

formar porque Cbp3-Cbp6 se liberan del intermediario o Cbp4 puede interactuar con *Cytb* independientemente de Cbp3-Cbp6.

El grupo del Dr. Martin Ott encontró por entrecruzamiento fotoreactivo 5 aminoácidos de Cbp3 que interactúan con *Cytb*, que tienen cargas positivas y negativas (Ndi *et al*, 2019), y podrían estar interactuando con algún aminoácido cargado del extremo C-ter de *Cytb*. En ausencia del extremo C-ter estos aminoácidos continúan interactuando con *Cytb*, indicando que podrían ser otros los aminoácidos de Cbp3 que interactúan específicamente con el extremo C-ter de *Cytb*. Será interesante mapear cuál aminoácido o región de Cbp3 interactúa con el extremo C-ter, o podría existir una proteína que ayude a la interacción entre Cbp3-Cbp6 y *Cytb*, porque en ausencia del extremo C-ter se forman intermediarios aberrantes y la cantidad de Cbp3-Cbp6 libre se incrementa.

La síntesis de *Cytb* se regula cuando hay defectos en la hemilación de *Cytb* y el ensamblaje del complejo *bc₁*, provocando que Cbp3-Cbp6 se secuestran en un intermediario con *Cytb* impidiendo que se activen nuevas rondas de su traducción (Gruschke *et al*, 2012; Hildenbeutel *et al*, 2014); encontramos que el extremo C-ter de *Cytb* es el sitio donde estas chaperonas se secuestran como mecanismo de regulación. El extremo C-ter de Cox1 está involucrado en: regular su propia síntesis, la formación y estabilidad de los supercomplejos. Mss51 interactúa con el extremo C-ter de Cox1 y cuando hay defectos en el ensamblaje de la CcO, Mss51 se secuestra en el C-ter para regular la síntesis de Cox1 (Shingú-Vázquez *et al* 2010; García-Villegas *et al*, 2017). Mss51 es el encargado de modular la síntesis de Cox1 y funciona como Cbp3-Cbp6 para *Cytb*, curiosamente al eliminar el extremo C-ter de Cox1 y de *Cytb* se abate el mecanismo de regulación de su síntesis.

Este mecanismo es característico del complejo *bc₁* y CcO. La síntesis de *Cytb* y Cox1 son blancos de regulación cuando hay defectos en el ensamblaje, lo que sugiere que es más fácil para la célula detener la biogénesis de los complejos en este punto, porque *Cytb* y Cox1 son las primeras subunidades en sintetizarse ya

que están codificadas en el genoma mitocondrial y son las primeras subunidades de los complejos en ensamblarse. Surge la pregunta de si este mecanismo podría existir para otros complejos respiratorios que tengan subunidades codificadas en el genoma mitocondrial.

Estos no son los únicos casos reportados donde el extremo C-ter de una proteína regula su propia síntesis. El citocromo *b6F* en los cloroplastos de *Chlamydomonas reinhardtii* es un complejo que tiene analogía al complejo *bc₁* en levadura donde se lleva a cabo el ciclo Q, está formado por citocromo f (*petA*), citocromo b6 (*petB*), la subunidad IV (*petD*) y una proteína fierro-sulfurada de rieske (*petC*) (Wollman FA, 1998). La síntesis de citocromo f está sometida a un mecanismo de regulación negativa de su síntesis por defectos en el ensamblaje del complejo *b6f*. El extremo C-ter de citocromo f interactúa directamente o indirectamente con la región 5'UTR del mRNA de *petA* para regular su propia síntesis (Choquet *et al*, 1998; Choquet *et al*, 2003). Se sugiere que podrían existir dos mecanismos uno donde el extremo C-ter de citocromo f interactúa con la región del 5'UTR del mRNA de *petA* y el otro donde el extremo C-ter de citocromo f secuestra al activador traduccional de *petA* llamado TCA1 para regular su traducción, pero no se conoce aún el mecanismo (Choquet *et al*, 1998).

El extremo C-ter de Cox1 no es esencial para la formación y función de la CcO, porque al eliminarlo las células conservan la capacidad respiratoria (Shingú-Vázquez *et al* 2010; García-Villegas *et al*, 2017). En contraste el extremo C-ter de Cytb es esencial para la biogénesis del complejo *bc₁*, ya que al eliminarlo las células pierden su capacidad respiratoria.

En este trabajo encontramos que el C-ter de Cytb es esencial para que se lleve a cabo la hemilación de Cytb, la regulación de la síntesis de Cytb y el ensamblaje del complejo *bc₁*. Será interesante estudiar más a fondo estos mecanismos para conocer más sobre la biogénesis del complejo *bc₁*.

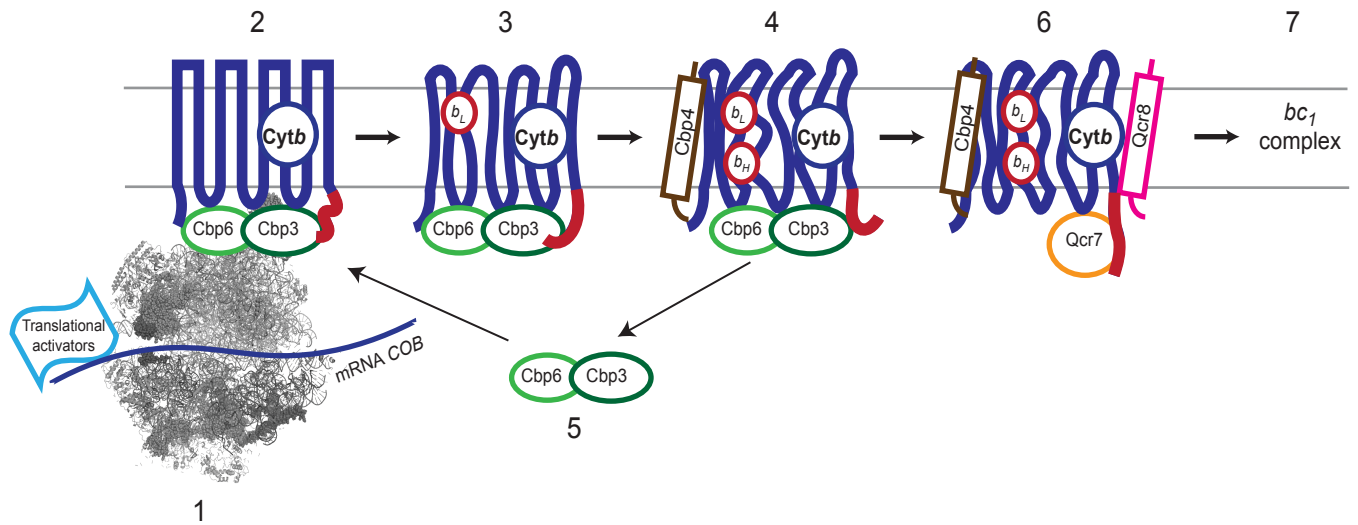


Figura 27. Funciones del extremo C-ter de *Cytb*:

- 1) Para la traducción del mRNA de *COB* se requiere de activadores traduccionales específicos (Cbs1 y Cbs2), y de las chaperonas Cbp3-Cbp6. El extremo C-ter no se necesita para la síntesis de *Cytb*.
- 2) Las chaperonas Cbp3-Cbp6 se localizan en el túnel de salida del péptido en el mitorribosoma e interactúan con *Cytb* recién sintetizado. Sugerimos que el extremo C-ter de *Cytb* podría favorecer un estado conformacional relajado de *Cytb* para fomentar la hemilación de *Cytb*. En la mutante del C-ter las chaperonas Cbp3-Cbp6 interactúan con *Cytb*, pero la interacción podría ser ineficiente para favorecer un estado relajado que promueva la hemilación.
- 3) Se forma el intermediario 0 (*Cytb*, Cbp3, Cpp6) y posiblemente el intermediario que llamamos 0^{7,8} (*Cytb*, Cbp3, Cpp6, Qcr7 y Qcr8) intermediario no mostrado en la figura. *Cytb* adquiere su primer grupo hemo *b_L*. En la mutante del C-ter sugerimos que el *Cytb* no adquiere su primer grupo hemo *b_L* y se forman el intermediario 0 y el intermediario 0^{7,8}.
- 4) Cbp4 interactúa con *Cytb* se forma el intermediario I (*Cytb*, Cbp3, Cpp6, Cbp4) y posiblemente el intermediario que llamamos I^{7,8} (*Cytb*, Cbp3, Cpp6, Cbp4, Qcr7 y Qcr8) intermediario no mostrado en la figura. Se incorpora el segundo grupo hemo *b_H*, provocando un cambio conformacional importante del extremo C-ter de *Cytb* para que Cbp3-Cbp6 se liberen. En la mutante del extremo C-ter, Cbp4 puede interactuar con *Cytb* aunque posiblemente no este hemilando; se forma el intermediario I, el intermediario I^{7,8} y se genera una nueva población que llamamos intermediario I⁸ (*Cytb*, Cbp3, Cpp6, Cbp4 y Qcr8) sin Qcr7 intermediario no mostrado en la figura.
- 5) Cbp3-Cbp6 libres pueden ir al ribosoma para activar nuevas rondas de traducción de *Cytb*. En la mutante hay una mayor cantidad de Cbp3-Cbp6 libres que estimula la síntesis constitutiva de *Cytb*, abatiendo el mecanismo de regulación de la síntesis de *Cytb*.
- 6) El extremo C-ter se encuentra en una conformación para favorecer su interacción con el N-ter de Qcr7 y posteriormente se ensambla Qcr8, para formar el intermediario II (*Cytb*, Cbp4, Qcr7 y Qcr8).

En la mutante del C-ter la subunidad Qcr7 no interactúa con *Cytb*, pero la subunidad Qcr8 interactúa formando el intermediario que llamamos II $\Delta 7$ (*Cytb*, Cbp4 y Qcr8) intermediario no mostrado en la figura.

(7) se incorporan las demás subunidades para formar el complejo *bc₁*. En la mutante del C-ter el resto de las subunidades no pueden ensamblarse y no se forma el complejo *bc₁*.

Conclusiones

1. Los últimos 8 aminoácidos del extremo C-ter de *Cytb* de levadura, son esenciales para la biogénesis del complejo *bc₁*.
2. El extremo C-ter favorece la estabilidad de *Cytb*.
3. El extremo C-ter de *Cytb* probablemente favorezca la hemilación de *Cytb*.
4. El extremo C-ter de *Cytb* es necesario para el ensamblaje del complejo *bc₁* y la formación de los supercomplejos.
5. El extremo C-ter ayuda a coordinar las primeras etapas de ensamblaje del complejo *bc₁*.
6. El extremo C-ter de *Cytb* está involucrado en la regulación de su propia síntesis.
7. El extremo C-ter de *Cytb* es necesario para su interacción con Cbp3-Cbp6.
8. El extremo C-ter de *Cytb* es esencial para la biogénesis del complejo *bc₁*.

Perspectivas

Conocer más sobre la biogénesis del complejo *bc₁* y la función del extremo C-ter de *Cytb*.

- Determinar si la función del C-ter está conservada en humano, será interesante estudiar mutantes del C-ter de *Cytb* en cultivos celulares, buscando pacientes que tenga alguna mutación en los últimos aminoácidos del C-ter.

- Identificar los aminoácidos de Cbp3 o Cbp6 que interactúan específicamente con el C-ter de *Cytb*, con el método de entrecruzamiento fotoreactivo o con la estructura por Cryo-EM del intermediario 0 o I.
- Estudiar el mecanismo de hemilación de *Cytb*, lo único que conocemos es que se requiere de las chaperona Cbp3-Cbp6 y del C-ter. Es posible que existan otras proteínas que favorecen la hemilación de *Cytb*, o el C-ter le da una conformación estable para que pueda hemilarse. Hay que buscar proteínas candidatas que podrían ayudar en este proceso, un método podría ser la búsqueda de revertantes. Si es un proceso espontáneo que depende de un estado relajado, podrían realizarse dinámicas moleculares para predecir estados favorables de *Cytb* para su hemilación.
- Estudiar más a fondo el ensamblaje de los primeros intermediarios del complejo *bc₁*, ya que posiblemente existan más proteínas involucradas. Observamos la formación de los nuevos estados de ensamblaje, sugiriendo que el ensamblaje es un proceso muy dinámico y está coordinado por la correcta conformación de *Cytb* en cada etapa. Obtener la estructura por Cryo-EM del intermediario 0 y I podría ayudarnos a comprender más sobre el ensamblaje.
- Es altamente probable que existan más proteínas involucradas en el ensamblaje de los diferentes intermediarios del complejo *bc₁* y en la formación de los supercomplejos. Mediante mutantes de algunas proteínas reportadas que interactúan con las diferentes subunidades del complejo *bc₁*. Ensayos de BioID de cada una de las subunidades del complejo y perfiles complexómicos de mutantes que afecten las diferentes etapas de ensamblaje; se podrían caracterizar nuevas proteínas necesarias para la formación del complejo *bc₁*.

- El C-ter está involucrado en la regulación de su propia síntesis; sin embargo, el mecanismo lo desconocemos. Se sugiere que existen dos proteínas involucradas en este mecanismo, una ya fue encontrada (Martin Ott comunicación personal). Será interesante encontrar la segunda proteína y caracterizarla para comprender a detalle cómo se regula la síntesis de Cytb.

Bibliografia

- Barros MH, McStay GP. Modular biogenesis of mitochondrial respiratory complexes. *Mitochondrion*. 2020;50:94-114.
- Barros MH, Tzagoloff A. Regulation of the heme A biosynthetic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*. 2002;516(1-3):119-123.
- Bestwick M, Khalimonchuk O, Pierrel F, Winge DR. The Role of Coa2 in Hemylation of Yeast Cox1 Revealed by Its Genetic Interaction with Cox10. *Molecular and Cellular Biology*. 2010;30(1):172-185.
- Bonnefoy N, Fox TD. Directed Alteration of *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondrial DNA by Biolistic Transformation and Homologous Recombination. *Methods in Molecular Biology*. Published online 2007:153-166.
- Brzezinski P, Moe A, Ädelroth P. Structure and Mechanism of Respiratory III–IV Supercomplexes in Bioenergetic Membranes. *Chemical Reviews*. 2021;121(15):9644-9673.
- Cabrera-Orefice A, Yoga EG, Wirth C, et al. Locking loop movement in the ubiquinone pocket of complex I disengages the proton pumps. *Nature Communications*. 2018;9(1).
- Choquet Y, Stern DB, Wostrikoff K, Kuras R, Girard-Bascou J, Wollman FA . Translation of cytochrome *f* is autoregulated through the 5' untranslated region of *petA* mRNA in *Chlamydomonas* chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(8):4380-4385.
- Choquet Y, Zito F, Wostrikoff K, WollmanFA. Cytochrome *f* Translation in *Chlamydomonas* Chloroplast Is Autoregulated by its Carboxyl-Terminal Domain[W]. *The Plant Cell*. 2003;15(6):1443-1454.
- Cipollone R, Ascenzi P, Visca P. Common themes and variations in the rhodanese superfamily. *IUBMB Life*. 2007;59(2):51-59.
- Colby G, Wu M, Tzagoloff A. MTO1 Codes for a Mitochondrial Protein Required for Respiration in Paromomycin-resistant Mutants of

Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(43):27945-27952.

- Conte A, Papa B, Ferramosca A, Zara V. The dimerization of the yeast cytochrome bc₁ complex is an early event and is independent of Rip1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2015;1853(5):987-995.
- Dieckmann CL, Staples RR. Regulation of Mitochondrial Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *International Review of Cytology*. Published online 1994:145-181.
- Diekert K, I.P.M. de Kroon A, Kispal G, Lill R. Chapter 2 Isolation and subfractionation of mitochondria from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Cell Biology*. Published online 2001:37-51.
- Fekete Z, Ellis TP, Schonauer MS, Dieckmann CL. Pet127 Governs a 5' → 3' -Exonuclease Important in Maturation of Apocytochrome b mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(7):3767-3772.
- Franco LVR, Su CH, Tzagoloff A. Modular assembly of yeast mitochondrial ATP synthase and cytochrome oxidase. *Biological Chemistry*. 2020;401(6-7):835-853.
- García-Guerrero AE, Camacho-Villasana Y, Zamudio-Ochoa A, Winge DR, Pérez-Martínez X. Cbp3 and Cbp6 are dispensable for synthesis regulation of cytochrome b in yeast mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 2018;293(15):5585-5599.
- García-Villegas R, Camacho-Villasana Y, Shingú-Vázquez MÁ, et al. The Cox1 C-terminal domain is a central regulator of cytochrome c oxidase biogenesis in yeast mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 2017;292(26):10912-10925.
- Geldon S, Fernández-Vizarra E, Tokatlidis K. Redox-Mediated Regulation of Mitochondrial Biogenesis, Dynamics, and Respiratory Chain Assembly in Yeast and Human Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021;9.

- Gilea AI, Ceccatelli Berti C, Magistrati M, et al. *Saccharomyces cerevisiae* as a Tool for Studying Mutations in Nuclear Genes Involved in Diseases Caused by Mitochondrial DNA Instability. *Genes*. 2021;12(12):1866.
- Gruschke S, Kehrein K, Römpler K, et al. Cbp3–Cbp6 interacts with the yeast mitochondrial ribosomal tunnel exit and promotes cytochrome b synthesis and assembly. *Journal of Cell Biology*. 2011;193(6):1101-1114.
- Gruschke S, Römpler K, Hildenbeutel M, et al. The Cbp3–Cbp6 complex coordinates cytochrome b synthesis with bc1 complex assembly in yeast mitochondria. *Journal of Cell Biology*. 2012;199(1):137-150.
- Guerrero-Castillo S, Baertling F, Kownatzki D, et al. The Assembly Pathway of Mitochondrial Respiratory Chain Complex I. *Cell Metabolism*. 2017;25(1):128-139.
- Guo R, Zong S, Wu M, Gu J, Yang M. Architecture of Human Mitochondrial Respiratory Megacomplex I2III2IV2. *Cell*. 2017;170(6):1247-1257.e12.
- Hildenbeutel M, Hegg EL, Stephan K, Gruschke S, Meunier B, Ott M. Assembly factors monitor sequential hemylation of cytochrome b to regulate mitochondrial translation. *Journal of Cell Biology*. 2014;205(4):511-524.
- Hirst J. Mitochondrial Complex I. *Annual Review of Biochemistry*. 2013;82(1):551-575.
- Isaac RS, McShane E, Churchman LS. The Multiple Levels of Mitonuclear Coregulation. *Annual Review of Genetics*. 2018;52(1):511-533.
- Kehrein K, Bonnefoy N, Ott M. Mitochondrial Protein Synthesis: Efficiency and Accuracy. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2013;19(16):1928-1939.
- Krause-Buchholz U, Barth K, Dombrowski C, Rödel G. *Saccharomyces cerevisiae* translational activator Cbs2p is associated with mitochondrial ribosomes. *Current Genetics*. 2004;46(1).
- Krause-Buchholz U, Schöbel K, Lauffer S, Rödel G. *Saccharomyces cerevisiae* translational activator Cbs1p is associated with translationally active mitochondrial ribosomes. *Biological Chemistry*. 2005;386(5).

- Kronekova Z, Rödel G. Organization of assembly factors Cbp3p and Cbp4p and their effect on bc1 complex assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*. 2005;47(4):203-212.
- Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685.
- Lange C, Hunte C. Crystal structure of the yeast cytochrome bc₁ complex with its bound substrate cytochrome c. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(5):2800-2805.
- Lazowska J, Claisse M, Gargouri A, Kotylak Z, Spyridakis A, Slonimski PP. Protein encoded by the third intron of cytochrome b gene in *Saccharomyces cerevisiae* is an mRNA maturase. *Journal of Molecular Biology*. 1989;205(2):275-289.
- Lazowska J, Jacq C, Slonimski PP. Sequence of introns and flanking exons in wild-type and box3 mutants of cytochrome b reveals an interlaced splicing protein coded by an intron. *Cell*. 1980;22(2):333-348.
- Lee SY, Hunte C, Malaney S, Robinson BH. The N-terminus of the Qcr7 Protein of the Cytochrome bc₁ Complex in *S. cerevisiae* May Be Involved in Facilitating Stability of the Subcomplex with the Qcr8 Protein and Cytochrome b. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2001;393(2):215-221.
- Markwell MAK, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry*. 1978;87(1):206-210.
- Mathieu L, Marsy S, Saint-Georges Y, Jacq C, Dujardin G. A transcriptome screen in yeast identifies a novel assembly factor for the mitochondrial complex III. *Mitochondrion*. 2011;11(3):391-396.
- Ndi M, Marin-Buera L, Salvatori R, Singh AP, Ott M. Biogenesis of the bc₁ Complex of the Mitochondrial Respiratory Chain. *Journal of Molecular Biology*. 2018;430(21):3892-3905.
- Ndi M, Masuyer G, Dawitz H, et al. Structural basis for the interaction of the chaperone Cbp3 with newly synthesized cytochrome b during mitochondrial

respiratory chain assembly. *Journal of Biological Chemistry*. 2019;294(45):16663-16671.

- Nelson D, Cox M. 2005. Lehninger Principles of Biochemistry. Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation. 4th edition. Freeman: 690-704.
- Ott M, Amunts A, Brown A. Organization and Regulation of Mitochondrial Protein Synthesis. *Annual Review of Biochemistry*. 2016;85(1):77-101.
- Parey K, Wirth C, Vonck J, Zickermann V. Respiratory complex I - structure, mechanism and evolution. *Current Opinion in Structural Biology*. 2020;63:1-9.
- Perez-Martinez X. Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. *The EMBO Journal*. 2003;22(21):5951-5961.
- Popov L. Mitochondrial biogenesis: An update. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2020;24(9):4892-4899.
- Rathore S, Berndtsson J, Marin-Buera L, et al. Cryo-EM structure of the yeast respiratory supercomplex. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2018;26(1):50-57.
- Roger AJ, Muñoz-Gómez SA, Kamikawa R. The Origin and Diversification of Mitochondria. *Current Biology*. 2017;27(21):R1177-R1192.
- Sagan L. On the origin of mitosing cells. 1967. *The Journal of NIH research : life sciences research and news about the National Institutes of Health and the Alcohol, Drug Abuse, and Mental Health Administration*. 2017;5(3).
- Salvatori R, Kehrein K, Singh AP, et al. Molecular Wiring of a Mitochondrial Translational Feedback Loop. *Molecular Cell*. 2020;77(4):887-900.e5.
- Shingú-Vázquez M, Camacho-Villasana Y, Sandoval-Romero L, Butler CA, Fox TD, Pérez-Martínez X. The Carboxyl-terminal End of Cox1 Is Required for Feedback Assembly Regulation of Cox1 Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(45):34382-34389.

- Singh AP, Salvatori R, Aftab W, et al. Molecular Connectivity of Mitochondrial Gene Expression and OXPHOS Biogenesis. *Molecular Cell*. 2020;79(6):1051-1065.e10.
- Smith PM, Fox JL, Winge DR. Biogenesis of the cytochrome bc₁ complex and role of assembly factors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2012;1817(2):276-286.
- Sousa JS, D'Imprima E, Vonck J. Mitochondrial Respiratory Chain Complexes. *Subcellular Biochemistry*. Published online 2018:167-227.
- Steele DF, Butler CA, Fox TD. Expression of a recoded nuclear gene inserted into yeast mitochondrial DNA is limited by mRNA-specific translational activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996;93(11):5253-5257.
- Stephan K, Ott M. Timing of dimerization of the bc₁ complex during mitochondrial respiratory chain assembly. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2020;1861(5-6):148177.
- Stuart RA. Supercomplex organization of the oxidative phosphorylation enzymes in yeast mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2008;40(5).
- Tabak HF, Grivell LA, Borst P, Attardi G. Transcription of Mitochondrial DNA. *Critical Reviews in Biochemistry*. 1983;14(4):297-317.
- Tsuboi T, Yamazaki R, Nobuta R, et al. The tRNA Splicing Endonuclease Complex Cleaves the Mitochondria-localized CBP1 mRNA. *Journal of Biological Chemistry*. 2015;290(26):16021-16030.
- Tucker EJ, Wanschers BFJ, Szklarczyk R, et al. Mutations in the UQCC1-Interacting Protein, UQCC2, Cause Human Complex III Deficiency Associated with Perturbed Cytochrome b Protein Expression. Moraes CT, ed. *PLoS Genetics*. 2013;9(12):e1004034.
- Wang Q, Li H, Xia Y, Xun L, Liu H. *Saccharomyces cerevisiae* Rhodanese RDL2 Uses the Arg Residue of the Active-Site Loop for Thiosulfate Decomposition. *Antioxidants*. 2021;10(10):1525.

- Weiss-Brummer B, Rödel G, Schweyen RJ, Kaudewitz F. Expression of the split gene *cob* in yeast: Evidence for a precursor of a “maturase” protein translated from intron 4 and preceding exons. *Cell*. 1982;29(2):527-536.
- Wittig I, Braun HP, Schägger H. Blue native PAGE. *Nature Protocols*. 2006;1(1):418-428.
- Wittig I, Karas M, Schägger H. High Resolution Clear Native Electrophoresis for In-gel Functional Assays and Fluorescence Studies of Membrane Protein Complexes. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2007;6(7):1215-1225.
- Wollman FA. (1998) The Structure, Function and Biogenesis of Cytochrome *b₆f* Complexes. In: Rochaix J.D., Goldschmidt-Clermont M., Merchant S. (eds) *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas*. *Advances in Photosynthesis and Respiration*, vol 7. Springer, Dordrecht.
- Yonetani T. Studies on cytochrome oxidase. I. Absolute and difference absorption spectra. *The Journal of biological chemistry*. 1960;235.
- Youle RJ, van der Bliek AM. Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress. *Science*. 2012;337(6098):1062-1065. doi:10.1126/science.1219855
- Zara V, Conte L, Trumpower BL. Biogenesis of the yeast cytochrome *bc₁* complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2009;1793(1):89-96.

Publicaciones derivadas de mi trabajo de Doctorado

- **Mitochondrial splicing in *Saccharomyces cerevisiae*.** Daniel Flores-Mireles, Yolanda Camacho-Villasana, Aldo E. García-Guerrero and Xochitl Pérez-Martínez. *In preparation*.
- **The *ARG8* reporter for the study of yeast mitochondrial translation.**, Daniel Flores-Mireles, Yolanda Camacho-Villasana and Xochitl Pérez-Martínez. "The mitoribosome: methods and protocols, From the Lab protocol series Methods in Molecular Biology, by Springer Nature. *In press*.
- **Aim 11 is a novel chaperone to assembly of Cytochrome c oxidase.** Daniel Flores-Mireles, Ulrik Hiram Pedroza Dávila, Yolanda Camacho-Villasana, Alfredo Cabrera-Orefice, Madhurya Lutikurti, Ulrich Brandt and Xochitl Pérez-Martínez. *In preparation*.
- **Rdl2 is part of the synthesis and regulation of *Cytb*.** Daniel Flores Mireles, Yolanda Camacho Villasana, Andreas Carlström, Martin Ott and Xochitl Pérez. *In preparation*.
- **Study of Complex II biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*.** Ulrik Hiram Pedroza Dávila, Daniel Flores Mireles, Yolanda Camacho Villasana, Alfredo Cabrera Orefice, Madhurya Lutikurti, Ulrich Brandt and Xochitl Pérez Martínez. *In preparation*.

Apéndice 1

Tablas de plásmidos y cepas de *S. cerevisiae*

Tabla 8. Plásmidos

Nombre	Características	Referencia
pDM8	Contiene Cbp3-HA en pRS315 subclonado con Hind III y SacI.	Este trabajo.
pRS403-pBpa	pRS403 contiene a pBpa-RS y tRNA _{CUA}	Ndi <i>et al</i> , 2019
pYX142, Q183	pYX142- Cbp3His7- Gln-183 _{TAG}	Ndi <i>et al</i> , 2019
pYX142, K185	pYX142- Cbp3His7- Lys-185 _{TAG}	Ndi <i>et al</i> , 2019
pYX142, D188	pYX142- Cbp3His7- Asp-188 _{TAG}	Ndi <i>et al</i> , 2019
pYX142, E195	pYX142- Cbp3His7- Glu-195 _{TAG}	Ndi <i>et al</i> , 2019
pYX142, K215	pYX142- Cbp3His7- Lys-215 _{TAG}	Ndi <i>et al</i> , 2019

Tabla 9. Cepas

Nombre	Genotipo	Referencia
DFM2	Mata, <i>arg8::URA3, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, COX1(delta1), cob::ARG8m, BY4742, [rho⁺]</i> .	García-Guerrero <i>et al</i> , 2018.
DFM9	Mata, <i>arg8::URA3, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, COX1(delta1), COB intronless (delta C-ter 13), BY4742, [rho⁺]</i> .	Este trabajo.
DFM10	Mata, <i>arg8::URA3, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, COX1(delta1), COB intronless (delta C-ter 8), BY4742, [rho⁺]</i> .	Este trabajo.
AGG46 *	Mata, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3-112, [rho⁺], D273-10b, cbp3Δ::KANMX⁴</i> .	García-Guerrero <i>et al</i> , 2018.

AGG59	Mata, <i>his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, BY4742, [rho⁺], cbp6Δ::LEU2.</i>	García-Guerrero <i>et al</i> , 2018.
AGG76	Mata, <i>arg8::URA3, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, COX1(deltai), COB(1-385)::pARG8m, BY4742, [rho⁺], cbs1Δ::HIS3.</i>	García-Guerrero <i>et al</i> , 2018.
RRS1 *	Mata, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3-112, rho⁺, D273-10b, [rho⁺], COX1(deltai), qcr7Δ::KANMX⁴.</i>	Generado por Rodrigo Reskala Sánchez en nuestro laboratorio.
AGG58	Mata, <i>his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, BY4742, [rho⁺] cbp3Δ::KANMX⁴.</i>	García-Guerrero <i>et al</i> , 2018.
AGG68	Mata, <i>his3-delta1, leu2-delta0, met15-delta0, ura3-delta0, BY4742, [rho⁺], qcr7Δ::KANMX⁴.</i>	García-Guerrero <i>et al</i> , 2018.
AGG77	Mata, <i>his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, BY4742, [rho⁺], cbs1Δ::URA3.</i>	García-Guerrero <i>et al</i> , 2018.
YCV170	Mata, <i>arg8::URA3, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, COX1(deltai), COB intronless (delta C-ter 13), BY4742, [rho⁺], cbp6Δ::LEU2.</i>	Este trabajo.
YCV167	Mata, <i>arg8::URA3, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, COX1(deltai), COB intronless (delta C-ter 13), BY4742, [rho⁺], qcr7Δ::KANMX⁴.</i>	Este trabajo.

