



Universidad Nacional Autónoma de  
México



Programa de Doctorado en  
Ciencias Biomédicas

Instituto de Fisiología Celular

**Estudio de una nueva función de  
Pet54 en la regulación de la  
síntesis de Cox1 en mitocondrias  
de *Saccharomyces cerevisiae***

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOMÉDICAS)

P R E S E N T A:

Juan Pablo Mayorga Juárez

Asesor: Dra. Xochitl Pérez Martínez

Comité tutor

Dra. Alicia González Manjarrez  
Dr. Roberto Hernández Fernández



México D. F. JUNIO, 2016



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.

# **Estudio de una nueva función de Pet54 en la regulación de la síntesis de Cox1 en mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae***

## **AGRADECIMIENTOS**

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

El comité tutorial que asesoró este trabajo estuvo conformado por:

Dra. Alicia González Manjarrez	Instituto de Fisiología Celular
Dr. Roberto Hernández Fernández	Instituto de Investigaciones Biomédicas
Dra. Xochitl Pérez Martínez	Instituto de Fisiología Celular

Se agradece la asesoría técnica de la Dra. Yolanda Camacho Villasana del departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular así como valioso apoyo en la realización de este proyecto.

Se agradece al Dr. Gabriel del Rio y a la Dra. María Teresa Lara Ortiz del departamento de Bioquímica y Biología estructural del Instituto de Fisiología Celular por la donación de cepas de levadura proporcionadas de la colección YKO.

Se agradece al Dr. Diego González Halphen y a la Q. B. P. Miriam Vázquez Acevedo del departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular por la donación de reactivos.

Se agradece a la Dra. Soledad Funes del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular por la donación de anticuerpos.

Se agradece a la Dra. Laura Ongay Larios y a la Dra. María Guadalupe Códiz Huerta, de la Unidad de Biología Molecular, IFC, por su asistencia técnica.

Durante la realización de este proyecto fui apoyado por una beca del CONACYT (238399).

Índice	Página
Abreviaturas	1
Resumen	3
Abstract	5
Introducción	7
• La levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudio	7
• La mitocondria y su genoma	7
• Complejo IV mitocondrial o Citocromo <i>c</i> Oxidasa (CcO)	11
• La subunidad Cox1 de la CcO	14
• La proteína Pet54	21
Justificación	24
Hipótesis y objetivos	25
Materiales y métodos	27
Resultados	49
• 1. Caracterización del efecto de Pet54 sobre la síntesis de Cox1	49
• 1.1. La mutante $\Delta pet54$ no recupera la síntesis de Cox1 $\Delta C15$	49
• 1.2. El efecto de la mutante $\Delta pet54$ es independiente de Cox14 y Coa3	52
• 2. Posibles sitios de acción de Pet54 en la síntesis de Cox1	55
• 3. Pet54 actúa en los extremos UTR's del mRNA de <i>COX1</i>	57
• 3.1 El efecto de la mutante $\Delta pet54$ depende de la presencia de Cox1	57
• 3.2 Pet54 actúa a través del 5'UTR de <i>COX1</i>	60

• 3.3 Pet54 no afecta los niveles de Mss51 o de Pet309	61
• 3.4 Pet54 interacciona genéticamente con Mss51	62
• 4. Pet54 es necesaria para activar eficientemente la traducción del mRNA de <i>COX1</i>	64
• 4.1 Pet54 migra en un complejo de alto peso molecular diferente a Mss51	64
• 4.2 Pet54 interacciona físicamente con Mss51	67
• 4.3 La mutante $\Delta pet54$ altera la migración de Mss51	71
• 4.4 Mss51 se encuentra mayoritariamente libre de los complejos COA en las mutantes $\Delta pet54/\Delta cox14$ y $\Delta pet54/Cox1(\Delta C15)$	74
• 5. La mutante $mss51^{F199I}$ recupera la síntesis de Cox1 en la mutante $\Delta pet54$	79
• 6. Pet54 interacciona físicamente con el mRNA de <i>COX1</i>	80
Discusión	82
Conclusiones	88
Perspectivas	89
Apéndice I: Artículo publicado	90
Apéndice II: Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas	103
Referencias	107

