



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR
POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

EXPRESIÓN DEL GEN *cox3* DE *Polytomella* sp. EN LA LEVADURA
Saccharomyces cerevisiae.

TESIS

Que para obtener el grado de Maestro en Ciencias (Bioquímica).

P R E S E N T A :

Biól. Alain Macedo Márquez

Director de tesis: Dr. Diego González Halphen



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se llevó acabo en el laboratorio del Dr. Diego González Halphen en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

El financiamiento para realizar este trabajo fue gracias a los donativos del CONACyT con número 56619 y de la DGAPA con número IN217108.

Durante mis estudios de Maestría conté con el apoyo económico del CONACyT con número 227724.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser un espacio en donde se puede pensar y expresar libremente, en especial al Instituto de Fisiología Celular y al posgrado en Ciencias Bioquímicas por brindarme los espacios necesarios para mi formación.

A los doctores que formaron parte del jurado de examen que con sus correcciones, críticas y sugerencias hicieron mejorar este escrito: Dra. Georgina Garza-Ramos Martínez, Dra. Alicia González Manjarrez, Dra. Sobeida Sánchez Nieto, Dr. Antonio Peña Díaz y Dr. Alejandro Sosa Peinado, muchas gracias por su tiempo.

A mi comité tutorial durante mis estudios de Maestría: Dra. Tzventanka Dimitrova Dinkova, Dr. Antonio Peña Díaz y Dr. Diego González Halphen, por todos los consejos y observaciones durante el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Diego González Halphen por abrirme las puertas, por todo lo que aprendo de él día con día, no solo en la parte académica sino mejorar todos esos aspectos personales, como enfrentar esas barreras para superarlas, por recordarme que mantenga la frente en alto y tratarme como a un hijo, apretando pero sin asfixiar. Por la oportunidad de ir al extranjero y enfrentarme con la vida en otro lugar, y por el camino que tenemos que recorrer juntos durante el desarrollo del proyecto de doctorado. Siempre estaré agradecido ¡GRACIAS DOCTOR!

Al Dr. Patrice Hamel por todo lo que me enseñó durante la estancia en su laboratorio y su amistad.

Al Dr. Fernando Bastarrachea Avilés por ser un ejemplo de vida y por brindarme su amistad.

Al Dr. Sven Nellen Hummel por devolverme la vida, GRACIAS.

A mi MAMÁ por todo lo que hizo, hace y hará por mí. Por darme la vida, por ser mamá y papá, por todo su amor, dedicación, regaños, consentimiento, comprensión y consejos: Por ser un ejemplo de lucha y de admiración. Gracias por todo ¡TE QUIERO MUCHO!

Pinpilinpausa eres la persona que amo, todo este tiempo es parte de descubrirnos como personas y como pareja. No sueltes mi mano, caminemos mirando siempre de frente y sin miedo al futuro, porque juntos seguiremos construyendo esta relación: entre nosotros, por nosotros y para nosotros; eres parte de mi mente y de mi corazón. Claudia, ¡TE AMO!

A Michel, gracias por cuidar de mi cuando era muy pequeño y porque aunque pensemos de manera distinta, sé que puedo contar contigo.

A Bruno, mi fiel amigo y compañero. Algún día te volveré a ver...

A toda la familia del 324N: Adelma, Alexa, Araceli, Elizabeth, Ernesto, Héctor, Luis, Miriam, Paco, Rosario, Salvador, Sergio, Valentín y Sr. Alfredo. Porque sin ustedes el laboratorio no sería lo mismo. ¡GRACIAS!

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13
RESULTADOS	18
DISCUSIÓN	26
PERSPECTIVAS	30
LITERATURA CITADA	31

RESUMEN

Defectos en el genoma mitocondrial causan una variedad de enfermedades en el humano, algunas de estas están asociadas con mutaciones y/o deleciones de genes que codifican para proteínas que forman parte de los diferentes complejos que participan en la fosforilación oxidativa. Hasta el momento no existe una terapia para estos síndromes. Un avance hacia una posible terapia génica radica en la expresión alotópica, la cual implica que una nueva copia de este gen se localice funcionalmente en un nuevo compartimento celular, por ejemplo, un gen mitocondrial que se rediseñe para su expresión en el núcleo. Así, en el caso de la expresión alotópica de un gen mitocondrial, el producto proteico sintetizado en el citosol debe ser dirigido al compartimento mitocondrial donde se integrará funcionalmente. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un modelo idóneo para aplicar estrategias alotópicas. En el presente trabajo, intentamos rescatar la función de la citocromo *c* oxidasa de una cepa de levadura (*S. cerevisiae*) que tiene interrumpido al gen *cox3* mitocondrial. La cepa es incapaz de crecer en fuentes de carbono no fermentativas. Se transformó a la cepa mutante con el gen del alga incolora *Polytomella* sp. que codifica para la subunidad *cox3* del alga. Esta subunidad se encuentra naturalmente codificada en el núcleo en algas clorofíceas como *Polytomella* sp. En términos estrictos, no se intentó una expresión alotópica sino xenotópica, ya que se utilizó un gen de otro organismo. Se clonó el gen *cox3* del alga en el vector pCM188, dando como resultado la clona denominada pCM188-*cox3*. Las levaduras se transformaron y se lograron crecer en un medio de selección auxotrófico. Sin embargo, no se pudo complementar la ausencia del gen *cox3*, ya que la levadura fue incapaz de crecer en un medio no fermentativo. En primera instancia se realizó la búsqueda del transcrito, al no obtener resultados positivos se continuó con la exploración de la proteína con técnicas de inmunodetección. El resultado negativo nos indicó que no teníamos la presencia de esta subunidad en la cepas de levadura transformadas con la construcción *cox3*. Concluimos que la levadura fue incapaz de transcribir y traducir el gen *cox3* xenotópico proveniente de un alga. El presente trabajo nos ha permitido plantear modificaciones adicionales que deben realizarse al gen *cox3* para promover su expresión alotópica.

INTRODUCCIÓN

Las mitocondrias

El origen intracelular de las mitocondrias se ha tratado de explicar mediante la hipótesis endosimbiótica, propone que las células protoeucariotas en un principio eran organismos anaerobios, carentes de mitocondrias. A consecuencia del aumento de los requerimientos energéticos de esta célula primitiva, junto con un aumento en la concentración del oxígeno atmosférico, se estableció una relación simbiótica estable con una bacteria de vida libre, como las α -proteobacterias (Margulis 1970). Las mitocondrias son organelos cuya forma más frecuente es ovalada (Figura 1), con una longitud de unos 2 μm y un diámetro de 0.5 μm , constituidos por dos membranas: la externa y la interna, las cuales delimitan a su vez el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial. La membrana externa es bastante permeable, permite el paso de varias sustancias a través de las porinas y contiene los receptores de las proteínas de origen citosólico que se importan al interior del organelo. La membrana interna es altamente impermeable y presenta una gran número de invaginaciones que forman las crestas mitocondriales, en donde se encuentran alojados los complejos proteicos que participan en la fosforilación oxidativa y en diversos procesos de transporte. Por su parte, la matriz mitocondrial contiene gran cantidad de enzimas solubles, que participan en fenómenos metabólicos de gran importancia, como son el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (ciclo de Krebs) y la oxidación de los ácidos grasos. También en la matriz mitocondrial se encuentra el DNA mitocondrial (DNAm) y la maquinaria necesaria para la replicación, la transcripción y la síntesis de proteínas (ribosomas y RNA de transferencia) (González-Halphen & Vázquez-Acevedo 2002).

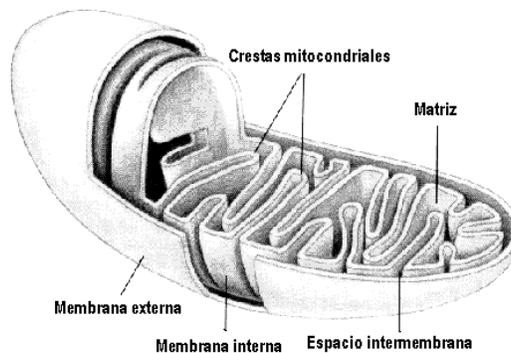


Figura 1. Esquema de la mitocondria y las partes que la componen.

Los genomas mitocondriales actuales son el resultado de una reducción del genoma bacteriano del endosimbionte original, y a pesar de que se piensa que todos los genomas mitocondriales derivan de un mismo ancestro común, cada grupo particular de organismos ha evolucionado de manera distinta. Actualmente los genomas mitocondriales presentan una diversidad en tamaño,

organización y complejidad génica (Lang *et al.* 1999). La migración de genes de los organelos al núcleo es el resultado de un proceso indispensable para el establecimiento de simbiosis metabólicas estables. En principio, los mismos procesos que han hecho que la mayor parte de los genes mitocondriales hayan migrado al núcleo deberían estar actuando sobre los genes que aún permanecen en las mitocondrias. Esto nos puede llevar a concluir que todos los genes mitocondriales deberían eventualmente migrar hacia el núcleo. Sin embargo, todas las mitocondrias estudiadas a la fecha poseen un genoma, y el contenido mínimo de genes es más o menos conservado entre las diferentes especies. En general todos ellos presentan genes que codifican para RNAs ribosomales (RNAr), RNAs de transferencia (RNAt), un conjunto variable de proteínas involucradas en la síntesis de proteínas, y un grupo de subunidades polipeptídicas de los complejos membranales translocadores de protones de la fosforilación oxidativa. Algunos genomas mitocondriales presentan incluso variaciones en el código genético universal. Por ejemplo, las mitocondrias de los mamíferos reconocen el codón UGA como codificador del triptofano en lugar del codón de término, y a los codones AGA y AGG como señales de terminación en lugar de codificar una arginina. En las mitocondrias de algunos hongos, de mamíferos, y de *Drosophila*, el codón AUU es reconocido como codificador de metionina, a diferencia del código genético universal, que reconoce a una isoleucina (Gray *et al.* 1999; Lang *et al.* 1999).

Desde el punto de vista de la bioenergética, las mitocondrias son los organelos de las células eucariontes aeróbicas donde ocurren las transformaciones energéticas más importantes: la oxidación de los sustratos y la fosforilación del ADP para formar ATP. Estos dos fenómenos se reúnen conceptualmente en un uno solo conocido como fosforilación oxidativa. Los complejos de la fosforilación oxidativa están constituidos por grupos prostéticos oxidoreductores asociados a complejos proteicos oligoméricos. Alojados en la membrana interna mitocondrial se encuentran los cinco complejos multiproteicos que participan en este proceso: el complejo I (NADH: ubiquinona oxidorreductasa), el complejo II (succinato: ubiquinona oxidorreductasa), el complejo III (ubiquinol: citocromo c oxidorreductasa), el complejo IV (citocromo c oxidasa) y el complejo V (ATP sintetasa) (Hatefi 1985) (Figura 2).

FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

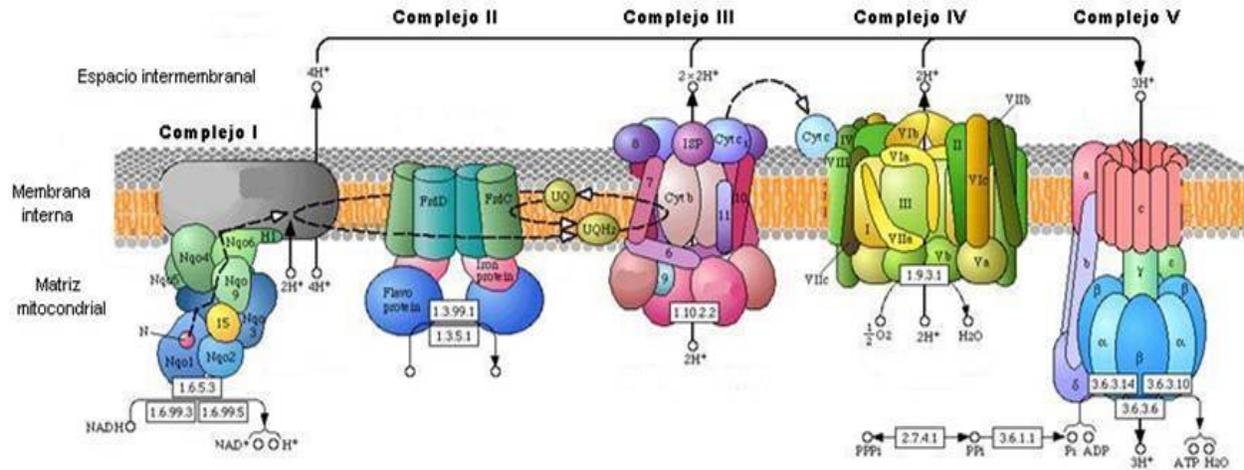
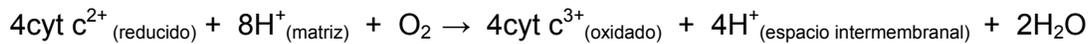


Figura 2. Esquema de los complejos que participan en la fosforilación oxidativa.

La citocromo oxidasa

El complejo IV mitocondrial, o citocromo c oxidasa (ferrocitocromo c: oxígeno oxidorreductasa) es el componente terminal de la cadena respiratoria. La enzima transfiere electrones desde el citocromo c reducido hasta el oxígeno y contribuye a la generación del gradiente electroquímico de protones. La reacción general que cataliza es la siguiente:



La enzima transfiere los electrones del acarreador móvil cyt c hasta el oxígeno molecular, mientras que cuatro protones son bombeados de la matriz al espacio intermembranal (Calboun *et al.* 1994).

Los centros de oxido-reducción involucrados en la transferencia de electrones son dos grupos hemo tipo a, denominados a y a₃, así como dos centros de cobre denominados Cu_A y Cu_B. La subunidad I contiene al hemo a y al centro binuclear hemo a₃-Cu_B. En este centro binuclear, compartido por el hemo y el cobre, el oxígeno es reducido hasta formar agua. Por otra parte el centro binuclear de cobre denominado Cu_A, se encuentra unido a la subunidad II y recibe los dos electrones provenientes del citocromo c en el centro Cu_A, para después transferirlos al hemo a, y finalmente hasta el centro binuclear hemo a₃-Cu_B, donde el oxígeno se reduce a agua (Babcock & Wikström 1992).

Desde las bacterias hasta los mamíferos, existe una marcada conservación en las características estructurales y funcionales de la enzima, y las diferencias particulares que se observan, probablemente están involucradas en mecanismos de regulación en animales superiores, que pueden no existir o ser muy diferentes en bacterias. Haciendo una comparación entre las estructuras de la citocromo *c* oxidasa de *Paracoccus denitrificans* (Iwata *et al.* 1995) y de bovino (Tsukihara *et al.* 1996), podemos decir que tanto en la secuencia como en la estructura, las tres subunidades más conservadas son: COXI, COXII y COXIII.

La subunidad COXI, es altamente hidrofóbica, con 12 cruces transmembranales y está involucrada en el bombeo de protones a través de la membrana interna al espacio intermembranal, para contribuir a la formación del gradiente electroquímico. La subunidad COXII, es una proteína compuesta por tres segmentos: una región pequeña amino terminal que se localiza en el espacio intermembranal, dos hélices transmembranales y una región en el extremo carboxilo terminal que es hidrofílica y que también se localiza en el espacio intermembranal. Esta última sección contiene a los residuos que unen el centro Cu_A, el cual recibe los electrones provenientes del citocromo *c* reducido. Al igual que COXI, COXIII es una proteína altamente hidrofóbica, con 7 cruces transmembranales. De las tres subunidades, esta es la menos conservada, siendo la hélice III y parte de la VII las que presentan mayor similitud entre las proteínas de diversas especies. No se conoce con certeza la función de esta subunidad, ya que no posee grupos que participan en las reacciones de oxido-reducción ni en el bombeo de protones, pero participa en la biogénesis del complejo y en el transporte de oxígeno molecular hasta el sitio catalítico en la subunidad I (Capaldi, 1990; Michel, 1998; Rottenberg, 1998).

La citocromo *c* oxidasa de corazón de bovino es un dímero, y cada complejo está constituido por trece distintas subunidades, tres de ellas, las de mayor masa molecular (subunidades I, II y III), están codificadas en el genoma mitocondrial, mientras que las diez restantes (IV, Va, Vb, VIa, VIb, VIc, VIIa, VIIb, VIIc y VIII) están codificadas en el genoma nuclear (Scheffler, 1999). Algo similar se puede observar en el caso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, en donde las subunidades I, II y III, están codificadas en el genoma mitocondrial, y las subunidades IV, Va, Vb, VI, VIa, VIb, VII, VIIa y VIII, están codificadas en el núcleo (Barrientos *et al.*, 2002). En contraste, en algunas algas de la familia Chlamydomonadaceae como *Chlamydomonas reinhardtii* y *Polytomella* sp., el gen *cox3* es nuclear, su producto proteico se sintetiza en el

citosol y la proteína se importa al interior de la mitocondria para integrarse en el complejo de la citocromo *c* oxidasa en la membrana interna mitocondrial (Pérez-Martínez *et al.*, 2000).

Importación de proteínas a la mitocondria

Hasta el momento se desconoce el mecanismo por el cual se importa la subunidad COXIII al interior de las mitocondrias de las algas clorofíceas. Sin embargo, es posible inferir un posible mecanismo basado en los estudios realizados en *S. cerevisiae*. En la levadura, existen complejos translocadores presentes en la membrana externa (TOM por sus siglas en inglés) e interna (TIM por sus siglas en inglés) encargados de la importación de precursores de proteínas mitocondriales al interior del organelo. Después de sintetizarse en ribosomas citosólicos, la preproteína es direccionada al complejo translocador TOM localizado en la membrana externa mitocondrial. Probablemente, la presecuencia mitocondrial ubicada en el extremo amino terminal del precursor de la subunidad COXIII, que contiene dos presuntos sitios de corte para peptidasas, interactúa con la subunidad Tom 20, la cual dirige el péptido hacia el poro formado por la subunidad Tom 40 que está embebida en la membrana externa mitocondrial. En seguida, el precursor pasa al complejo translocador TIM 23 situado en la membrana interna mitocondrial; la primera interacción se realiza con los dominios expuestos en el espacio intermembranal de Tim 21, 50 y 23. Con ayuda del potencial electroquímico ($\Delta\Psi$), se promueve el movimiento electroforético de cargas positivas de la proteína a través del canal formado por Tim 17. El siguiente paso es realizado por la chaperona Hsp70m (mitochondrial Heat shock protein) que se encuentra en asociación con los dominios expuestos en la matriz mitocondrial. La hidrólisis de ATP induce la translocación de la proteína a través de las subunidades Tim 44, 16 y 14 del sistema importador (Neupert, 1997; Neupert & Herrmann, 2007). En la matriz mitocondrial, probablemente se realiza la primera proteólisis de la presecuencia por la enzima *m*-AAA (Arlt *et al.*, 1998). El reclutamiento e inserción de la preproteína en la membrana interna es realizado por Oxa1, Mba1 y el complejo Pnt1-Mss2- Cox18; todas estas proteínas son traducidas en el citoplasma e importadas a la mitocondria, la energía necesaria es facilitada por el potencial de membrana ($\Delta\Psi$) (Barrientos *et al.*, 2002; Herrmann & Funes, 2005; Khalimonchuk & Rödel, 2005; Koehler, 2004; Stiburek *et al.*, 2006). Para obtener la proteína madura se efectúa la segunda proteólisis de la presecuencia en el espacio intermembranal, realizada por IMP (Inner Membrane Protease) la cual está constituida por dos subunidades catalíticas (Imp1 e Imp2) y una accesoria (Som1) que aumenta la eficiencia de Imp1 (Lou *et al.* 2006).

Aproximadamente el 15 % de los genes nucleares de *S. cerevisiae* codifican para proteínas mitocondriales (Neupert & Herrmann, 2007) . En contraste, el genoma mitocondrial es circular y contiene 85779 nucleótidos; sin embargo, presenta toda la maquinaria necesaria para la síntesis de proteínas (15s y 21s RNAr y 23 RNAt) y codifica para diecinueve proteínas, tres de las cuales son las subunidades más hidrofóbicas de la citocromo *c* oxidasa: COXI, COXII y COXIII (Foury *et al.* 1998). Las nueve subunidades restantes están codificadas en el núcleo, son sintetizadas por ribosomas libres en el citosol y se importan a la mitocondria (Margeot *et al.*, 2005).

Migración de genes mitocondriales al núcleo

La transferencia de genes de la mitocondria al núcleo es parte de una relación simbiótica estable, y la tendencia de los genes presentes en la mitocondria es migrar al núcleo. Una posible explicación radica en la idea basada en que el DNA de este organelo está sometido a concentraciones relativamente altas de radicales libres y especies reactivas de oxígeno producidos en la cadena respiratoria, y sería más susceptible a mutaciones que el DNA nuclear. Aunado a esto, la maquinaria de reparación del DNA es más eficiente en el núcleo que en las mitocondrias (de Grey, 2005; von Heijne, 1986; Blanchard & Lynch, 2000; Race *et al.*, 1999).