YCV168	<i>Mata</i> , <i>arg8::URA3</i> , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>COX1(deltai)</i> , <i>COB intronless (delta C-ter 13)</i> , <i>BY4742</i> , [<i>rho</i> ⁺], <i>cbs1Δ::HIS3</i> .	Este trabajo.
DFM11	<i>Mata</i> , <i>arg8::URA3</i> , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>COX1(deltai)</i> , <i>COB intronless (delta C-ter 8)</i> , <i>BY4742</i> , [<i>rho</i> ⁺], <i>cbp3Δ::KANMX⁴</i> .	Este trabajo.
DFM12	<i>Mata</i> , <i>arg8::URA3</i> , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>COX1(deltai)</i> , <i>COB intronless (delta C-ter 8)</i> , <i>BY4742</i> , [<i>rho</i> ⁺], <i>cbp6Δ::LEU2</i> .	Este trabajo.
DFM13	<i>Mata</i> , <i>arg8::URA3</i> , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>COX1(deltai)</i> , <i>COB intronless (delta C-ter 8)</i> , <i>BY4742</i> , [<i>rho</i> ⁺], <i>qcr7Δ::KANMX⁴</i> .	Este trabajo.
DFM14	<i>Mata</i> , <i>arg8::URA3</i> , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>COX1(deltai)</i> , <i>COB intronless (delta C-ter 8)</i> , <i>BY4742</i> , [<i>rho</i> ⁺], <i>cbs1Δ::HIS3</i> .	Este trabajo.
BY4742	<i>Mata</i> , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>BY4742</i>	YKO Matx Strain Collection-Glycerol Stocks (Open Biosystems)
NB40-36 ^a *	<i>Mata</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>lys2</i> , <i>ura3-52</i> , <i>D273-10B</i>	Perez-Martinez <i>et al</i> , 2003

DFM16 *	<i>Mata</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>lys2</i> , <i>ura3-52</i> , <i>D273-10B</i> ($\Delta\Sigma$ ai, <i>cob</i> Δ :: <i>ARG8^m</i>)	Este trabajo.
DFM24*	<i>Mata</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>lys2</i> , <i>ura3-52</i> , <i>D273-10B</i> ($\Delta\Sigma$ ai, <i>COB</i> Δ <i>C13</i>)	Este trabajo.
DFM25	<i>Mata</i> , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>lys2-</i> <i>delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>cbp3</i> Δ :: <i>KANMX4</i> , ^d <i>HIS3::pBpa-RS::tRNA^{CUA}</i> (<i>pBpa</i>), <i>BY4742</i>	Este trabajo.
DFM26	<i>Mata</i> , <i>arg8::URA3</i> , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-</i> <i>delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>cbp3</i> Δ :: <i>KANMX4</i> , <i>HIS3::pBpa-</i> <i>RS::tRNA^{CUA}</i> (<i>pBpa</i>), <i>BY4742</i> ($D\Sigma$ ai, <i>COBDC13</i>)	Este trabajo.
AGG26	<i>Mata</i> , <i>arg8::URA3</i> , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-</i> <i>delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>BY4742</i> ($D\Sigma$ ai)	García-Guerrero <i>et al</i> , 2018.
AGG78*	<i>Mata</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>lys2</i> , <i>ura3-52</i> , <i>cbs1</i> Δ :: <i>URA3</i> , <i>D273-10B</i>	García-Guerrero <i>et al</i> , 2018.
YCV169	<i>Mata</i> , <i>arg8::URA3</i> , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-</i> <i>delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>cbp3</i> Δ :: <i>KANMX4</i> , <i>BY4742</i> ($D\Sigma$ ai, <i>COBDC13</i>)	Este trabajo.
YVC171	<i>Mata</i> , <i>arg8::URA3</i> , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-</i> <i>delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>cbs1</i> Δ :: <i>HIS3</i> , <i>BY4742</i> ($D\Sigma$ ai, $D\Sigma$ bi)	Este trabajo.
YCV176	<i>Mata</i> , <i>arg8::URA3</i> , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-</i> <i>delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>cbp3</i> Δ :: <i>KANMX4</i> , <i>BY4742</i> ($D\Sigma$ ai, $D\Sigma$ bi)	Este trabajo.

YCV177	<i>Mata</i> , <i>arg8::URA3</i> , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>qcr7Δ::KANMX4</i> , BY4742 ($\Delta\Sigma$ ai, $\Delta\Sigma$ bi)	Este trabajo.
YCV178	<i>Mata</i> , <i>arg8::URA3</i> , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>cbp6Δ::LEU2</i> , BY4742 ($\Delta\Sigma$ ai, $\Delta\Sigma$ bi)	Este trabajo.
YC173	<i>Mata</i> , <i>arg8::URA3</i> , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>cbp6Δ::LEU2</i> , <i>COX1(deltai)</i> , <i>cob::ARG8m</i> , BY4742, [<i>rho</i> ⁺].	Este trabajo.
YC203	<i>Mata</i> , <i>arg8::URA3</i> , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>mrx4Δ::KANMX4</i> , <i>COX1(deltai)</i> , <i>cob::ARG8m</i> , BY4742, [<i>rho</i> ⁺].	Este trabajo.
YC204	<i>Mata</i> , <i>arg8::URA3</i> , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>rdl2Δ::LEU2</i> , <i>COX1(deltai)</i> , <i>cob::ARG8m</i> , BY4742, [<i>rho</i> ⁺].	Este trabajo.
DFM34	<i>Mata</i> , <i>arg8::URA3</i> , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>cbp6Δ::LEU2</i> , <i>rdl2Δ::KANMX4</i> , <i>COX1(deltai)</i> , <i>cob::ARG8m</i> , BY4742, [<i>rho</i> ⁺].	Este trabajo.
YC206	<i>Mata</i> , <i>arg8::URA3</i> , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>rdl2Δ::LEU2</i> , <i>mrx4Δ::KANMX4</i> , <i>COX1(deltai)</i> , <i>cob::ARG8m</i> , BY4742, [<i>rho</i> ⁺].	Este trabajo.

Tabla 4. Cepas utilizadas. De cada una de las cepas se describen sus características y el genoma mitocondrial se describe entre []. La mayoría de las cepas utilizadas para este estudio se derivan de la cepa BY4742, las que derivan de otra cepa tiene un (*).

Apéndice 2

Medios que se utilizaron para el crecimiento de levadura

YPD 1 L

1% Extracto de levadura 10 g

2% Bacto peptona 20 g

2% Dextrosa 20 g

Para medio solido:

2% Bacto agar 20 g

Esterilizar en autoclave

Medio mínimo 1 L

6.7 g

0.67% Base nitrogenada sin aminoácidos

2% Dextrosa 20 g

Para medio drop-out con deficiencia de algún aminoácido Leer el frasco

Para medio solido:

2% Bacto agar 20 g

Esterilizar en autoclave

YPEG 1 L

10 g

1% Extracto de levadura

2% Bacto peptona 20 g

3% Glicerol	30 mL
3% Etanol	30 mL Agregar después de esterilizar
Adenina	30 mg
Para medio solido:	
2% Bacto agar	20 g
Esterilizar en autoclave	

YPGal 1 L

	10 g
1% Extracto de levadura	
2% Bacto peptona	20 g
2% Galactosa	20 g
Esterilizar en autoclave	

Medio mínimo Gal/-Met 1 L

	6.7 g
0.67% Base nitrogenada sin aminoácidos	
2% Galactosa	20 g
Medio - metionina	0.75 g
Esterilizar en autoclave	

Medio de crecimiento para bacterias

LB para Bacterias 1 L

	5 g
Extracto de levadura	
Bacto Triptona	10 g
NaCl	10 g
Para medio solido:	
Bacto agar	15 g

Para LB-Ampicilina se agregan 100 mg de Ampicilina
Esterilizar en autoclave

Apendice 3

Rdl2 regula la síntesis de Cytb

Introducción

El mecanismo de regulación de la síntesis de *Cytb* es desconocido, lo que conocemos es que están involucrados; Cbp3-Cbp6 y el extremo carboxilo terminal de *Cytb* (C-ter) (Gruschke *et al*, 2012; Hildenbeutel *et al*, 2014; Flores-Mireles *et al*, en preparación). García-Guerrero propuso que existen dos factores desconocidos involucrados en este mecanismo (García-Guerrero *et al*, 2018).

El grupo del Dr. Martin Ott en la Universidad de Estocolmo, Suecia; encontró uno de estos factores desconocidos llamado Mrx4. Está proteína reprime la síntesis de *Cytb* cuando hay defectos en el ensamblaje del complejo *bc₁*. Al eliminar a Mrx4 se abate el mecanismo de regulación traduccional y la síntesis de *Cytb* es constitutiva (Dr. Martin Ott, comunicación personal). Desconocemos la identidad del otro factor, identificarlo podría ayudarnos a comprender cómo es el mecanismo de regulación de la síntesis de *Cytb*.

El Dr. Martin Ott reportó proteínas que interactúan con Cbp3 por un método llamado proximity-dependent biotinylation technique (BioID) acoplado a espectrometría de masas (Singh *et al*, 2020); ellos encontraron que Mrx4 interactúa con Cbp3. Por medio de diferentes experimentos observaron que Mrx4 está involucrada en el mecanismo de regulación de la síntesis de *Cytb* (Dr. Martin Ott, comunicación personal). Al analizar los resultados de BioID publicados, encontramos que Rdl2 también interactúa con Cbp3 y esta proteína podría ser un candidato del factor desconocido.

Al eliminar el extremo C-ter de *Cytb* se pierde el mecanismo de regulación de la síntesis de *Cytb* (Figuras 22A, 22B). Por lo tanto se analizó el perfil complexómico de Rdl2 y Mrx4. Se observó en la cepa WT que comigran ambas proteínas a 55 kDa que corresponde al peso molecular si ambas proteínas interactúan (Figura 1). En la mutante *Cytb* Δ C13 no se observó que comigren Rdl2 y Mrx4, y se observó un enorme pico de Mrx4 libre en 44 kDa. Indicando que cuando se pierde el mecanismo de regulación Mrx4 y Rdl2 ya no podrían interactuar. Rdl2 podría estar involucrado en el mecanismo de regulación de la síntesis de *Cytb*.

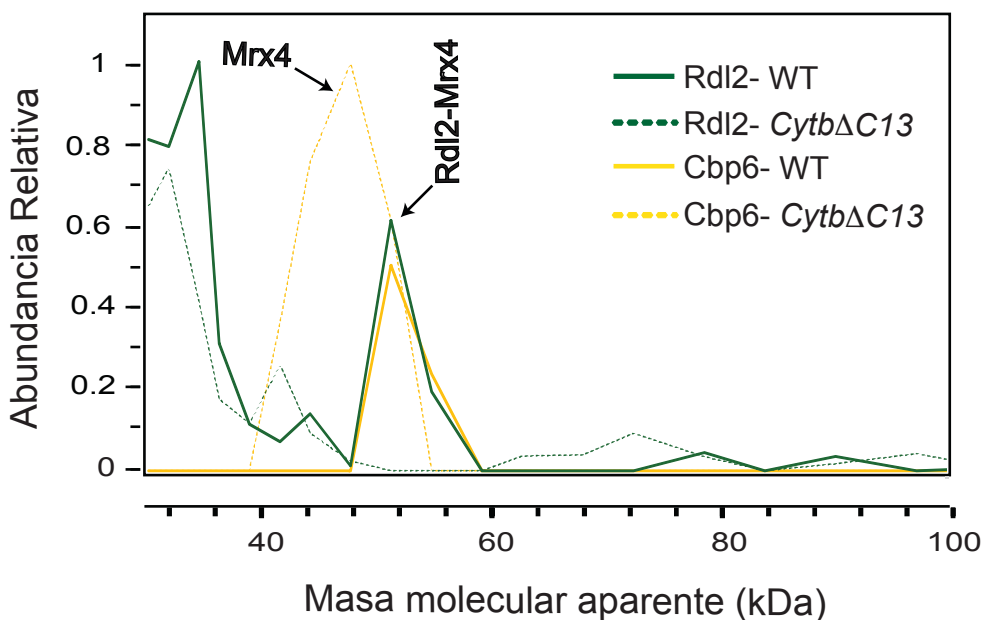


Figura 1. Rdl2 y Mrx4 forman un intermediario de aproximadamente 55 kDa. Perfil complexómico de Rdl2 y Mrx4. Se representó a la cepa WT con línea sólida y con línea punteada a la mutante del extremo C-ter. Mrx4 en su forma libre, Rdl2-Mrx4 forman un complejo de 55 kDa en la cepa WT. Peso molecular de Mrx4 44 kDa y Rdl2 13 kDa.

Rdl2 es una proteína de 13 kDa y tiene pre-secuencia mitocondrial, tiene actividad de rodanasa que cataliza la reacción entre el tiosulfato y la cianida para la formación

de tiocianato y sulfito. Las rodanasas están involucradas en la desintoxicación del cianuro y metabolismo del azufre; probablemente tienen funciones alternativas en el metabolismo del selenio y en la biosíntesis de grupos prostéticos hierro-azufre (Cipollone *et al*, 2007) (Figura 2).

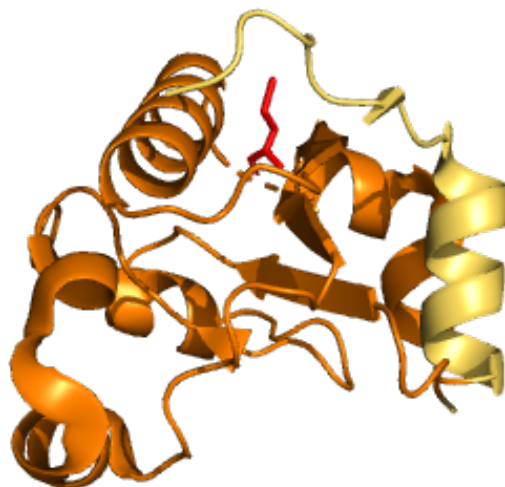


Figura 2. Estructura de Rdl2. En anaranjado es el motivo de rodanasa de Rdl2, en rojo se representa la cisteína conservada que tiene la función catalítica (PBD: 6K6R, Wang *et al*, 2021).

Pensamos que Rdl2 podría regular la síntesis de *Cytb* junto con Mrx4, por qué al afectar la regulación estas proteínas ya no comigran en el perfil complexómico (Figura 1).

Hipótesis

- Rdl2 regula la síntesis de *Cytb*.

Objetivo general

- Demostrar si Rdl2 participa en el mecanismo de regulación de la síntesis de *Cytb*.

Objetivos particulares

- Realizar mutantes nulas de Rdl2 en diferentes cepas que contienen a un gen reportero de la traducción mitocondrial que codifica para arginina (*pARG8^m*).
- Evaluar el crecimiento de las mutantes nulas de Rdl2 ($\Delta rdl2$) en medio sin arginina.
- Evaluar los niveles de arginina por inmunodetección.

Resultados

Se generaron mutantes nulas de $\Delta rdl2$ en una cepa que contiene a *CYTB* reemplazado por el gen reportero de la traducción *pARG8m* (codifica para una enzima esencial en la síntesis de arginina). Este gen reportero es muy utilizado para estudiar la traducción de genes mitocondriales, porque es una proteína soluble, estable y no forma parte de los complejos respiratorios (García-Guerrero *et al*, 2018; Steele *et al*, 1996). Es fácil monitorear mediante inmunodetección a arginina (α -Arg), por crecimiento en medio sin arginina y por ensayos de traducción *in vivo*.

Se generó la mutante sencilla de Rdl2 y mutantes dobles con las proteínas involucradas en el mecanismo de regulación: Cbp6 y Mrx4, y se evaluó la cantidad de Arg8 mediante inmunodetección contra (α -Arg8) (Figura 3). Al eliminar a Rdl2 no se afectaron los niveles de Arg8 al igual que al eliminar a Mrx4, pero al hacer la doble mutante de Rdl2 y Mrx4 los niveles de Arg8 disminuyeron, indicándonos que en conjunto estas proteínas podrían tener una función sobre la síntesis de *Cytb*. Se observó que al eliminar a Cbp6 la síntesis de Arg8 es casi nula porque Cbp6 es necesario para la síntesis y en la doble mutante con Rdl2 no cambiaron los niveles.

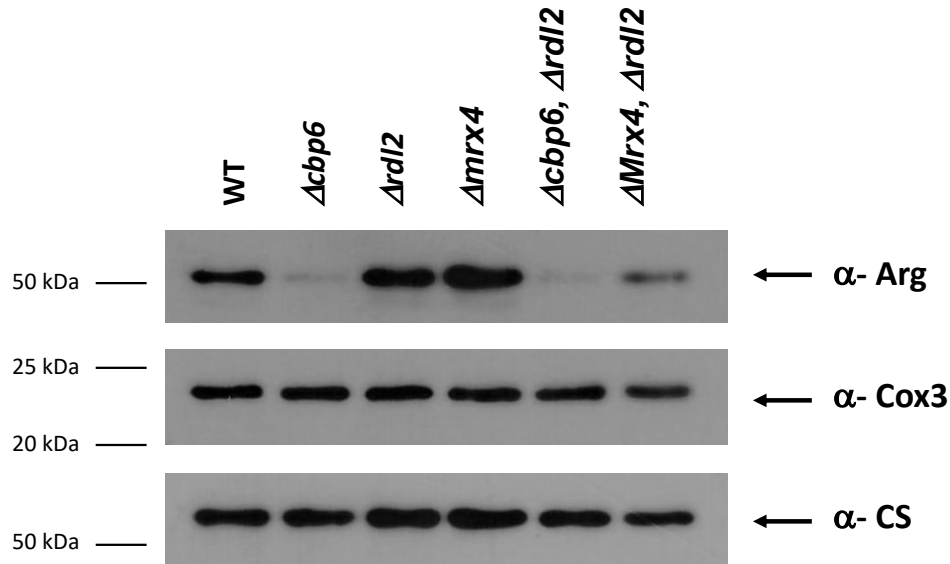


Figura 3. Rdl2 y Mrx4 se requieren para la síntesis de Cytb. Mitocondrias aisladas (50 μ g) de diferentes cepas se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF. Se analizaron por inmunodetección a Arg8 (α -Cytb), Cox3 (α -Cox3) para asegurar que las células tengan DNA mitocondrial y citrato sintasa (α -CS) como control de carga. Todas las cepas tienen a COB reemplazado por *pARG8m*.

Se evaluó el crecimiento de las mutantes sencillas y dobles en medio sin arginina. Corroboramos los resultados de la inmunodetección en la doble mutante de Rdl2 y Mrx4. Se observó una menor síntesis de Arg8 por lo tanto un menor crecimiento en comparación a las mutantes sencillas. Por lo tanto Rdl2 en conjunto con Mrx4 se necesitan para la síntesis de Cytb (Figura 4).

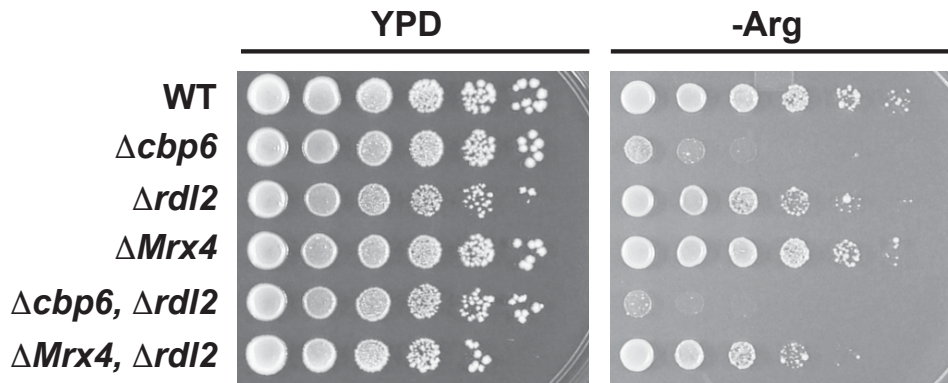


Figura 4. Rdl2 y Mrx4 se necesitan para la síntesis de *Cytb*. Diluciones seriadas en medio fermentativo (YPD) y en medio mínimo sin arginina (-Arg). De la cepa WT, las mutantes sencillas de Cbp6, rdl2 y Mrx4; y las mutantes dobles. Las placas se incubaron a 30 °C durante 3 días. Todas las cepas tienen a *COB* remplazado por *pARG8m*.

Discusión

Estos datos indican que Rdl2 podría ser el factor desconocido involucrado en la regulación de la síntesis de *Cytb*. Necesitamos realizar otros ensayos para conocer el mecanismo de Rdl2 sobre la regulación de la síntesis de *Cytb*. Lo importante es que la función de Rdl2 sobre la síntesis de *Cytb* depende de Mrx4.

Conclusión

- Rdl2 y Mrx4 se necesitan para la síntesis de *Cytb*

Perspectivas

- Demostrar si la función de Rdl2 depende de Mrx4, y corroborar si estas proteínas interactúan entre sí.
- Analizar la interacción de Rdl2 con el ribosoma, cuando hay regulación o desregulación de la síntesis de *Cytb*.
- Conocer las proteínas que interactúan con Rdl2, cuando está activo o reprimido el mecanismo de regulación de la síntesis de *Cytb*.
- Evaluar si Rdl2 interactúa con los primeros intermediarios de ensamblaje del complejo *bc1*.

Artículo de primer autor en prensa en la revista Life Science Alliance.

Version preprint: doi: <https://doi.org/10.1101/2022.11.25.517933>

**The cytochrome *b* carboxyl-terminal region is necessary for mitochondrial Complex
III assembly**

Daniel Flores-Mireles¹, Yolanda Camacho-Villasana¹, Madhurya Lutikurti², Aldo E. García-Guerrero³, Guadalupe Lozano-Rosas⁴, Victoria Chagoya⁴, Emma Berta Gutiérrez-Cirlos⁵, Ulrich Brandt², Alfredo Cabrera-Orefice²✉ and Xochitl Pérez-Martínez¹✉.

¹*Departamento de Genética Molecular, and ⁴Departamento de Biología Celular y Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Exterior s/n Ciudad Universitaria, Coyoacán, 045 10 México City, México.*

²*Radboud Institute for Molecular Life Sciences, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands*

³*Department of Medicine and Biochemistry, University of Utah School of Medicine. Salt Lake City, UT, USA*

⁵*Laboratorio de Bioquímica y Bioenergética. UBIMED. FES Iztacala, UNAM, México*

To whom correspondence should be addressed:

Xochitl Pérez-Martínez, Ph.D. Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. E-mail: xperez@ifc.unam.mx

Alfredo Cabrera-Orefice, Ph.D. Radboud Institute for Molecular Life Sciences, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands. E-mail: alfredbiomed@gmail.com

Running title: *The Cytb C-terminal regulates bc₁ assembly*

Abstract

Mitochondrial *bc₁* complex from yeast has ten subunits, but only Cytochrome *b* (*Cytb*) subunit is encoded in the mitochondrial genome. *Cytb* has eight transmembrane helices containing two hemes *b* for electron transfer. Cbp3 and Cbp6 assist *Cytb* synthesis, and together with Cbp4 induce *Cytb* hemylation. Subunits Qcr7/Qcr8 participate in the first steps of assembly, and lack of Qcr7 reduces *Cytb* synthesis through an assembly-feedback mechanism involving Cbp3/Cbp6. Since Qcr7 resides near the *Cytb* carboxyl-region, we wondered whether this region is important for *Cytb* synthesis/assembly. Although deletion of the *Cytb* C-region did not abrogate *Cytb* synthesis, the assembly-feedback regulation was lost, so *Cytb* synthesis was normal even if Qcr7 was missing. Mutants lacking the *Cytb* C-terminus were non-respiratory due to absence of fully assembled *bc₁* complex. By performing complexome profiling, we showed the existence of aberrant early-stage subassemblies in the mutant. In this work we demonstrate that the C-terminal region of *Cytb* is critical for regulation of *Cytb* synthesis and *bc₁* complex assembly.

Keywords: *bc₁* complex/Cbp3-Cpb6/Cytochrome *b*/Mitochondria/Translation

Introduction

Mitochondrial complex III or *bc₁* complex is part of the respiratory chain. It oxidizes ubiquinol through the “Q cycle” and reduces cytochrome *c*. Coupled to this redox process, *bc₁* complex contributes to the electrochemical gradient of protons across the inner membrane, which is used by the F₁F₀-ATP synthase (complex V) to produce ATP. In yeast and mammals, *bc₁* complex has ten and eleven subunits, respectively, of which cytochrome *b* (*Cytb*) is the only subunit encoded in the mitochondrial genome. *Cytb*, together with subunits cytochrome *c₁* (*Cytc₁*), and the Rieske Iron Sulfur protein (Rip1) contain the redox centers, while the rest of subunits have structural roles (Schägger *et al*, 1995). Mutations that affect function, stability or assembly of this enzyme are cause of severe mitochondrial pathologies in humans (Ghezzi *et al*, 2011; Meunier *et al*, 2013; Wanschers *et al*, 2014).

Assembly of the *bc₁* complex is a modular process. In yeast, *Cytb* forms an early assembly intermediate complex together with subunits Qcr7 and Qcr8. Subunits Cor1, Cor2 and *Cytc₁* form another assembly intermediate. These intermediates further associate, and together with subunit Qcr6, they form a 500 kDa intermediate that is already dimerized (Conte *et al*, 2015; Stephan & Ott, 2020; Zara *et al*, 2007, 2009b). Finally, subunits Qcr9, Qcr10 and Rip1 are added to form the functional enzyme (Ndi *et al*, 2018; Zara *et al*, 2009a). In addition, *bc₁* complex associates with cytochrome *c* oxidase (Complex IV) to form respiratory supercomplexes (Cruciat *et al*, 2000; Hartley *et al*, 2019; Schägger & Pfeiffer, 2000).

Cytb is a hydrophobic subunit of the *bc₁* complex, with eight transmembrane helices and two hemes *b* of low (*b_L*) and high (*b_H*) redox potential that are directly involved in electron transfer. This subunit is encoded by in the mitochondrial genome, synthesized in the mitochondrial matrix and inserted into the inner membrane. Current knowledge indicates that in yeast, translational activation of the *COB* mRNA depends on Cbp1, Cbs1 and Cbs2 (Dieckmann *et al*, 1984; Islas-Osuna *et al*, 2002; Rödel, 1986; Rödel & Fox, 1987). These proteins act on the *COB* 5'-UTR mRNA and interact with the mitoribosome to allow translation initiation, probably tethering translation to the mitochondrial inner membrane (Gruschke *et al*, 2012; Ott *et al*, 2016). Cbs1 might act as a translational repressor maintaining the *COB* mRNA close to the ribosomal exit tunnel, and only after translation activation, Cbs1 is released from the mitoribosome (Salvatori *et al*, 2020). Cbp3 and Cbp6 are chaperones that interact with the mitoribosome tunnel exit and with the newly synthesized *Cytb* (Gruschke *et al*, 2011). In some yeast strains, Cbp3/Cbp6 are necessary for *COB* mRNA efficient translation (Dieckmann & Tzagoloff, 1985; García-Guerrero *et al*, 2018; Gruschke *et al*, 2011; Gruschke *et al*, 2012; Wu & Tzagoloff, 1989), although the main role of these proteins is to trigger heme *b_L* addition to *Cytb*, through a mechanism that is not completely understood (García-Guerrero *et al*, 2018; Hildenbeutel *et al*, 2014). The current model states that interaction of *Cytb*, Cbp3 and Cbp6 form intermediate 0 (Hildenbeutel *et al*, 2014). Upon addition of heme *b_L* site, the chaperone Cbp4 (Crivellone, 1994) is recruited to stabilize the hemylated *Cytb* forming intermediate I, comprising *Cytb*, Cbp3, Cbp6, and Cbp4 (Hildenbeutel *et al*, 2014). After addition of heme *b_H* by an unknown mechanism, Cbp3 and

Cbp6 are released, while subunits Qcr7 and Qcr8 are then added to form intermediate II. This intermediate is ready to associate with the Cor1/Cor2/Cytc₁ subcomplex to continue the assembly pathway (Stephan & Ott, 2020; Zara *et al.*, 2007, 2009b). The current model proposes that in mutants where complex III assembly is blocked, Cbp3 and Cbp6 are sequestered in intermediates containing Cytb making them unavailable for more rounds of COB mRNA translation. This assembly-feedback regulation of translation is clearly observed in mutants lacking subunit Qcr7 or deficient in Cytb hemylation (Gruschke *et al.*, 2012; Hildenbeutel *et al.*, 2014).

High resolution structures of complex III from different organisms show that the carboxyl terminal region of Cytb is facing the mitochondrial matrix and in close proximity to the Qcr7 amino terminal region (Berndtsson *et al.*, 2020; Guo *et al.*, 2017; Hartley *et al.*, 2020; Iwata *et al.*, 1998; Lange & Hunte, 2002; Rathore *et al.*, 2019; Sousa *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2016). This region could have an important mechanistic role for Cbp3/Cbp6 function during Cytb synthesis and assembly, because the release of Cbp3/Cbp6 from assembly intermediates has only been described before the association of Qcr7 with Cytb to form intermediate II. Cbp3/Cbp6 and Qcr7 could thus interact with the same region of the Cytb C-terminus. To investigate the possible role of the Cytb C-terminal region in complex III biogenesis, we deleted its last 8 or 13 residues. We demonstrate that this critical region of Cytb is essential for synthesis regulation by assembly-feedback, and for correct progression of bc₁ complex assembly. We also detected the presence of aberrant assembly subcomplexes that accumulate in the absence of the Cytb C-terminal region.