## Abreviaturas

APS	Sigla en inglés de “Amonium Persulfate”.
BN-PAGE	Gel de acrilamida azul nativo.
CcO	Citocromo c oxidasa.
Cox1	Subunidad 1 de la citocromo c oxidasa.
Cox1ΔC15	Subunidad 1 de la citocromo c oxidasa que carece de los últimos 15 aminoácidos del extremo carboxilo terminal.
COX1	mRNA mitocondrial que codifica para Cox1.
Cox2	Subunidad 2 de la citocromo c oxidasa.
COX2	mRNA mitocondrial que codifica para Cox2.
Cox3	Subunidad 3 de la citocromo c oxidasa.
COX3	mRNA mitocondrial que codifica para Cox3.
DEPC	Siglas en inglés de “Diethyl pyrocarbonate”.
EDTA	Siglas en inglés de “Ethylenediaminetetraacetic acid disodium”.
HEPES	siglas en inglés de “4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-sulfonic acid”.
ioTL	Traducción mitocondrial <i>in organello</i> (en mitocondrias aisladas).
ivTL	Traducción mitocondrial in vivo (en células completas).
mtDNA	DNA mitocondrial.
mRNA de COX1	RNA mensajero de COX1.
ORF	Siglas en inglés de “Open reading frame”.
PMSF	Siglas en inglés de “Phenylmethanesulfonyl fluoride”.

PVDF	Siglas en inglés de “Polyvinylidene fluoride”.
RRM	Siglas en inglés de “RNA recognition motif”.
SDS	Siglas en inglés de “Sodium dodecyl sulfate”.
SDS-PAGE	Gel de acrilamida desnaturalizante, con SDS.
TLCK	Siglas en inglés de “N $\alpha$ -Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride”.
UTR	Región no traducible.

## RESUMEN

La citocromo *c* oxidasa (CcO) es el último complejo de la cadena respiratoria mitocondrial. En el genoma mitocondrial de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se codifican 3 de las 12 subunidades de esta enzima, Cox1, Cox2 y Cox3. La síntesis de cada una depende de proteínas conocidas como activadores traduccionales que actúan en el extremo 5'-UTR de su mRNA blanco para activar la traducción. Pet54 es una proteína de la familia RRM (por las siglas en inglés "RNA Recognition Motif") que se sintetiza en el citosol y se importa a la mitocondria, donde lleva a cabo sus funciones. Originalmente Pet54 fue identificado como uno de los tres activadores traduccionales específicos del mRNA de COX3. Adicionalmente se encontró que Pet54 se necesitaba para procesar un intrón del gen mitocondrial COX1. En este trabajo describimos una tercera función de Pet54 en la regulación de la síntesis de Cox1 y que es independiente de su función en el procesamiento del intrón del transcrito de COX1.

Cox1 es la subunidad más grande de la CcO y es el centro de nucleación de la enzima durante su ensamblaje. Su síntesis está altamente regulada por varias proteínas entre las que se encuentra Mss51, Cox14 y Coa3. Estas proteínas forman parte de un intermediario de ensamblaje de alto peso molecular conocido como COA, donde también se encuentra Cox1 recién sintetizada. Estas chaperonas coordinan el ensamblaje de la CcO con la traducción del mRNA de COX1, de tal manera que cuando hay un defecto en el ensamblaje de la CcO la síntesis de Cox1 disminuye. En el laboratorio encontramos que esta regulación depende de señales en el extremo carboxilo terminal de la misma proteína Cox1. Cuando se elimina esta región de Cox1, la regulación de la síntesis de Cox1 se pierde, y la proteína se sintetiza a niveles normales aunque la CcO no se ensamble. Se ha observado que esta regulación se da en la gran mayoría de mutantes que bloquean el ensamblaje de la CcO, excepto para la mutante  $\Delta pet54$ . Esto sugería que Pet54 podía ser un regulador positivo de la síntesis de Cox1. Nuestro objetivo fue estudiar el mecanismo mediante el cual Pet54 regula la



síntesis de Cox1. A partir del comportamiento único de Pet54 se encontró que la disminución de la síntesis de Cox1 en mutantes  $\Delta pet54$  no sólo era independiente del extremo C-terminal de Cox1, sino también de Cox14 y Coa3, reguladores negativos de la síntesis de Cox1.