La migración de genes de la mitocondria al núcleo es un proceso que puede dividirse en varios pasos: en primer lugar, el material genético debe atravesar las membranas mitocondriales e ingresar al núcleo a través de los poros de la membrana nuclear. Posteriormente, debe integrarse en el genoma y adquirir elementos de regulación y expresión nucleares. Después de un cierto periodo durante el cual tanto el gen mitocondrial como la copia nuclear son funcionales, cualquiera de las dos copias puede ser silenciada y eventualmente eliminada. Para que la migración sea exitosa, el gen mitocondrial relocalizado en el genoma nuclear debe activarse y convertirse en un gen funcional. Si por alguna razón no se lleva a cabo las modificaciones necesarias para activarlo, el gen puede desaparecer, o bien permanecer en el genoma nuclear como pseudogene. Existen varias hipótesis acerca de por qué en los genomas mitocondriales se conserva todavía un conjunto limitado de genes. Una posible explicación ha sido que en las mitocondrias de algunos organismos se utiliza un código genético diferente al que se emplea en el genoma nuclear. Esta heterogeneidad de lenguajes podría evitar la expresión de genes mitocondriales relocalizados en el núcleo. Sin embargo, esto no explica por qué cierto grupo de genes permaneció en los genomas mitocondriales durante la migración masiva de genes hacia el núcleo, cuando el fenómeno de endosimbiosis apenas comenzaba y

no existían diferencias en los códigos genéticos. Otra hipótesis que explica la permanencia de ciertos genes en el DNAm_t toma en consideración la hidrofobicidad de los productos proteicos correspondientes. Las proteínas codificadas en los DNAm_t suelen ser aquellas que se localizan en la membrana interna mitocondrial y que se caracterizan por ser altamente hidrofóbicas. Se ha propuesto que la síntesis en el citosol de este tipo de proteínas podría ocasionar que no se dirigieran al compartimento celular adecuado (por ejemplo, que se insertaran en las membranas del retículo endoplásmico en lugar de hacerlo en las mitocondrias). Se ha propuesto que las proteínas altamente hidrofóbicas no pueden ser importadas correctamente a la mitocondria, por lo que deben ser sintetizadas en el interior del organelo para ser insertadas a la membrana interna mitocondrial y adquirir la conformación topológica necesaria para su acoplamiento correcto en el complejo respiratorio al que pertenecen (von Heijne, 1986). Hay dos ejemplos de proteínas que se han conservado en los genomas mitocondriales de todos los organismos caracterizados hasta la fecha: el gen *cob1* que codifica al citocromo *b* del complejo *bc*₁ y el gen *cox1* que codifica para la subunidad I de la citocromo *c* oxidasa. El citocromo *b* tiene ocho cruces transmembranales y la subunidad *cox1* tiene doce cruces transmembranales. Aquellos organismos que poseen complejo I (NADH-ubiquinona oxidoreductasa), también contienen varios de los genes *nad* en su genoma mitocondrial (los genes *nad1*, *nad2*, *nad3*, *nad4*, *nad4L* y *nad5*), que codifican para proteínas altamente hidrofóbicas con tres a 16 cruces transmembranales (González-Halphen *et al.* 2003) (Figura 3).

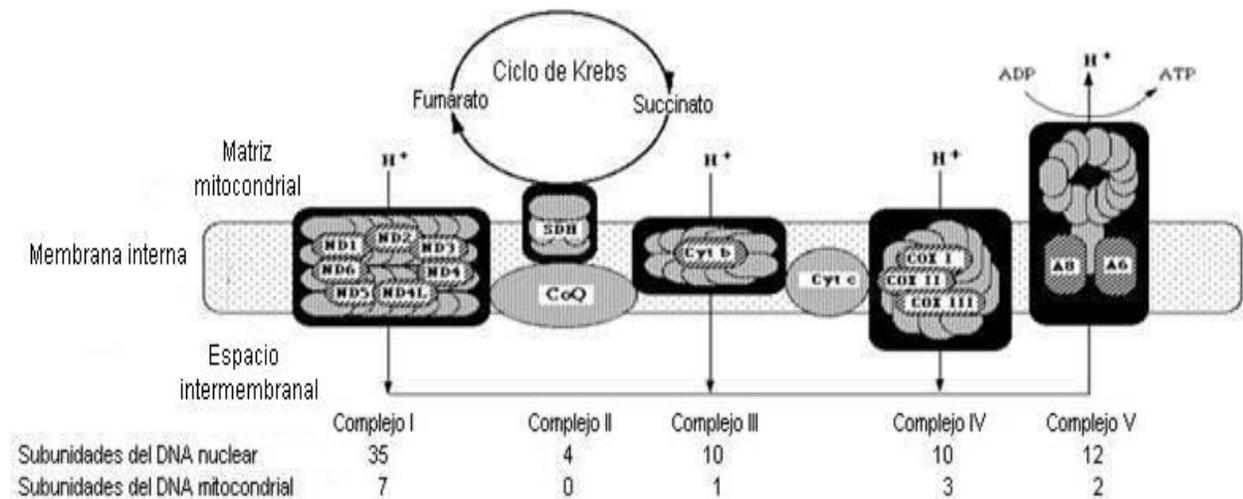


Figura 3. Esquema de las subunidades de los diferentes complejos, que se codifican en el núcleo y en la mitocondria del humano.

Enfermedades relacionadas con la mitocondria.

Existen muchas enfermedades ocasionadas por mutaciones en el DNA mitocondrial. Dado el papel fundamental en la producción de la energía dentro de las células eucariotas, las consecuencias de mutaciones en el DNA mitocondrial pueden producir la muerte en individuos de corta edad (recién nacidos hasta los primeros años de la infancia), o bien dar lugar a enfermedades degenerativas asociadas con el envejecimiento como problemas cardiacos, diabetes tardía, y enfermedades como Parkinson ó Alzheimer. Los tipos de mutaciones se pueden agrupar en diferentes tipos: rearrreglos del DNAm, como duplicaciones y/o ablaciones; mutaciones puntuales en genes involucrados en la traducción, como RNAr y RNAt; y mutaciones puntuales en genes que codifican para proteínas de la cadena respiratoria (Wallace 1992a, 1992b).

La subunidad III (COXIII ó CO3) de la citocromo *c* oxidasa del humano es una de las tres codificadas en el DNA mitocondrial (CO1, CO2 y CO3), las subunidades restantes IV, Va, Vb, VIa, VIb, VIc, VIIa, VIIb, VIIc, y VIII están codificadas en el núcleo (Kadenbach *et al.*, 1983; Capaldi, 1990). El gen *cox3* se encuentra en la posición 9207 y 9990 del genoma mitocondrial (Anderson *et al.*, 1981), contiene 783 pares de bases, no tiene intrones y codifica un solo péptido. El transcrito de este gen, es un policistrón flanqueado en el extremo 5' por el gen ATP6 y en el 3' por el tRNA de glicina (Ojala *et al.*, 1981); el peso molecular esperado para la subunidad COXIII es de 30 kD (Anderson *et al.*, 1981).

Una de las enfermedades relacionadas con cambios en la secuencia de nucleótidos del gen *cox3* es la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON por sus siglas en inglés), la cual consiste en una degeneración de los gangliocitos de la retina y sus axones. Se ha reportado una mutación puntual en la posición 9438 que da lugar al cambio de una glicina por un serina en la posición 78 de la proteína (G78S) y otra en la posición 9804 que da lugar al cambio de alanina por una treonina en la posición 200 de la proteína (A200T). En ambos casos se trata de una transición de una base G por una A, según lo reportado por Johns & Neufeld (1993).

Otra enfermedad relacionada con mutaciones en el gen CO3 es la denominada MELAS por su nombre en inglés (Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes), la cual es un trastorno progresivo. Debido a que las células musculares y nerviosas tienen necesidades especialmente altas de energía, los problemas musculares y neurológicos son característicos de este síndrome. Sus manifestaciones clínicas fundamentales son:

encefalomiopatía, acidosis láctica, y episodios recurrentes de isquemia cerebral transitoria (que se manifiestan como jaquecas semejantes a la migraña, vómitos y (con menos frecuencia) convulsiones. En casos más graves, puede llevar al daño cerebral permanente. La mutación responsable de esta enfermedad fue reportada por Manfredi *et al.* (1995) en la cual una transición de T a C en la posición 9957 del gen CO3, genera un cambio en la proteína correspondiente de fenilalanina a leucina F251L.

Keightley *et al.* (1996) reportaron la pérdida de 15 pares de bases en el gen CO3 9486- 9501, lo cual se traduce en la pérdida de 5 aminoácidos altamente conservados en un segmento transmembranal, que altera la función, el ensamblaje y/o la estabilidad del complejo IV . En 1998, Hanna *et al.*, encontraron que una transición de G a A en la posición 9952, genera un cambio de triptofano a un codón de paro W249X, que resulta en la pérdida de 13 aminoácidos altamente conservados en la región C-terminal de esta subunidad. La inserción de una C en la posición 9537 (9537C_{ins}) del gen CO3, provoca un corrimiento en el marco de lectura, por lo que el gen no se transcribe. Esto provoca una acidosis láctica severa, debido a la ausencia de ensamblaje de una citocromo c oxidasa funcional (Taranti *et al.* 2000). Horváth *et al.* en 2002 encontraron una mutación puntual en la posición 9379 (G9379A), por lo que en la secuencia péptida el aminoácido W58 se convierte en un codón de paro (W58X); esto genera que no se traduzca completo el gen, y a nivel del complejo IV que no se ensamble adecuadamente la holoenzima. Estos autores también observaron la acumulación de las subunidades COXI y COXII, y la degradación de las subunidades menores. La consecuencia clínica de esta mutación se manifiestan como una miopatía con intolerancia al ejercicio, acidosis láctica, crecimiento retardado y lipidosis.

EXPRESIÓN ALOTÓPICA

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* tiene varias propiedades que tienden a establecerla como un sistema adecuado para la expresión de proteínas heterólogas. Puede ser crecida rápidamente sobre un medio simple hasta obtener una alta densidad de células, su genética es una de las más avanzadas y puede ser manipulada casi con la misma facilidad que *Escherichia coli* (Romanos *et al.*, 1992).

La expresión alotópica de un gen implica que una nueva copia de este gen se localice funcionalmente en un nuevo compartimento celular; por ejemplo, un gen originalmente mitocondrial que ahora se exprese desde el núcleo. Así, en el caso de la expresión alotópica de

un gen mitocondrial, el producto proteico sintetizado en el citosol debe ser dirigido al compartimento mitocondrial donde se integrará funcionalmente (Claros *et al.*, 1996).

S. cerevisiae puede ser un modelo para aplicar estrategias alotópicas, y puede proveer un camino hacia una eventual terapia génica para revertir las enfermedades del DNA mitocondrial (Gray *et al.*, 1996).

En estudios realizados por Claros *et al.* (1995) en *S. cerevisiae* se probaron construcciones citoplásmicas de longitudes variables del citocromo *b*, encontrando que la capacidad de los polipéptidos para ser importados al interior de la mitocondria no está estrictamente relacionada con la cantidad de cruces transmembranales. Proponen que los parámetros críticos que permiten o no la importación de una proteína al interior de la mitocondria son el promedio máximo de hidrofobicidad de una cadena de entre 60 y 80 residuos de aminoácidos (mesohidrofobicidad) y la hidrofobicidad máxima de las regiones transmembranales. Estos valores son los indicadores adecuados de la facilidad o dificultad con la que una proteína puede ser importada a la mitocondria. De acuerdo con estos parámetros, las proteínas de origen nuclear COXIII, COXIIA y COXII B, de las algas *C. reinhardtii* y *Polytomella* sp., tienen una hidrofobicidad reducida que permite su importación a la mitocondria (Pérez-Martínez *et al.*, 2000, 2001).