Results

The Cytb carboxyl terminal region is necessary for correct regulation of Cytb synthesis and respiratory growth.

According to the available high resolution structures of mitochondrial bc₁ complex from different species, the Cytb C-terminus is facing the matrix side, and interacts with subunit

Qcr7 (Berndtsson *et al.*, 2020; Guo *et al.*, 2017; Hartley *et al.*, 2020; Iwata *et al.*, 1998; Lange & Hunte, 2002; Rathore *et al.*, 2019; Sousa *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2016). In fact, Cytb, Qcr7 and Qcr8 are the first subunits to interact during *bc₁* complex assembly (Gruschke *et al.*, 2012; Zara *et al.*, 2009b). Compared to other complex III subunits, absence of Qcr7 has the greatest impact on decreasing Cytb synthesis (Gruschke *et al.*, 2012., Garcia-Guerrero *et al.*, 2018). For this reason, we hypothesized that the Cytb C-terminal region could play a central role in regulation of Cytb synthesis. Furthermore, subunit Qcr7 was proposed to properly bind to Cytb only after Cbp3/Cbp6 are released (Gruschke *et al.*, 2012; Zara *et al.*, 2009b), thus the Cytb C-terminal region might be a major contact site shared by those proteins. To investigate whether the Cytb C-terminal region is critical for Cytb synthesis, we truncated it by deleting several residues. By microprojectile bombardment we inserted two different mutant versions of *COB* in the mitochondrial genome. In the *Cytb* Δ *CI3* mutant we deleted the sequence IENVLFYIGRVNK comprising the last 13 amino acids of the protein. This region is exposed to the mitochondrial matrix and contains the sequence IEN that is highly conserved among fungi and mammals (**Fig EV1A**). We also created the *Cytb* Δ *C8* mutant, where the last 8 amino acids (FYIGRVNK) were eliminated. In the fully assembled complex III, the somewhat less conserved FYI sequence of the Cytb C-terminal region resides closest to the N-terminal region of Qcr7.

In both strains, truncation of Cytb induced a complete lack of respiratory growth on ethanol/glycerol medium (**Fig 1A**), similar to a control strain where the *COB* mRNA translational activator Cbs1 was deleted (Rödel, 1986; Rödel & Fox, 1987). To test whether truncation of the Cytb C-terminus abolished Complex III assembly by inhibiting Cytb synthesis, we performed *in vivo* mitochondrial translation assays in the presence of (³⁵S)-methionine and cycloheximide (to inhibit cytosolic translation). After 15 minutes of labeling, mitochondria were extracted and newly made polypeptides were separated by SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane, and analyzed by autoradiography. Synthesis of mitochondrial products, including Cytb synthesis, was unchanged in *Cytb* Δ *CI3* and *Cytb* Δ *C8* mutants as compared to wild-type (**Fig 1B**). In contrast, steady state levels of *Cytb* Δ *CI3* and *Cytb* Δ *C8* were drastically reduced when analyzed by Western blot (**Fig 1C**), indicating that

even though newly synthesized *Cytb* Δ C13 and *Cytb* Δ C8 were produced at wild-type levels, the truncated proteins exhibited markedly decreased stability.

In some wild-type yeast strains (e.g., BY4742 and W303), efficient translation of the *COB* mRNA depends on the chaperones Cbp3 and Cbp6, and on the presence of subunit Qcr7 (García-Guerrero *et al.*, 2018; Gruschke *et al.*, 2012). We asked whether these factors still regulate *Cytb* Δ C13 synthesis, since the C-terminal region could be an important site of interaction for *Cytb* synthesis regulators. We generated deletion strains lacking Cbp3, Cbp6 or Qcr7 in cells carrying either wild-type *Cytb* or *Cytb* Δ C13. As expected, *in vivo* mitochondrial translation assays revealed that wild-type *Cytb* synthesis was dramatically reduced in Δ *cbp3*, Δ *cbp6* and Δ *qcr7* mutants (**Fig 1D**). Synthesis of *Cytb* Δ C13 was similarly reduced in the absence of Cbp3 and Cbp6. In contrast, *Cytb* Δ C13 synthesis was no longer dependent on the presence of Qcr7, as the Δ *qcr7* mutant showed normal levels of *Cytb* Δ C13 (³⁵S)-methionine labeling. Similar results were obtained for the mutant *Cytb* Δ C8 (**Fig EV1B**). These results indicate that even though translation of the *COB* Δ C13 or *COB* Δ C8 mRNAs still depended on Cbp3 and Cbp6, it was no longer regulated by Qcr7 binding and consequently by the assembly-feedback mechanism.

According to the current model (Ott *et al.*, 2016), Cbp3/Cbp6 are translational activators of the *COB* mRNA. If complex III assembly is blocked at early stages (e.g., by absence of Qcr7), then Cbp3/Cbp6 remain associated with *Cytb*, so these chaperones are not available for *COB* mRNA translational activation. This model explains why Δ *qcr7* mutants show reduced *Cytb* synthesis (García-Guerrero *et al.*, 2018; Gruschke *et al.*, 2012). Therefore, we next investigated whether *Cytb* Δ C13 and *Cytb* Δ C8 still interact with Cbp3 by using a strain expressing Cbp3 with a hemagglutinin epitope fused to its C-terminal region (Cbp3-HA). Presence of this tag does not affect respiratory capacity of the cells (García-Guerrero *et al.*, 2018). Mitochondria were isolated and subjected to (³⁵S)-methionine labeling before solubilization with digitonin. Extracts were immunoprecipitated with an anti-HA commercial antibody. Samples were separated by SDS-PAGE and analyzed by autoradiography and Western blotting. Newly synthesized *Cytb* Δ C13 and *Cytb* Δ C8 were able to physically interact with Cbp3-HA, although with less efficiency, as was consistently observed in all our

repeats (**Fig 2A, 2B**). Since, strains carrying *Cytb* Δ C13 and *Cytb* Δ C8 had presented highly similar results, we decided to continue our experiments only with the *Cytb* Δ C13 mutant.

Considering that Cbp3 seemed to have a weaker interaction with *Cytb* Δ C13 than with full-length *Cytb*, and *Cytb* Δ C13 synthesis was no longer feedback-regulated, we asked whether the assembly intermediates containing Cbp3/Cbp6 were modified in our mutant. Mitochondria were solubilized with digitonin and separated, first by blue native PAGE (BN-PAGE), and then by 2D SDS-PAGE. As expected, wild-type *Cytb* mitochondria showed the presence of Cbp3 at ~150-440 kDa corresponding to early complex III assembly intermediates (Gruschke *et al.*, 2012) (**Fig EV2**). A small fraction of *Cytb* was also detected in these subcomplexes, but the main population was observed at fully assembled complex III dimers and supercomplexes. In contrast, *Cytb* Δ C13 no longer comigrated with supercomplexes or complex III₂. Instead, it was only detected in subcomplexes of an apparent mass of ~130 to 440 kDa. A population of Cbp3 comigrated with these subcomplexes. In addition, Cbp3 was enriched in a fraction migrating at ~60 kDa, which corresponds to the Cbp3-Cbp6 heterodimer. The ~30 kDa fraction corresponding to free Cbp3 was hardly detectable (Gruschke *et al.*, 2012). In the absence of *Cytb* (*Δ cbs1* mutant), Cbp3 was observed only as Cbp3/Cbp6 heterodimer and monomer in similar intensities, with no other complex detected. These results suggest that the absence of the *Cytb* C-terminal region induced accumulation of the Cbp3-Cbp6 dimer, formation of additional Cbp3-containing complexes of higher molecular mass, and a severe reduction of steady state levels of *Cytb* Δ C13.

To better define the populations of Cbp3- and Cbp6-containing complexes that are present in the *Cytb* Δ C13 mutant, we carried out a complexome profiling analysis. For this, purified mitochondria were solubilized with digitonin, and extracts were separated by BN-PAGE. Gel lanes from control and mutant were cut into 60 slices, and each fraction was trypsin-digested and analyzed by LC-MS/MS. Cbp3 and Cbp6 had similar migration patterns, with a predominant population around 100-200 kDa (**Fig 2C**). Indeed, one main peak with a clear shoulder at ~140 kDa was observed in the WT *Cytb* strain from both proteins. These fractions correspond to the previously observed early-assembly intermediates (Gruschke *et al.*, 2012). In the *Cytb* Δ C13 mutant these peaks were decreased by ~50%, with the appearance of an

additional shoulder at lower mass (~100 kDa). The previously described Cbp3/Cbp6 complex of 66 kDa (Gruschke *et al.*, 2012) was hardly detectable in wild-type and enriched in *Cytb*ΔC13 mitochondria. The apparent mass of ~60 kDa for the heterodimeric complex fitted well with its expected molecular mass of 53 kDa. Monomeric Cbp3 and Cbp6 were found to accumulate in the mutant mitochondria as well.

Taken together, these results indicate that the C-terminal region of *Cytb* is critical for the assembly-feedback mechanism of *Cytb* synthesis. The increased free fractions and heterodimers of Cbp3/Cbp6 probably accumulated due to their lower affinity to *Cytb*ΔC13 and thus were released from assembly intermediates, kept *Cytb* synthesis going, but without proper regulation. This lack of regulation might be due to the presence of increased concentrations of Cbp3/Cbp6 heterodimers or free Cbp3 and Cbp6 in the mutant. Moreover, *Cytb*ΔC13 led to the formation of additional subcomplexes of smaller size containing Cbp3 and Cbp6.

The Cytochrome b carboxyl terminal region is indispensable for complex III assembly.

Although we found that translation of the *COB*ΔC13 and *COB*ΔC8 mRNAs was as efficient as that of wild-type *COB* mRNA, *Cytb* steady state levels decreased in the mutants, respiratory capacity was lost completely, indicating severe complex III deficiency (**Fig 1**). Moreover, we observed that formation of Complex III dimers and supercomplexes was abolished in the *Cytb*ΔC13 mutant (**Fig EV2**). To further investigate this, we first analyzed differential redox spectra of *Cytb*ΔC13 mitochondria. While signals of heme *c* and heme *a* were unaffected, the heme *b* peak at ~560 nm was absent in the *Cytb*ΔC13 mutant, similar to what was observed for a mutant lacking *Cytb* (*Δcbs1*) (**Fig EV3A**). Besides, no complex III activity was detected in this mutant, which further confirms the loss of a functional assembled enzyme (**Fig EV3B**). No cytochrome *c* reduction catalyzed by individual complex III (using decylubiquinol as electron donor) or by coupling CII+CIII (using succinate to generate endogenous ubiquinol via CII to promote CIII activity) was detected in the mutant further

confirming the loss of a functional assembled enzyme (**Fig EV3B**). Individual activities of complexes II and IV were not significantly affected in this strain; hence indicating a specific impairment at the complex III assembly level.

Next, we analyzed the behavior of the *bc₁* complex subunits in more detail using the complexome profiling data. While in WT mitochondria, all complex III subunits were primarily comigrating at ~500- 1000 kDa (corresponding to supercomplexes (III₂/IV and III₂/IV₂) and complex III dimer), in *Cytb*ΔC13 mitochondria, no subunits were detectable in this mass range (**Fig 3A**). In addition, small amounts of both, *Cytb*ΔC13 and wild-type *Cytb*, were detected in early-assembly intermediates at ~100-200 kDa (see also **Fig 4**). In both WT and *Cytb*ΔC13 strains, a slight accumulation of a soluble subcomplex containing Cor1 and Cor2 was observed at ~300 kDa (soluble mass scale), which fits well with a previously reported heterotetrametric arrangement, i.e. (Cor1/2)₄ (Stephan & Ott, 2020). As expected, formation of supercomplexes with complex IV (CIV) was dramatically reduced in *Cytb*ΔC13 mitochondria (**Fig 3B**). However, expression of mitochondrially-encoded COX subunits and enzyme activity of CIV were not affected in this mutant (**Fig 1B, Fig EV3B**). The relative content of the fully assembled complex was also unchanged, as evaluated by in gel CIV activity staining (**Fig EV3C**).

Lack of the *Cytb* C-terminal region leads to accumulation of aberrant early-stage sub-assemblies of *bc₁* complex.

So far, we have presented evidence that the *Cytb* C-terminal region is not essential for translation of the *COB* mRNA but required for correct assembly of the *bc₁* complex. The notion that this is due to its involvement in the assembly feedback regulation of *Cytb* synthesis was corroborated by our observation that *Qcr7*, a component of the first assembly intermediates, was not required for the stability of the truncated cytochrome *b*. *Cbp3* and *Cbp6* have an essential role in the first steps of *bc₁* complex assembly, which together with chaperone *Cbp4* and subunit *Qcr8*, orchestrate the formation of the early intermediates coined 0 (Hildenbeutel *et al.*, 2014), I and II (Gruschke *et al.*, 2011; Gruschke *et al.*, 2012). To further corroborate our hypothesis of a feedback function of the *Cytb* C-terminal region,

we asked how these early stage intermediates were affected by its truncation. To address this, we analyzed subassemblies found at 50-200 kDa mass range that contain *Cytb*, *Cbp3*, *Cbp6*, *Cbp4*, *Qcr7* and *Qcr8*.

Three different sub-assemblies have been described previously in this mass range: intermediate 0, containing *Cytb*, *Cbp3* and *Cbp6*; intermediate I, containing *Cytb*, *Cbp3/6* and *Cbp4*; and intermediate II, containing *Cytb*, *Cbp4*, *Qcr7* and *Qcr8* (Gruschke *et al.*, 2012; Hildenbeutel *et al.*, 2014). While we could confirm the formation of such intermediates as discussed below, our analysis provided additional insight into complex III assembly and the involvement of the C-terminal region of cytochrome *b*.

In the wild-type strain, all components of intermediate II comigrated at the expected mass of ~90 kDa (**Fig 4A**, **EVTable 1**). However, the bulk of *Cbp3* and *Cbp6*, indicative of intermediates 0 and I, were not observed at the predicted masses of 97 and 115 kDa, respectively. Instead, they appeared as a peak with a pronounced shoulder at apparent masses that were ~25 kDa higher suggesting the presence of additional components. Consistent with its presence in intermediate I but not intermediate 0, *Cbp4* peaked at ~140 kDa. Because significant amounts of *Qcr7* and *Qcr8* were also detected in the same mass range of 120-140 kDa, we concluded that before *Cbp3* and *Cbp6* dissociate to form intermediate II, the two subunits are able to associate and form additional intermediates, here referred to as $0^{7,8}$ and $I^{7,8}$. However, the low relative abundance of *Qcr7* and *Qcr8*, the presence of rather high amounts of *Cbp4* in this mass range and a shoulder observed at the lower edge of the main peak indicated the presence of significant amounts of intermediate I.

This notion was corroborated by the pattern of intermediates observed in the migration profiles from mutant *Cytb* Δ C13. In a range of overlapping peaks at ~80-180 kDa, sub-assemblies at apparent masses indicative of intermediates $0^{7,8}$ and $I^{7,8}$, but also a higher fraction of the canonical intermediates 0 and I were detected (**Fig 4B**). It should be noted that, in the mutant, *Qcr7* was too low in abundance to be reliably quantified. This could be because the abundance of all assembly intermediates was markedly diminished by truncation of *Cytb*. Nevertheless, the presence of *Qcr7* in some sub-assemblies could still be deduced

based not only on its migration pattern, but also on the diagnostic apparent masses of these intermediates established for the wild-type. The usefulness of this diagnostic mass approach is illustrated by the observation that in the mutant, an intermediate containing *Cytb* and Cbp4, but not Cbp3/Cbp6, comigrated with Qcr8 at ~70 kDa rather than at ~85 kDa as predicted for intermediate II indicating the loss of Qcr7. We thus could assign this peak to a sub-assembly II^{Δ7} (**Fig 4B**). Likewise, the presence of large amounts of Cbp4 and Qcr8 at ~120 kDa in the mutant suggested the presence of intermediate I⁸. The apparent molecular masses of the assigned intermediates matched remarkably well with the predicted values deviating just ≤5 kDa (**EVTable 1**).

Steady-state levels of the intermediates were overall reduced in the mutant. Moreover, the observation that in the *Cytb*ΔC13 mutant canonical intermediates 0 and I were present in markedly higher amounts than the ones already associated with Qcr7 and Qcr8, indicated that the C-terminal region of *Cytb* must be involved in this interaction. Occurrence of intermediates I⁸ and II^{Δ7}, still containing Qcr8 but lacking the other subunit, suggested the incomplete binding of Qcr7 to the truncated *Cytb* as the primary cause for a weaker association of both proteins.

Truncation of the *Cytb* C-terminal region does not prevent the association of cytochrome *b* with Cbp3.

Cbp3 has a direct, physical interaction with *Cytb*, and some Cbp3-specific residues involved in this interaction have been identified, i.e., Gln-183, Lys-185, Asp-188, Glu-195 and Lys-215 (Ndi *et al*, 2019). These residues, located in the C-terminal half of Cbp3, form a cleft where *Cytb* may be recruited. Deletion of the *Cytb* C-terminal region did not abrogate the *Cytb*-Cbp3 interaction, but reduced accumulation of intermediate I, increased the abundance of intermediate 0, prevented formation of intermediate II and induced the appearance of aberrant sub-assemblies, e.g., II^{Δ7}. A significant accumulation of free Cbp3/Cbp6 complex was also observed in the mutant. These results suggested a lower affinity of Cbp3/Cbp6 with *Cytb* upon its C-terminal truncation.

To investigate if some of the previously identified interacting residues of Cbp3 could no longer interact with *Cytb* Δ C13, we analyzed photo-crosslinked products of Cbp3 and *Cytb* Δ C13 using the non-natural, photo-activable amino acid *p*-aminobenzoyl-phenylalanine (pBpa). Plasmids coding for Cbp3-His₇ were mutagenized to introduce an amber stop codon at the desired positions, Lys-185, Asp-188 and Lys-215. Δ *cbp3* cells carrying one of these plasmids were incubated with pBpa in the dark. Then, mitochondrial translation products were labeled with (³⁵S)-Methionine in the presence of cycloheximide to detect *Cytb* in cross-linked products. Cells were further incubated under UV light to photo-crosslink Cbp3His₇. Cbp3His₇ cross-linked products were purified using Ni-NTA beads. Samples were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography, as well as by Western blot using antibodies against Cbp3. The *Cytb*-Cbp3-His₇ cross-linking product was previously identified at ~64 kDa (Ndi *et al.*, 2019). We also detected this product by looking at (³⁵S)-methionine labeled products (**Fig EV4A**) and by Western blot against Cbp3 (**Fig EV4B**). Similar crosslinked products were observed for *Cytb* and for *Cytb* Δ C13, indicating that, at least Lys-185, Asp-188 and Lys-215 from Cbp3 are still interacting with *Cytb*, even when the C-terminal region is missing. Accordingly, the suggested weaker interaction of Cbp3 with *Cytb* must involve other contact sites.

Discussion

Cytochrome *b* is the only subunit of complex III that is encoded in the mitochondrial genome, and it is a key component for its catalysis and assembly. Synthesis of *Cytb* depends on chaperones Cbp3/Cbp6 (Gruschke *et al.*, 2011) and is highly coupled not only to its hemylation states, but also to assembly of the complex (Gruschke *et al.*, 2012; Hildenbeutel *et al.*, 2014). In the present work we demonstrated that the carboxyl terminal region of cytochrome *b* has an essential role in these processes.

We sought to investigate the function of the cytochrome *b* C-terminal region because: *i*) it is a hydrophilic region of the protein facing the mitochondrial matrix, potentially placing it close to chaperones and translational activators at early assembly stages; *ii*) subunit Qcr7 interacts with the *Cytb* C-terminal region, and absence of this subunit triggers the *COB*

mRNA translational repression by an assembly feedback loop (García-Guerrero *et al.*, 2018; Gruschke *et al.*, 2012); and *iii*) once subunit Qcr7 fully associates, Cbp3/Cbp6 release from intermediate I, suggesting that Cbp3/Cbp6 and Qcr7 should share common sites of interaction on *Cytb*.

As the nascent *Cytb* polypeptide emerges from the mitoribosome it associates with Cbp3 and Cbp6 to form intermediate 0 and subsequently intermediate I. The current yeast *bc₁* complex assembly model proposes that incorporation of subunits Qcr7 and Qcr8 triggers the release of Cbp3/Cbp6 to form intermediate II (Gruschke *et al.*, 2012). Therefore, Cbp3/Cbp6, which are rate limiting for *Cytb* synthesis, are available to activate more *COB* mRNA translation. If either Qcr7 binding or *Cytb* hemylation do not take place, Cbp3/Cbp6 are then sequestered in intermediates 0 and I and translation of the *COB* mRNA decreases through an assembly-feedback regulatory mechanism (Gruschke *et al.*, 2012; Hildenbeutel *et al.*, 2014). Remarkably, deletion of the *Cytb* C-terminal region abrogates this assembly-feedback regulatory loop, since a *Cytb* Δ *C13* Δ *qcr7* double mutant showed normal levels of *Cytb* synthesis. Our data indicate that Cbp3/Cbp6-containing sub-assemblies are observed in the absence of the *Cytb* C-terminal region, and that significant amounts of free Cbp3 and Cbp6 as well as Cbp3/Cbp6 heterodimer accumulate. This could restore *COB* mRNA translation even in absence of Qcr7. We thus propose that absence of the *Cytb* C-terminal region leads to a weaker interaction between Cbp3/Cbp6 and *Cytb*, which makes the chaperones more prone for self-release.

Even though absence of *Cytb* C-terminal region decreased the abundance of the predominant early-assembly intermediate I, it did not prevent its formation. In previous reports, the hemylation state of *Cytb* had been shown critical for accurate progression of the early-assembly steps and binding of Cbp4. It was previously observed that cytochrome *b*, in association with Cbp3/Cbp6, receives the heme *b_L*, and incorporation of Cbp4 stabilizes this hemylation, as well as facilitating addition of heme *b_H* to transit into formation of intermediate II (Hildenbeutel *et al.*, 2014). It is unclear whether the identified early sub-assemblies in the *Cytb* Δ *C13* mutant contain *Cytb* with heme(s) *b* or not. High accumulation of the canonical heme *b_H*-less intermediate 0 was consistently observed in the mutant profiles.

Three sub-assemblies containing Cbp4 were also detected in *Cytb*ΔC13. We reason that conformational changes in the WT *Cytb* C-terminal region might coordinate the incorporation of Cbp4 to assembly intermediate I. If WT *Cytb* is not hemylated, then its C-terminal region could remain in a conformation that may hamper Cbp4 binding. At this point, it is not known if the missing *Cytb* C-terminal region might block heme *b_L* insertion even if Cbp3/Cbp6 are associated, or if the incorporation of Cbp4 is unable to stabilize heme *b_L* in this context. In addition, canonical intermediate II was not detected in the *Cytb*ΔC13 mutant. An aberrant sub-assembly containing *Cytb*, Cbp4 and Qcr8 (II^{Δ7}) accumulated in its place. Lack of Qcr7 in this sub-assembly is not surprising since its major interaction site, the *Cytb* C-terminal, is absent. This may explain the poor stability of this subunit in this complex. All these results suggest that the *Cytb* C-terminal region is crucial to regulate *Cytb* hemylation, Cbp4 interaction with intermediate I and stability of Qcr7 within *bc₁* complex.

Interestingly, our complexome profiling analysis revealed additional subassemblies containing the same components as intermediates 0 and I but migrating at slightly higher molecular masses. These sub-assemblies were consistently found in all analyzed biological replicates from WT and *Cytb*ΔC13 strains. To further investigate which additional interactor(s) caused the observed mass shift, we carefully checked the list of identified proteins of ~15-25 kDa that comigrated with *Cytb*, Cbp3, Cbp6 and Cbp4 in the mass range of 50-200 kDa. While we found several proteins with similar migration patterns, the profiles of Qcr7 and Qcr8 showed the best match with *Cytb* and other chaperones. Moreover, their molecular masses fitted well to the observed differences in the apparent molecular masses. Hence, we propose that the two subunits can bind already to intermediates 0 and I. Such sub-assemblies, i.e., 0^{7,8} and I^{7,8} (**Fig 4, EVTable 1**) might denote parallel assembly pathways occurring during *Cytb* folding and binding/releasing of subunits/chaperones ultimately converging in the formation of stable intermediates I and II. Binding of Qcr7/Qcr8 to intermediate I (i.e., I^{7,8}) agrees with the recent evidence from the group of Martin Ott (Salvatori *et al.*, 2020). Incorporation and settled interaction of such subunits is what could promote the final releasing of Cbp3/Cbp6. Nevertheless, it is not straightforward to understand why Qcr7/Qcr8 bind to intermediate 0. We speculate that there are interaction sites in *Cytb* that might not be occupied by Cbp3/Cbp6 where Qcr7/Qcr8 can interact early

and wait until Cbp4 binds to promote conformational changes that allow their final mode of interaction. Further structure and mechanistic research will be required to validate the existence of these sub-assemblies, as well as the specific molecular roles of all early assembly-involved complex III chaperones.

Chaperone Cbp3 interacts physically and directly with cytochrome *b* (Gruschke *et al.*, 2012; Ndi *et al.*, 2019). K185, D188 and K215 are some of the amino acids from Cbp3 that directly interact with cytochrome *b* and localize at an extended surface area on the chaperone (Ndi *et al.*, 2019). All three Cbp3 amino acids are still interacting with mutant cytochrome *b*, indicating that the Cbp3-Cytb interaction takes place probably with one of the three matrix-side soluble Cytb loops. Even though the cytochrome *b* carboxyl terminal region is not absolutely required for Cbp3 association, this region of the protein seems to regulate how tightly Cbp3/Cbp6 associates with cytochrome *b*. This function might be achieved by Cytb C-terminal region conformational changes throughout the progression of this subunit through the assembly intermediates.

The Cytb C-terminal region could also regulate, how Cbp4 incorporates and executes its role(s) in the assembly complex. This could be a direct or indirect role through the correct positioning of Cbp3/Cbp6 as well as Qcr7/Qcr8 in intermediates 0 or 0^{7,8}. This is of particular importance since truncation of Cytb did not prevent the formation of Cbp4-containing subcomplexes (I⁸, I^{7,8} and II^{Δ7}), that seem to be not functional, nonetheless. If hemylation proceeds correctly, Cbp3/Cbp6 are then released, which may be promoted not only by association of subunits Qcr7/Qcr8, but also by a new conformation of the Cytb C-terminal region enabling intermediate I to transit into intermediate II. Indeed, stability of intermediate II seems to depend on the presence of the Cytb C-terminal region, as we were unable to detect this intermediate in the mutant lacking this region.

In summary, our data demonstrate that the cytochrome *b* C-terminal region has an essential role in regulation of the assembly-feedback loop of *COB* mRNA translation, formation of early-assembly intermediates and, thereby, assembly of complex III. Based on previous work and the results presented here, we propose an updated model in which, as Cytb emerges

from the mitoribosome, it first interacts with Cbp3 and Cbp6. These interactions are promoted by a specific conformation of the cytochrome *b* carboxyl terminal region (**Fig 5**) to assemble into intermediate 0. Correct formation of this intermediate triggers the addition of heme *b_L*. Maybe another conformation of the Cytb C-terminal region is necessary to assist heme binding by Cbp3/Cbp6 by an unknown mechanism. Cbp4 is recruited to stabilize heme *b_L*, and heme *b_H* is added to conform intermediate I (Hildenbeutel *et al.*, 2014). Interestingly, our data also suggest an alternative early-assembly route where intermediate 0 already binds Qcr7/Qcr8. Then, Cbp4 attaches and may help stabilize Cytb folding/hemylation and proper interactions of Qcr7/Qcr8, which makes Cbp3/Cbp6 lose affinity for Cytb and detach to form the intermediate II.

Finally, we would like to emphasize that the carboxyl terminal region of other mitochondrially encoded proteins is important for the biogenesis of their respective oxidative phosphorylation complexes. As the Cytb C-terminal region is essential at different steps of complex III biogenesis, it has also been shown for the carboxyl terminal region of Cox1, the largest subunit of cytochrome *c* oxidase (García-Villegas *et al.*, 2017; Shingú-Vázquez *et al.*, 2010). In this case, deletion of the last 15 residues of the Cox1 C-terminal region abrogates the assembly-feedback regulation of Cox1 synthesis, with a cascade of defects in cytochrome *c* oxidase biogenesis (García-Villegas *et al.*, 2017). Moreover, biogenesis of complex II, which is only formed by nuclear encoded subunits, is also regulated by the C-terminal region of subunits Sdh1 and Sdh4 (Kim *et al.*, 2012; Oyedotun & Lemire, 1997). This mechanism of regulation is not exclusively found in mitochondria since similar findings were reported for chloroplast-encoded mRNAs (Choquet & Wollman, 2002). All these studies highlight the intricate regulation of translation and assembly involving a small soluble region of, in this case, mitochondrial proteins. Such domains seem to play a special role in maintaining the concerted formation and coordinated assembly of nuclear and organellar encoded subunits, particularly at early-assembly stages of the biogenesis of multiprotein complexes of dual genomic origin.

Materials and Methods

Strains, plasmids, medium and genetic methods.

S. cerevisiae strains used are congenic or isogenic to *BY4742* and *D273-10b* (listed in the **Supplemental Table S1**). Genetic methods and medium were previously described (Burke *et al*, 2000; Dunham *et al*, 2015). Cells were grown in complete fermentative medium (1 % yeast extract, 2 % Bacto-peptone, and 2% glucose or 2 % galactose), synthetic complete medium (0.67% yeast nitrogen base, 2 % glucose and without uracil or the amino acids to select), respiratory medium (1 % yeast extract, 2 % Bacto-peptone, 3 % ethanol and 3 % glycerol). Deletion of nuclear genes was made by PCR amplification of cassettes where the *orf* of interest was replaced with *LEU2*, *HIS3*, *URA3* or resistance to G418 (*KanMX4*). This DNA was used to transform yeast by the Lithium Acetate method. *CBP3-HA* was amplified by PCR and cloned on the yeast expression plasmid pRS315 to create plasmid pDM8.