Mss51 es una chaperona con doble función, por un lado es activador traduccional del mRNA de *COX1* actuando en su extremo 5'-UTR, y formando un complejo de 180 kDa; por otro lado forma parte del complejo COA (de 250-450 kDa) al interactuar físicamente con Cox1. Se piensa que Mss51 es el factor principal que coordina la síntesis con el ensamblaje de Cox1. En este trabajo se encontró que existe una interacción genética entre Pet54 y Mss51, ya que la sobreexpresión de Mss51 llevó a un rescate parcial de la disminución de la síntesis de Cox1 provocada por la mutación  $\Delta pet54$ . Mediante ensayos de doble híbrido se observó una interacción física débil y/o transitoria entre Pet54 y Mss51. Mediante geles azules nativos identificamos que en ausencia de Pet54, Mss51 se encuentra separada del complejo COA, y se enriquece en el complejo de 180 kDa, involucrado en la activación traduccional del mRNA de *COX1*. Nuestros datos sugieren que aunque Mss51 se encuentra formando el complejo de activador traduccional, Mss51 no se encuentra activa.

Se concluye que Pet54 es un factor necesario para la correcta síntesis de Cox1, posiblemente promoviendo la función de Mss51 sobre la activación traduccional del mRNA de *COX1*.

Curiosamente, se observó que el efecto de Pet54 sobre la síntesis de Cox1 es observable sólo en presencia de la proteína Cox1. Esto sugiere que Mss51 contiene señales reguladoras en su secuencia que son modificadas al interactuar con Cox1 durante su ensamblaje. Pet54 podría participar en el reciclaje de Mss51 a un nivel estructural.

## ABSTRACT

Cytochrome c oxidase (CcO) is the last complex of the mitochondrial respiratory chain. Three, out of 12 subunits, named Cox1, Cox2 and Cox3, are coded by mitochondrial genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Synthesis of these three subunits depend on translational activators that act on the 5'-UTR of target mRNAs to activate translation. Pet54 is a RRM protein (RNA Recognition Motif) that is synthesized in the cytosol and imported into the mitochondria, where it carries out its functions. Pet54 originally was identified as one of three translational activators of COX3 mRNA. Additionally Pet54 is necessary to process an intron of COX1 mRNA. In this work we describe a third, novel Pet54 function on the regulation of Cox1 synthesis. This role is independent on its activity in processing the COX1 intron.

Cox1 is the largest subunit of CcO and is the enzyme's nucleation center during assembly. Its synthesis is highly regulated by various proteins, including Mss51, Cox14 and Coa3. These proteins form a high molecular weight complex known as COA complex, in which Cox1 is also present. These chaperones coordinate CcO assembly with COX1 mRNA translation. When there is a defect in CcO assembly, then Cox1 synthesis decreases. In our lab we found that this control signal is dependent on the carboxyl terminal region of Cox1. When this region of Cox1 is deleted, then Cox1 synthesis regulation is lost, and the protein is synthesized to normal levels, even when CcO is not assembled. The role that the Cox1 C-terminal end plays is conserved among the majority of mutants that block CcO assembly, except for  $\Delta pet54$  mutant. This was the only case in which synthesis of Cox1 was still decreased even if Cox1 lacked the C-terminal. This observation suggests that Pet54 may have a positive role on Cox1 synthesis. Our goal was to understand the mechanism by which Pet54 regulates Cox1 synthesis. The observed role of Pet54 was not only independent on the Cox1 C-terminal of Cox1 but also was independent on Coa3 and Cox14, the negative regulators Cox1 synthesis.