HIPÓTESIS

La expresión heteróloga del gen *cox3* nuclear de algas clorofíceas en el citosol puede complementar la ausencia del gen mitocondrial correspondiente en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

OBJETIVOS

- a)** Expresar el gen *cox3* de *Polytomella* sp. en la cepa de levadura mutante DFS189 que carece del gen mitocondrial que codifica para la subunidad COXIII de la citocromo *c* oxidasa.
- b)** Demostrar la complementación heteróloga de dicha cepa en un medio de cultivo no fermentativo.
- c)** De ser exitoso el punto *b*, localizar la presencia de la subunidad heteróloga COXIII, en la citocromo *c* oxidasa quimérica de la levadura.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de levadura

Las cepas de la levadura *S. cerevisiae* utilizadas en este estudio fueron proporcionadas por el Dr. Thomas D. Fox de la Universidad de Cornell. Los genotipos son: **NB40-36A** *MAT α lys2 arg8::hisG ura3-52 leu2-3,112 [rho⁺]* (Bonnefoy & Fox, 2000) y **DFS189** *MAT α leu2-3,-112 his3- Δ HindIII lys2 ura3-52 arg8::hisG [rho⁺ cox3::ARG8^m]*; esta cepa contiene una interrupción del gen *ARG8* nuclear, que codifica para la enzima acetilornitina aminotransferasa, que interviene en el cuarto paso de la biosíntesis de arginina. Sin embargo, la cepa es prototrófica para la biosíntesis de arginina, ya que el gen *ARG8^m*, recodificado para la expresión mitocondrial, se encuentra insertado en el gen *cox3* mitocondrial. Esta mutante tiene una interrupción muy estable, incapaz de generar citocromo oxidasa y de respirar. Se puede descartar la presencia de levaduras que reviertan el genotipo (Steele *et al.*, 1996). Se confirmó el genotipo de las levaduras mediante la siembra en diferentes medios mínimos (SD), que carecían de los diferentes aminoácidos de auxotrofia. El medio estaba compuesto por 0.67% de base nitrogenada sin aminoácidos, 2% de glucosa como base y 2% de agar si el medio es sólido, cambiando la concentración final de los diferentes aminoácidos, para arginina, histidina y uracilo de 20 mg/l, lisina 30 mg/l y para leucina de 100 mg/l. El medio YPD contiene 1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 2% de glucosa y 2% de agar si el medio es sólido. El medio YPGly contiene lo mismo que el YPD, pero 2% de glicerol como fuente de carbono; las cepas se preservaron en 15% de glicerol a -80 °C (Burke *et al.*, 2000).

Bacterias y plásmidos

La cepa bacteriana utilizada para la construcción de los plásmidos fue *E. coli* DH5 α ([F ϕ 80d *lacZ* Δ M15], *endA1*, *hsdR17*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA*, *relA1*, λ -). Las técnicas para preparar el medio LB (que contiene 1% de NaCl, 1% de triptona y 0.5% de extracto de levadura y 2% de agar si el medio es sólido para el crecimiento de *E. coli*), plaquear, estriar y preservar las clonas en medio LB con 15% de glicerol a -80°C, fueron obtenidas de Miller (1972). La transformación de estas células por choque térmico, se llevó a cabo como lo describieron Sambrook & Russell (2000).

Los plásmidos utilizados fueron pCR4-TOPO de Invitrogen, en el cual estaba insertado el gen *cox3* de *Polytomella* sp. y el plásmido pCM188 para expresión de genes en *S. cerevisiae* modulable por tetraciclina (Gari *et al.* 1997)

Réplicas tipo Northern

La extracción de RNA total se realizó con la técnica del fenol ácido caliente, descrita por Ausubel *et al.* (2003). La separación de RNA en un gel al 1 % de agarosa con formamida-formaldehído, desnaturalizante para ácidos nucleicos (Ausubel *et al.* 2002). Los ensayos de tipo Northern blot se realizaron por la técnica descrita por Sambrook & Rusell (2000), mediante una transferencia capilar no alcalina a una membrana de nylon Hybond-N (Amersham Pharmacia Biotech) sin carga, y se fijó con luz UV (254 nm por 1 min a 1.5 J/cm²). La sonda se hizo cortando el producto de PCR del gen *cox3* de *Polytomella* sp. con *Bam*H I; el marcaje de la sonda se hizo con el kit Rediprime II DNA Labeling System (Amersham Pharmacia Biotech). Para la extracción de RNA total de *Polytomella* sp. se usaron 80 ml de cultivo y se extrajo con el sistema RNeasy de Qiagen.

PCR

Para esta técnica se sintetizaron cebadores (COX3PF1A y COX3PRA), y se utilizó el Taq PCR Core Kit de Qiagen. El volumen final de la reacción se estandarizó a 100 µl, utilizando el protocolo que contiene el amortiguador QSolution. El programa del termociclador se muestra en la siguiente tabla:

Ciclo	Temperatura	Tiempo
x 1	94°C	5 min
x 30	94°C	30 sec
	60°C	45 sec
	72°C	1 min
x 1	72°C	10 min
x 1	4°C	∞

RT-PCR

A partir de la extracción de RNA total con la técnica antes mencionada, se utilizó como templado para ver la expresión del gen *cox3*, con ayuda del Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit de Roche. Se llevó acabo la síntesis de cadena sencilla de DNA a partir del templado de RNA; posteriormente se amplificó por PCR, con los cebadores previamente diseñados (RT-cox3F y RT-cox3R), siguiendo los mismos ciclos en el termociclador y con el sistema que se utilizó para la amplificación del gen.

Extracción de plásmido

La extracción se hizo por diferentes métodos, dependiendo de los requerimientos, la pureza y la cantidad. En el caso de obtener el gen y/o vector para ligar, se utilizaron las columnas Plasmid Midi Kit de Qiagen, ya que se obtienen rendimientos de 20 a 100 µg, dependiendo del origen de replicación. Para secuenciar o para hacer restricciones preliminares se utilizaron las columnas QIAprep Miniprep de Qiagen, hasta 20 µg por columna. Para comprobar las ligaciones se usó el protocolo propuesto por Zhou *et al.* (1990).

Enzimas de restricción

Las endonucleasas de restricción empleadas fueron del tipo II, las cuales obtenidas de diferentes laboratorios como Invitrogen, Roche o New England Biolabs. Las reacciones de restricción se efectuaron con el amortiguador correspondiente según el fabricante y la cantidad de DNA digerido. Para ligar se cortaba alrededor de 6 µg de plásmido o de inserto, manteniendo una relación de 1 unidad de enzima por cada 1 µg de DNA, y el volumen final de la reacción se llevó a 50 µl.

Ligación

Para efectuar la ligación, se usó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{ng de vector} \times \text{tamaño del inserto en Kb}}{\text{tamaño del vector en Kb}} \times \text{relación molar} \frac{\text{inserto}}{\text{vector}} = \text{ng de inserto}$$

Se utilizó la T4 DNA Ligase de Roche, la cual requiere que la reacción se lleve a cabo en un volumen de 30 µl con su amortiguador respectivo.

Purificación de producto de restricciones, PCR y extracción del gel.

Se empleó el kit QIAquick Spin de Qiagen para limpiar, ya sea los fragmentos generados a partir de las digestiones con endonucleasas o para el producto de PCR, esto con el fin de eliminar las enzimas y los amortiguadores con los cuales se llevan a cabo estas reacciones. Estas columnas también permiten extraer del gel de agarosa fragmentos de DNA.

Geles de agarosa

Los geles se hicieron a diferentes porcentajes de agarosa, dependiendo de lo que se quisiera visualizar. Se tiñeron con 1 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml). La electroforesis se llevó a cabo a 70 Volts entre 45 min a 1 hr en cámaras MINICELL, el buffer utilizado fue TAE (40 mM Tris-

acetato, 1 mM EDTA). Las muestras se cargaron en los pocillos conteniendo 5 μ l del amortiguador Dye (0.25% azul de bromofenol, 0.25% xilen-cianol FF, 30% glicerol)(Sambrook & Russell, 2000), el marcador de peso molecular utilizado fue 1 Kb plus DNA Ladder de Invitrogen.

Cebadores:

Para secuenciar en la colección de plásmidos pCM

182AF 5' CACACACTAAATTACCGC

182AR 5' GCGTGAATGTAAGCG

Para obtener el gen *cox3*

COX3PF1A 5' GTTTTTGGTCAAGCGGCCGCATGAGGTCTCAGC

COX3PR1A 5' CCCTTGACAATCGACGTCTTAGTACTGGCCAACG

Para el RT-PCR

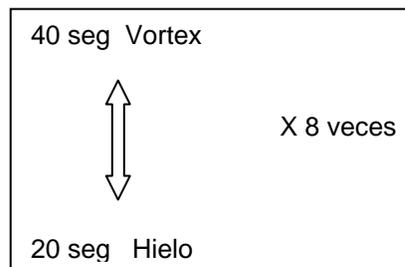
RT-cox3F 5' ATGAGGTCTCAGCTTCTTAAG

RT-cox3R 5' TTAGTACTGGCCAACGTAG

Obtención del extracto proteico de levadura

Las cepas de levadura (NB40-36A y DFS189) sin plásmido fueron crecidas en el medio YPD (50 ml), y las cepas con el plásmido en el medio SD sin uracilo (50 ml); ambos medios contenían glucosa como fuente de carbono. Las levaduras se crecieron hasta alcanzar una densidad óptica de 1.0 (600 nm), se colectaron las células centrifugando a 5000 rpm durante 5 min en un rotor Fiberlite F1-8x50 (SS-34) con una centrifuga Sorvall RC 5B, se resuspendieron en 2 ml de amortiguador que contenía 600 mM de manitol , 5 mM de MES y 1% de SDS.

El volumen resuspendido se colocó en un tubo Falcon de 15 ml y se agregó la misma cantidad de perlas de vidrio de 0.5 mm (Bio Spec Products); con ayuda de un vortex se homogeneizó con el siguiente ciclo:



La concentración de proteína se determinó por el método descrito por Lowry *et al.* (1951), midiendo la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A.

Gel desnaturizante de poliacrilamida

Se realizaron geles de placa de 1.2 mm de espesor al 12% de acrilamida en una cámara BRL (Vertical Gel Eletrophoresis Sistem) de acuerdo al protocolo propuesto por Schägger *et al.* (1986).

Inmunorélicas tipo Western

Las muestras del extracto total proteico de las cepas de levadura sin transformar y transformadas con la construcción pCM188-cox3, se separaron en el gel de poliacrilamida antes mencionado. Por medio del procedimiento descrito por Towbin *et al.* (1979), se transfirió a una membrana de nitrocelulosa Trans-Blot (BIO-RAD) que mantenía las mismas dimensiones que el gel, mediante una cámara semi-seca de transferencia Hoefer TE 70 (Amersham Biosciences), por un lapso de dos horas y media; el miliamperaje se calculó multiplicando el largo por el ancho de la membrana (cm). La membrana se bloqueó, se incubó con el anticuerpo primario (anti-COXIII Molecular Probes) y con el secundario (anti-ratón IgG Invitrogen). Finalmente la réplica tipo Western se reveló según lo descrito por Hawkes *et al.* (1982)

RESULTADOS

El gen *cox3* de *Polytomella* sp. contiene 1113 pares de bases, y está insertado en el plásmido pCR4-TOPO (Fig. 4). Este vector se utilizó para ligar los productos de PCR por medio de topoisomerasas y en la secuencia de inserción contiene el gen (*ccdB*), que es tóxico para *E. coli*. Así, las bacterias que no tengan el inserto deseado mueren, en cambio las bacterias que presenten el inserto interrumpen este gen y pueden vivir en un medio LB con ampicilina 100 µg/ml o con kanamicina 50 µg/ml, ya que el plásmido confiere resistencia a estos dos antibióticos.