Mitochondrial transformation.

Mutant version of *CYTB* coding for proteins lacking the last 8 (*Cytb* Δ C8) or 13 residues (*Cytb* Δ C13) were made by fusion PCR and subcloned in pDFM2 plasmid (containing the *CYTB* sequences cloned in pBluescript KS). Plasmid and PCR products were digested with *Sph1* and *Kpn1* and ligated to obtain plasmids pDFM4 (*Cytb* Δ C8) and pDFM6 (*Cytb* Δ C13). The plasmids was transformed into NAB69 rho0 strain by high-velocity microprojectile bombardment (Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System, BIO-RAD) (Bonnefoy & Fox, 2007) to create the Rho- synthetic strains DFM7 and DFM8 containing *CYTB* Δ C13 and *CYTB* Δ C8, respectively. *CYTB* mutants were inserted into DFM2 (strain derived from *BY4742*, that has intronless *COX1* and the construct *cytb* Δ ::*ARG8^m*) mitochondria by cytoduction to create DFM9 and DFM10. The Rho- synthetic *CYTB* Δ C13 (DFM7) was inserted into DFM16 (strain derived from *D273-10b*, that has intronless *COX1* and the construct *cytb* Δ ::*ARG8^m*) mitochondria by cytoduction to create DFM24. The strains were tested with M17-162 4D that contains the *CYTB2* allele (Bonjardim *et al*, 1996). The mutants were corroborated by PCR and sequencing.

Analysis of mitochondrial proteins

Cell cultures were grown in complete fermentative medium with 2% galactose (YPGal) until late exponential phase. Mitochondria were isolated breaking the cell with Zimolyase 20T and

with glass beads (Diekert *et al*, 2001). The mitochondrial proteins were measuring by Lowry method (Markwell *et al*, 1978) and separated for SDS-PAGE (12 % and 16%), transferred to PVDF membrane and immunodecorated with antibodies against: anti-HA (Roche Applied Science), anti- Cytb (García-Guerrero *et al.*, 2018), anti-Rip1 (Rosemary Stuart), anti-Cbp3 and anti-Citrate synthase (Thomas D. Fox). For immunoprecipitation, mitochondria (500 µg) were solubilized with 1% digitonin (w/v) and separated by centrifugation, the supernatant was incubated with Protein A-sepharose beads coupled with anti-HA antibody. Total (10%) and immunoprecipitated fraction (90%) were collect and separated for SDS-PAGE.

Differential spectra analysis

For hemes spectrophotometric analysis in isolated mitochondria, samples (1.5 mg protein) were resuspended in phosphate buffer pH 6.6. Differential spectra were determined by subtraction of dithionite-reduced minus ferricyanide-oxidized state in a DW2 Aminco UV-Visible spectrophotometer modernized by OLIS Inc. (On-Line Instrumental Systems, Inc. Bogart, GA USA).

Synthesis of mitochondrial proteins

In vivo labeling of cells in the presence of (³⁵S)-Methionine and cycloheximide was performed as previously describe (Perez-Martinez *et al*, 2003). After 15 min of pulse labeling, cells were chilled on ice/water and disrupted by vortexing with glass beads to obtain mitochondria by centrifugation. Mitochondrial proteins were separated on a 16% polyacrylamide gel, transferred to a PVDF membrane and analyzed with a Typhoon 8600 Phosphorimager (GE Healthcare).

In organello translation assays were carried out incubating isolated mitochondria (500 µg) with [³⁵S]- Methionine for 20 min, as previously described (Westermann *et al*, 2001).

Blue-native electrophoresis

BN-PAGE was performed as previously described (Wittig *et al*, 2006). Samples (100µg) of mitochondrial protein were solubilized with 20 µl of 50mM Bis-Tris pH 7.0, 750mM aminocaproic acid, and either 1-2% digitonin or 1% n-dodecyl β-D-maltoside (DDM) on ice. Mitochondrial extracts were cleared at 30,000 x g for 30 min, and the supernatants were

mixed with 2.5 μ l of Coomassie solution (5% Coomassie, 750mM aminocaproic acid, 50 mM Bis-Tris). Extracts were loaded on a 5% to 12% polyacrylamide gel and transferred to a PVDF membrane. Proteins were detected by immunoblotting with the indicated antibodies. In-gel CIV activity was performed after BN-PAGE using 0.04% diaminobenzidine (Sigma-Aldrich) and 0.02% of horse heart cytochrome *c* (Sigma-Aldrich) in phosphate buffer pH 7.4 (Wittig *et al*, 2007). For second dimension analysis, one BN gel lane was cut and separated on 12 % SDS-PAGE.

Isolation of yeast mitochondria membranes for complexome profiling and enzyme activity assays.

Small-scale isolation of unsealed mitochondrial membranes was done as follows. Freshly harvested yeast cells (wet weight ~10 g) were resuspended in 10 ml mitobuffer (600 mM D-mannitol, 2 mM EGTA, 2 mM phenylmethylsulphonylfluoride (PMSF), 10 mM Tris/HCl pH 6.8). Yeasts were cracked with glass beads (10 g) by high speed vortexing; 10 x 1 min pulses with 1 min resting intervals on ice. The unbroken cells, nuclei and glassbeads were pelleted by centrifugation at 3,300 x *g* for 20 mins at 4°C. The supernatant was decanted into a fresh tube. The remaining pellet was rinsed again with fresh 10 mL mitobuffer and centrifuged as in the previous step. The supernatant was recovered and pooled with the first one followed by high-speed centrifugation at 40,000 x *g* for 60 mins at 4°C. Resulting pellets of crude mitochondrial membranes were resuspended in 500 μ l mitobuffer, carefully homogenized, aliquoted, shock-frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C. The aliquots were thawed on ice before use and respective protein concentrations were determined using the Bio-Rad DC protein assay.

Complexome profiling.

Isolated mitochondrial membranes (100 μ g) were solubilized with digitonin (3 mg/mg protein) and separated by BN-PAGE using a 4-16% polyacrylamide gradient gel as described previously (Wittig *et al.*, 2006). After the run, proteins were fixed overnight in 50% methanol, 10% acetic acid, 100 mM ammonium acetate. Gels were further stained with 0.025% Coomassie blue G-250 (Serva G) in 10% acetic acid for 45 min, destained with 10%

acetic acid and maintained in deionized water until maximal size recovery. After scanning gels, the real size images were used as templates for the cutting procedure.

Proteins were identified by tandem mass spectrometry (MS/MS) after in-gel tryptic digestion following the procedure described in (Heide *et al*, 2012) with a few modifications. Briefly, entire gel lanes were cut in 60 uniform slices starting at the bottom. The slices were chopped and transferred into 96-well filter plates (Millipore®, MABVN1250) adapted manually to 96-well plates (MaxiSorp™ Nunc) as waste collectors. Gel pieces were incubated in 50% methanol, 50 mM ammonium bicarbonate (ABC) under moderate shaking; the solution was refreshed until all the blue dye was removed. In all cases, removal of excess solution was done by centrifugation (1,000 x g, 20 s). Then, gel pieces were reduced with 10 mM dithiothreitol in 50 mM ABC for 1 h. After removing excess solution, 30 mM chloroacetamide in 50 mM ABC was added to each well, incubated in the dark for 45 min and removed. A 15 min incubation step with 50% methanol, 50 mM ABC was performed to dehydrate gel pieces. Excess solution was removed, and gel pieces were dried for 30-45 min at room temperature. To digest proteins, 20 µl of 5 ng·µl⁻¹ trypsin (sequencing grade, Promega®) in 50 mM ABC, 1 mM CaCl₂ were added to each well and incubated for 20 min at 4°C. Later, gel pieces were totally covered by adding 50 µl of 50 mM ABC followed by an overnight incubation at 37°C. The next day, the diffused peptides-containing supernatants were collected by centrifugation (1,000 × g, 60 s) into clean 96-well PCR plates (Axygen®). The gel pieces were lastly incubated with 50 µl of 30% acetonitrile (ACN), 3% formic acid (FA) for ~20 min prior elution of the remaining peptides on the previous eluates by centrifugation. The peptides were dried in a SpeedVac Concentrator Plus (Eppendorf) for 3 hours, resuspended in 30 µl of 5% ACN, 0.5% FA and stored at -20 °C until MS analysis.

After thawing and gentle shaking the resuspended peptides for ~20 min, each fraction was loaded and separated by reverse phase liquid chromatography (LC) and analyzed by tandem MS/MS in a Q Exactive orbitrap mass spectrometer equipped with a nano-flow ultra-HPLC system (Easy nLC-1000, Thermo Fisher Scientific). In short, peptides were separated using 100 µm ID × 15 cm length PicoTip™ EMITTER columns (New Objective) filled with ReproSil-Pur C18-AQ reverse-phase beads (3 µm, 120Å) (Dr. Maisch GmbH, Germany) using linear gradients of 5%–35% ACN, 0.1% FA (30 min) at a flow rate of 300 nl min⁻¹, followed by 35%–80% ACN, 0.1% FA (5 min) at 600 nl min⁻¹ and a final column wash with

80% ACN (5 min) at 600 nl min⁻¹. All settings for the mass spectrometer operation were the same as detailed in (Guerrero-Castillo *et al*, 2017). The 60 fractions of each yeast strain were analyzed thrice by LC-MS/MS (three biological replicates).

MS raw data files from all individual fractions were analyzed using MaxQuant (v1.5.0.25) against the *S. cerevisiae* reference proteome entries retrieved from Uniprot (UP000002311, 26.03.2022). Settings applied: Trypsin/P, as protease, N-terminal acetylation, deamidation (NQ) and methionine oxidation (1 and 2 sites) as variable modifications; cysteine carbamidomethylation as fixed modification; two trypsin missed cleavages; matching between runs, 2 min matching time window; 6 residues as minimal peptide length; common contaminants included, I=L. All other parameters were kept as default. Individual protein abundances were determined by label-free quantification using the obtained intensity-based absolute quantification (iBAQ) values. To account for gel slicing, protein loading and MS sensitivity variations, complexome profiles were aligned and normalized against the list of identified yeast proteins annotated as mitochondrial in UniProt using the tool COPAL (Van Strien *et al*, 2019). For each protein group, migration profiles were generated and normalized to the maximal abundance through all fractions (relative abundance). Hierarchical clustering of the migration patterns of all identified proteins was applied using an average linkage algorithm with centered Pearson correlation distance measures. Resulting complexome profiles consisting of a list of proteins arranged according to the similarity of their migration patterns in BN-PAGE were visualized as heatmaps representing the normalized abundance in each gel slice by a three-color gradient (black/yellow/red) and processed in Microsoft Excel 2019 for analysis. Data from three biological replicates were averaged to generate the final complexome profiles. For proteins Qcr7 and Qcr8, low-score peptides that were not found in all replicates were manually excluded from the analysis. The mass calibration for the BN gel was performed using the apparent molecular masses of well-known membrane and soluble proteins from *S. cerevisiae* (see below for data availability).

Enzyme activity assays.

Activity measurements were carried out for succinate:decylubiquinone reductase (Complex II), decylubiquinol:cytochrome *c* reductase (complex III) and cytochrome *c* oxidase (complex IV) by spectrophotometric measurements using a SpectraMax ABS Plus

microplate reader (Molecular Devices). Unsealed mitochondrial membranes were thawed on ice and diluted to 100 µg/ml in 25 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5) with 2mM PMSF. In all cases, activity assays were performed at 25°C, recorded for 3 min and using 20 µg/ml mitochondrial membranes. Complex II activities were measured in 25 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5), 10 mM succinate, 1mg/mL bovine serum albumin (BSA), 2 µM antimycin A, 500 µM sodium cyanide and 80 µM 2,6-dichlorophenolindo-phenol (DCPIP). The reactions were initiated with the addition of 70 µM decylubiquinone (DBQ) and resultant reduction of DCPIP was followed at 600 nm ($\epsilon_{600\text{nm}} = 19.1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Further, 10mM malonate was added to inhibit the reaction and the residual activity was subtracted accordingly. Complex III activities were measured in 25 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5), 0.1 mM EDTA, 500 µM NaCN, 100 µM decylubiquinol (DBQH₂). The reactions were initiated with the addition of 75 µM oxidized cytochrome *c* and its reduction was followed at 550 nm ($\epsilon_{550\text{nm}} = 18.5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). 2 µM antimycin A was added to inhibit the reaction and the residual activity was later subtracted. Similarly, Complex II+III activities were measured in 25 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5), 1 mg/mL BSA, 10 mM succinate, 500 µM NaCN. The reactions were initiated with the addition of 75 µM oxidized cytochrome *c* and its reduction was followed at 550 nm. Residual activities in the presence of 10 mM malonate were subtracted from the respective measurements. To account for variation between preparations, all data were corrected against complex IV activities, which were measured in 25 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) with 2 µM antimycin A. The reactions were initiated with the addition of 50 µM reduced cytochrome *c* and its oxidation was followed at 550 nm. 1mM NaCN was added to inhibit the reaction and residual activities were subtracted.

Photo-Cross linking of Cbp3.

Δcbp3 cells that contained EcYRS-Bpa (*E. coli* tyrosyl-tRNA synthetase) and tRNA (*E. coli* tyrosyl tRNA_{CUA}) integrated in the yeast nuclear genome; were transformed with a plasmid containing *CBP3-HIS₇* with amber stop codons at the desired positions. Cells were grown o/n in 50 ml of minimal medium (SGal-Leu) with 250 µl of 200 mM pBpa in darkness and harvested in logarithmic growth phase. Cells were radiolabeled with [³⁵S]-Methionine in the presence of cycloheximide for *in vivo* translation for 40 min, as described above. Cells were

resuspended in SGal-Leu and transferred to a 12 well-plate to irradiate with UV-light at 350 nm for 45 min. Cells were then treated with 0.1 M NaOH for 5 min at room temperature and lysate with 140 µl of 4% SDS, 100 mM DTT for 5 min at 95 °C. The cross-linked products were purified on Ni-NTA beads (Quiagen) as previously described (Ndi *et al.*, 2019). Proteins were separated by SDS-PAGE 16%, transferred to PVDF membrane, revealed by autoradiography and immunodecorated with antibodies against Cbp3.

Data availability

The complexome profiling dataset was deposited in the ComplexomE profiling DATA Resource (CEDAR) (Van Strien *et al.*, 2019) website (<https://www3.cmbi.umcn.nl/cedar/browse/experiments/CRX37>) for free public access with the accession code CRX37. The mass calibration curves are available in the submitted processed dataset file (tab: Mass calibration). Raw data and other datasets generated and/or analyzed during this study are available from the corresponding authors upon appropriate request.

Author contributions

XP-M conceived and coordinated the study, analyzed the results, and together with A. C-O wrote the manuscript. DF-M performed and analyzed the experiments from all figures, constructed yeast mutants and contributed with the writing of the manuscript. YC-V constructed yeast strains and plasmids. AEG-G contributed to elaboration of Fig 1. and Fig EV1. V. C, G.L-R and EBGCM contributed on the elaboration of Fig EV3. A.C-O, M.L. and U.B performed enzyme activity assays and complexome profiling data analysis and interpretation. All authors analyzed the results and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

We thank Thomas D. Fox, Rosemary Stuart for the gift of antisera; Thomas D. Fox, Gabriel del Río-Guerra and Teresa Lara-Ortiz for the gift of yeast strains. We thank Martin Ott and

Andreas Carlström (Stockholm University) for advice on the experiment of Fig EV4. We thank the technical support provided by Tecilli Cabellos-Avelar and Enrique Chávez. We thank Ulrik Pedroza-Ávila for careful reading of the manuscript. This work was supported by research grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) [47514 to XP-M], and fellowship [777444 to D. F-M; 255917 to A. E. G-G.]; and Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, (PAPIIT), UNAM [IN202720 and IN2223623 to XP-M]. A. C-O, M. L. and U. B. are supported by the Netherlands Organization for Health Research and Development (ZonMW TOP-Grant 91217009). This manuscript is part of the doctoral dissertation of Daniel Flores-Mireles from the Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Disclosure and competing interests statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Berndtsson J, Aufschnaiter A, Rathore S, Marin-Buera L, Dawitz H, Diessl J, Kohler V, Barrientos A, Büttner S, Fontanesi F *et al* (2020) Respiratory supercomplexes enhance electron transport by decreasing cytochrome c diffusion distance. *EMBO Rep* 21: e51015

Bonjardim CA, Pereira LS, Nobrega FG (1996) Analysis of exon and intron mutants in the cytochrome b mitochondrial gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 30: 200-205

Bonnefoy N, Bsath N, Fox TD (2001) Mitochondrial translation of *Saccharomyces cerevisiae* COX2 mRNA is controlled by the nucleotide sequence specifying the pre-Cox2p leader peptide. *Mol Cell Biol* 21: 2359-2372

Bonnefoy N, Fox TD (2007) Directed alteration of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial DNA by biolistic transformation and homologous recombination. *Methods Mol Biol* 372: 153-166

Burke D, Dawson D, Stearns T, Cold Spring Harbor Laboratory. (2000) *Methods in yeast genetics : a Cold Spring Harbor Laboratory course manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.

Choquet Y, Wollman FA (2002) Translational regulations as specific traits of chloroplast gene expression. *FEBS Lett* 529: 39-42

Conte A, Papa B, Ferramosca A, Zara V (2015) The dimerization of the yeast cytochrome bc1 complex is an early event and is independent of Rip1. *Biochim Biophys Acta* 1853: 987-995

Crivellone MD (1994) Characterization of CBP4, a new gene essential for the expression of ubiquinol-cytochrome c reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 269: 21284-21292

Cruciat CM, Brunner S, Baumann F, Neupert W, Stuart RA (2000) The cytochrome bc1 and cytochrome c oxidase complexes associate to form a single supracomplex in yeast mitochondria. *J Biol Chem* 275: 18093-18098

Dieckmann CL, Koerner TJ, Tzagoloff A (1984) Assembly of the mitochondrial membrane system. CBP1, a yeast nuclear gene involved in 5' end processing of cytochrome b pre-mRNA. *J Biol Chem* 259: 4722-4731

Dieckmann CL, Tzagoloff A (1985) Assembly of the mitochondrial membrane system. CBP6, a yeast nuclear gene necessary for synthesis of cytochrome b. *J Biol Chem* 260: 1513-1520

Diekert K, de Kroon AI, Kispal G, Lill R (2001) Isolation and subfractionation of mitochondria from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Cell Biol* 65: 37-51

Dunham MJ, Gartenberg MR, Brown GW (2015) *Methods in yeast genetics and genomics : a Cold Spring Harbor Laboratory course manual / Maitreya J. Dunham, University of Washington, Marc R. Gartenberg, Robert Wood Johnson Medical School, Rutgers, The State University of New Jersey, Grant W. Brown, University of Toronto*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

García-Guerrero AE, Camacho-Villasana Y, Zamudio-Ochoa A, Winge DR, Pérez-Martínez X (2018) Cbp3 and Cbp6 are dispensable for synthesis regulation of cytochrome. *J Biol Chem* 293: 5585-5599

García-Villegas R, Camacho-Villasana Y, Shingú-Vázquez M, Cabrera-Orefice A, Uribe-Carvajal S, Fox TD, Pérez-Martínez X (2017) The Cox1 C-terminal domain is a central regulator of cytochrome. *J Biol Chem* 292: 10912-10925

Ghezzi D, Arzuffi P, Zordan M, Da Re C, Lamperti C, Benna C, D'Adamo P, Diodato D, Costa R, Mariotti C *et al* (2011) Mutations in TTC19 cause mitochondrial complex III deficiency and neurological impairment in humans and flies. *Nat Genet* 43: 259-263

Gruschke S, Kehrein K, Römpler K, Gröne K, Israel L, Imhof A, Herrmann JM, Ott M (2011) Cbp3-Cbp6 interacts with the yeast mitochondrial ribosomal tunnel exit and promotes cytochrome b synthesis and assembly. *J Cell Biol* 193: 1101-1114

Gruschke S, Römpler K, Hildenbeutel M, Kehrein K, Kühl I, Bonnefoy N, Ott M (2012) The Cbp3-Cbp6 complex coordinates cytochrome b synthesis with bc(1) complex assembly in yeast mitochondria. *J Cell Biol* 199: 137-150

Guerrero-Castillo S, Baertling F, Kownatzki D, Wessels HJ, Arnold S, Brandt U, Nijtmans L (2017) The Assembly Pathway of Mitochondrial Respiratory Chain Complex I. *Cell Metab* 25: 128-139

Guo R, Zong S, Wu M, Gu J, Yang M (2017) Architecture of Human Mitochondrial Respiratory Megacomplex I. *Cell* 170: 1247-1257.e1212

Hartley AM, Lukoyanova N, Zhang Y, Cabrera-Orefice A, Arnold S, Meunier B, Pinotsis N, Maréchal A (2019) Structure of yeast cytochrome c oxidase in a supercomplex with cytochrome bc. *Nat Struct Mol Biol* 26: 78-83

Hartley AM, Meunier B, Pinotsis N, Maréchal A (2020) Rcf2 revealed in cryo-EM structures of hypoxic isoforms of mature mitochondrial III-IV supercomplexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117: 9329-9337

Heide H, Bleier L, Steger M, Ackermann J, Dröse S, Schwamb B, Zörnig M, Reichert AS, Koch I, Wittig I *et al* (2012) Complexome profiling identifies TMEM126B as a component of the mitochondrial complex I assembly complex. *Cell Metab* 16: 538-549

Hildenbeutel M, Hegg EL, Stephan K, Gruschke S, Meunier B, Ott M (2014) Assembly factors monitor sequential hemylation of cytochrome b to regulate mitochondrial translation. *J Cell Biol* 205: 511-524

Islas-Osuna MA, Ellis TP, Marnell LL, Mittelmeier TM, Dieckmann CL (2002) Cbp1 is required for translation of the mitochondrial cytochrome b mRNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 277: 37987-37990

Iwata S, Lee JW, Okada K, Lee JK, Iwata M, Rasmussen B, Link TA, Ramaswamy S, Jap BK (1998) Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc₁ complex. *Science* 281: 64-71

Kim HJ, Jeong MY, Na U, Winge DR (2012) Flavinylation and assembly of succinate dehydrogenase are dependent on the C-terminal tail of the flavoprotein subunit. *J Biol Chem* 287: 40670-40679

Lange C, Hunte C (2002) Crystal structure of the yeast cytochrome bc₁ complex with its bound substrate cytochrome c. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 2800-2805

Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 87: 206-210

Meunier B, Fisher N, Ransac S, Mazat JP, Brasseur G (2013) Respiratory complex III dysfunction in humans and the use of yeast as a model organism to study mitochondrial myopathy and associated diseases. *Biochim Biophys Acta* 1827: 1346-1361

Ndi M, Marin-Buera L, Salvatori R, Singh AP, Ott M (2018) Biogenesis of the bc₁. *J Mol Biol* 430: 3892-3905

Ndi M, Masuyer G, Dawitz H, Carlström A, Michel M, Elofsson A, Rapp M, Stenmark P, Ott M (2019) Structural basis for the interaction of the chaperone Cbp3 with newly synthesized cytochrome. *J Biol Chem* 294: 16663-16671

Notredame C, Higgins DG, Heringa J (2000) T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* 302: 205-217

Ott M, Amunts A, Brown A (2016) Organization and Regulation of Mitochondrial Protein Synthesis. *Annu Rev Biochem* 85: 77-101

Oyedotun KS, Lemire BD (1997) The carboxyl terminus of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase membrane subunit, SDH4p, is necessary for ubiquinone reduction and enzyme stability. *J Biol Chem* 272: 31382-31388

Perez-Martinez X, Broadley SA, Fox TD (2003) Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. *EMBO J* 22: 5951-5961

Rathore S, Berndtsson J, Marin-Buera L, Conrad J, Carroni M, Brzezinski P, Ott M (2019) Cryo-EM structure of the yeast respiratory supercomplex. *Nat Struct Mol Biol* 26: 50-57

Rödel G (1986) Two yeast nuclear genes, CBS1 and CBS2, are required for translation of mitochondrial transcripts bearing the 5'-untranslated COB leader. *Curr Genet* 11: 41-45

Rödel G, Fox TD (1987) The yeast nuclear gene CBS1 is required for translation of mitochondrial mRNAs bearing the cob 5' untranslated leader. *Mol Gen Genet* 206: 45-50

Salvatori R, Kehrein K, Singh AP, Aftab W, Möller-Hergt BV, Forne I, Imhof A, Ott M (2020) Molecular Wiring of a Mitochondrial Translational Feedback Loop. *Mol Cell* 77: 887-900.e885

Schägger H, Brandt U, Gencic S, von Jagow G (1995) Ubiquinol-cytochrome-c reductase from human and bovine mitochondria. *Methods Enzymol* 260: 82-96

Schägger H, Pfeiffer K (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J* 19: 1777-1783

Shingú-Vázquez M, Camacho-Villasana Y, Sandoval-Romero L, Butler CA, Fox TD, Pérez-Martínez X (2010) The carboxyl-terminal end of Cox1 is required for feedback assembly regulation of Cox1 synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *J Biol Chem* 285: 34382-34389

Sousa JS, Mills DJ, Vonck J, Kühlbrandt W (2016) Functional asymmetry and electron flow in the bovine respirasome. *Elife* 5

Stephan K, Ott M (2020) Timing of dimerization of the bc. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1861: 148177

Van Strien J, Guerrero-Castillo S, Chatzisprou IA, Houtkooper RH, Brandt U, Huynen MA (2019) COMplexome Profiling ALIGNment (COPAL) reveals remodeling of mitochondrial protein complexes in Barth syndrome. *Bioinformatics* 35: 3083-3091

Wanschers BF, Szklarczyk R, van den Brand MA, Jonckheere A, Suijskens J, Smeets R, Rodenburg RJ, Stephan K, Helland IB, Elkamil A *et al* (2014) A mutation in the human CBP4 ortholog UQCC3 impairs complex III assembly, activity and cytochrome b stability. *Hum Mol Genet* 23: 6356-6365

Westermann B, Herrmann JM, Neupert W (2001) Analysis of mitochondrial translation products in vivo and in organello in yeast. *Methods Cell Biol* 65: 429-438

Wittig I, Braun HP, Schägger H (2006) Blue native PAGE. *Nat Protoc* 1: 418-428

Wittig I, Karas M, Schagger H (2007) High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Mol Cell Proteomics* 6: 1215-1225

Wu M, Gu J, Guo R, Huang Y, Yang M (2016) Structure of Mammalian Respiratory Supercomplex I. *Cell* 167: 1598-1609.e1510

Wu M, Tzagoloff A (1989) Identification and characterization of a new gene (CBP3) required for the expression of yeast coenzyme QH₂-cytochrome c reductase. *J Biol Chem* 264: 11122-11130

Zara V, Conte L, Trumpower BL (2007) Identification and characterization of cytochrome bc(1) subcomplexes in mitochondria from yeast with single and double deletions of genes encoding cytochrome bc(1) subunits. *FEBS J* 274: 4526-4539

Zara V, Conte L, Trumpower BL (2009a) Biogenesis of the yeast cytochrome bc1 complex. *Biochim Biophys Acta* 1793: 89-96

Zara V, Conte L, Trumpower BL (2009b) Evidence that the assembly of the yeast cytochrome bc1 complex involves the formation of a large core structure in the inner mitochondrial membrane. *FEBS J* 276: 1900-1914

Figure Legends

Figure 1. The *Cytb* C-terminal region is necessary for respiratory growth and *Cytb* stability.

A) Cells carrying the indicated mutations were grown on complete media with glucose or ethanol/glycerol as carbon source for two days at 30°C.

B) Cells carrying the indicated mutations were labeled with (³⁵S)-Methionine in the presence of cycloheximide and analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. Mitochondrial products were Var1 (small ribosomal subunit protein Var1); Cox1, Cox2 and Cox3, subunits 1, 2 and 3, respectively, from cytochrome *c* oxidase; *Cytb*, subunit from *bc₁* complex; Atp6, subunit 6 from ATP synthase. The *Δcbs1* mutant was used as a negative control for absence of *Cytb* synthesis (Rödel & Fox, 1987).

C) A sample of 20 μg of mitochondrial protein from the indicated strains was loaded on SDS-PAGE and analyzed by Western blot. Citrate synthase (CS) antibody was used as loading control. This is a representative Western blot experiment from 3 independent repeats. The asterisk (*) indicates an unspecific signal associated with the polyclonal antibody against *Cytb*.

D) Cells carrying WT *Cytb* or *Cytb*ΔC13 were labelled with (³⁵S)-Methionine in the presence of cycloheximide as in Figure 1B.

Figure 2. The *Cytb* C-terminal region is necessary for assembly-feedback regulation of *Cytb* synthesis.

A) Purified mitochondria (500 μg) from the indicated strains and carrying a hemagglutinin-tagged Cbp3 (Cbp3-HA) were labeled with (^{35}S)-Methionine. 10% of the reaction was used for the total fraction. Mitochondria were solubilized with 1% digitonin, and extracts were immunoprecipitated with a HA antibody. Samples were separated by SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. This membrane was analyzed by autoradiography and incubated with the indicated antibodies. Citrate synthase (CS) antibody was used as loading control and as negative control for immunoprecipitation of Cbp3-HA.

B) Signals of immunoprecipitated *Cytb* from three independent experiments \pm SEM (Fig 1A) were normalized to the signal from the immunoprecipitated Cbp3-HA and quantified densitometrically. The densitometries are expressed as mean with SD of three different repetitions ($n=3$) were analyzed by Image J. Statistical analysis performed by one-way ANOVA followed by Bonferroni to compare the mean of each group to the control (WT), $*p < 0.05$ vs WT.

C) Mitochondria (100 μg) were solubilized with digitonin (3 mg/mg protein) and separated by BN-PAGE. One lane from each sample was cut into 60 slices and analyzed by LC-MS/MS. The heat maps (top) and abundance plots (bottom) show the relative abundance of Cbp3 and Cbp6 (data normalized to maximum iBAQ values across the two profiles). Averaged data from three biological replicates are shown.