Mss51 has a dual function, it is translational activator of COX1 mRNA, acting on the 5'-UTR, and forming an 180 kDa complex; Mss51 is also part of the COA

complex (250-450 kDa) that physically interacts with Cox1. This is the central factor that coordinates Cox1 synthesis and assembly. In this work, a genetic interaction between Mss51 and Pet54 was observed, as the overexpression of *MSS51* led to a partial rescue of the reduced Cox1 synthesis caused by  $\Delta$ *pet54* mutation. Two-hybrid assays showed a weak and/or transient physical interaction between Pet54 and Mss51. By blue native gels we identified that in the absence of Pet54, Mss51 is enriched in the 180kDa complex involved in translational activation of *COX1* mRNA. However, Mss51 is not competent for translation.

It is concluded that Pet54 is necessary for efficient synthesis of Cox1, possibly by promoting the activation of Mss51 as translational activator of the *COX1* mRNA.

## **INTRODUCCIÓN.**

### **La levadura *S. cerevisiae* como modelo de estudio.**

*S. cerevisiae* se utiliza ampliamente como modelo de estudio de la dinámica y función mitocondrial. Gracias a su capacidad fermentadora, la levadura puede sobrevivir aun cuando la cadena respiratoria esté afectada. Esto permite manipular genes que afecten la producción de ATP en la levadura sin afectar la viabilidad del organismo. En este organismo se pueden utilizar herramientas muy poderosas de genética que permiten identificar factores asociados a la función mitocondrial con facilidad. Esto se debe a que *S. cerevisiae* posee una recombinación genética altamente eficiente que permite la manipulación fácil y rápidamente de genes nucleares. En 1996 se publicó la secuencia del genoma de *S. cerevisiae* (Goffeau A, 1996), y en 1998 se pudo secuenciar completamente su genoma mitocondrial (Foury F *et al*, 1998).

Actualmente se cuenta con las herramientas moleculares para manipular fácilmente tanto el genoma mitocondrial como el genoma nuclear de *S. cerevisiae* (Bonney N and Fox TD, 2002). Esto hace de este organismo uno de los modelos más utilizados para estudiar a la cadena respiratoria. Además, se sabe que muchos de los genes que tienen una función en la biogénesis mitocondrial en *S. cerevisiae*, tienen homólogos en humano (Soto IL *et al*, 2012, Szklarczyk R *et al*, 2012). Por ello, esta levadura es también un modelo muy importante para estudiar las bases moleculares de enfermedades mitocondriales humanas derivadas de mutaciones en genes conservados.

### **La mitocondria y su genoma.**

La mitocondria es el organelo en el que se encuentra la cadena transportadora de electrones compuesta por los complejos respiratorios (Figura 1). Éstos transportan electrones desde el NADH y el FADH<sub>2</sub> hasta al oxígeno. En *S. cerevisiae*, existen tres complejos respiratorios: el complejo II (succinato deshidrogenasa) que

transporta los electrones del succinato a la ubiquinona; el complejo III o complejo bc<sub>1</sub>, que oxida al ubiquinol y cede los electrones al citocromo *c*, transportando 4 protones al espacio intermembranal (EIM); y el complejo IV (citocromo *c* oxidasa) que oxida al citocromo *c* y reduce el oxígeno, transportando durante este proceso 2 protones por cada 2 electrones. El bombeo de protones al espacio intermembranal genera un gradiente electroquímico que es aprovechado por la ATP sintasa para producir ATP.