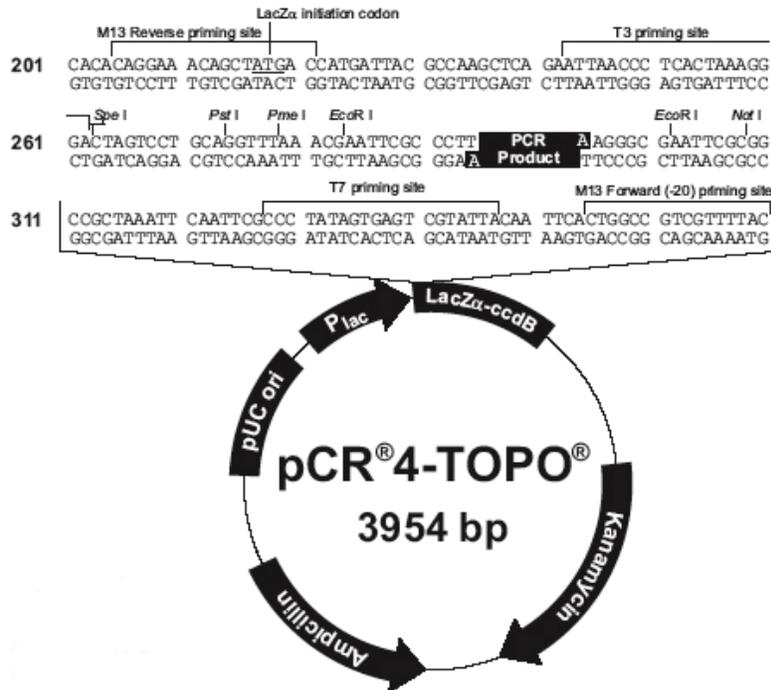


Figura 4. Diagrama del plásmido pCR4-TOPO y del sitio múltiple de clonación.

Las células DH5α se transformaron con este vector por medio de choque térmico y se seleccionaron en medio LB con ampicilina 100 µg/ml. El plásmido se purificó en una columna de Qiagen, se concentró a 2.5 µg/µl, y el producto se secuenció en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular. Los cebadores utilizados fueron el T3 y el T7 que flanquean el producto de la ligación. Con las secuencias se pudo observar que el codón de inicio estaba en la orientación de cebador T3. Haciendo un alineamiento con la secuencia obtenida de *cox3* en la base de datos de National Center for Biotechnology Information (NCBI) con acceso AF286057, se observó que el inserto no presentaba ninguna alteración en la secuencia de nucleótidos. Dentro del sitio múltiple de clonación de este vector se encuentran los sitios *Not I* y

Pst I, los cuales están flanqueando al gen *cox3*, *Not* I en el extremo 5' y *Pst* I en el 3' (Fig. 5); estos son compatibles con el sitio múltiple de clonación del plásmido pCM188.

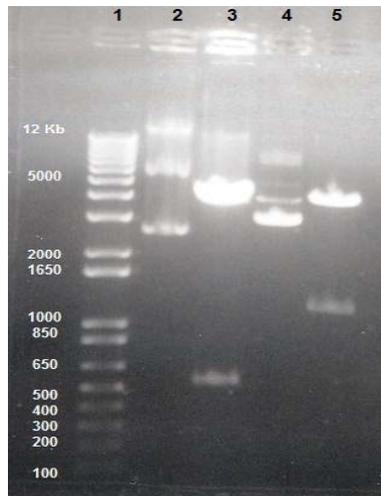


Figura 5. 1) Marcador de peso molecular; 2) pCR4-TOPO con el gen *cox2b* de *Polytomella* sp. sin digerir; 3) pCR4-TOPO con el gen *cox2b* de *Polytomella* sp. liberado con las enzimas *Not* I y *Pst* I, 4) pCR4-TOPO con el gen *cox3* de *Polytomella* sp. sin digerir; 5) pCR4-TOPO con el gen *cox3* de *Polytomella* sp., el cual fue liberado con las enzimas *Not* I y *Pst* I.

Aprovechando estos sitios de restricción se logró insertar el cDNA de *cox3* en el vector pCM188 (Fig. 6), dando el nombre a esta construcción de pCM188-*cox3*, quedando en fase con el promotor.

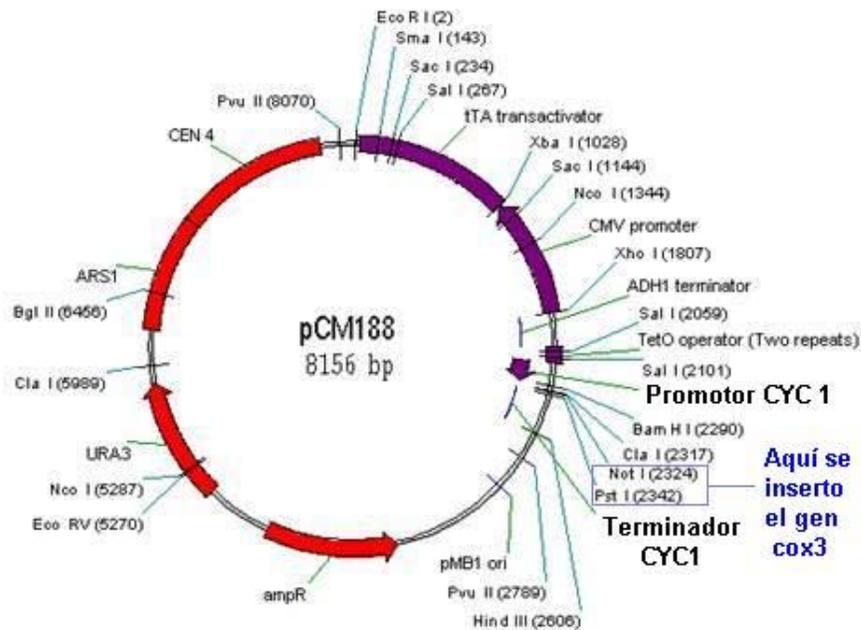


Figura 6. Esquema del plásmido pCM188 en el cual se puede observar los orígenes de replicación para bacterias (pMB1) y para levadura (ARS1), el marcador de selección para bacterias (Amp) y para levadura (*URA3*), el promotor (CYC1) y el operador de tetraciclina (TetO).

Este plásmido tiene la capacidad de replicarse tanto en bacterias como en *S. cerevisiae*; para seleccionarlo en bacterias solo se requiere de ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$), y para la selección en levadura se usa un marcador de auxotrofia para *URA3*, presente en las dos cepas que se utilizan en este proyecto (NB40-36A y DFS189). Dicha proteína interviene en la biosíntesis de uracilo, así en un medio mínimo sin uracilo, solo las levaduras transformadas podrán sobrevivir. También posee un origen de replicación como si fuera el centrómero del cromosoma 4, y se asegura que al menos una copia de este vector estará presente en cada célula. La elección del vector pCM188 se debe a que el promotor que flanquea el gen de interés, contiene la secuencia del gen de la isoforma 1 del citocromo *c* (CYC-1) de *S. cerevisiae*, el cual se expresa de manera constitutiva. De esta manera se evitó el uso de vectores inducibles por galactosa (evitar que la levadura creciera fermentando la galactosa) o inducibles por cobre (ya que dicha inducción puede llegar a ser tóxica para la levadura). Al inverso de estos vectores el pCM188, no requiere de inducción, y se puede modular la expresión del gen de interés con la presencia de tetraciclina, con 0.001 $\mu\text{g/ml}$ del antibiótico la expresión decrece un 20% y la inactivación completa se logra con 1 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina, según lo reportado por Gari *et al.* (1997),

Para corroborar la secuencia de la construcción pCM188-cox3 la cual tiene 9262 pares de bases, se generó un mapa de restricción con el programa EnzymeX de licencia libre para Mac OS X 10, así se obtuvo que la enzima *BamH* I corta en el sitio múltiple de clonación del plásmido y en la posición 481 del gen *cox3* de *Polytomella* sp.; el peso esperado para esta restricción es una banda de 8741 y 521 pares de bases (Fig. 7).

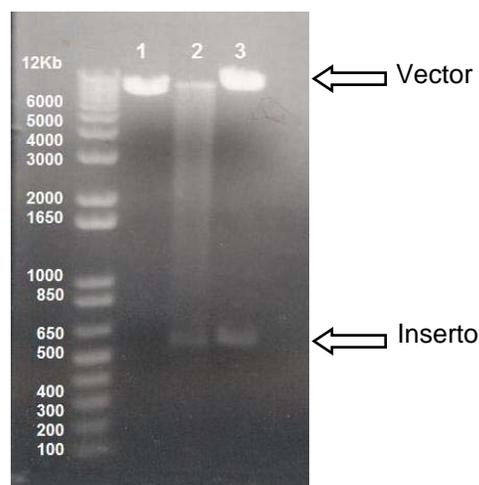


Figura 7. En los carriles del 1 al 3 se hizo una digestión con la enzima *BamH* I, 1) plásmido pCM188 sin inserto, 2) y 3) son pCM188-cox3 se puede observar un banda de alrededor de 500 pares.

Se probaron las cepas NB40-36A y DFS189 en medios con diferentes fuentes de carbono que contenían glucosa (YPD) medio en el cual las levaduras fermentan, y glicerol (YPGly) en el cual las levaduras solo pueden respirar (Fig. 8). Como puede observarse, la cepa interrumpida en el gen *cox3* mitocondrial es incapaz de crecer en sustratos no fermentables.

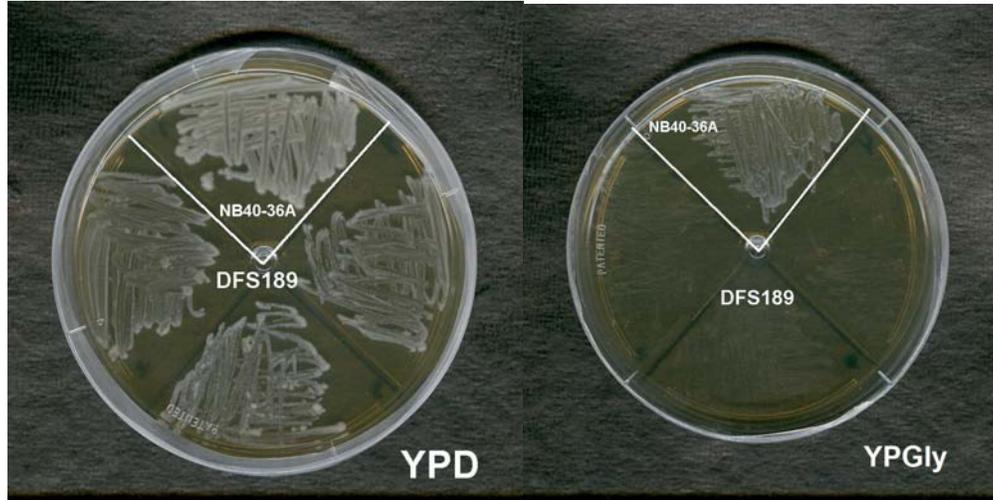


Figura 8. Prueba de las cepas utilizadas en medio fermentativo y respiratorio.

Obtenida la construcción pCM188-cox3 se continuó con la transformación de las levaduras con el procedimiento descrito por Gietz & Woods (2002); los resultados obtenidos se muestran en la figura 9.