Figure 3. The *Cytb* carboxyl terminal region is necessary for assembly of the *bc1* dimer and supercomplexes.

A) Heat maps of migration profiles for all *bc1* complex subunits in wild-type and mutant *Cytb* Δ C13 as determined by complexome profiling. III₂, complex III dimer; III₂/IV₁, III₂/IV₂, supercomplexes containing complex III and one or two copies of complex IV, respectively.

B) Migration profiles of averaged subunits of complexes III and IV from wild-type and mutant *Cytb* Δ C13 as determined by complexome profiling from three biological replicates

are presented as heatmaps (top) and abundance plots (bottom). III₂, complex III dimer; III₂/IV₁, III₂/IV₂, supercomplexes containing complex III and one or two copies of complex IV, respectively.

Figure 4. Lack of the *Cytb* carboxyl terminal region induced changes in accumulation and composition of early-stage assembly intermediates.

Abundance and distribution of *Cytb*, Cbp3, Cbp6, Cbp4, Qcr7 and Qcr8 from WT *Cytb* (A) and *Cytb*ΔC13 (B) mitochondria were analyzed by complexome profiling. Heat maps (top) and migration plots (bottom) show the relative abundance values for the respective proteins. For data visualization and interpretation, the relative abundance of all analyzed proteins in the mass range between 40-400 kDa were re-normalized. First, the observed values of *Cytb*, Cbp3, Cbp6, Cbp4 were normalized to intermediate I^{7,8} at 144 kDa and set as 1.0 in the WT strain. Next, the relative abundances of subunits Qcr7 and Qcr8 were normalized to intermediate II and set to the adjusted value of Cbp4 at 91 kDa. The profiles of WT and mutant strains were re-normalized together. Abbreviations: 0: intermediate 0 (*Cytb*, Cbp3 and Cbp6); I: intermediate I (*Cytb*, Cbp3, Cbp6 and Cbp4); II: intermediate II (*Cytb*, Cbp4, Qcr7 and Qcr8); 0^{7,8}: intermediate 0 associated with Qcr7/Qcr8; I^{7,8}: intermediate I associated with Qcr7/Qcr8; I⁸: intermediate I associated with Qcr8; II^{Δ7}: intermediate II lacking Qcr7 (see also EV Fig 4 and EV Table 1 for extra details). Averaged data from three biological replicates.

Figure 5. Schematic model for participation of the *Cytb* carboxyl terminal region on regulation of *Cytb* synthesis and *bc₁* complex assembly.

After translational activation of the *COB* mRNA, the *Cytb* C-terminal region, exposed to the mitochondrial matrix, changes conformation throughout early assembly intermediates 0, I, II, and in low abundance 0^{7,8} and I^{7,8}. This region of the protein allows correct association with Cbp3/Cbp6 for *Cytb* hemylation and synthesis regulation. After hemylation, the *Cytb*

C-terminal region changes until it reaches its final conformation once *bc₁* complex is fully assembled. If the *Cytb* C-terminal region is missing, then there is an overall decreased accumulation of intermediates 0, I, 0^{7,8} and I^{7,8}; intermediate II is lost and instead intermediates II^{Δ7} and I⁸ appear. Upon truncation of *Cytb* C-terminus, Cbp3/Cbp6 binding is inefficient, and free Cbp3/Cbp6 heterodimers are accumulated. Consequently, the assembly feedback regulation of *Cytb* synthesis is lost, so now *Cytb* is efficiently translated even if *Qcr7* subunit is missing. Since canonical intermediate II is not formed in the mutant, the assembly of the *bc₁* complex is abrogated. Low abundant, not previously described intermediates 0^{7,8}, I^{7,8}, and I⁸ are shown as transparent images.

Expanded View Figure 1. The last eight residues of the *Cytb* C-terminal region are necessary for assembly-feedback regulation of *Cytb* synthesis.

A) Left panel, the *Cytb* C-terminal region from different species was aligned using T-COFFEE (Notredame *et al*, 2000). Identical amino acids are indicated with an asterisk. Sequence numbering is indicated for each species. Right panel, a structural model from yeast complex III (PDB 1KY0) (Lange & Hunte, 2002) indicates the *Cytb* C-terminal region residues (red) from where deletions were created. The grey line indicates the approximate position of the matrix side facing membrane interface.

B) Autoradiograms of cells carrying WT *Cytb* or *Cytb*ΔC8 were labelled with (³⁵S)-Methionine in the presence of cycloheximide and separated by SDS-PAGE. Mutant *Δcbs1* was used as control for null *Cytb* synthesis (Rödel & Fox, 1987).

Expanded View Figure 2. Deletion of the *Cytb* C-terminal region affect Cbp3/Cbp6 subcomplexes accumulation.

Mitochondria (100 μg) from the indicated mutants were solubilized with digitonin 2% and separated by 5-12% BN-PAGE. A lane from this gel was analyzed by second dimension

SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane. Samples were analyzed by Western blot against *Cytb*, *Cbp3* or *Cox1* antibodies. Molecular masses from the BN-PAGE are indicated at the bottom. The asterisk (*) indicates an unspecific signal associated to the polyclonal antibody against *Cytb*. III₂, complex III dimer; III₂/IV and III₂/IV₂ represent supercomplexes with one or two monomers of complex IV, respectively.

Expanded View Figure 3. The *Cytb* C-terminal region is necessary for assembly and activity of the *bc₁* complex.

A) UV-visible difference spectrum from purified mitochondria (1.5 mg) (dithionite reduced minus oxidized). *Δcbs1* mitochondria were used as negative control for complete absence of *Cytb*. The maxima of hemes *a*, *b*, and *c* are indicated by vertical lines.

B) Enzyme activities (using 20 μg/ml of mitochondrial membranes) for complexes II, II+III, III and IV were measured spectrophotometrically. To account for batch differences, all specific activities were divided by the specific CII activity determined in the respective sample. Averages of the resulting quotients, i.e. (CII+CIII)/CII, CIII/CII and CIV/CII, from the WT strain were set as 100%, respectively. Normalized data against the WT strain are shown as percentage values (%). Specific activities (averages ± SD) for the WT strain: CII, 0.145 ± 0.03 U/mg; CII+CIII, 0.141 ± 0.02 U/mg; CIII, 0.3 ± 0.09 U/mg; CIV, 0.39 ± 0.04 U/mg. Statistically significant changes were determined using a student's t-test analysis; **p<0.01, ***p<0.001 (n=3 independent preparations; 8-12 technical replicates).

C) Mitochondria (100 μg) were solubilized with 1% n-Dodecyl β-D-maltoside and separated by BN-PAGE. One gel was used for cytochrome *c* oxidase (CIV) activity staining and one for Coomassie stain (used as loading control). Another gel was used for Western blot against *Cytb* and Rieske Iron-sulfur protein (Rip1).

Expanded View Figure 4. *Cbp3* residues K185, D188 and K215 are not necessary for physical interaction with the *Cytb* C-terminal region.

Δcbp3 strains were transformed with a plasmid expressing *CBP3-HIS₇* mutants that introduced an amber stop codon in positions codifying K185, D188 or K215. Cells were grown O/N with pBpa. Mitochondrial products were labeled with (³⁵S)-Methionine in the presence of cycloheximide. The cells were lysate and subjected to Ni-NTA pulldown to purify Cbp3-HIS₇. Eluates (E) and total fraction representing 5% of the sample (T) were TCA precipitated and analyzed by SDS-PAGE, autoradiography (A) and Western blot using an antibody against Cbp3 (B).

Expanded View Table 1. Composition of *bc₁* complex assembly intermediates observed in WT *Cytb* and *CytbΔC13* mitochondria by complexome profiling. The columns show the apparent molecular masses (App. M_r) compared to the theoretical calculated masses (Calc. M_r) of the different subunits and chaperones present in early-stage *bc₁* complex assembly intermediates. The difference between apparent and calculated molecular masses is shown in column ΔM_r . Presence of each subunit or chaperone as component of a given intermediate is indicated with an “X”.

Expanded View Table 1. Composition of *bc*₁ complex assembly intermediates observed in WT *Cytb* and *Cytb*ΔC13 mitochondria by complexome profiling.

	Intermediate	App. M _r kDa	Calc. M _r kDa	ΔM _r kDa	<i>Cytb</i>	<i>Cbp3</i>	<i>Cbp6</i>	<i>Cbp4</i>	<i>Qcr7</i>	<i>Qcr8</i>
Wild-type	II	91	87	4	X			X	X	X
	0 ^{7,8}	124	123	1	X	X	X		X	X
	I	115	115	0	X	X	X	X		
	I ^{7,8}	144	141	3	X	X	X	X	X	X
<i>Cytb</i>ΔC13	II ⁴⁷	72	71	1	X			X		X
	0	98	95	3	X	X	X			
	0 ^{7,8}	124	121	3	X	X	X		X	X
	I	115	113	2	X	X	X	X		
	I ⁸	124	124	0	X	X	X	X		X
	I ^{7,8}	144	139	5	X	X	X	X	X	X

Comparison of experimental apparent molecular mass (App. M_r) and calculated molecular mass (Calc. M_r), as well as the difference between these two values (ΔM_r) are indicated. Presence of proteins in the indicated intermediates on the left side is indicated by an "X".

Supplemental Table S1

Strain	Nuclear (mitochondrial) genotype	Reference/source
NAB69	<i>Mata, ade2-101, arg8-delta::hisG, ura3-52, kar1-1 (ρ^0)</i>	(Bonnefoy <i>et al.</i> , 2001)
NB71	<i>Mata, ade2-101, ura3-52, leu2-delta, arg8-delta::URA3, kar1-1, (cox3Δ:ARG8^m-1)</i>	(Bonnefoy <i>et al.</i> , 2001)
BY4742	<i>Mata, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, BY4742</i>	YKO <i>Mata</i> Strain Collection (Open Biosystems)
NB40-36a	<i>Mata, arg8::hisG, leu2-3,112, lys2, ura3-52, D273-10B</i>	(Perez-Martinez <i>et al.</i> , 2003)
DFM1	<i>Mata, ade2-101, arg8-delta::hisG, ura3-52, kar1-1^o(ρ, pYCV66)</i>	This study
DFM2	<i>Mata, arg8::URA3, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, BY4742 (^b $\Delta\Sigma$ ai, cobΔ::ARG8^m)</i>	(García-Guerrero <i>et al.</i> , 2018)
DFM4	<i>Mata, ade2-101, arg8-delta::hisG, ura3-52, kar1-1 (ρ^-, pMD2)</i>	This study
DFM6	<i>Mata, arg8::URA3, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, BY4742 ($\Delta\Sigma$ ai, ^c $\Delta\Sigma$ bi)</i>	This study
DFM7	<i>Mata, ade2-101, arg8-delta::hisG, ura3-52, kar1-1 (ρ^-, pDM4)</i>	This study
DFM8	<i>Mata, ade2-101, arg8-delta::hisG, ura3-52, kar1-1(ρ^-, pDM6)</i>	This study
DFM9	<i>Mata, arg8::URA3, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, BY4742 ($\Delta\Sigma$ ai, COBΔC13)</i>	This study
DFM10	<i>Mata, arg8::URA3, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, BY4742 ($\Delta\Sigma$ ai, COBΔC8)</i>	This study
DFM11	<i>Mata, arg8::URA3, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, cbp3Δ::KANMX4, BY4742 ($\Delta\Sigma$ ai, COBΔC8)</i>	This study
DFM12	<i>Mata, arg8::URA3, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, cbp6Δ::LEU2, BY4742 ($\Delta\Sigma$ ai, COBΔC8)</i>	This study
DFM13	<i>Mata, arg8::URA3, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, qcr7Δ::KANMX4, BY4742 ($\Delta\Sigma$ ai, COBΔC8)</i>	This study

DFM14	<i>Mata, arg8::URA3, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, cbs1Δ::HIS3, BY4742 (ΔΣai, COBΔC8)</i>	This study
DFM15	<i>Mata, ade2-101, arg8-delta::hisG, ura3-52, kar1-1 (cobΔ::ARG8^m)</i>	This study
DFM16	<i>Mata, arg8::hisG, leu2-3,112, lys2, ura3-52, D273-10B (ΔΣai, cobΔ::ARG8^m)</i>	This study
DFM21	<i>Mata, arg8::hisG, leu2-3,112, lys2, ura3-52, D273-10B (ΔΣai, ΔΣbi)</i>	This study
DFM24	<i>Mata, arg8::hisG, leu2-3,112, lys2, ura3-52, D273-10B (ΔΣai, COBΔC13)</i>	This study
DFM25	<i>Mata, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, cbp3Δ::KANMX4, ^dHIS3::pBpa-RS::tRNA^{CUA} (pBpa), BY4742</i>	This study
DFM26	<i>Mata, arg8::URA3, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, cbp3Δ::KANMX4, HIS3::pBpa-RS::tRNA^{CUA} (pBpa), BY4742 (ΔΣai, COBΔC13)</i>	This study
AGG26	<i>Mata, arg8::URA3, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, BY4742 (ΔΣai)</i>	(García-Guerrero et al., 2018)
AGG58	<i>Mata, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, cbp3Δ::KANMX4, BY4742</i>	(García-Guerrero et al., 2018)
AGG59	<i>Mata, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, cbp6Δ::LEU2, BY4742</i>	(García-Guerrero et al., 2018)
AGG68	<i>Mata, his3-delta1, leu2-delta0, met15-delta0, ura3-delta0, qcr7Δ::KANMX4, BY4742</i>	(García-Guerrero et al., 2018)
AGG77	<i>Mata, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, cbs1Δ::URA3, BY4742</i>	(García-Guerrero et al., 2018)
AGG78	<i>Mata, arg8::hisG, leu2-3,112, lys2, ura3-52, cbs1Δ::URA3, D273-10B</i>	(García-Guerrero et al., 2018)
YCV167	<i>Mata, arg8::URA3, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, qcr7Δ::KANMX4, BY4742 (ΔΣai, COBΔC13)</i>	This study
YCV168	<i>Mata, arg8::URA3, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, cbs1Δ::HIS3, BY4742 (ΔΣai, COBΔC13)</i>	This study
YCV169	<i>Mata, arg8::URA3, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, cbp3Δ::KANMX4, BY4742 (ΔΣai, COBDC13)</i>	This study

YCV170	<i>Mata</i> , <i>arg8::URA3</i> , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>cbp6Δ::LEU2</i> , BY4742 ($\Delta\Sigma ai$, <i>COBΔC13</i>)	This study
YVC171	<i>Mata</i> , <i>arg8::URA3</i> , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>cbs1Δ::HIS3</i> , BY4742 ($\Delta\Sigma ai$, $\Delta\Sigma bi$)	This study
YCV176	<i>Mata</i> , <i>arg8::URA3</i> , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>cbp3Δ::KANMX4</i> , BY4742 $\Delta D\Sigma ai$, $\Delta\Sigma bi$)	This study
YCV177	<i>Mata</i> , <i>arg8::URA3</i> , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>qcr7Δ::KANMX4</i> , BY4742 ($\Delta\Sigma ai$, $\Delta\Sigma bi$)	This study
YCV178	<i>Mata</i> , <i>arg8::URA3</i> , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>cbp6Δ::LEU2</i> , BY4742 ($\Delta\Sigma ai$, $\Delta\Sigma bi$)	This study
M17-162	<i>Mata</i> , <i>met6 (cob2)</i>	(Bonjardim <i>et al.</i> , 1996)
M17-162 4D	<i>Mata</i> , <i>ade1 (cob2)</i>	(Bonjardim <i>et al.</i> , 1996)

^a Parenthesis refer to the mitochondrial genotypes

^b $\Delta\Sigma ai$ refers to the intronless *COX1* gene

^c $\Delta\Sigma bi$ refers to the intronless *COB* gene

^d *pBpa-RS* refers to the tRNA synthetase for pBpa and *tRNA^{CUA} (pBpa)* refers to the tRNA for pBPa

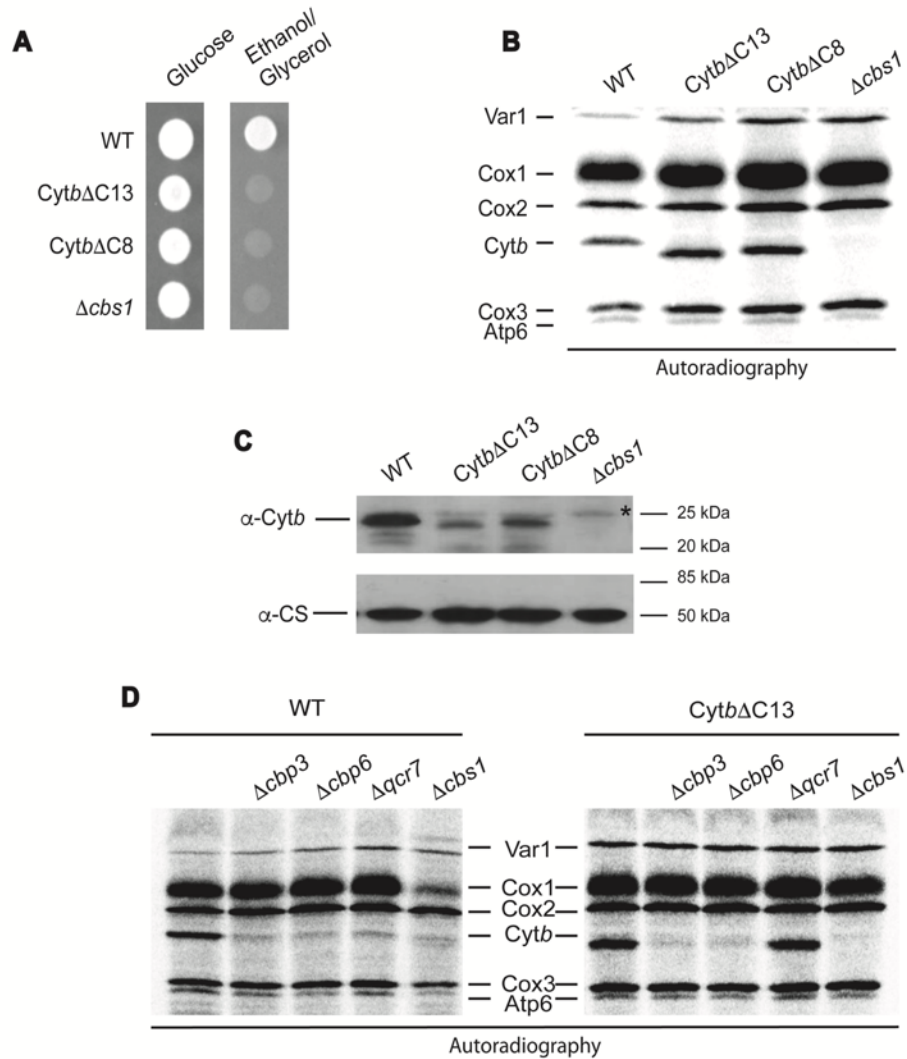


Figure 1. The *Cytb* C-terminal region is necessary for respiratory growth and *Cytb* stability.

A) Cells carrying the indicated mutations were grown on complete media with glucose or ethanol/glycerol as carbon source for two days at 30°C.

B) Cells carrying the indicated mutations were labeled with (³⁵S)-Methionine in the presence of cycloheximide and analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. Mitochondrial products were Var1 (small ribosomal subunit protein Var1); Cox1, Cox2 and Cox3, subunits 1, 2 and 3, respectively, from cytochrome *c* oxidase; *Cytb*, subunit from *bc₁* complex; Atp6, subunit 6 from ATP synthase. The Δ*cbs1* mutant was used as a negative control for absence of *Cytb* synthesis (Rödel & Fox, 1987).

C) A sample of 20 μg of mitochondrial protein from the indicated strains was loaded on SDS-PAGE and analyzed by Western blot. Citrate synthase (CS) antibody was used as loading control. This is a representative Western blot experiment from 3 independent repeats. The asterisk (*) indicates an unspecific signal associated with the polyclonal antibody against *Cytb*.

D) Cells carrying WT *Cytb* or *Cytb*ΔC13 were labelled with (³⁵S)-Methionine in the presence of cycloheximide as in Figure 1B.

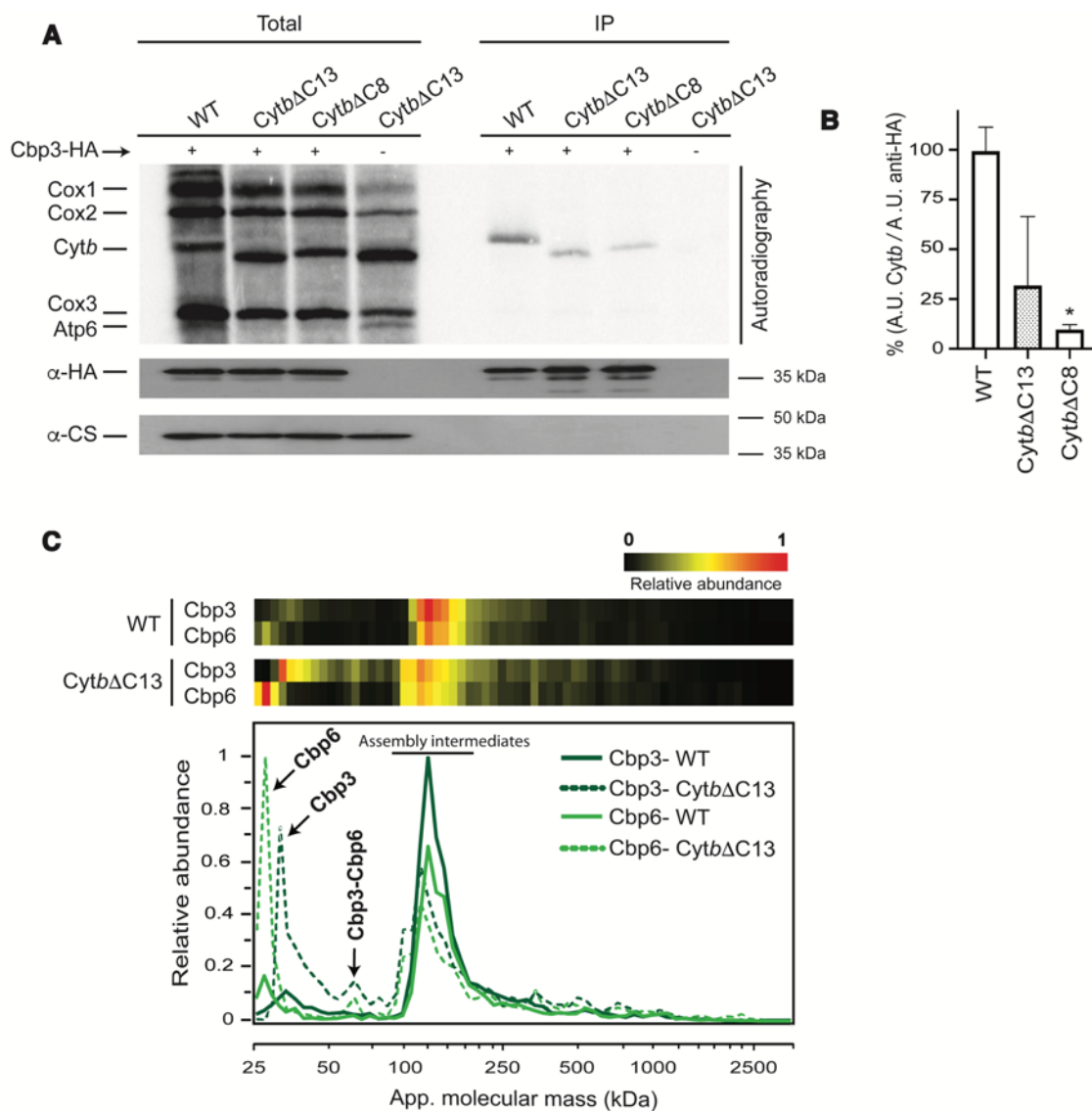


Figure 2. The Cytb C-terminal region is necessary for assembly-feedback regulation of Cytb synthesis.

A) Purified mitochondria (500 μ g) from the indicated strains and carrying a hemagglutinin-tagged Cbp3 (Cbp3-HA) were labeled with (35 S)-Methionine. 10% of the reaction was used for the total fraction. Mitochondria were solubilized with 1% digitonin, and extracts were immunoprecipitated with a HA antibody. Samples were separated by SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. This membrane was analyzed by autoradiography and incubated with the indicated antibodies. Citrate synthase (CS) antibody was used as loading control and as negative control for immunoprecipitation of Cbp3-HA.

B) Signals of immunoprecipitated Cytb from three independent experiments \pm SEM (Fig. 1A) were normalized to the signal from the immunoprecipitated Cbp3-HA and quantified densitometrically. The densitometries are expressed as mean with SD of three different repetitions (n=3) were analyzed by Image J. Statistical analysis performed by one-way ANOVA followed by Bonferroni to compare the mean of each group to the control (WT), * $p < 0.05$ vs WT.

C) Mitochondria (100 μ g) were solubilized with digitonin (3 mg/mg protein) and separated by BN-PAGE. One lane from each sample was cut into 60 slices and analyzed by LC-MS/MS. The heat maps (top) and abundance plots (bottom) show the relative abundance of Cbp3 and Cbp6 (data normalized to maximum iBAQ values across the two profiles). Averaged data from three biological replicates are shown.

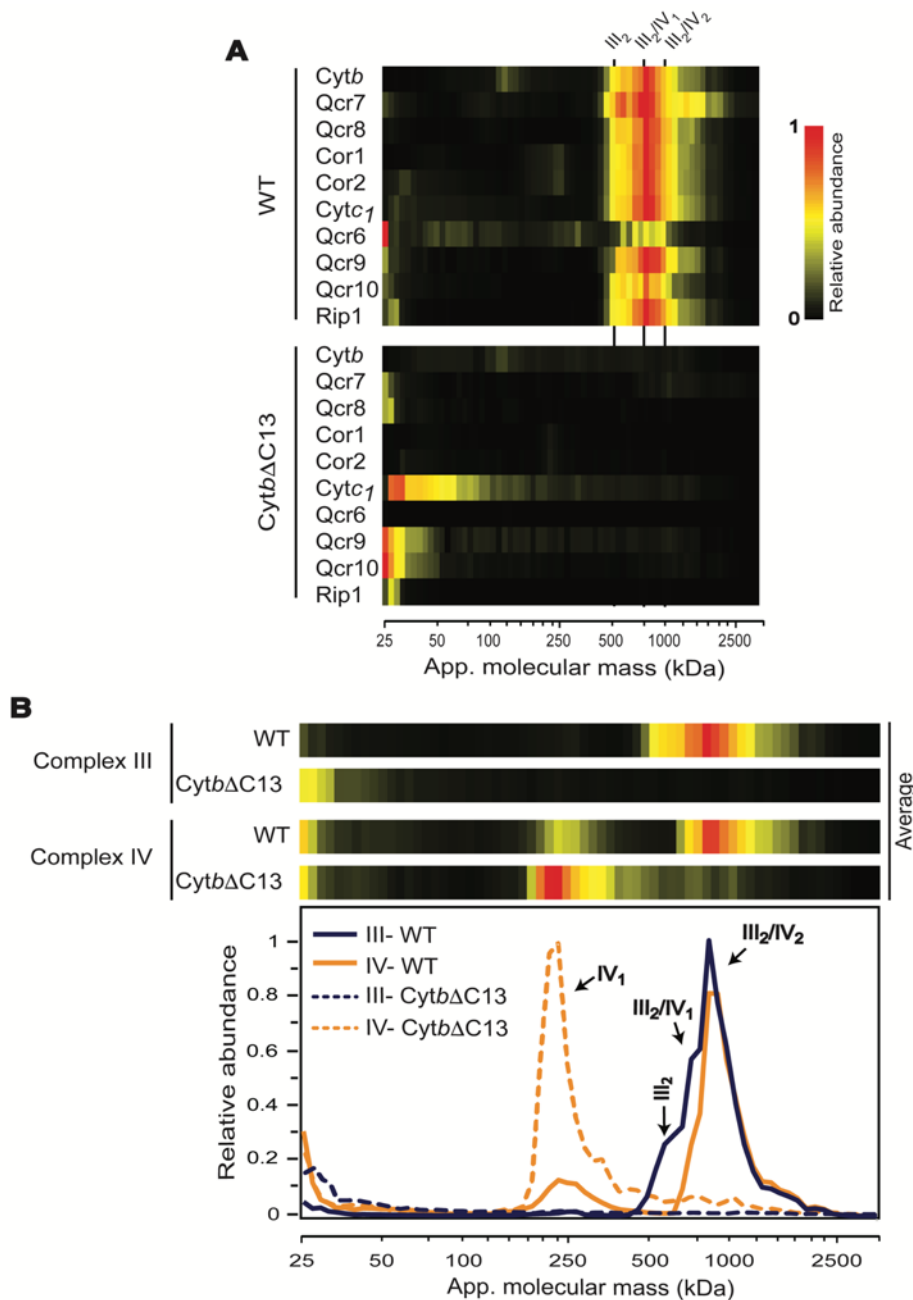


Figure 3. The *Cytb* carboxyl terminal region is necessary for assembly of the bc_1 dimer and supercomplexes.

A) Heat maps of migration profiles for all bc_1 complex subunits in wild-type and mutant *Cytb* Δ C13 as determined by complexome profiling. III₂, complex III dimer; III₂/IV₁, III₂/IV₂, supercomplexes containing complex III and one or two copies of complex IV, respectively.

B) Migration profiles of averaged subunits of complexes III and IV from wild-type and mutant *Cytb* Δ C13 as determined by complexome profiling from three biological replicates are presented as heatmaps (top) and abundance plots (bottom). III₂, complex III dimer; III₂/IV₁, III₂/IV₂, supercomplexes containing complex III and one or two copies of complex IV, respectively.