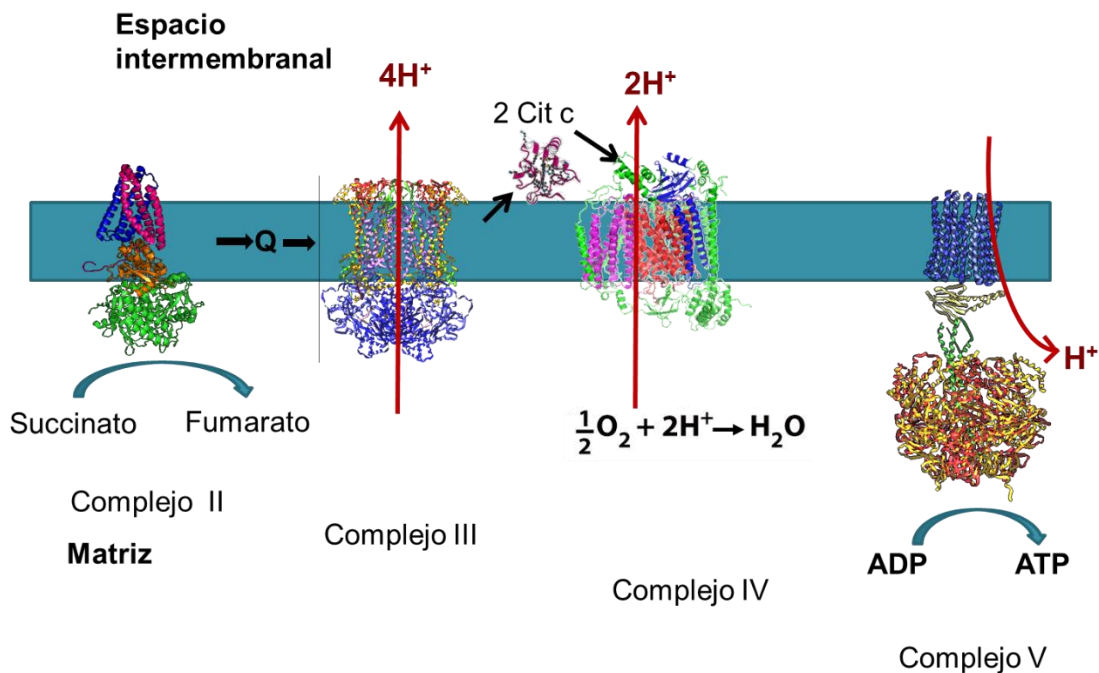


Figura. 1. Cadena respiratoria de *S. cerevisiae* en la membrana interna mitocondrial. Los cristales se obtuvieron de Protein Data Bank: Complejo II, 1ZOY (Sun F, *et al* 2005), Complejo III, 1NTM (Gao X, *et al* 2003), Complejo IV, 1OCC (Tsukihara, T *et al* 1996) y la ATP sintasa 2WPD (Giraud MF, *et al* 2012). Se esquematiza el flujo de electrones (flechas negras) y la translocación de los protones hacia el espacio intermembranal (flechas rojas).

La mitocondria contiene su propio material genético (mtDNA), localizado en la matriz mitocondrial. Este genoma es muy compacto (70-85 Kb) y en el caso de *S. cerevisiae*, codifica para sólo 8 proteínas, siete de las cuales son subunidades de los complejos de la cadena respiratoria: Cob, el citocromo *b* del complejo III; Cox1,

Cox2, Cox3, de la CcO; Atp6, Atp8 y Atp9 de la ATP sintasa. La proteína restante, Var1, forma parte de la subunidad chica del ribosoma. Éste genoma codifica además 24 tRNAs y los rRNA 15S y 21S que forman al ribosoma mitocondrial, así como un RNA 9S que forma parte de la RNAasa P (Foury F *et al*, 1998).

El genoma mitocondrial de levadura contiene intrones en los genes *COX1*, *COB* y rRNA 21S. El número de intrones varía entre cepas de laboratorio; incluso existen cepas de levadura que no contienen intrones en el mtDNA y la función respiratoria no se ve afectada (Séraphin B *et al*, 1987). Pueden encontrarse hasta siete intrones en *COX1*, cinco en *COB* y uno en el RNA 21S (Tzagoloff A *et al*, 1986). La mayoría de los intrones en *COX1* y *COB* son marcos de lectura abiertos (ORF) que se encuentran en fase con los exones que les preceden (Figura 2). Cinco intrones codifican para madurasas (*bi2*, *bi3*, y *bi4* de *COB*; *ai1* y *ai2* de *COX1*) que participan en el procesamiento de algunos intrones mitocondriales. Adicionalmente, cuatro intrones codifican para endonucleasas (*ai3*, *ai4*, y *ai5α* de *COX1* y  $\omega$  del rRNA 21S) y dos intrones codifican para transcriptasas reversas (*ai1* and *ai2* de *COX1*) (Lipinski A *et al*, 2010).