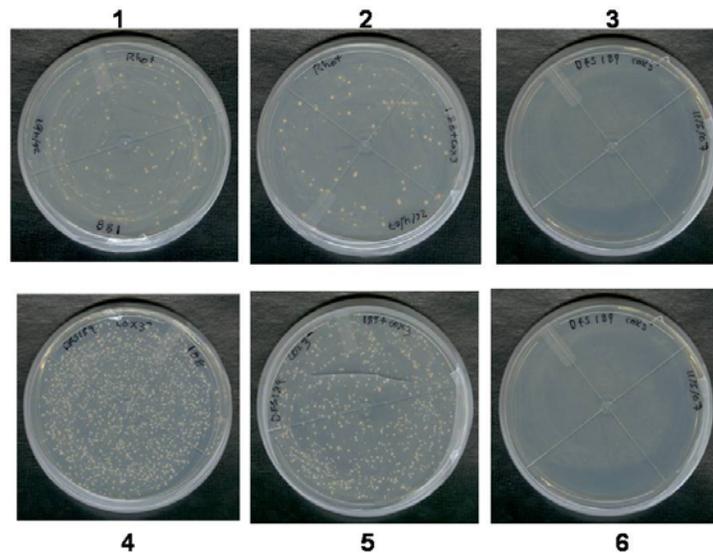


Figura 9. Transformación de las cepas con el pCM188 y pCM188-cox3, de 1 a 3 es NB40-36A, de 4 a 6 es DFS189, 1 y 4 con pCM188, 2 y 5 con pCM188-cox3, 3 y 6 sin vector.

Las cepas transformadas con la construcción pCM188-cox3 se sembraron en medio mínimo sin uracilo con 2% de glicerol como fuente de carbono. La complementación no fue exitosa, ya que

no crecieron en este medio las cepas que tenían interrumpido el gen mitocondrial. La presencia del vector con el gen *cox3* de *Polytomella* sp. no restauró la deficiencia del gen *cox3* mitocondrial de la levadura. Al no obtener los resultados esperados nos preguntamos si la proteína COXIII del alga se está expresando en la levadura. Se continuó con la búsqueda del RNA mensajero de este gen, por medio de RT-PCR, en el cual se usó como templado el RNA total de las cepas de levaduras transformadas con la construcción (Fig. 10).

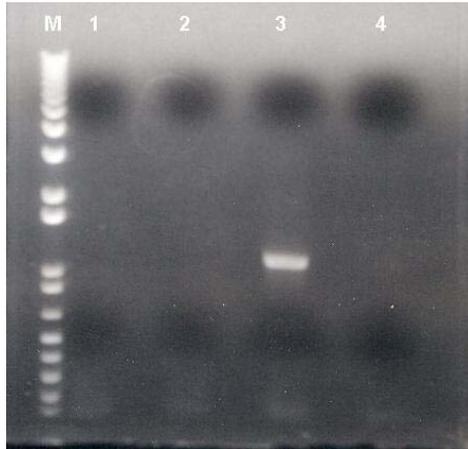


Figura 10. M) Marcador, 1) DFS189, 2) DFS189 con pCM188, 3) DFS189 con pCM188-cox3, 4) control de la reacción sin RNA.

Con esta técnica se obtuvieron resultados positivos, como se puede observar en el carril 3 de la figura 10. Al realizar nuevamente el experimento pero agregando desoxirribonucleasa 1 de Roche, no se observó la banda, lo que sugería que el producto de PCR observado se debiera a la amplificación de DNA del vector. Se decidió hacer ensayos de tipo Northern blot, usando como templado el RNA total que se tenía extraído, y como sonda la digestión con *Bam*H I del gen *cox3* de *Polytomella* sp. alrededor de 500 pares de bases (Fig. 11).

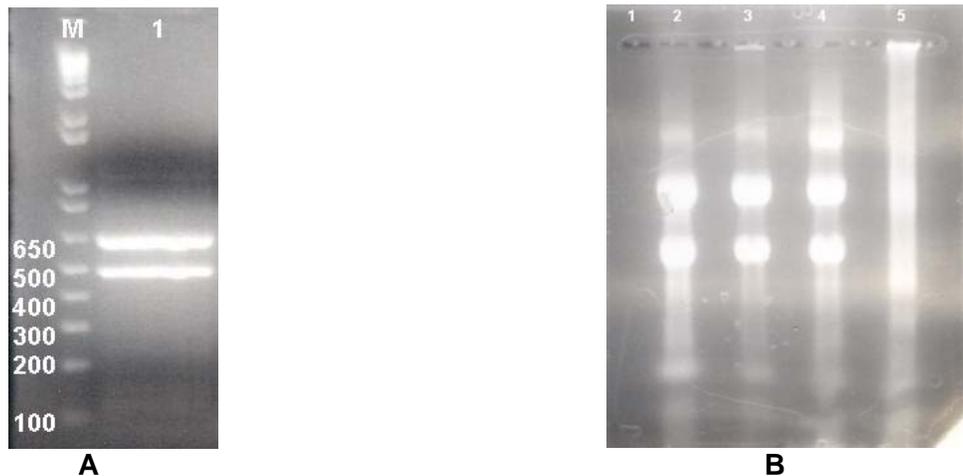


Figura 11. A: La digestión del gen *cox3* de *Polytomella* sp., el fragmento de alrededor de 500 pares de bases (carril 1) se emplea para hacer la sonda en el ensayo de Northern blot. B: 1) Sonda del gen *cox3* 2) RNA de DFS189 3) RNA de DFS189 con pCM188 4) RNA de DFS189 con pCM188-cox3 5) RNA total de *Polytomella* sp.

La membrana se tiñó con azul de metileno para visualizar la transferencia del RNA, y posteriormente se efectuó la hibridación, y la membrana se colocó en un cassette de Molecular Dynamics con una pantalla sensible al fósforo radioactivo. No se obtuvo una señal positiva para la cepa transformada con el plásmido pCM188-cox3; lo único que se pudo apreciar fue la sonda marcada (Fig. 12).

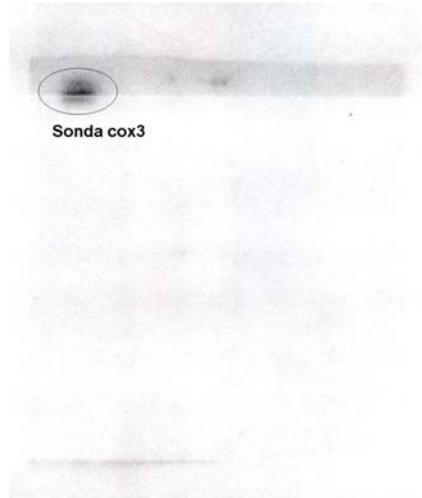


Figura 12. Membrana de nylon que se digitalizó por medio de un aparato Storm de Molecular Dynamics en la Unidad de Biología Molecular del I.F.C., con RNA de la cepa DFS189 y con RNA total de *Polytomella* sp., el gel que se muestra en la figura 12 es el mismo que se utilizó para este análisis.

Los experimentos de Northern blot sugerían la ausencia de un transcrito del gen *cox3*. Para confirmar este resultado, se exploró la presencia/ausencia de la proteína con ensayos de tipo Western blot, ya que en laboratorio contamos con un anticuerpo anti-COXIII de *S. cerevisiae*, que cruza con la subunidad de *Polytomella* sp., como fue previamente reportado por Pérez-Martínez *et al.* (2000).

En la figura 13 se muestra el gel desnaturizante de poliacrilamida, el cual se realizó para separar las proteínas presentes en los extractos totales de los cultivos, como controles positivos para la inmunoréplica de tipo Western se utilizó mitocondrias aisladas de *Yarrowia lipolytica* y la citocromo *c* oxidasa de *Polytomella* sp.; en paréntesis se muestra la concentración de proteína que se cargó en cada pozo.

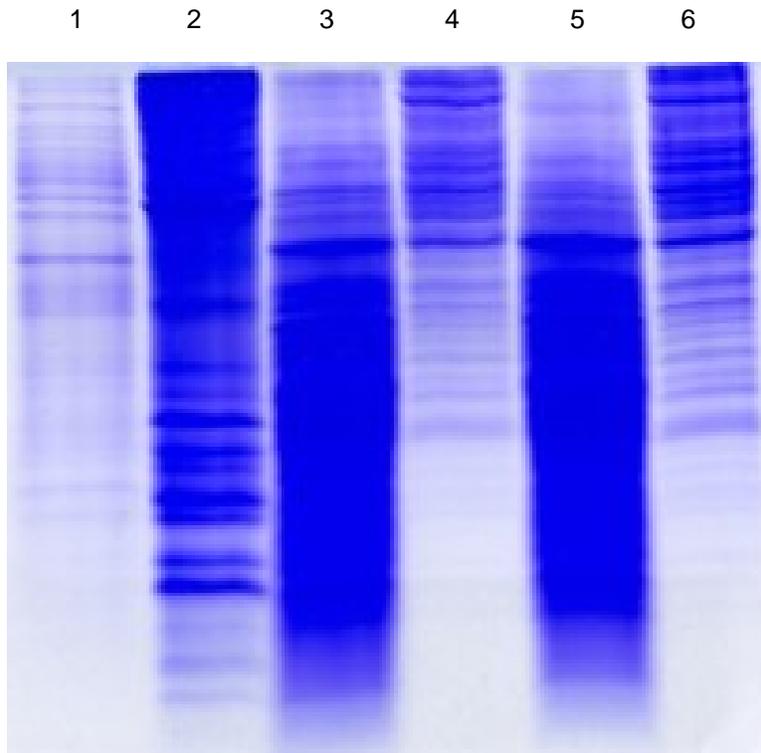


Figura 13. Gel desnaturalizante: 1) Mitocondrias aisladas de *Yarrowia lipolytica* (25 μ g), 2) Complejo IV de *Polytomella* sp. (375 μ g), 3) Extracto total de la cepa NB40-36A (817 μ g), 4) Extracto total de la cepa NB40-36A transformada con la construcción pCM188-cox3 (252 μ g), 5) Extracto total de la cepa DFS189 (767 μ g), y 6) Extracto total de la cepa DFS189 transformada con la construcción pCM188-cox3 (250 μ g).

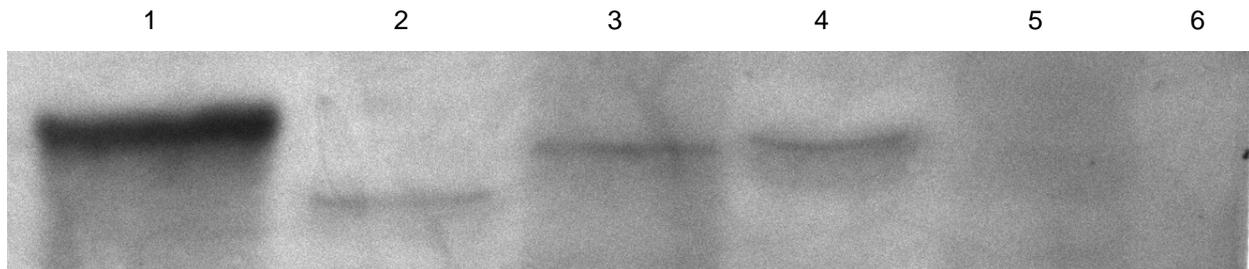


Figura 14. Inmunoréplica tipo Western usando el anticuerpo anti-COXIII: 1) Mitocondrias aisladas de *Y. lipolytica*, 2) Complejo IV de *Polytomella* sp, 3) Extracto total de la cepa NB40-36A, 4) Extracto total de la cepa NB40-36A transformada con la construcción pCM188-cox3, 5) Extracto total de la cepa DFS189, y 6) Extracto total de la cepa DFS189 transformada con la construcción pCM188-cox3.