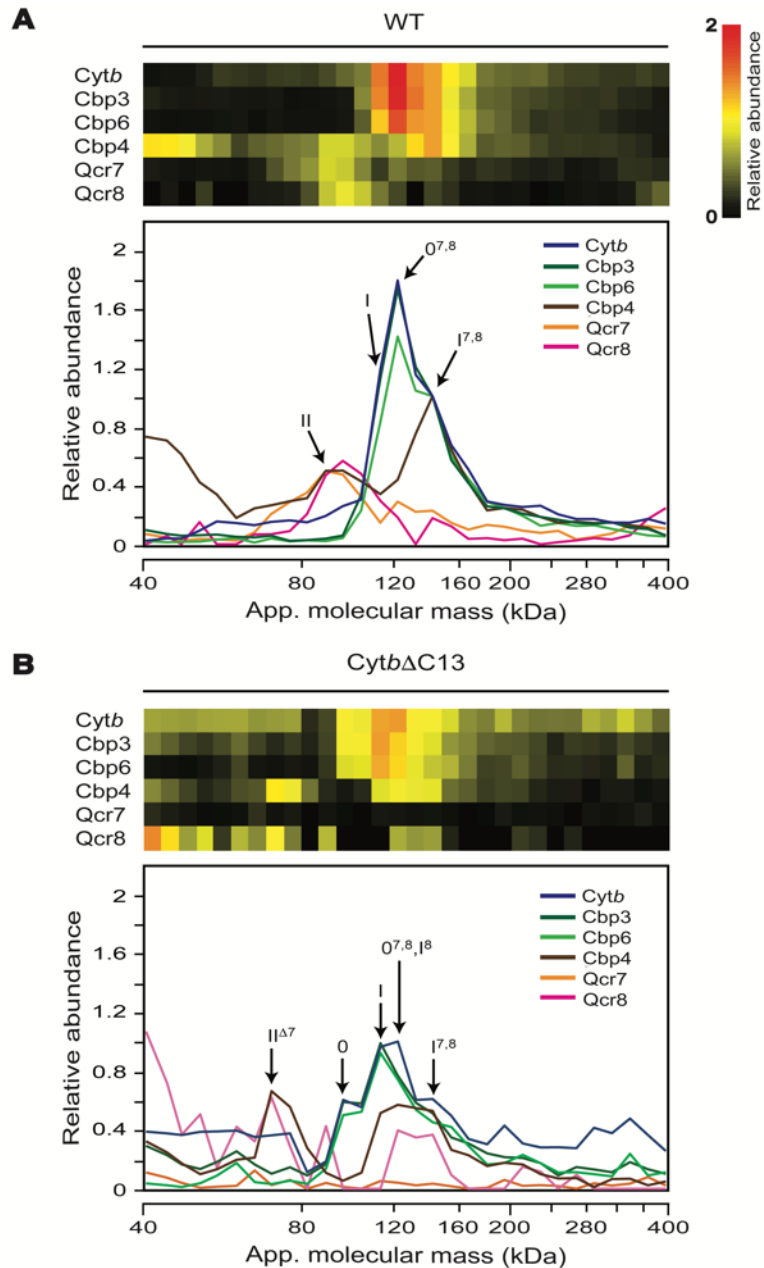


Figure 4. Lack of the *Cytb* carboxyl terminal region induced changes in accumulation and composition of early-stage assembly intermediates.

Abundance and distribution of *Cytb*, *Cbp3*, *Cbp6*, *Cbp4*, *Qcr7* and *Qcr8* from WT *Cytb* (A) and *Cytb* Δ C13 (B) mitochondria were analyzed by complexome profiling. Heat maps (top) and migration plots (bottom) show the relative abundance values for the respective proteins. For data visualization and interpretation, the relative abundance of all analyzed proteins in the mass range between 40-400 kDa were re-normalized. First, the observed values of *Cytb*, *Cbp3*, *Cbp6*, *Cbp4* were normalized to intermediate I^{7,8} at 144 kDa and set as 1.0 in the WT strain. Next, the relative abundances of subunits *Qcr7* and *Qcr8* were normalized to intermediate II and set to the adjusted value of *Cbp4* at 91 kDa. The profiles of WT and mutant strains were re-normalized together. Abbreviations: 0: intermediate 0 (*Cytb*, *Cbp3* and *Cbp6*); I: intermediate I (*Cytb*, *Cbp3*, *Cbp6* and *Cbp4*); II: intermediate II (*Cytb*, *Cbp4*, *Qcr7* and *Qcr8*); 0^{7,8}: intermediate 0 associated with *Qcr7*/*Qcr8*; I^{7,8}: intermediate I associated with *Qcr7*/*Qcr8*; I⁸: intermediate I associated with *Qcr8*; II^{Δ7}: intermediate II lacking *Qcr8* (see also EV Fig 4 and EV Table 1 for extra details). Averaged data from three biological replicates.

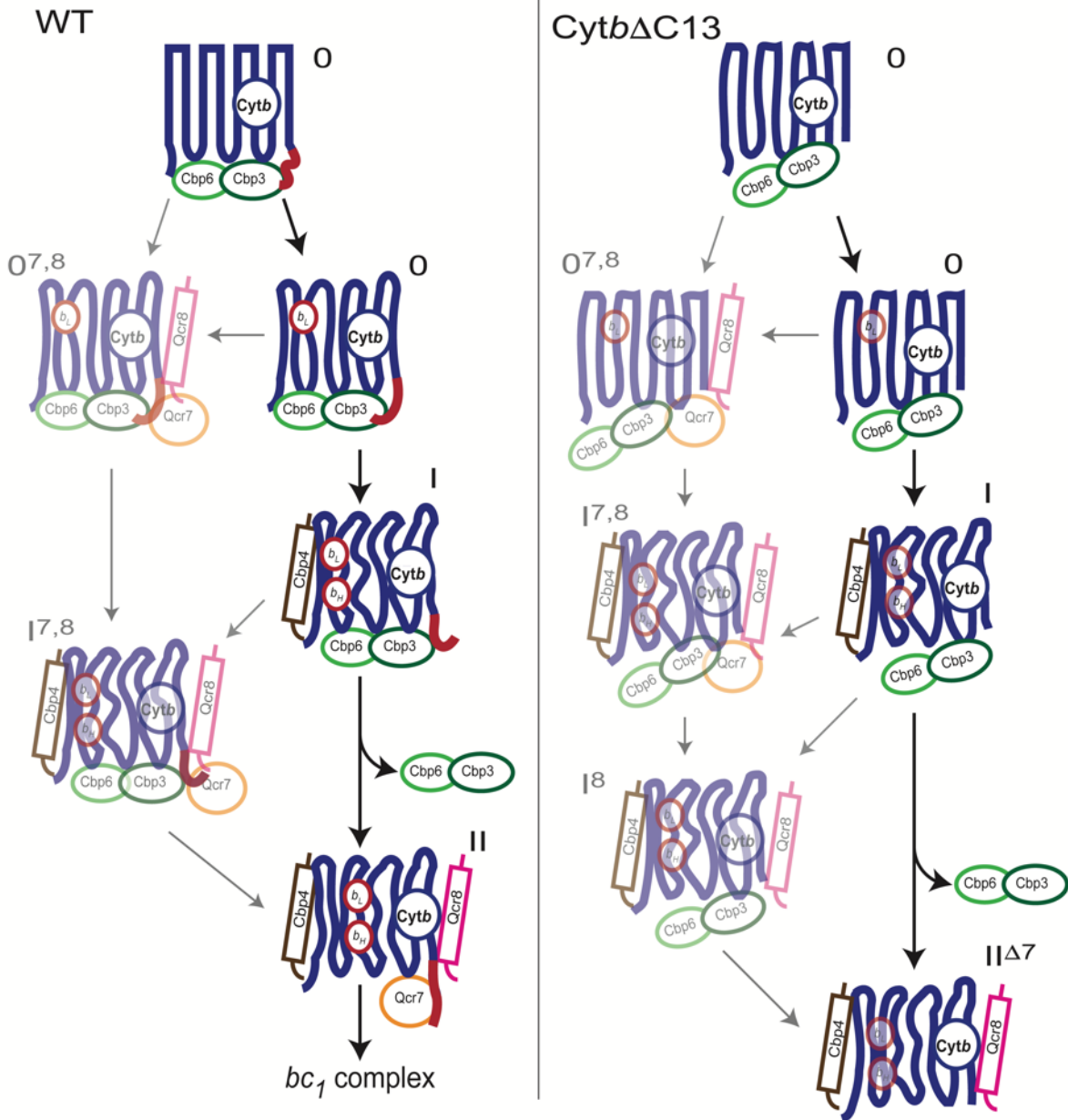
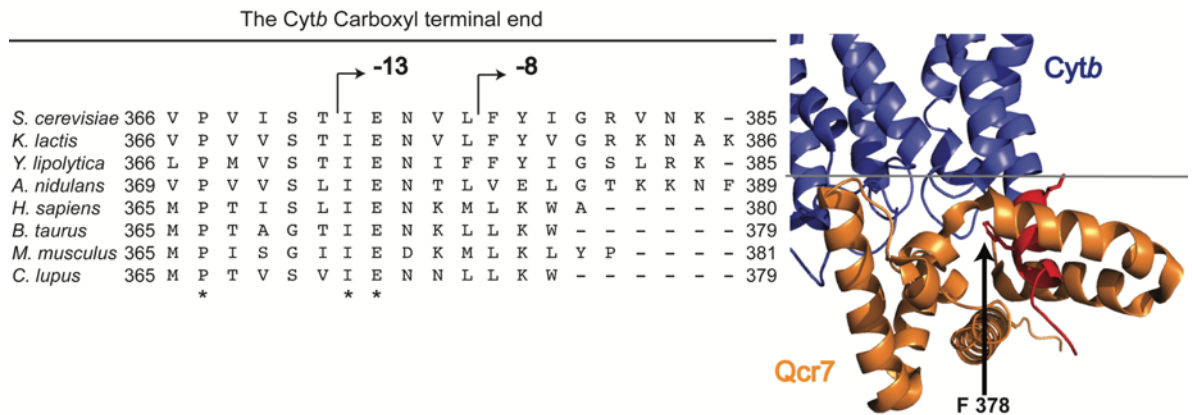
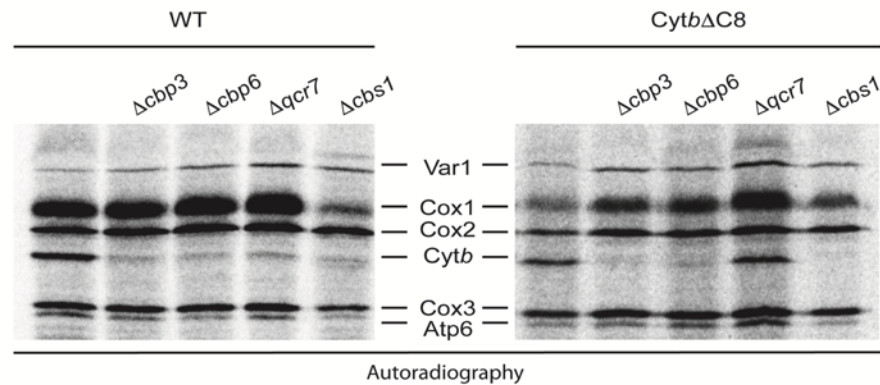


Figure 5. Schematic model for participation of the *Cytb* carboxyl terminal region on regulation of *Cytb* synthesis and *bc*₁ complex assembly.

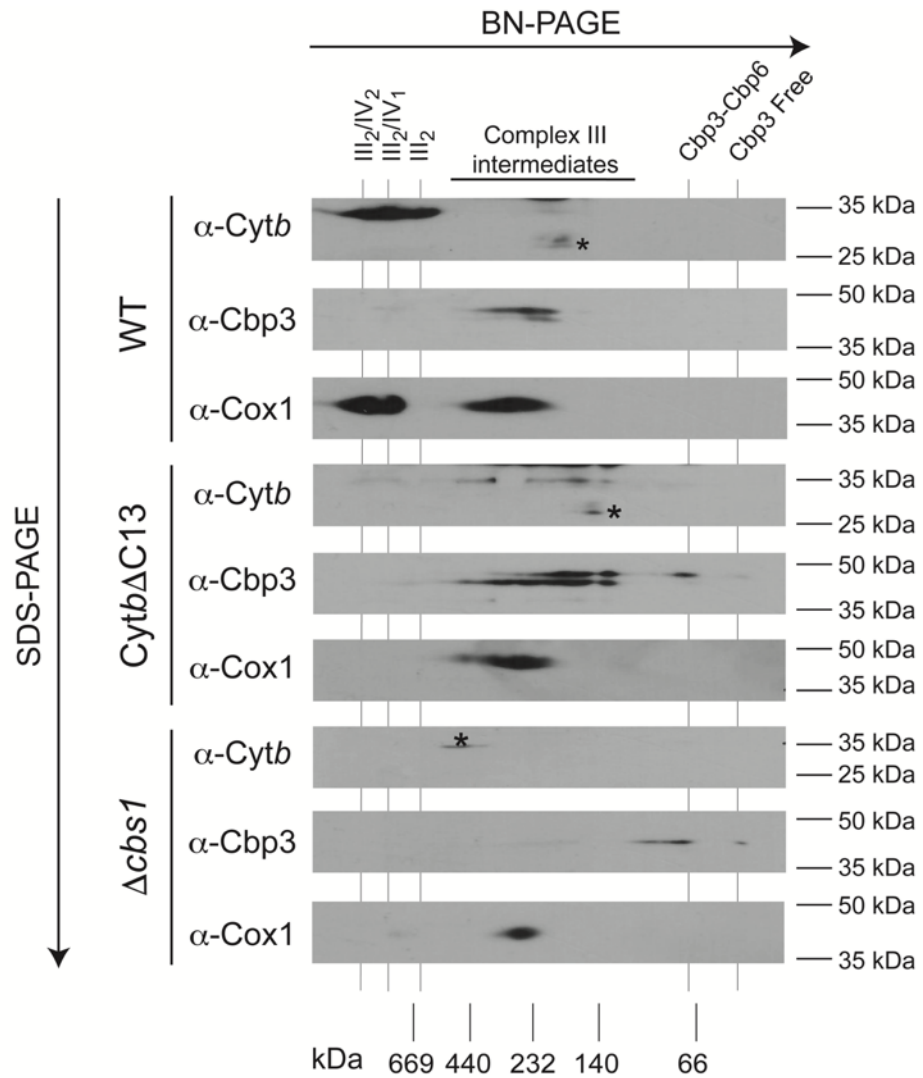
After translational activation of the *COB* mRNA, the *Cytb* C-terminal region, exposed to the mitochondrial matrix, changes conformation throughout early assembly intermediates 0, I, II, and in low abundance 0^{7,8} and I^{7,8}. This region of the protein allows correct association with Cbp3/Cbp6 for *Cytb* hemylation and synthesis regulation. After hemylation, the *Cytb* C-terminal region changes until it reaches its final conformation once *bc*₁ complex is fully assembled. If the *Cytb* C-terminal region is missing, then there is an overall decreased accumulation of intermediates 0, I, 0^{7,8} and I^{7,8}; intermediate II is lost and instead intermediates II^{Δ7} and I⁸ appear. Upon truncation of *Cytb* C-terminus, Cbp3/Cbp6 binding is inefficient, and free Cbp3/Cbp6 heterodimers are accumulated. Consequently, the assembly feedback regulation of *Cytb* synthesis is lost, so now *Cytb* is efficiently translated even if Qcr7 subunit is missing. Since canonical intermediate II is not formed in the mutant, the assembly of the *bc*₁ complex is abrogated. Low abundant, not previously described intermediates 0^{7,8}, I^{7,8}, and I⁸ are shown as transparent images.

A**B**

Expanded View Figure 1. The last eight residues of the *Cytb* C-terminal region are necessary for assembly-feedback regulation of *Cytb* synthesis.

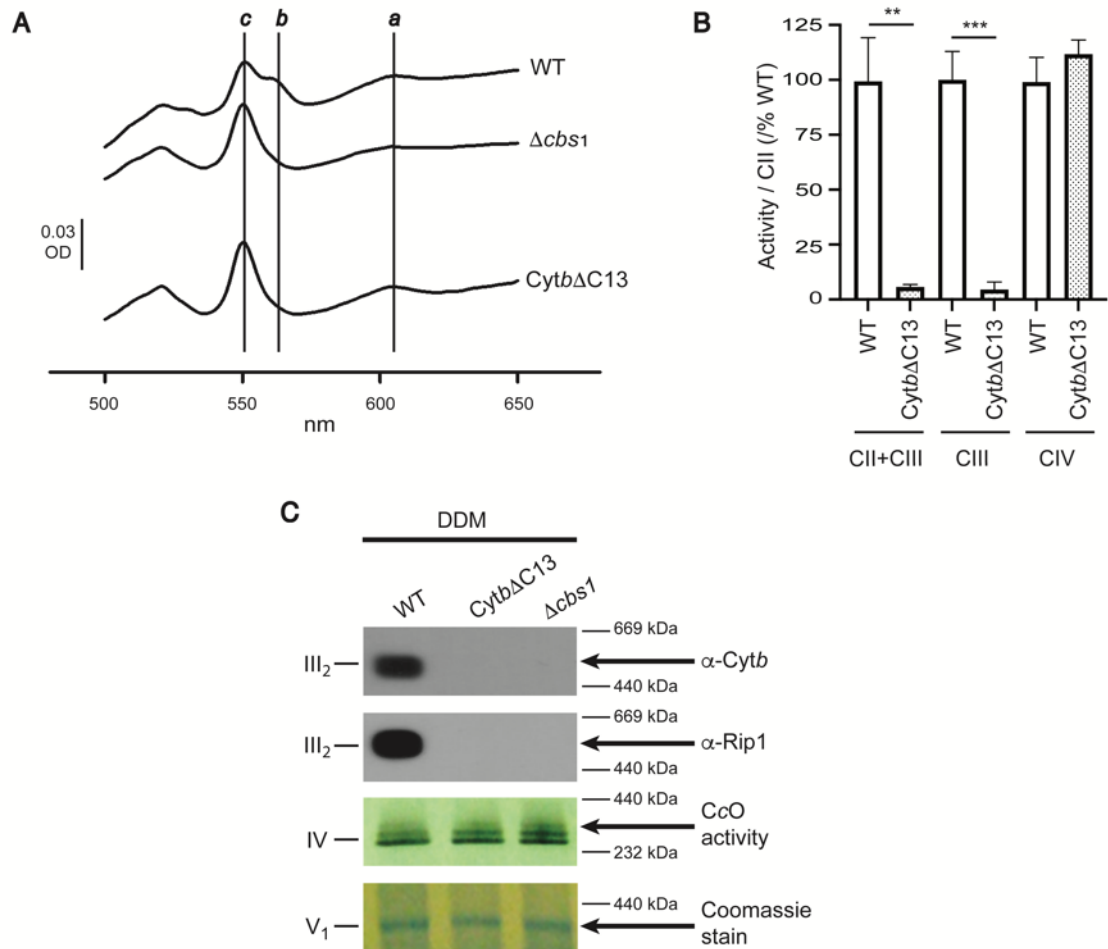
A) Left panel, the *Cytb* C-terminal region from different species was aligned using T-COFFEE (Notredame et al, 2000). Identical amino acids are indicated with an asterisk. Sequence numbering is indicated for each species. Right panel, a structural model from yeast complex III (PDB 1KYO) (Lange & Hunte, 2002) indicates the *Cytb* C-terminal region residues (red) from where deletions were created. The grey line indicates the approximate position of the matrix side facing membrane interface.

B) Autoradiograms of cells carrying WT *Cytb* or *Cytb*ΔC8 were labelled with ³⁵S-Methionine in the presence of cycloheximide and separated by SDS-PAGE. Mutant Δ cbs1 was used as control for null *Cytb* synthesis (Rödel & Fox, 1987).



Expanded View Figure 2. Deletion of the Cytb C-terminal region affect Cbp3/Cbp6 subcomplexes accumulation.

Mitochondria (100 μ g) from the indicated mutants were solubilized with digitonin 2% and separated by 5-12% BN-PAGE. A lane from this gel was analyzed by second dimension SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane. Samples were analyzed by Western blot against Cytb, Cbp3 or Cox1 antibodies. Molecular masses from the BN-PAGE are indicated at the bottom. The asterisk (*) indicates an unspecific signal associated to the polyclonal antibody against Cytb. III₂, complex III dimer; III₂/IV₁ and III₂/IV₂ represent supercomplexes with one or two monomers of complex IV, respectively.



Expanded View Figure 3. The Cytb C-terminal region is necessary for assembly and activity of the *bc*₁ complex.

A) UV-visible difference spectrum from purified mitochondria (1.5 mg) (dithionite reduced minus oxidized). $\Delta cbs1$ mitochondria were used as negative control for complete absence of Cytb. The maxima of hemes *a*, *b*, and *c* are indicated by vertical lines.

B) Enzyme activities (using 20 μ g/ml of mitochondrial membranes) for complexes II, II+III, III and IV were measured spectrophotometrically. To account for batch differences, all specific activities were divided by the specific CII activity determined in the respective sample. Averages of the resulting quotients, i.e. (CII+CIII)/CII, CIII/CII and CIV/CII, from the WT strain were set as 100%, respectively. Normalized data against the WT strain are shown as percentage values (%). Specific activities (averages \pm SD) for the WT strain: CII, 0.145 ± 0.03 U/mg; CII+CIII, 0.141 ± 0.02 U/mg; CIII, 0.3 ± 0.09 U/mg; CIV, 0.39 ± 0.04 U/mg. Statistically significant changes were determined using a student's *t*-test analysis; ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 (n=3 independent preparations; 8-12 technical replicates).

C) Mitochondria (100 μ g) were solubilized with 1% n-Dodecyl β -D-maltoside and separated by BN-PAGE. One gel was used for cytochrome c oxidase (CIV) activity staining and one for Coomassie stain (used as loading control). Another gel was used for Western blot against Cytb and Rieske Iron-sulfur protein (Rip1).

There is no Author Query !

The *ARG8^m* Reporter for the Study of Yeast Mitochondrial Translation

Daniel Flores-Mireles Affiliationids : Aff1

Yolanda Camacho-Villasana Affiliationids : Aff1

Xochitl Pérez-Martínez✉

Email : xperez@ifc.unam.mx

Affiliationids : Aff1, Correspondingaffiliationid : Aff1

Aff1 Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

Abstract

Mitochondrial translation is an intricate process involving both general and mRNA-specific factors. In addition, in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, translation of mitochondrial mRNAs is coupled to assembly of nascent polypeptides into the membrane. *ARG8^m* is a reporter gene widely used to study the mechanisms of yeast mitochondrial translation. This reporter is a recodified gene that uses the mitochondrial genetic code and is inserted at the desired *locus* in the mitochondrial genome. After deletion of the endogenous nuclear gene, this reporter produces Arg8, an enzyme necessary for arginine biosynthesis. Since Arg8 is a soluble protein with no relation to oxidative phosphorylation, it is a reliable reporter to study mitochondrial mRNAs translation and dissect translation form assembly processes. In this chapter, we explain how to insert the *ARG8^m* reporter in the desired spot in the mitochondrial DNA, how to analyze Arg8 synthesis inside mitochondria, and how to follow steady-state levels of the protein. We also explain how to use it to find spontaneous suppressors of translation defects.

Key words

ARG8^m

ATP synthase

bc₁ complex

Cytochrome c oxidase

Mitochondria

Mitochondrial DNA

Suppressor

Respiratory complexes

Translation

Yeast

1. Introduction

S. cerevisiae mitochondrial translation can be studied *in vivo* by location of different reporter genes in the mitochondrial DNA (mtDNA). This can happen due to the ease to transform and manipulate yeast mitochondrial DNA [1]. This process must consider addition of mitochondrial 5' and 3' flanking regions to the reporter gene and recodification since the yeast mitochondrial genetic code differs from the universal genetic code (Reviewed in [2]). The reporters that have been inserted into the mtDNA are Arg8 [3], GFP [4,5], and Barstar [6]. Arg8 is by far the most successfully used mitochondrial reporter, and today the studies of translation of all mtDNA-encoded mRNAs have used this reporter [3,7,8,9,10,11,12].

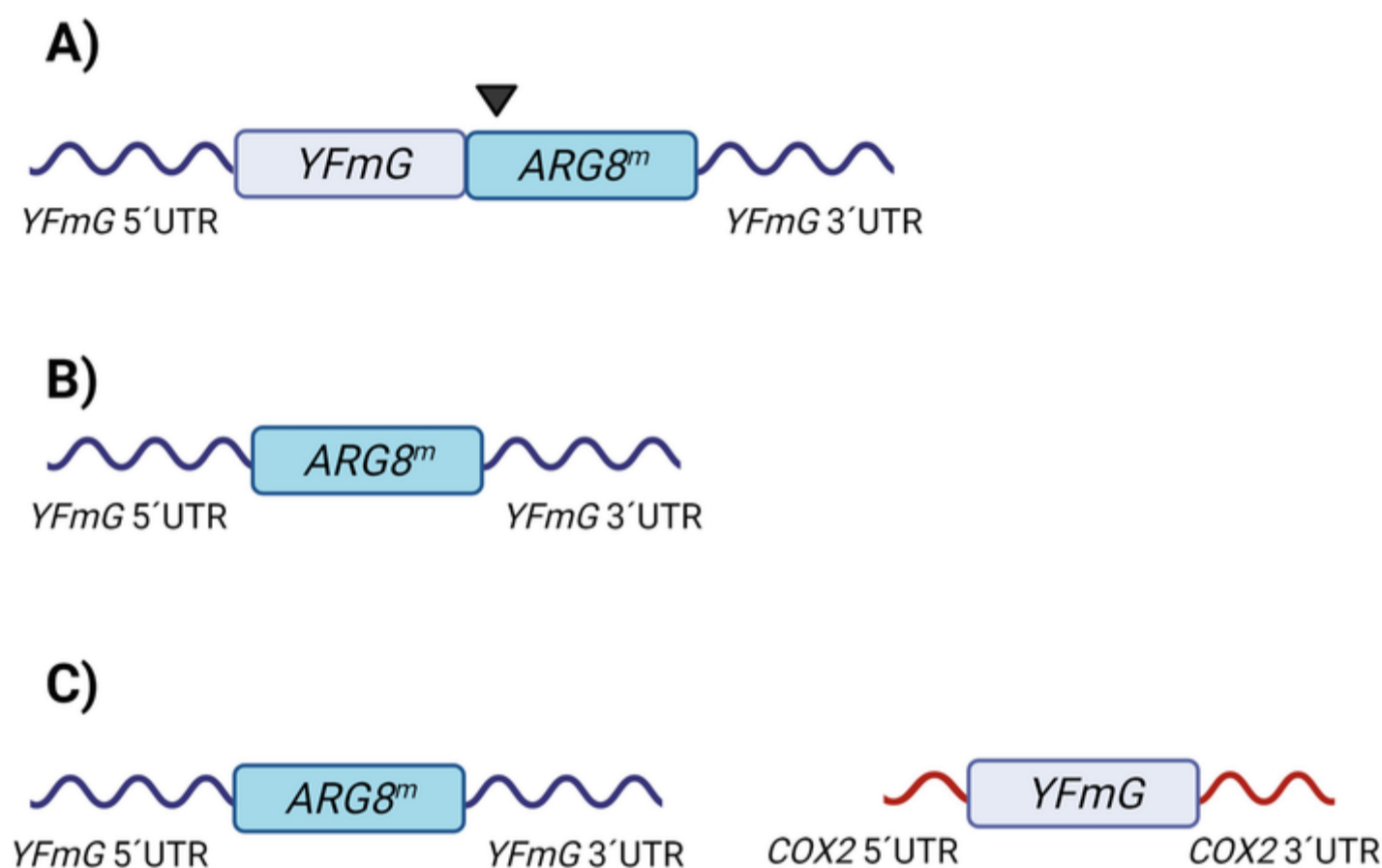
Arg8 is the acetylornithine aminotransferase (EC 2.6.1.11), an enzyme that participates in ornithine and arginine production [13]. In yeast, this enzyme is encoded by the nuclear gene *ARG8*, and the protein is directed to mitochondria with the aid of a mitochondrial targeting sequence (MTS) that is cleaved once the protein is localized in mitochondria. To use this protein as a reporter gene for mitochondrial mRNAs translation and as selectable marker, Steele and collaborators [3] deleted the nuclear gene and inserted a recodified version in the mtDNA, named *ARG8^m*, that uses the yeast mitochondrial genetic code. The produced Arg8 protein has the exact same sequence as the nuclear one, and the MTS can be included or not in this sequence, depending on the particular question we want to address. Since Arg8 is a soluble protein that has no relation to the oxidative phosphorylation (OXPHOS) complexes, it has

been demonstrated to be a reliable **reporter** to study **translation** of the **mtDNA**-encoded **OXPPOS** subunits and dissect it from posttranslational processes, like assembly.

This **reporter** can be fused in frame to a mitochondrial *orf* or a fragment of an *orf* to create chimeric proteins (see Fig. 1). In this context, one can analyze how the presence of the mitochondrial coding sequence of your favorite mitochondrial gene (*YFmG*) influences **translation**. *ARG8^m* can replace the coding region of *YFmG* and preserve the original 5' and 3' untranslated regions. This mutation is useful to analyze the role of untranslated regions of the **mRNA** of interest on **translation** of the **reporter**. In addition, the *orf* of *YFmG* can be inserted at an ectopic site in the mitochondrial genome. This site is commonly used and locates at 285 nt upstream of the *COX2* locus. Ectopic *YFmG*'s *orf* is flanked by the *COX2* UTRs since they are the shortest ones in the **mtDNA** and prevent **mtDNA** recombination with the original *COX2 locus*, leading to a stable mitochondrial genome [6]. In this context, it is possible to dissect the role of *YFmG*'s untranslated regions on one side, and of *YFmG*'s *orf* on the other side. Both *YFmG*'s untranslated regions and coding regions are present in the same **mtDNA** molecule, but physically apart (see Fig. 1). Moreover, *ARG8^m* have been inserted at this ectopic site to study stability of the **mtDNA** [14].