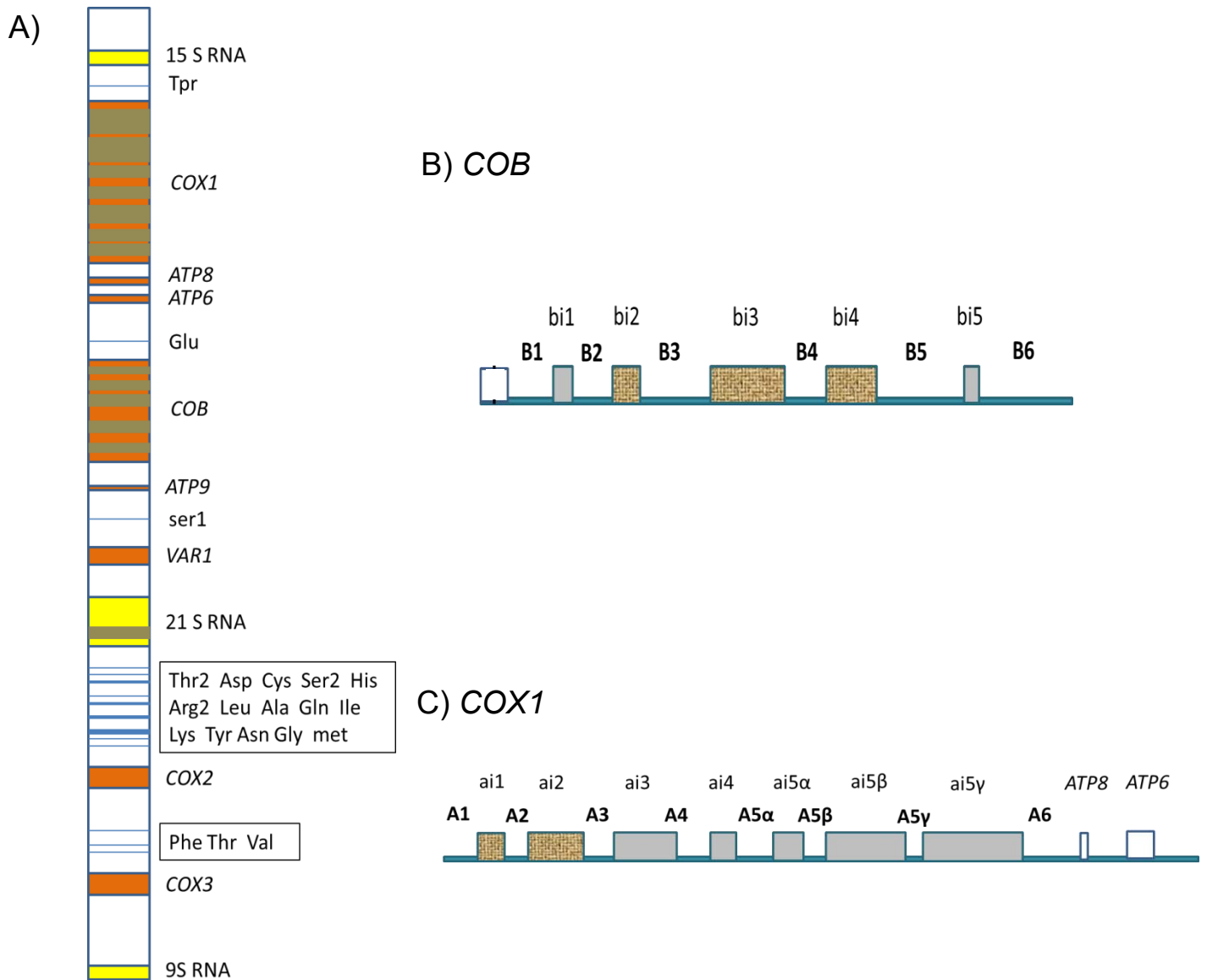


Figura 2. A) Genoma mitocondrial de *S. cerevisiae*. En naranja se muestran los exones y en verde los intrones. En amarillo se muestra los RNA ribosomales y en líneas azules los tRNAs (Thr2, Asp, Cys, Ser2, His, Arg2, Leu, Ala, Gln, Ile, Lys, Tyr, Asn, Gly, Met, Phe, Thr y Val). Diagrama del transcrito de *COB* (B) y de *COX1* (C). En letras negras se indican los exones. En café se muestran los intrones que codifican para madurasas, y en gris el resto de los intrones. Modificado de Dieckmann, CL and Staples, R. (1994)