El gel se utilizó para realizar el estudio de tipo Western blot, según lo descrito en Materiales y Métodos. En la figura 14 se muestra el resultado de este procedimiento, en el cual podemos observar que el anticuerpo anti-COXIII tiene reacción cruzada con la subunidad COXIII de *Y. lipolytica* (carril 1), y con la subunidad COXIII de *Polytomella* sp. (carril 2), y en los carriles 3 (cepa silvestre) y 4 (cepa silvestre con la construcción pCM188-cox3), se puede observar que el anticuerpo hace reacción contra el péptido para el cual fue diseñado. En el caso de la cepa

carente del gen *cox3* (DFS189), carriles 5 (sin transformar) y 6 (transformada con la construcción pCM188-*cox3*), no se pudo observar la presencia de esta subunidad de la citocromo *c* oxidasa. Concluimos que no hay presencia de la proteína COXIII del alga en las levaduras transformadas.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo, intentamos rescatar la función de la citocromo *c* oxidasa de una cepa de levadura (*S. cerevisiae*) que tiene interrumpido al gen *cox3* mitocondrial, expresando el gen del alga incolora *Polytomella* sp. que codifica para la subunidad *cox3* del alga. En términos estrictos, no se realizó una expresión alotópica sino mas bien xenotópica, ya que se utilizó un gen de otro organismo.

Para lograr este propósito, se clonó el gen *cox3* del alga en el vector pCM188, dando como resultado la clona denominada pCM188-*cox3*. Las levaduras se transformaron y se lograron crecer en un medio sin uracilo. Sin embargo, no se pudo complementar la ausencia del gen *cox3*, ya que la levadura fue incapaz de crecer en un medio no fermentativo. En primera instancia se realizó la búsqueda del transcrito; al no obtener resultados positivos se continuó con la exploración de la proteína con técnicas de inmunodetección. El resultado negativo nos indicó que no teníamos la presencia de esta subunidad en la cepas de levadura transformadas con la construcción.

Para que ocurra una expresión alotópica exitosa se requiere de una serie de eventos que faciliten la transcripción, la traducción, la importación a la mitocondria, el procesamiento de la preproteína, la inserción en la membrana interna, y la integración funcional en la holoenzima

a) La primera parte a contemplar es la preferencia de codones del gen que se va a expresar. En el caso de algas clorofíceas y de *S. cerevisiae* los genes utilizan el código estándar, pero tienen preferencias distintas para cada aminoácido.

b) El vector de expresión es otro punto a contemplar; como requerimientos esenciales podríamos señalar que tenga un origen de replicación multicopia (2 μ) y un promotor fuerte como son el CYC-1 o el PGK (fosfoglicerato cinasa). Obtenida la expresión del gen, se puede modular, haciendo uso de otros vectores como el utilizado en este trabajo pCM188 o pSAL1, el cual regula su expresión mediante variaciones en la concentración de cobre en el medio. Ambos contienen una región centromérica por lo que cada célula tendrá sólo una copia del plásmido.

c) Para el direccionamiento de proteínas hacia el compartimento mitocondrial correspondiente, una parte importante son las presecuencias mitocondriales. Como característica general, la

presecuencia mitocondrial es un péptido anfifílico que contiene preferentemente aminoácidos con cargas positivas, que pueden adoptar una estructura de α -hélice o de β -lámina. Las longitudes son muy variables, desde 12 hasta más de 70 aminoácidos, ubicada en el extremo amino terminal de la proteína madura (Roise & Schatz, 1988).

d) Una de las grandes limitaciones para la importación de proteínas a la mitocondria de origen nuclear es la hidrofobicidad, la cual no está relacionada exactamente con el número de cruces transmembranales, sino mas bien con la hidrofobicidad total de cada segmento transmembranal y con la hidrofobicidad promedio de la preproteína (mesohidrofobicidad) (Claros *et al.*, 1995, 1996). Así, la reducción de la hidrofobicidad debe ser preferencialmente en los cruces transmembranales que no alteren la función ni en las interacciones importantes subunidad-subunidad como es el caso de la subunidad COXIII de las algas clorofíceas (Pérez-Martínez *et al.*, 2001). Con la reducción de la hidrofobicidad también se facilitaría el transporte a través de los complejos translocadores TOM/TIM (Membrana externa/Membrana interna). En el estudio realizado por Oca-Cossio *et al.* (2003) en células de mamífero, se importó una proteína resultante de la fusión entre el apocitocromo *b* (proteína que forma parte del núcleo catalítico del complejo III) y la EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) y observaron por medio de microscopia confocal agregaciones en la periferia de la membrana externa, por lo que sugirieron que la traducción de proteínas hidrofóbicas debe estar acoplada a la translocación (Fujiki & Verner, 1993). La inserción cotraduccional facilitaría el transporte e impediría que se generen agregados en la membrana externa mitocondrial.

e) Para que la traducción del RNAm se lleve a cabo en la periferia de la membrana externa mitocondrial, es necesaria la presencia de elementos en *cis* dentro del 3'UTR, que dirija RNAm hacia la mitocondria (Marc *et al.* 2002). Una posible explicación para este fenómeno radica en el doble origen (procariota y eucariota) la composición de proteínas presentes en la mitocondria (Karlberg *et al.*, 2000), por el cual las proteínas de origen procariota se traducen preferentemente en superficie de la membrana externa. También se ha observado una relación con el tamaño del RNAm y el lugar de la traducción con la biogénesis. Así, los RNAm que son largos, indican que son elementos básicos de la arquitectura de los complejos mitocondriales, por lo que suelen localizarse en la periferia de la membrana externa (Silvestre *et al.*, 2003a). El grupo de Corral-Debrinski, ha realizado diferentes estudios con el 3'UTR para que el RNAm se dirija y traduzca en la periferia de la membrana externa mitocondrial y han observado que la presencia de elementos en *cis* en el 3'UTR está conservada desde la levadura (*S. cerevisiae*)

hasta los humanos (Silvestre *et al.* 2003b). En células HeLa han podido importar *in vivo* la subunidad ATP6 la cual es altamente hidrofóbica y forma parte del sector F₀ de la ATP sintetasa; esto fue posible sin la sustitución de aminoácidos para disminuir la hidrofobicidad; simplemente recodificaron el gen mitocondrial para su expresión nuclear y colocaron la presecuencia y el 3'UTR de la isoforma 2 de la superóxido dismutasa (SOD2) la cual es un enzima que se encuentra en la matriz mitocondrial (Kaltimbacher *et al.* 2006).

f) El transporte de la preproteína hacia la matriz mitocondrial se realiza por medio de los complejos translocadores TOM/TIM23. Este proceso implica el reconocimiento de la presecuencia y de un potencial electroquímico ($\Delta\Psi$) que impulse el movimiento electroforético, con la participación de la chaperona Hsp70 asociada a los dominios expuestos en la matriz del complejo TIM23 (Tim 44, 16 y 14), que hidrolizando ATP ayuda a la importación de la proteína a la matriz mitocondrial.

g) La preproteína ubicada en la matriz sufre una primera edición, realizada presumiblemente por la enzima *m*-AAA, la cual remueve parte de la presecuencia con la hidrólisis de ATP, esta peptidasa participa en la proteólisis para la formación de los complejos de la cadena respiratoria (Artl *et al.* 1998).

h) El siguiente paso es la exportación e inserción de la preproteína en la membrana interna mitocondrial; este proceso es llevado a cabo por Oxa1, Mba1 y el complejo formado por Pnt1-Mss2-Cox18.

i) Para que la preproteína adquiera la conformación madura se requiere de una segunda escisión de la presecuencia restante en el espacio intermembranal, este paso es realizado por el complejo IMP.

j) La incorporación de COXIII a la holoenzima, no es un evento aislado, ya que debe acoplarse a la biogénesis de las otras subunidades que forman parte del núcleo de esta enzima. Lo primero que se incorpora es COXI, la cual tiene que adquirir los grupos hemo (*a* y *a*₃) y el cobre B, al mismo tiempo se debe de integrar COXII y adquirir el cobre A, realizada la asociación COXI - COXII, se incorpora COXIII. Esta última subunidad establece tres contactos con COXI y se forma el complejo COXIII - COXI - COXII. El ensamblaje correcto de esta subunidad da como resultado

la función del complejo, ya que aunque no presenta grupos que participen en las reacciones de oxido-reducción, parece tener un papel estructural importante.

k) Como puede observarse, la expresión alotópica de genes no es un proceso trivial, e implica una gran cantidad de pasos. En el presente trabajo, se encontró que la cepa de levadura transformada con el gen *cox3* de las algas clorofíceas, no se expresó en la levadura. No pudo detectarse en el sistema un RNA mensajero o a la proteína correspondiente. El sistema de expresión que se escogió para este trabajo, se truncó desde el primer paso, probablemente porque la levadura fue incapaz de transcribir y traducir el gen *cox3* xenotópico proveniente de un alga.

PERSPECTIVAS

En el futuro, utilizaremos un gen *cox3* recodificado de la propia levadura para intentar su expresión alotópica. El gen se diseñará haciendo alineamientos múltiples de las secuencias de las subunidades COXIII de levadura, *Chlamydomonas reinhardtii* y *Polytomella* sp., y comparando los alineamientos con la estructura cristalográfica de la subunidad de bovino, cuya estructura cristalográfica ya se conoce. Se diseñará la proteína reduciendo la hidrofobicidad de los cruces transmembranales de acuerdo a lo que ha ocurrido naturalmente en la subunidad COXIII de algas clorofíceas. Para el diseño del gen correspondiente, se tomará en cuenta el uso y preferencia de codones que son utilizados en el núcleo de la levadura. A este gen se añadirá en el extremo 5' la secuencia que codifica para la presecuencia mitocondrial de *Polytomella* sp. e incluiremos regiones 3' UTR típicas de RNA mensajeros de levadura que darán lugar a proteínas mitocondriales. Como un primer acercamiento, el gen sintético se expresará bajo el control de un promotor constitutivo en un vector multicopia, para confirmar la presencia del transcrito y la proteína, posteriormente se realizarán otras construcciones con vectores en los que se pueda regular la expresión del gen.