Fig. 1

The mitochondrial **reporter** gene *ARG8^m* can be inserted in the **mtDNA** in different forms. (a) The **reporter** can be fused in frame with the 3' end of your favorite mitochondrial gene (*YFmG*). The stop codon of *YFmG* is thus replaced by the *ARG8^m* coding sequence. This **reporter** could also be fused to fragments of *YFmG* if the effect of a particular section of *YFmG* on *ARG8^m* **translation** is to be analyzed. The *ARG8^m* sequence can code for the Arg8 mitochondrial targeting sequence (▼), so once the Yf_mg-Arg8 precursor is produced, the Arg8 moiety can release from Yf_mg region. (b) The *ARG8^m* **reporter** can completely replace the *YFmG* coding sequence. (c) The *ARG8^m* **reporter** completely replaces the *YFmG* coding sequence. In addition, *YFmG* coding sequence, flanked with ~73 and ~119 nucleotides from the *COX2* 5' and 3' UTRs, respectively, are inserted at an ectopic site of **mtDNA**, 285 nt upstream of the *COX2* coding sequence. (Created with [BioRender.com](https://www.biorender.com))



A detailed protocol for yeast mitochondrial transformation have been published [3]. Here we focused on how to transform and integrate *ARG8^m* into the mitochondrial genome (see Subheading 3.1), and how to growth yeast cells on media lacking arginine to assess *ARG8^m* **mRNA translation** (see Subheading 3.2). We also briefly explained how *ARG8^m* **translation** can be assessed by (³⁵S)-Methionine labeling (see Subheading 3.3), how to make quick and small mitochondrial preparations to study steady-state levels of the produced Arg8 protein (see Subheading 3.4), and how to use this **reporter** to find yeast **suppressors** that can help identifying new factors and pathways related to mitochondrial **translation** (see Subheading 3.5). Lastly, we included an example of how this **reporter** can be useful to differentiate between **translation** and posttranslational effects.

2. Materials

2.1. Media for Yeast Cell Growth

1. Complete media: 1% yeast extract, 2% bacto peptone, 2% glucose (for YPD), 2% Raffinose (for YPRaf), 2% **galactose** (for YPGal), or 3% glycerol/3% ethanol (for YPEG). For solid media, add 2% bacto agar.
2. Minimal media: 0.67% Nitrogen base without amino acids (BD Biosciences, Difco), 2% glucose, drop-out media lacking the desired amino acids, add according to the manufacturer's instructions (Formedium). For solid media, add 2% bacto agar.

- Bombardment (SD + Sorb + Ade + Arg) media: 0.67% Nitrogen base without amino acids, 5% glucose, 1 M sorbitol, 0.01% adenine, 0.015% arginine, and 2% bacto agar. Prepare this medium fresh since it contaminates easily. Do not keep it at 4 °C.
- Sporulation media: 1% Yeast extract, 1% Potassium acetate, glucose 0.05%, bacto agar 2%.

2.2. Mitopreps and Western blot

- MPZ buffer: 1.2 M Sorbitol, 20 mM Phosphate buffer pH 7.4 ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$), 0.04% Zymolyase 20T (AMSBIO, 120491-1).
- SHP buffer: 20 mM HEPES pH 7.4, 0.6 M Sorbitol, 0.33 $\mu\text{L}/\text{mL}$ Protease inhibitors cocktail for yeast (Sigma-Aldrich, P8215).
- Laemmli buffer: 100 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 0.2% bromophenol blue.
- 16% acrylamide for SDS-PAGE to separate proteins from *in vivo* or *in organello* translation assays (use a stock solution of 30% acrylamide, 0.3% bis-acrylamide): 388 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.01% SDS, 0.05% Ammonium persulfate, 0.05% N, N, N', N'-tetrametyletilendiamina.
- 12% acrylamide (from a stock solution of 30% acrylamide, 0.8% bis-acrylamide) 388 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.01% SDS, 0.05% Ammonium persulfate, 0.05% N, N, N', N'-tetrametyletilendiamina.
- Western blot blocking solution: 1% Fat-free milk, 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl.
- Western blot antibody solution: 0.1% Fat-free milk, 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA-Na pH 8.0, 0.1% Tween-20.
- We use a polyclonal antibody against Arg8 [3] diluted 1:10,000 and Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG diluted 1:2000 (Jackson Immuno Research, 111-035-144).
- Western blot washing solution: 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA-Na pH 8.0, 0.005% Tween-20.
- Stripping solution: 0.7% 2-Mercaptoethanol, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS.

2.3. Tetrad Dissection

- Digestion buffer: 1.5 mg/mL Zymolyase 20T, 1 M sorbitol. Store aliquots at -20 °C.
- Light microscope with micromanipulator (we use a Zeiss Scope A1 AX10 with a 10 \times /0.25 objective).

2.4. Mitochondrial Transformation

- PDS-1000/ He™ Biolistic Particle Delivery System (BIO-RAD).
- Helium tank grade 5 (99.99%).
- Rupture discs 1350 Psi (BIO-RAD, 1652330).
- Vacuum pump of 100 L/min capacity.
- The most used strains have the following genotype: *Mata* or *Mata*, *ura3-52*, *arg8 Δ ::hisG*, *ade2-101*, *Kar1-1 (rho⁰)*.

2.5. Serial Dilutions

- Replica plater for 96-well plate, 8 \times 6 array (Sigma-Aldrich, R2383).
- Assay plate 96-well flat bottom (Corning, 3370).

3. Methods

3.1. Mitochondrial Transformation to Insert the ARG8^m Reporter

Generation of yeast strains containing the ARG8^m reporter inserted at a desired site in the mitochondrial genome requires four general steps: (1) Transformation of a *rho*⁰ strain (strain devoid of mtDNA) with a bacterial plasmid containing the ARG8^m reporter to generate a synthetic *rho*⁻ strain (see Fig. 2a) (see **Note 1**). (2) Selection of transformants carrying the bacterial plasmid in mitochondria (correct synthetic *rho*⁻ cells) (see Fig. 2b). (3) Transfer of the ARG8^m reporter from the synthetic *rho*⁻ strain (donor)

to the yeast strain with **mtDNA** where the **reporter** will be finally integrated (acceptor) through cytoduction. (4) Selection of the correct acceptor colonies (see Fig. 3).

Fig. 2

Diagram of the procedure to (a) transform **mitochondria** with a bacterial plasmid containing $ARG8^m$ and to (b) select the synthetic ρ^- colonies after mitochondrial transformation. (Created with [BioRender.com](https://www.biorender.com))

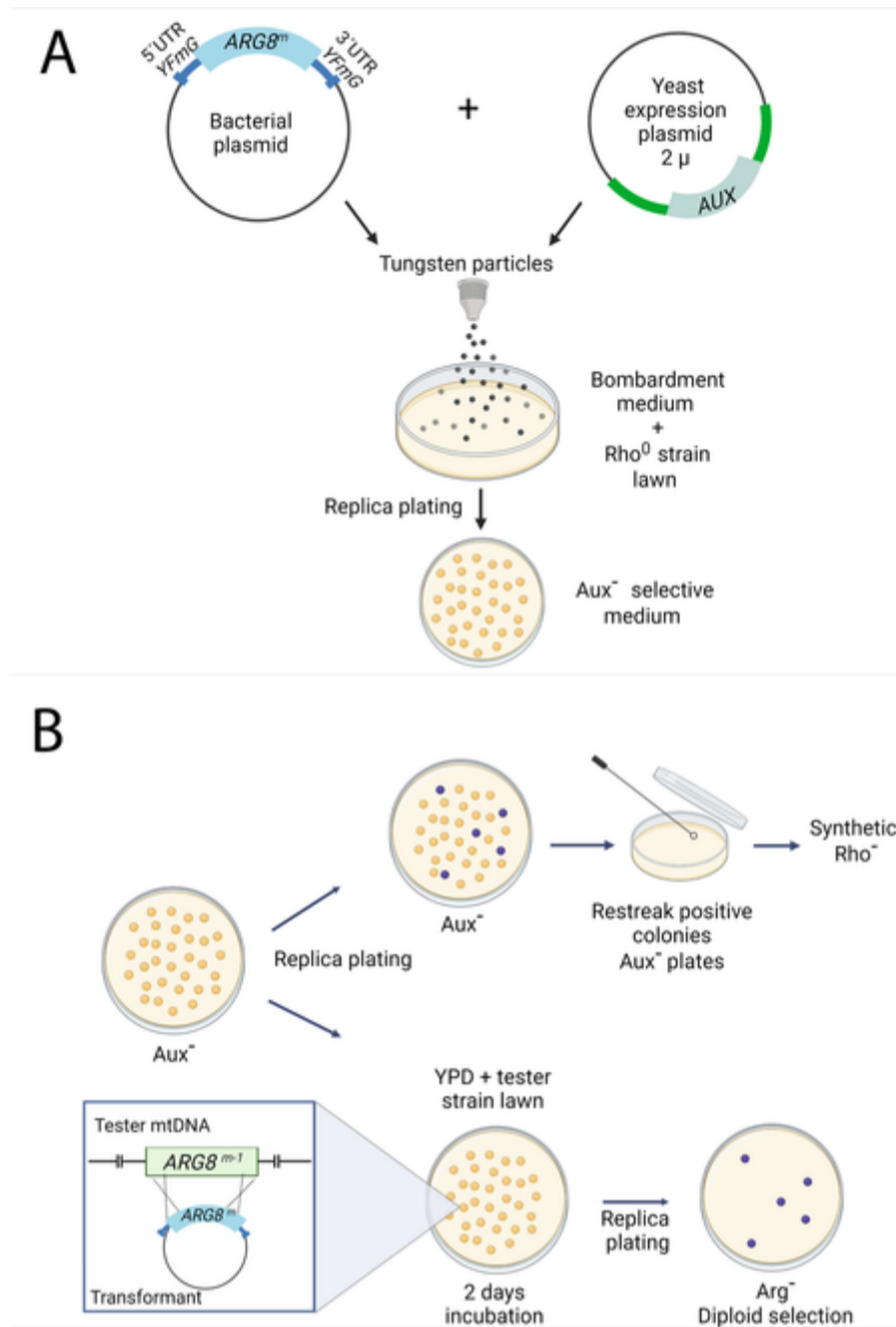
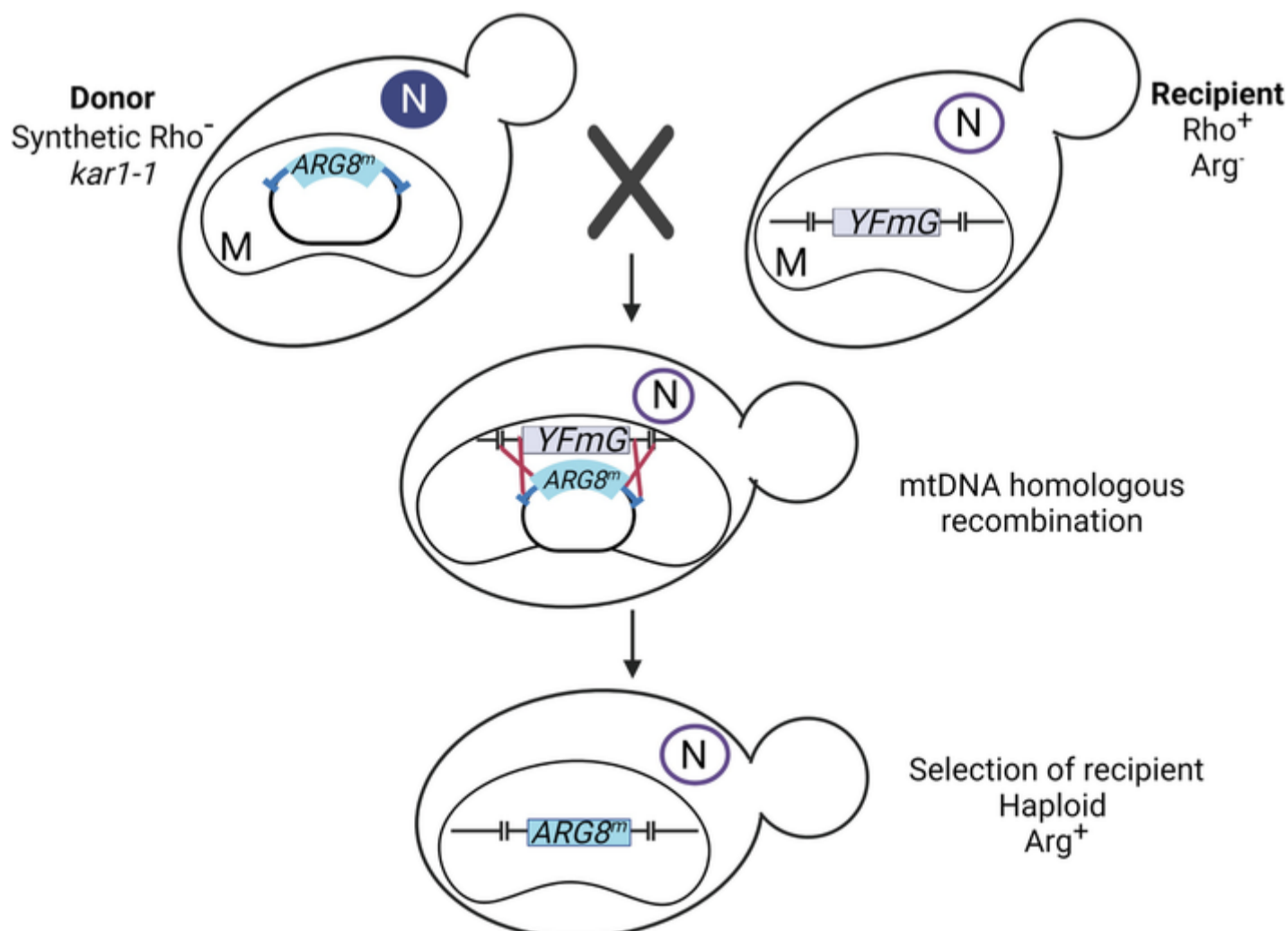


Fig. 3

During cytoduction, donor (synthetic ρ^-) and recipient (strain of interest) cells mate, and cytosolic contents, including **mitochondria** (M) combine. Due to a $kar1$ mutation, the nuclear fusion (N) is prevented. (Created with [BioRender.com](https://www.biorender.com))



All procedures are carried out under sterile conditions. Flame sterilization with a Bunsen burner is enough to prepare materials for transformation (bombardment step does not require a Bunsen burner). All materials and reagents must be sterile.

3.1.1. Yeast Strain Preparation for Six Transformation Reactions by Microprojectile Bombardment

1. Grow cells on 2 mL culture of YPRaf or YPGal for two nights at 30 °C under constant agitation.
2. Inoculate 30 mL of fresh YPRaf or YPGal with 300 µL of culture. Grow overnight at 30 °C under constant agitation.
3. Centrifuge cells at 654 × *g* for 5 min at room temperature. Resuspend pellet in 600 µL of YPD.
4. Spread 100 µL on a petri dish containing bombardment medium using a glass cell spreader. Allow it to absorb and dry for at least 1–3 h before bombardment. Repeat procedure for a total of six plates.

3.1.2. Tungsten Particle Preparation

1. Sterilize 50 mg of tungsten particles (Bio-Rad Tungsten M-10 Microcarriers 1652266) in 1.5 mL microtube tube with 1.4 mL of 70% ethanol. Vortex and incubate at room temperature for 10 min.
2. Centrifuge at 13,200 × *g* for 15 min.
3. Wash particles with 1.5 mL of sterile water and vortex. Centrifuge at 13,200 × *g* for 15 min. Discard supernatant.
4. Add 16.7 µL of glycerol/mg of particles. Store at –20 °C.

3.1.3. Precipitation of Plasmid DNA on Tungsten Particles

Two different bacterial plasmids are transformed into yeast cells: One plasmid is a 2 micron yeast expression plasmid (e.g., YEp351 or YEp352 with *LEU2* or *URA3* genes, respectively, for auxotrophy selection) and is used to select nuclear transformed cells. The second plasmid is a bacterial one (e.g., pBluescript, pGem, pUC) and contains the *ARG8^m* sequence in the desired context and must be flanked by 100 or more bp of mitochondrial genome sequence on the 5' and 3' sides to insert into the desired locus by homologous recombination.

1. To a 1.5 mL microtube on ice, add the following reagents:
 - (a) 5 µg of 2 micron plasmid (e.g., YEp351 or YEp352) and 15 µg of plasmid containing the *ARG8^m* reporter, both plasmids in a total volume of maximum 51 µL in water.
 - (b) 100 µL of tungsten particles glycerol suspension.
 - (c) 4 µL of 1 M spermidine (Sigma-Aldrich, free-base, S0266).
 - (d) 100 µL of ice-cold 2.5 M CaCl₂.
2. Incubate on ice for 10 min. Gently vortex every 3 min.
3. Centrifuge at 13,200 × *g* for 30 s at 4 °C. Discard supernatant.
4. Gently resuspend in 200 µL of 100% ethanol (at –20 °C). Centrifuge at 13,200 × *g* for 30 s at 4 °C. Discard supernatant.
5. Gently resuspend in 200 µL of 100% ethanol (at –20 °C). Centrifuge at 13,200 × *g* for 30 s at 4 °C. Discard supernatant.
6. Gently resuspend particles in 60 µL of 100% ethanol at room temperature.
7. During precipitation, insert six macrocarriers (“flying discs”—do not sterilize them) in six macrocarrier holders (which was previously autoclaved and dried). Place holders in a sterile petri dish (see **Note 2**).
8. Distribute the tungsten particles over the entire surface of each one of the six macrocarriers. If necessary, you can add few microliters more of 100% ethanol to facilitate an even spreading of the particles.
9. Let dry for 20 min until no liquid is visible.
10. In the meantime, sterilize the cavity of the microprojector with 70% ethanol let stand for 10 min and then wipe it out and dry the cavity.

3.1.4. Bombardment

For microprojectile bombardment, carefully follow the manual. Conditions are:

1. Pressure for rupture discs: 1350 psi. Adjust pressure on the Helium tank at 2000 Psi (do not treat the rupture discs with isopropanol as suggested in the manual, it decreases the transformation rate dramatically).
2. Place the petri plate with the yeast strain lawn at the second level from bottom of the micro projector's cavity.
3. Apply vacuum: fire at 26–27 inches of Hg. Release vacuum immediately after bombardment.
4. After bombardment, remove parts of flying discs from the agar plate with sterile forceps.
5. Incubate plates for 6–7 days at 30 °C (see **Note 3**).
6. At the end, wash equipment with 70% ethanol. Wash microcarrier holders with 0.1% SDS, then with distilled water and finally with 100% ethanol, autoclave sterilize.
7. To select mitochondrial transformants, replica plate with sterile velveteen on two different media (see Fig. 2b): (1) Medium lacking uracil (if transformed with YEp352) or leucine (if transformed with YEp351). This will be the master plate. (2) YPD medium with a 150 μ L lawn of a YPD yeast culture carrying the allele $ARG8^{m-1}$. This is a tester strain that is unable to grow in medium lacking arginine. Only the diploid will grow after mating with a transformant colony carrying the plasmid in mitochondria.
8. Incubate for 2 days at 30 °C.
9. Replica plate the diploid plate from **step 7** (YPD plate with diploids resulting from the cross between $ARG8^{m-1}$ tester and transformant colonies) on medium lacking arginine. Those colonies that contain the transformed plasmid in mitochondria (named synthetic ρ^-) will be able to grow on media lacking arginine. Identify the positive colony on the master plate (see **Note 4**). Take single colonies from the master plate with a sterile toothpick and streak each one on a fresh plate lacking uracil or leucine accordingly.
10. Repeat replica plating on media lacking uracil or arginine (master plate) and on YPD with a lawn of the $ARG8^{m-1}$ allele (see **Note 5**).
11. Select one to six different synthetic ρ^- cells, grow overnight at 30 °C each one on 2 mL of YPD and prepare 25% glycerol stocks to preserve at -70 °C.

Table 1 presents the most frequently used tester strains to select synthetic ρ^- when the $ARG8^m$ reporter is inserted on different mitochondrial *loci*.

Table 1

Tester strains most used to select synthetic ρ^- cells

Mitochondrial gene where $ARG8^m$ was inserted	Tester strain	Tester's mitochondrial relevant genotype	$ARG8^m$ construct present in synthetic ρ^-	Medium to test diploid phenotype after mating synthetic ρ^- and tester	Reference
COX2	NB40-3C	ρ^+ , <i>cox2-62</i>	Ectopic ^a <i>cox2Δ::ARG8^m</i>	YPEG	[14]
COX2	NB71 or TF236	ρ^+ , <i>cox3Δ::arg8^{m-1}</i>	<i>cox2Δ::ARG8^m</i> or <i>COX2::ARG8^m</i> ^b	-Arg	[8]
COX1	NB71	ρ^+ , <i>cox1D369N</i>	<i>COX1(1-512)::pARG8^m</i> ^c	YPEG	[9]
COX1	L45	ρ^+ , <i>cox3Δ::arg8^{m-1}</i>	<i>cox1Δ::ARG8^m</i>	-Arg	[9]
COX1	L45	ρ^+ , <i>cox1D369N</i>	<i>cox2Δ::COX1^a</i> , <i>cox1Δ::ARG8^m</i> ^d	YPEG	[9]
COB	TF236 or NB71	ρ^+ , <i>cox3Δ::arg8^{m-1}</i>	<i>cobΔ::ARG8^m</i>	-Arg	[28]
COB	NB160	ρ^+ , <i>cox2-30</i>	<i>cox2Δ::COB^a</i> , <i>cobΔ::ARG8^m</i> ^d	YPEG	[25, 29]
COB	NB71	ρ^+ , <i>cox3Δ::arg8^{m-1}</i>	<i>COB(1-352)::pARG8^m</i> ^c	-Arg	[28]
COX3	GW22	ρ^+ , <i>cox3-421</i>	<i>cox3Δ::ARG8^m</i>	YPEG	[3]

^aEctopic insertion of the mitochondrial gene at 285 nt upstream of the *COX2* *orf*. The insertion includes the 5' and 3' flanking regions of *COX2*. Importantly, the resultant *mtDNA* contains in addition the wild type, functional *COX2* gene in its original *locus*

^b $ARG8^m$ was fused in frame to different fragments of the *COX2* coding region

^cThe $ARG8^m$ sequence has the MTS

^dTo create the strains with genes at the ectopic site in *mtDNA*, first it is necessary to make the complete replacement of the gene from the original locus with the $ARG8^m$ reporter

^eThe plasmid contains the *COX2* sequence in addition to the $ARG8^m$ sequence. *COX2* is used as a rescue gene to select transformants but is not going to be integrated on the final *mtDNA*. That is why a *cox2* mutant is used as tester strain

^fAfter transformation, the synthetic ρ^- was mated to DFS188 to generate the diploids that were used on the study. In other words, no tester strain was used, instead the construction was directly integrated on the diploid strain

Mitochondrial gene where <i>ARG8^m</i> was inserted	Tester strain	Tester's mitochondrial relevant genotype	<i>ARG8^m</i> construct present in synthetic <i>rho⁻</i>	Medium to test diploid phenotype after mating synthetic <i>rho⁻</i> and tester	Reference
<i>ATP6</i>	NB40-3	<i>rho⁺, cox2-62^e</i>	<i>atp6Δ::ARG8^m</i>	YPEG	[30]
<i>ATP8</i>	NB40-3C	<i>rho⁺, cox2-62^e</i>	<i>atp8Δ::ARG8^m</i>	YPEG	[11]
<i>VAR1</i>	DFS188 ^f	<i>rho⁺</i>	<i>var1(1-20)::ARG8^m</i>	-Arg	[10]
<i>ATP9</i>	NB40-3C	<i>rho⁺, cox2-62^e</i>	<i>atp9Δ::ARG8^m</i>	YPEG	[31]

^aEctopic insertion of the mitochondrial gene at 285 nt upstream of the *COX2* *orf*. The insertion includes the 5' and 3' flanking regions of *COX2*. Importantly, the resultant *mtDNA* contains in addition the wild type, functional *COX2* gene in its original *locus*

^b*ARG8^m* was fused in frame to different fragments of the *COX2* coding region

^cThe *ARG8^m* sequence has the MTS

^dTo create the strains with genes at the ectopic site in *mtDNA*, first it is necessary to make the complete replacement of the gene from the original *locus* with the *ARG8^m* reporter

^eThe plasmid contains the *COX2* sequence in addition to the *ARG8^m* sequence. *COX2* is used as a rescue gene to select transformants but is not going to be integrated on the final *mtDNA*. That is why a *cox2* mutant is used as tester strain

^fAfter transformation, the synthetic *rho⁻* was mated to DFS188 to generate the diploids that were used on the study. In other words, no tester strain was used, instead the construction was directly integrated on the diploid strain

3.1.5. Genetic Recombination to Integrate the *ARG8^m* Reporter in the Mitochondrial Genome

The next step for integrating the *ARG8^m* reporter on the desired *locus* in the *mtDNA* is to transfer the bacterial plasmid from the synthetic *rho⁻* mitochondria (donor) into the final yeast strain of interest (acceptor). This process is achieved by cytoduction, a mating-based method to introduce mitochondria from the *rho⁻* donor strain to the acceptor yeast strain. This method takes advantage of a *kar1-1* allele with limited nuclear fusion [15, 16, 17]. Mating the donor with the receptor allows cytoplasmic content to mix, and mitochondria from both strains are fused, allowing for *mtDNA* recombination. The resulting cytoductant contains the original nucleus of the acceptor. However, the *ARG8^m* reporter from the synthetic *rho⁻* integrates on the desired *locus* of the acceptor's *mtDNA* by homologous recombination. The only absolute requirement is that at least the donor or recipient must carry the *kar1-1* mutation (see Fig. 3).

1. Grow 2 mL of YPD cultures of donor and acceptor strains overnight at 30 °C with constant agitation.
2. Mix 750 μL of donor and 250 μL of acceptor on a sterile 1.5 mL microtube.
3. Centrifuge 1 min at 13,200 × *g* and discard supernatant.
4. With sterile scissors cut the tip of the micropipette tip. Gently resuspend the combined cells by pipetting up and down 2–3 times and place combined cells as a drop on a solid YPD plate.
5. Incubate 3–5 h at 30 °C to allow mating.
6. Look under the light microscope for the presence of shmoo formation in cells. Shmoo cells have a shape that is closer to a triangle with rounded corners.
7. If shmoo-shaped cells are present, take a small scoop of the mixed cells and resuspend on 2 mL YPD. Incubate for 2–3 h at 30 °C with constant agitation.
8. Dilute 10 μL of the culture in 990 μL of sterile water. Vortex briefly.
9. Spread 100 μL of the mix on a petri dish containing selection medium using a glass cell spreader. Make duplicates for each cytoduction.
10. Incubate at 30 °C for 2–3 days until appearance of single colonies.
11. Make replica plates with velvet on selection media for acceptors containing the desired *mtDNA* integration of the *ARG8^m* reporter gene and to discard the few diploids that are formed. Incubate overnight at 30 °C. Table 2 indicates an example of how to choose selective media.
12. Pick at least six different positive cytoductants and restreak on master medium (on the above example it would be medium lacking adenine) to obtain single colonies (see **Note 6**).
13. Repeat replica plating on all the above selective media.
14. Restreak and test positive colonies on the master medium as in points 12 and 13 for a final round of purification of positive cytoductants. We suggest keeping two independent positive cytoductants to make a freezer stock. For this, grow an overnight YPD culture of cytoductants and prepare a 25% glycerol stock for the –70 °C freezer.

15. Amplify the inserted gene by **PCR** and sequence to verify correct integration of the $ARG8^m$ **reporter** on the desired *locus*.

Table 2

Example of selective media to use to select positive colonies after cytoduction

	Relevant genotype
Donor strain (synthetic rho ⁻)	<i>Mata, kar1-1, ade2-101 (rho⁻)</i>
Acceptor strain	<i>Mata, leu2-3,112 (rho⁺ YFmG::ARG8^m)</i>
Medium to plaque cytoduction	-ade This medium selects against the donor strain. It will also be the master plate.
Medium to detect diploid	-leu Diploids are discarded from further purification.
Medium to detect correct acceptor	-arg If your cytoductant is unable to express the $ARG8^m$ reporter , a tester strain with the $arg8^{m-1}$ allele can be used. Spread 100 μ L of a YPD culture of the tester strain on YPD plates. Replica plate the master plate, allow to mate for 2 days at 30 °C. replica plate on medium lacking arginine. Incubate overnight at 30 °C.