La transcripción del genoma mitocondrial es catalizada por la RNA polimerasa mitocondrial (mtRNAP), conformada por la subunidad catalítica Rpo41p y el factor de transcripción Mtf1p (Costanzo MC and Fox TD, 1990). La mtRNAP produce trece transcritos primarios en forma de policistrones que incluyen varias combinaciones de rRNAs, tRNAs y mRNAs, y que generalmente contienen tRNAs en sus extremos, y funcionan como las principales señales de procesamiento (Schäfer B, 2005). Un ejemplo de un policistrón es el caso del transcrito de *COX1* (Figura 2C), el cual se transcribe junto con *ATP8* y *ATP6*. Este policistrón es procesado entre el cistrón *COX1* y *ATP8*, de esta manera liberando a *COX1* maduro (Lipinski *et al*, 2010).

### **Complejo IV mitocondrial o citocromo c oxidasa (CcO)**

El complejo IV mitocondrial es el último aceptor de electrones de la cadena respiratoria y lleva a cabo la reducción del oxígeno a agua (Figura 3). Esta reacción está acoplada al transporte de 4 protones hacia el espacio intermembranal por cada 4 electrones transferidos a la molécula de oxígeno. La CcO consta de 12 subunidades en levadura y 13 en mamíferos (Fontanesi F *et al*, 2006). Tres de estas subunidades, Cox1, Cox2 y Cox3, son altamente hidrofóbicas y se codifican en el DNA mitocondrial, mientras que el resto de las subunidades se importan a la mitocondria desde el citosol. En la estructura cristalina de bovino se aprecia que las subunidades Cox1, Cox2 y Cox3 forman el centro del complejo, el cual se encuentra rodeado por las diez subunidades adicionales (Tsukihara, T *et al* 1996).

El transporte de electrones en el complejo IV comienza con la oxidación del citocromo *c* por un centro binuclear de iones de cobre llamado  $Cu_A$  que se encuentra en el dominio intermembranal de Cox2. Posteriormente, el electrón es transferido al hemo *a* en Cox1 y finalmente transportado al centro hemo  $a_3:Cu_B$ , donde una molécula de oxígeno se reduce a 2 moléculas de agua (Khalimonchuk O *et al*, 2010).