LITERATURA CITADA

- Anderson S., Bankier A. T., Barrell B. G., de Bruijn M. H. L., Coulson A. R., Drouin J., Eperon I. C., Nierlich D. P., Roe B. A., Sanger F., Schreier P. H., Smith A. J. H., Staden R., and Young I. G. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 290: 457-65.
- Artl H., Steglich G., Perryman R., Guiard B., Neupert W., and Langer T. 1998. The formation of respiratory chain complexes in mitochondria is under the proteolytic control of the *m*-AAA protease. *EMBO J*. 17: 4837-47
- Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., and Struhl K. 2002. *Short protocols in molecular biology*. John Wiley and Sons. USA
- Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., and Struhl K. 2003. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley and Sons. USA
- Barrientos A., Barros M. H., Valnot I., Rötig A., Rustin P., and Tzagoloff A. 2002. Cytochrome oxidase in health and disease. *Gene*. 286: 53-63
- Blanchard L. J. and Lynch M. 2000. Organellar genes, why do they up end in the nucleus. *Trends in Genetics*. 16: 315-20
- Bonnefoy N., and Fox T. D. 2000. In vivo analysis of mutated initiation codons in the mitochondrial COX2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* fused to the reporter gene ARG8 m reveals lack of downstream reinitiation. *Mol. Gen. Genet*. 262: 1036-46
- Burke D., Dawson D., and Stears T. 2000. *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA
- Calboun M. W., Thomas J. W., and Gennis R. B. 1994. The cytochrome oxidase superfamily of redox-driven proton pumps. *Trends. Biochem. Sci*. 19: 325-30
- Capaldi R. A. 1990. Structure and function of cytochrome *c* oxidase. *Annu. Rev. Biochem*. 59: 569-96
- Claros M. G., Perea J., Shu Y., Samatey F. A., Popot J. L., and Jacq C. 1995. Limitations to in vivo import of hydrophobic proteins into yeast mitochondria. The case of a cytoplasmically synthesized apocytochrome *b*. *Eur. J. Biochem*. 228: 762-71
- Claros M. G., Perea J., and Jacq C. 1996. Allotopic expression of yeast mitochondrial maturase to study mitochondrial import of hydrophobic proteins. *Methods Enzymol*. 264: 389-403
- de Grey D. N. J. Aubrey. 2005. Forces maintaining organellar genomes: is any as strong as genetic code disparity or hidrophobicity. *BioEssays*. 27: 436-46
- Foury F., Roganti T., Lecrenier N., and Purnelle B. 1998. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*. 440: 325-31

- Fujiki M. and Verner K. 1993. Coupling of cytosolic protein synthesis and mitochondrial protein import in yeast. Evidence for cotranslational import *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 268: 1914-20
- Gari E., Piedrafita L., Aldea M., and Herrero E. 1997. A Set of Vectors a Tetracycline-Regulatable Promoter System for Modulated Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 13: 837-48
- Gray M. W., Burger G. and Lang F. B. 1999. Mitochondrial evolution. *Science.* 283: 1476-81
- Gray R. E., Law R. H. P., Devenish R. J., and Nagley P. 1996. Allotopic expression of mitochondrial ATP synthase genes in nucleus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* 264: 369-89
- Gietz R. D. and Woods R. A. 2002. Transformation of Yeast by Lithium Acetate/Single-Stranded Carrier DNA/Polyethylene Glycol Method. *Methods Enzymol.* 350: 87-96
- González-Halphen D., Pérez-Martínez X., Soledad Funes., Reyes-Prieto A., y Santillán-Torres J. L. 2003. La migración de genes de la mitocondria al núcleo y la evolución de los genomas mitocondriales. En Mensaje Bioquímico, Vol. XXVII. UNAM. México D.F. pp 201-20
- González-Halphen D. y Vázquez-Acevedo M. 2002. La cadena respiratoria mitocondrial: un enfoque estructural, Pp. 65-87. En: Vázquez-Memije M. E. y Tuena de Gómez-Puyou M. (eds.). "Mitocondria" Una mirada a la evolución de los conceptos básicos y modernos. (2002) Ed. Prados México D.F.
- Hanna G. M., Nelson P. I., Rahman S., Lane R. J. M., Land J., Heales S., Cooper M. J., Schapira A. H. V., Morgan-Hughes J. A., and Wood N. M. 1998. Cytochrome c oxidase deficiency associated with the first stop-codon point mutation in human mtDNA. *Am. J. Hum. Genet.* 63: 29-36
- Hatefi Y. 1985. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu. Rev. Biochem.* 54: 1015-69
- Hawkes R., Niday E., and Gordon J. 1982. A Dot-Immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal. Biochem.* 119: 142-7
- Herrmann M. J. and Funes S. 2005. Biogenesis of cytochrome oxidase - Sophisticated assembly lines in the mitochondrial inner membrane. *Gene.* 354: 43-52
- Horváth R., Scharfe C., Hoeltzenbein M., Do B. H., Schröder C., Warzok R., Vogelgesang S., Lochmüller H., Müller-Höcker J., Gerbitz K. D., Oefner P. J., and Jaksch M. 2002. Childhood onset mitochondrial myopathy and lactic acidosis caused by a stop mutation in the mitochondrial cytochrome c oxidase III gene. *J. Med. Genet.* 39: 812-16
- Iwata S., Ostermeier C. H., Ludwig B. and Michel H. 1995. Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature.* 376: 660-69
- Johns D. R. and Neufeld M. J. 1993. Cytochrome c oxidase mutations in Leber hereditary optic neuropathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196: 810-15

- Kadenbach B., Jarausch J., Hartmann R., and Merle, P. 1983. Separation of mammalian cytochrome c oxidase into 13 polypeptides by a sodium dodecyl sulfate-gel electrophoretic procedure. *Anal. Biochem.* 129: 517-21.
- Kaltimbacher V., Bonnet C., Lecoivre G., Foster V., Sahel J-A., and Corral-Debrinski M. 2006. mRNA localization to the mitochondrial surface allows the efficient translocation inside the organelle of a nuclear recoded ATP6 protein. *RNA.* 12: 1408-17
- Karlberg O., Canbäck B., Kurland G. C., and Andersson G. S. 2000. The dual origin of the yeast mitochondrial proteome. *Yeast.* 17: 170-87
- Keightley J. A., Hoffbuhr K. C., Burton M. D., Salas V. M., Johnston, W. S. W., Penn A. M. W., Buist N. R. M., and Kennaway N. G. 1996. A microdeletion in cytochrome c oxidase (COX) subunit III associated with COX deficiency and recurrent myoglobinuria. *Nature Genet.* 12: 410-16
- Khalimonchuk O., and Rödel G. 2005. Biogenesis of cytochrome c oxidase. *Mitochondrion.* 5: 263-88
- Koehler M. C. 2004. New developments in mitochondrial assembly. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20: 309-35
- Lang F. B., Gray M. W. and Burger G. 1999. Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 33: 351-97
- Lou W., Fang H., and Green N. 2006. Substrate specificity of the inner membrane peptidase in yeast mitochondria. *Mol. Gen. Genomics.* 275: 431-36
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., and Randall R. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-75
- Manfredi G., Schon E. A., Moraes C. T., Bonilla E., Berry G. T., Sladky J. T., and Dimauro S. 1995. A new mutation associated with MELAS is located in a mitochondrial DNA polypeptide-coding gene. *Neuromusc. Disord.* 5: 391-98
- Marc P., Margeot A., Devaux F., Blugeon C., Corral-Debrinski M., and Jacq C. Genome-wide analysis of mRNAs targeted to yeast mitochondria. *EMBO Rep.* 3: 159-64
- Margeot A., Garcia M., Wang W., Tetaud E., di Rago J. P., and Jacq C. 2005. Why are many mRNAs translated to the vicinity of mitochondria: A role in protein complex assembly?. *Gene.* 354: 64-71
- Margulis L. 1970. *The Origin of Eukariotic Cell.* Yale University Press. USA
- Michel H. 1998. The mechanism of proton pumping by cytochrome c oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:12819-24
- Miller H. J. 1972. *Experiments in Molecular Genetics.* Eleventh printing. Cold Spring Harbor Laboratory. USA
- Neupert W. 1997. Protein import into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 66: 863-917

- Neupert W. and Herrmann J. M. 2007. Translocation of Protein into Mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 76: 723-49
- Oca-Cossio J., Kenyon L., Hao H., Moraes T. C. 2003. Limitations of allotopic expression of mitochondrial genes in mammalian cells. *Genetics.* 165: 707-20
- Ojala D. Montoya J. and Attardi, G. 1981. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* 290: 470-74.
- Pérez-Martínez X., Vázquez-Acevedo M., Tulkunova E., Funes S., Claros M. G., Davidson E., King M. P., and González-Halphen D. 2000. Unusual Location of a Mitochondrial Gene. *J. Biol. Chem.* 275 (39): 30144-52
- Pérez-Martínez X., Antaramian A., Vázquez-Acevedo M., Funes S., Tulkunova E., d'Alayer J., Claros M. G., Davidson E., King M. P. and González-Halphen D. 2001. Subunit II of Cytochrome *c* Oxidase in Chlamydomonas Algae Is a Heterodimer Encoded by Two Independent Nuclear Genes. *J. Biol. Chem.* 276 (14): 11302-09
- Race L. H., Herrmann R. G. and Martin W. 1999. Why have organelles retained genomes?. *Trends in Genetics.* 15: 364-70
- Roise D. and Schatz G. 1988. Mitochondrial Presequences. *J. Biol. Chem.* 263: 4509-11
- Romanos A. M., Scorer A. C. and Clare J. J. 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast.* 8: 423-88
- Rottenberg H. 1998. The generation of proton electrochemical potential gradient by cytochrome *c* oxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1364: 1-16
- Sambrook J. and Russell W. D. 2000. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA
- Schagger H., Link T. A., Engle W. D., and von Jagow G. 1986. Isolation of the eleven protein subunits of the *bc₁* complex from beef heart. *Methods Enzymol.* 126: 224-37
- Steele F. D., Butler A. C., and Fox T. D. 1996. Expression of recoded nuclear gene inserted into yeast mitochondrial DNA is limited by mRNA-specific translational activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 5253-57
- Stiburek L., Hansikova H., Tesarova M., Cerna L., and Zeman J. 2006. Biogenesis of eukaryotic cytochrome *c* oxidase. *Physiol. Res.* 55: S27-S41
- Sylvestre J., Vialette S., Corral Debrinski M., and Jacq C. 2003a. Long mRNAs coding for yeast mitochondrial of prokaryotic origin preferentially localize to the vicinity of mitochondria. *Genome Biol.* 4: R44
- Sylvestre J., Margeot A., Jacq C., Dujardin G., and Corral-Debrinski M. 2003b. The role of the 3 untranslated region in mRNA sorting to the vicinity of mitochondria is conserved from yeast to human cells. *Mol. Biol. Cell.* 14: 3848–56.

- Tiranti V., Corona P., Greco M., Taanman, J. W., Carrara F., Lamantea E., Nijtmans L., Uziel G., and Zeviani M. 2000. A novel frameshift mutation of the mtDNA COIII gene leads to impaired assembly of cytochrome c oxidase in a patient affected by Leigh-like syndrome. *Hum. Molec. Genet.* 9: 2733-42
- Towbin H., Staehelin T., and Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 4350-54
- Tsukihara T., Aoyama H., Yamashita E., Tomizaki T., Yamaguchi H., Shinzawa-Itoh K., Nakashima R., Yaono R., and Yoshikawa S. 1996. The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science.* 272: 1136-44
- von Heijne G. 1986. Why mitochondria need a genome. *FEBS Letters.* 198: 1-4
- Wallace D. C. 1992a. Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 1175-1212
- Wallace D. C. 1992b. Mitochondrial genetics: A paradigm for aging and degenerative disease?. *Science.* 256: 628-32
- Zhou C., Yang Y., and Jong A. Y. 1990. Mini-prep in Ten Minutes. *BioTechniques.* 8: 172-73