3.2. Growth of Yeast Cells on Media Lacking Arginine to Assess $ARG8^m$ **mRNA** Translation

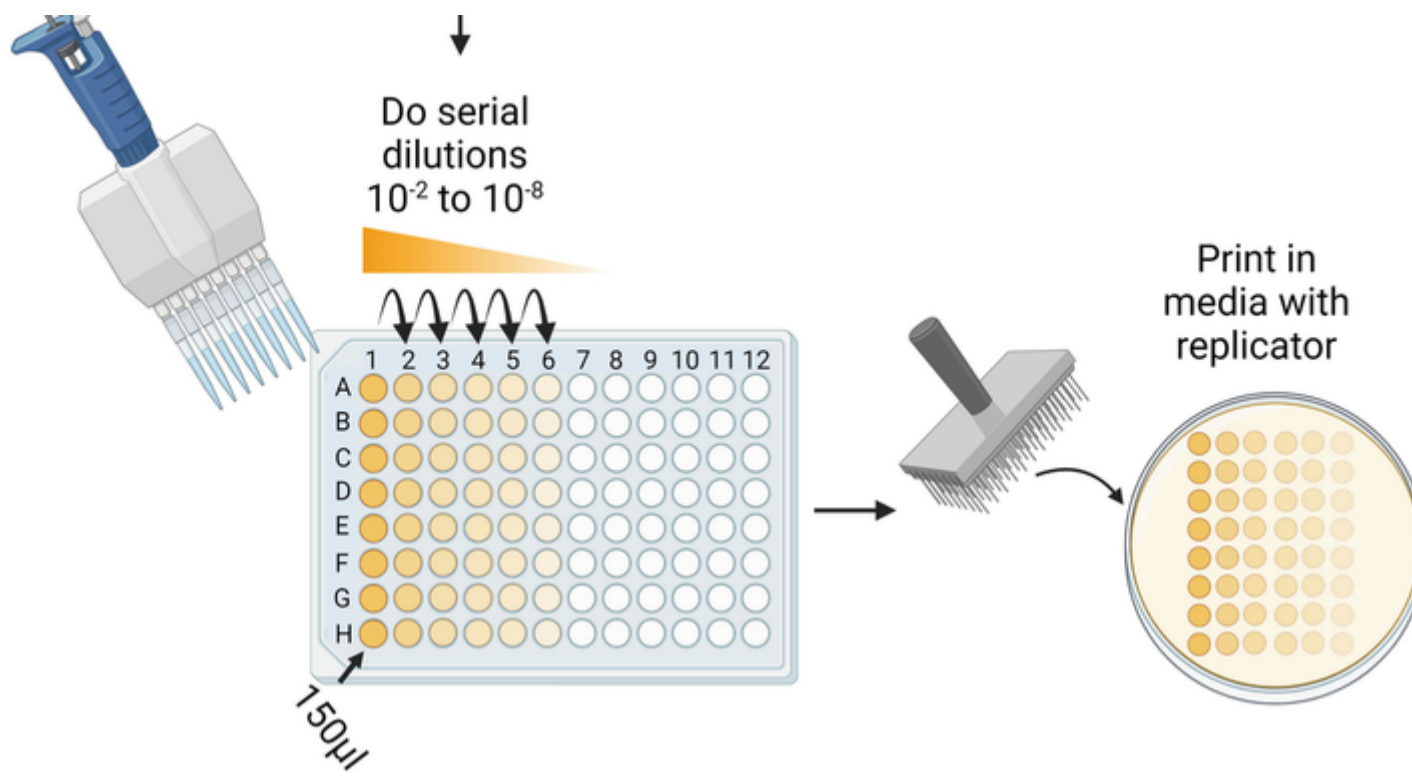
All procedures are carried out under sterile conditions. Flame sterilization with a Bunsen burner is enough to prepare and plaque serial dilutions. All materials and reagents must be sterile.

1. Grow the yeast strains in 2 mL liquid YPD medium at 30 °C overnight, with constant agitation.
2. Next morning, weight on analytical balance the number of 1.5 mL microtubes equivalent to the number of yeast strains to analyze.
3. Add 1 mL of culture to each pre-weighted 1.5 mL microtubes. Centrifuge on a tabletop equipment at 13,200 $\times g$ for 1 min. Completely eliminate supernatant.
4. Wash once with sterile water, and centrifuge as in **step 3**. Completely eliminate supernatant.
5. Weight tubes again to obtain the wet weight of the cells pellet.
6. Add water to a concentration of 0.02 g of cells/mL.
7. On a 96-well plaque, add 135 μ L of sterile water to all the wells to analyze, starting from the second column and to the sixth one, and including rows A, B, C... depending on the number of strains to study (see Fig. 4). In other words, fill spots A2, B2, C2...A6, B6, C6...
8. On the first column, which is empty, add 150 μ L of each yeast suspension to fill wells A1, B1, C1...
9. Take 15 μ L of cell suspensions on column 1 (A1, B1, C1...) and transfer to column 2 (A2, B2, C2...). Mix with the 135 μ L of water present in these wells. This column, thus, contains the first 10^{-1} dilution.
10. Repeat **step 9** by taking 15 μ L of suspension from column 2 (A2, B2, C2...) into column 3 (A3 B3, C3...). Repeat until column 6.
11. Immerse the poles from the replica plater on 100% ethanol (the use of a glass petri dish to pour ethanol is a good idea) and flame to sterilize it. Allow replicator to cool down to room temperature (1–2 min) before soaking it on the 96-well plate.
12. Take out replica plater and place it in contact with the surface of the indicated solid medium on petri dish. For each replica plate, it is necessary to soak the replica plater on the 96-well plate (see **Note 7**).
13. Incubate plates at 30 °C (or the desired temperatures) and follow cell growth for 5 days. It is recommended to take pictures every day starting on day 2.

Fig. 4

Diagram of the process to make yeast serial dilutions. (Created with [BioRender.com](https://www.biorender.com))



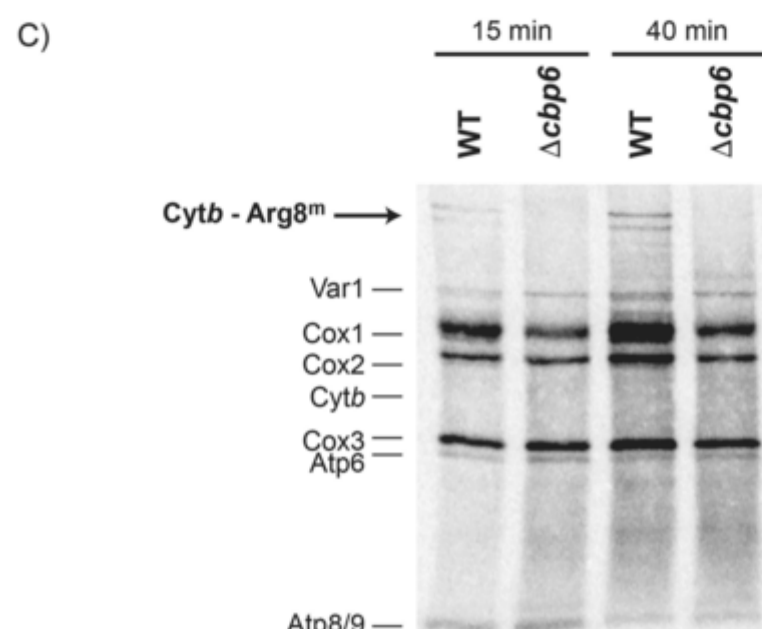
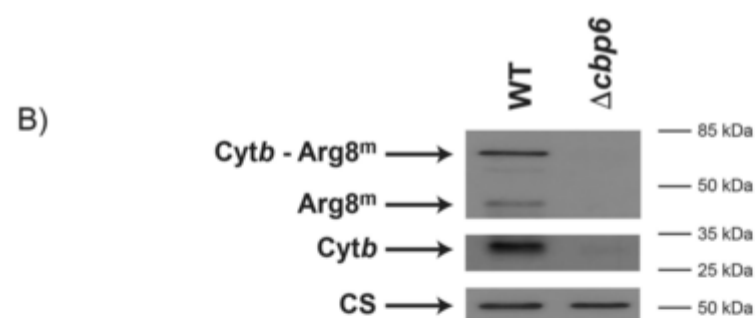
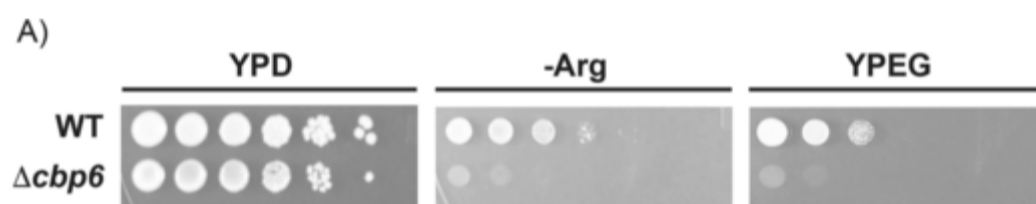


3.3. Mitochondrial Translation in Whole Cells or in Isolated Organelles

This method is useful to analyze mitochondrial translation products, including translation of the *ARG8^m* mRNA, and has been previously described [18]. One additional information to note is that, in our hands, Arg8 labels poorly, and the band migrates close to the Var1 band on SDS-PAGE. If Arg8 is fused to a mitochondrial coding region, then a higher size is expected. Detection of the Arg8 fusion protein depends on the locus in mtDNA where it is inserted, and might require different labeling times, from 10 to 40 min. For example, the fusion of Cox1-Arg8, which includes the Arg8 mitochondrial targeting sequence is detectable after 10–15 min of labeling, and some of the processed Arg8 is also detected [9]. In contrast, Cytb-Arg8 requires 40 min labeling for optimal detection (see Fig. 5).

Fig. 5

Example of how the *ARG8^m* reporter can be used to study mitochondrial translation. The Arg8 reporter is fused to the C-terminal end of Cytochrome *b*. (a) Serial dilutions were incubated 3–4 days at 30 °C. Cbp6 is a chaperone involved in translational activation of the *COB* mRNA [24, 25]. Deletion of Cbp6 in cells containing the mtDNA construct abolished Cytb synthesis. (b) Western blot of the indicated proteins. Citrate synthase (CS) was used as loading control. (c) Wild-type or $\Delta cbp6$ cells were labeled for 10 or 40 min with (³⁵S)-Methionine in the presence of cycloheximide and analyzed by 16% acrylamide SDS-PAGE and autoradiography. Mitochondrial products were Cytb, subunit from *bc₁* complex; Cox1, Cox2 and Cox3, subunits 1, 2, and 3, respectively, from cytochrome c oxidase; Atp6, subunit 6 from ATP synthase; Var1 (small ribosomal subunit protein Var1)



3.4. Rapid Mitochondrial Preparations and Western Blot Assays to Detect Arg8 Production

One hour before starting the preparation, place the glass beads on the freezer. Use tabletop microcentrifuge throughout the procedure.

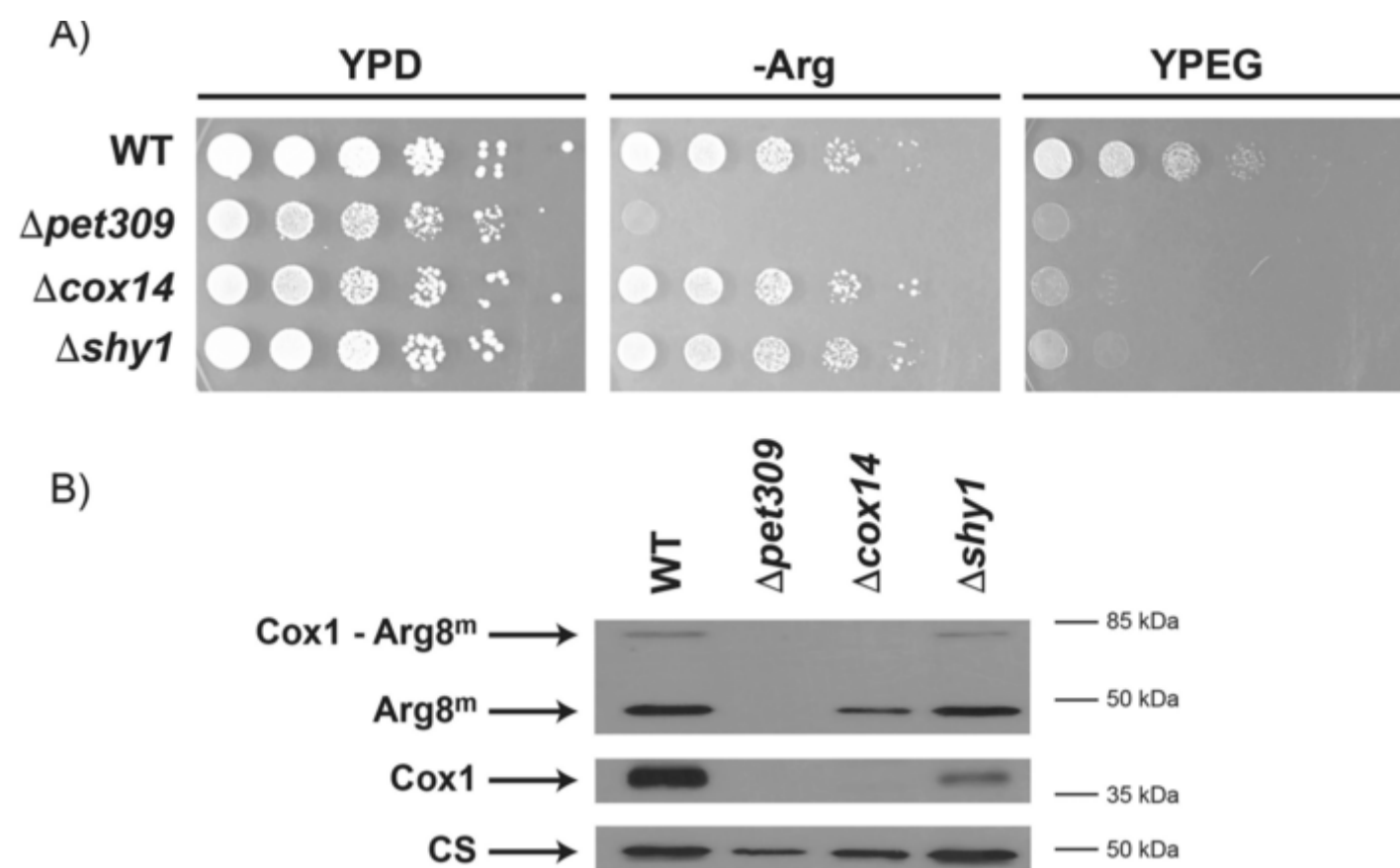
1. Grow 5 mL of liquid cultures on YPGal or YPRaf media at 30 °C with constant agitation. Grow non-respiring strains for two nights instead.
2. Next day, make a 1:10 dilution (100 µL of culture and 900 µL of fresh medium) and read the Optical Density (OD) at 600 nm. Harvest the equivalent amount to ten ODs from each culture. Transfer to a 1.5 mL microtube.
3. Centrifuge at 13,200 × *g* for 5 min and eliminate supernatant.
4. Wash with 1 mL of water and repeat centrifugation.
5. Add 2 mL of MPZ buffer and incubate 1 h at 30 °C under constant agitation on a thermal mixer.
6. From this point, all the procedure is carried out at 4 °C. Centrifuge at 2000 × *g* for 5 min at 4 °C, take out supernatant.
7. Resuspend pellet in 300 µL of SHP buffer.
8. Add 1 volume of glass beads (Sigma-Aldrich, Z250465).
9. Mix on the vortex at maximum power for 30 s, incubate on ice for 30 s. Repeat the cycle vortex/ice two more times.
10. Centrifuge at 600 × *g* for 5 min. Save the supernatant in a fresh, ice-cold 1.5 mL microtube.
11. Add 300 µL of SHP buffer to the remaining glass beads, resuspend with a micropipette tip, and repeat three cycles of vortex 30 s/ice 30 s.
12. Centrifuge at 600 × *g* for 5 min. Save supernatant and combine it with the supernatant from **step 10**.
13. Centrifuge at 13,200 × *g* for 12 min and eliminate supernatant.
14. Resuspend mitochondrial pellet in 100 µL of SHP buffer. Quantify proteins using the modified Lowry method [19] or any standard method used in your laboratory. At this point, samples can be kept at -70 °C or can continue with SDS-PAGE.
15. For electrophoresis, take 25–100 µg of mitochondrial protein, centrifuge at 13,200 × *g* for 5 min, eliminate supernatant, and resuspend pellet in 15 µL of Laemmli buffer with 5% 2-mercaptoethanol. Heat at 65 °C for 5 min before loading onto gel. Do not boil samples.
16. Proteins are separated on a 12% acrylamide gel for SDS-PAGE electrophoresis [20].
17. Gel is transferred to a PVDF or nitrocellulose membrane using a semidry or wet transfer chamber.
18. The membrane is incubated with an antibody against Arg8 and washed 3 times for 10 min at room temperature, then the membrane is incubated with the secondary antibody and washed 3 times for 10 min. Incubations are carried out for 1–2 h on a tube rocker, at room temperature or at 4 °C (see **Note 8**). We use a secondary antibody coupled to horseradish peroxidase activity, since many commercial kits for detection of this enzymatic activity are available. The signal is revealed with a Western blot imager or autoradiography.
19. If required, strip the membrane with stripping buffer incubating for 30 min at 50 °C. Wash 3 times with washing buffer for 10 min. The membrane is ready to be incubated with another antibody.

Figure 5 shows an example of the information that can be obtained when using the *ARG8^m* reporter. In this case, the reporter was inserted at the *COB* locus, and a mutant lacking the translational activator Cbp6 was included. Action of Cbp6 on growth on a medium lacking arginine, in (³⁵S)-Methionine labeling of mitochondrial products and on Arg8 steady-state levels were analyzed.

Fig. 6 shows an example of how the *ARG8^m* reporter can be used to differentiate between a translational defect (e.g., lack of Pet309 on *COX1* mRNA translation) and assembly defect (e.g., lack of Cox14 or Shy1 on Cox1 assembly).

Fig. 6

The mitochondrial reporter gene *ARG8^m* can be used to distinguish between mutations affecting translation and mutations affecting assembly of mitochondrial encoded proteins. Pet309 is a protein necessary to activate translation of the *COX1* mRNA [23]. In contrast, Cox14 [26] and Shy1 [27] affect Cox1 assembly. (a) Serial dilutions of the indicated strains were incubated for 3–4 days at 30 °C. (b) Western blot of the indicated mutants. Citrate synthase (CS) was used as loading control



3.5. Search for Mitochondrial Translation Defect Suppressor Genes

Suppressors provide a large amount of information regarding your pathway of interest. The secondary mutation(s) leading to the suppressor phenotype can locate on the same *locus* where *ARG8^m* is inserted in *mtDNA*, or can locate on a different gene, either nuclear or mitochondrial. In addition, these mutations can be dominant or recessive. Here we describe a method to identify spontaneous suppressors using the *ARG8^m* reporter.

A mutant with no expression of the *ARG8^m* reporter, leading to an arginine auxotrophy is better recommended, although mutants with leaky growth on media lacking arginine can also be used. All procedures are carried out under sterile conditions. Flame sterilization with a Bunsen burner is enough to prepare plates for suppressor mutants' growth. All materials and reagents must be sterile.

3.5.1. Method to Find and Isolate Suppressors

1. Grow six independent colonies of the mutant of interest on six tubes with 3 mL of YPD medium. Incubate overnight at 30 °C under constant shaking.
2. Take 1 mL of culture, centrifuge 1 min at 13,200 × *g* and wash with sterile water. Resuspend on 150 μL of sterile water and evenly spread on media plates lacking arginine. Two or more plates per culture should be spread, increasing the possibility of finding spontaneous suppressors.
3. Grow plates 5–7 days at 30 °C. Some suppressor colonies should pop out at this time.
4. Streak putative suppressors on plates with medium lacking arginine (streak to obtain single colonies). These will be the master plates.
5. If colonies grow again, restreak them on YPD plates to check if the suppressor phenotype endures in the absence of selective media. In this case, after colonies grow on YPD, replica plate them with velveteen on YPD and on medium lacking arginine. If colonies retained the capacity to grow on media lacking arginine, it means that the suppressor mutation is stable (see **Note 9**).
6. From master plates, grow on liquid YPD overnight at 30 °C (or in medium lacking arginine if the suppressor phenotype is not stable on YPD) and prepare 25% glycerol stocks to maintain on the freezer (–70 °C).

From this point, several tests can be made to identify the nature of the suppressor and solve questions like: *Is the suppressor phenotype due to a single mutation or multiple mutations? Is the same mutated gene(s) in all the obtained suppressor colonies? If suppressor mutation(s) have a nuclear origin, are they dominant or recessive? Who is mutated and what is the mechanism of suppression?* To answer these questions, refer to [21,22]. However, we provide a general view on how to address the next question.

3.5.2. Method to Determine Whether the Suppressor Is Nuclear or Mitochondrial

1. Cross on YPD your suppressors with a *rho⁰* strain (see **Note 10**) that is wild type for the original mutation.
2. Purify diploids by streaking them on selective medium, so only diploids can grow (e.g., if one haploid has a *leu2Δ* mutation and the other has a *ura3Δ* mutation, then only the diploid will grow on media lacking both leucine and uracil).

3. Induce mitosis by streaking them on solid sporulation media. Incubate for ~3–7 days at room temperature.
4. Look under the microscope to detect presence of asci. They look like a tetrahedral sack with visible three to four spores inside.
5. As soon as asci show up, take few cells from the sporulation plate with a sterile toothpick and gently resuspend them in 50 μL of digest sporulation buffer.
6. Incubate at 37 $^{\circ}\text{C}$ for ~10 min. Gently add 450 μL of cold sterile water, do not vortex or mix. Keep at 4 $^{\circ}\text{C}$.
7. Spot onto a line on a YPD plate with an inoculating loop. Gently put small drops along the line, in contact with each other, and allow them to dry before going to the dissecting microscope.
8. Incubate the resulting plates for 2 or 3 days at 30 $^{\circ}\text{C}$ until the dissected spores form visible colonies.
9. Replica plate on YPD and on medium lacking arginine. Incubate 24 h at 30 $^{\circ}\text{C}$.
10. The `suppressor` mutation has a nuclear origin if the arg^+ phenotype segregates 2:2 for each tetrad. This is also a good opportunity to select and keep spores for further analysis containing the `suppressor` mutation together with the original mutant gene, but from the opposite mating type.

3.5.3. A Second Method to Analyze if the Suppressor has a Mitochondrial or Nuclear Origin

1. Deplete `suppressors` from their `mtDNA` (rho^0) (see **Note 10**).
2. By cytoduction (discussed on Subheading [3.1.4](#)) add fresh `mtDNA` with the same ARG8^m construct originally used. If the `suppressor` phenotype (arg^+) is lost, it means that the `suppressor` mutation resides on the mitochondrial genome.

4. Notes

1. It is highly recommended that the plasmid containing ARG8^m has minimum 100 bp of 5' and 3' flanking sequence with identical sequence to the target region on the `mtDNA` where the `reporter` is going to be inserted. Homologous recombination is more efficient if 500 bp or more are included on each flanking region.
2. Take macrocarriers with a pair of ethanol-sterilized-flamed tweezers. It is very easy to select two macrocarriers instead of one, so be particularly careful. If two macrocarriers are loaded on the Biolistic Particle Delivery System, then the experiment will fail.
3. During the 5–7 days incubation after bombardment, make everyday a visual inspection of the plates to ensure that no contamination is growing. If visible contamination pops up, flame and ethanol-sterilize spatula and cut the contaminated region.
4. Bombardment plates will be saturated with yeast colonies, and it can be difficult to locate the positive colonies that showed up on the replica plating screening. We recommend making labels on two different parts of the master plate, and aligning them with labels on the velveteen replicating disc tool. After every replica, make the same labels for each plate.
5. Make up to three rounds of restreaking and replica plating of synthetic rho^- before preparing glycerol stocks for the -80 $^{\circ}\text{C}$ freezer. Additional rounds of purification may end in rho^- `mtDNA` lost. Some synthetic rho^- are not stable and tend to lose the transformed DNA. Indeed, if possible, after identification of correct synthetic rho^- , proceed to cytoduction as on Subheading [3.2](#) to integrate the `reporter` on the strain of interest. For this, carry out cytoduction from the same liquid YPD culture used for making freezer stocks.
6. At this point, it is essential to streak single colonies during cytoductant purification. Some colonies tend to contain a mix of correct cytoductants and original rho^0 acceptors.
7. The use of multichannel micropipettes is highly recommended to avoid mistakes and to save time. To prevent contamination of the experiment, we recommend soaking the replicator on ethanol and flame it after every three to five replicas. Let it cool down to room temperature before using it. When replica platter is in contact with the replicating surface medium on a petri dish, do not apply pressure to the replicator, just let it rest for 10 s on the surface before retiring it. Check that all the dots are present as wet, small circles. If replicator stops printing round drops, wash it with water/lab detergent and completely dry before use.
8. Usually, incubation of 1 h at room temperature or overnight at 4 $^{\circ}\text{C}$ works well for antibodies against Arg8, Cox1, citrate synthase, and Cytb.
9. Cells that have no stable `suppressor` phenotype on YPD might be worth to keep. Behavior of these `suppressors` could be due to the presence of heteroplasmic `mtDNA`. For an example of such `suppressors`, see [[23](#)]. In these kind of mutants, appearance of an additional rho^- genome, in combination with the original `mtDNA` provides the `suppressor`'s phenotype. However, the novel rho^- genome might not be stable on nonselective media like YPD.

- To make a *rho*⁰ strain, incubate cells on 2 mL of liquid complete minimal media with 10 mg/mL of ethidium bromide overnight at 30 °C with constant shaking. The next day inoculate 50 µL of this culture into 2 mL of fresh minimal complete media with 10 mg/mL ethidium bromide. Incubate 2 days at 30 °C with constant shaking. Take a drop from this culture and streak it on YPD plates. Incubate 2 days at 30 °C. Then take one colony and restreak it on a YPD plate and grow for 2 days at 30 °C.

Acknowledgements

This work was supported by research grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) [47514 to XP-M] and fellowship [777444 to D. F-M]; and Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, (PAPIIT), UNAM [IN202720 to XP-M].

References

- Bonnefoy N, Fox TD (2007) Directed alteration of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial DNA by biolistic transformation and homologous recombination. *Methods Mol Biol* 372:153–166
- García-Guerrero AE et al (2016) Chapter 6. In: Hernández G, Jagus R (eds) *Evolution of the protein synthesis machinery and its regulation*. Springer, Cham, Switzerland, pp 109–142
- Steele DF, Butler CA, Fox TD (1996) Expression of a recoded nuclear gene inserted into yeast mitochondrial DNA is limited by m RNA-specific translational activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5253–5257
- Cohen JS, Fox TD (2001) Expression of green fluorescent protein from a recoded gene inserted into *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial DNA. *Mitochondrion* 1:181–189
- Suhm T et al (2018) A novel system to monitor mitochondrial translation in yeast. *Microb Cell* 5:158–164
- Mireau H, Arnal N, Fox TD (2003) Expression of Barstar as a selectable marker in yeast mitochondria. *Mol Gen Genomics* 270:1–8
- Mookerjee SA et al (2013) In: Figurski D (ed) *Genetic manipulation of DNA and protein -examples from current research*, vol 19. In tech Open, London, pp 393–416
- Bonnefoy N, Fox TD (2000) In vivo analysis of mutated initiation codons in the mitochondrial COX2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* fused to the reporter gene ARG8m reveals lack of downstream reinitiation. *Mol Gen Genet* 262:1036–1046
- Perez-Martinez X, Broadley SA, Fox TD (2003) Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. *EMBO J* 22:5951–5961
- Sanchirico ME, Fox TD, Mason TL (1998) Accumulation of mitochondrially synthesized *Saccharomyces cerevisiae* Cox2p and Cox3p depends on targeting information in untranslated portions of their mRNAs. *EMBO J* 17:5796–5804
- Rak M, Tzagoloff A (2009) F1-dependent translation of mitochondrially encoded Atp6p and Atp8p subunits of yeast ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:18509–18514
- Gruschke S et al (2011) Cbp3-Cbp6 interacts with the yeast mitochondrial ribosomal tunnel exit and promotes cytochrome b synthesis and assembly. *J Cell Biol* 193:1101–1114
- Heimberg H et al (1990) *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* acetylornithine aminotransferase: evolutionary relationship with ornithine aminotransferase. *Gene* 90:69–78
- Duvezin-Caubet S et al (2006) A “petite obligate” mutant of *Saccharomyces cerevisiae*: functional mtDNA is lethal in cells lacking the delta subunit of mitochondrial F1-ATPase. *J Biol Chem* 281:16305–16313
- Zakharov IA, Yarovoy BP (1977) Cytoduction as a new tool in studying the cytoplasmic heredity in yeast. *Mol Cell Biochem* 14:15–18
- Dorweiler JE, Manogaran AL (2021) Cytoduction and plasmiduction in yeast. *Bio Protoc* 11:e4146

17. Conde J, Fink GR (1976) A mutant of *Saccharomyces cerevisiae* defective for nuclear fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:3651–3655
18. Carlström A, Rzepka M, Ott M (2021) The analysis of yeast mitochondrial translation. *Methods Mol Biol* 2192:227–242
19. Markwell MA et al (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 87:206–210
20. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
21. Burke D, Dawson D, Stearns T, Cold Spring Harbor Laboratory (2000) *Methods in yeast genetics: a Cold Spring Harbor Laboratory course manual*, 2000th edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y, p xvii, 205 p
22. Dunham MJ, Gartenberg MR, Brown GW (2015) *Methods in yeast genetics and genomics: a Cold Spring Harbor Laboratory course manual*/Maitreya J. Dunham, University of Washington, Marc R. Gartenberg, Robert Wood Johnson Medical School, Rutgers, The State University of New Jersey, Grant W. Brown, University of Toronto, 2015th edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, p xvii, 233 pages
23. Manthey GM, McEwen JE (1995) The product of the nuclear gene PET309 is required for translation of mature mRNA and stability or production of intron-containing RNAs derived from the mitochondrial COX1 locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 14:4031–4043
24. Dieckmann CL, Tzagoloff A (1985) Assembly of the mitochondrial membrane system. CBP6, a yeast nuclear gene necessary for synthesis of cytochrome b. *J Biol Chem* 260:1513–1520
25. Gruschke S et al (2012) The Cbp3-Cbp6 complex coordinates cytochrome b synthesis with bc(1) complex assembly in yeast mitochondria. *J Cell Biol* 199:137–150
26. Barrientos A, Zambrano A, Tzagoloff A (2004) Mss51p and Cox14p jointly regulate mitochondrial Cox1p expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 23:3472–3482
27. Mashkevich G et al (1997) SHY1, the yeast homolog of the mammalian SURF-1 gene, encodes a mitochondrial protein required for respiration. *J Biol Chem* 272:14356–14364
28. García-Guerrero AE et al (2018) Cbp3 and Cbp6 are dispensable for synthesis regulation of cytochrome. *J Biol Chem* 293:5585–5599
29. Ding MG et al (2009) Chapter 27: An improved method for introducing point mutations into the mitochondrial cytochrome B gene to facilitate studying the role of cytochrome B in the formation of reactive oxygen species. *Methods Enzymol* 456:491–506
30. Rak M et al (2007) Yeast cells lacking the mitochondrial gene encoding the ATP synthase subunit 6 exhibit a selective loss of complex IV and unusual mitochondrial morphology. *J Biol Chem* 282:10853–10864
31. Bietenhader M et al (2012) Experimental relocation of the mitochondrial ATP9 gene to the nucleus reveals forces underlying mitochondrial genome evolution. *PLoS Genet* 8:e1002876