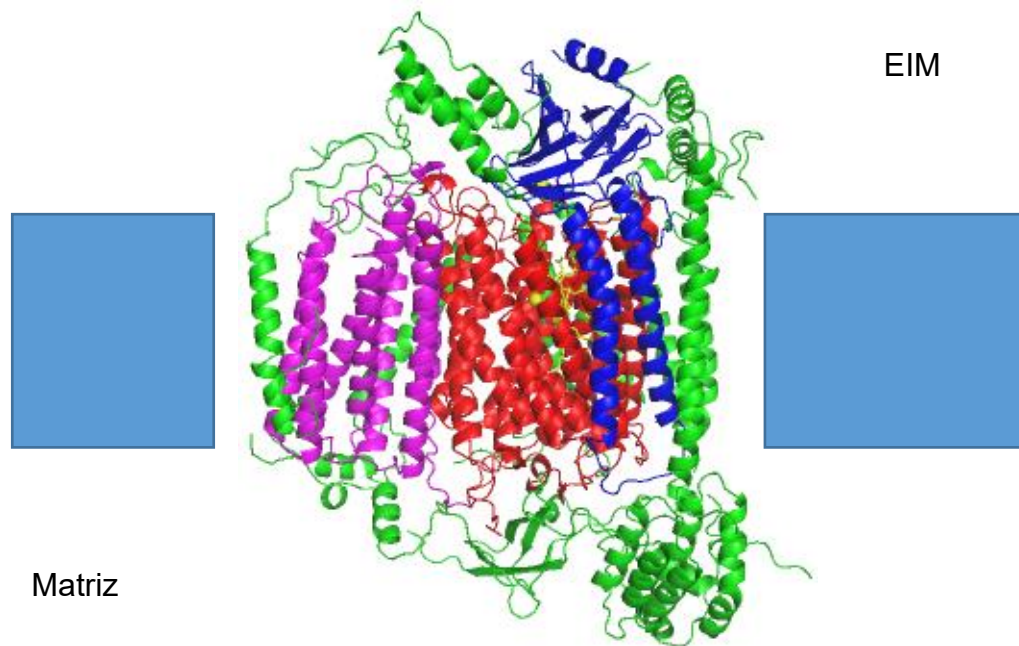


Figura 3. Modelo cristalográfico de un monómero de la CcO. Se muestran en verde las subunidades provenientes del citosol. Las subunidades codificadas en el genoma mitocondrial son Cox1 (en rojo), Cox2 (en azul), y Cox3 (en morado). En amarillo se muestra el centro hemo  $a_3$ :Cub. (Tsukihara, T *et al* 1996). EIM, espacio intermembranal.

El ensamblaje de la CcO es un proceso muy complejo debido al origen tanto nuclear como mitocondrial de sus subunidades (figura 4). Se han descrito al menos 30 factores que ayudan al ensamblaje de este complejo en levadura (Fontanesi F *et al*, 2008). Las subunidades no ensambladas son degradadas rápidamente, principalmente las subunidades que son codificadas en el mtDNA (Nakai T *et al*, 1994). Se propone que el ensamblaje de la CcO se lleva a cabo agregando módulos preensamblados cuyos núcleos se forman a partir de cada subunidad mitocondrial. De este modo, Cox1 forma un módulo, que se propone es al que se le agregan el resto de módulos y subunidades. Cox2 forma otro módulo

y Cox3 forma un tercer módulo. (Su CH, *et al*, 2014; Mcstay GP *et al*, 2013). El módulo de Cox1 se comienza a formar por la adición de las chaperonas Coa1, Cox14 y probablemente Coa3, que se asocian con Cox1 en un estadio conocido como D1. Posteriormente se ha propuesto que se agrega la chaperona Mss51 y la subunidad Cox5 para formar el subcomplejo D2. La adición de la subunidad Cox6 forma el estadio D3. A continuación se forma el subcomplejo D4 aunque no se sabe a ciencia cierta cuál es su composición. El último estadio es D5 que contiene a la chaperona Shy1 además de los componentes anteriores (McStay G, *et al* 2013). El módulo de Cox3 inicia con el subcomplejo C1 que está formado por Cox3-Cox4-Cox7-Cox13, posteriormente se forma el subcomplejo C2, al que se le adiciona Rfc1, y por último se forma un subcomplejo C3-C4 con una composición aún por determinar (Figura 4). La composición del módulo de Cox2 no se ha podido establecer, pero se especula que puedan estar presentes las subunidades Cox9 y Cox12 (Su CH, *et al*, 2014; Mcstay GP *et al*, 2013).

Se ha sugerido que la inserción de los grupos hemo a Cox1 se lleva a cabo antes de la adición de las subunidades Cox5 y Cox6, ya que en las mutantes COX10 y COX15, cuyos productos llevan a cabo la inserción de los grupos hemos a Cox1, no se observa la acumulación del intermediario Cox1-Cox5-Cox6 (Williams SL *et al* , 2004). Esto indica que los grupos hemo le confieren a Cox1 cierta conformación que le ayuda a asociarse con Cox5 y Cox6. Las mutantes de las chaperonas COX11, que produce la proteína encargada de la incorporación del Cu<sub>B</sub>, pueden acumular el intermediario Cox1-Cox5-Cox6, lo que apunta a que el Cu<sub>B</sub> se agrega posteriormente a este intermediario (Williams SL *et al*, 2004). La proteína Sco1 le confiere el Cu a Cox2 para formar el Cu<sub>A</sub>. Mutantes  $\Delta$ sco1 propician una fuerte inestabilidad de Cox2 por lo que el modulo de Cox2 no es formado adecuadamente (Rigvy K *et al*, 2008).

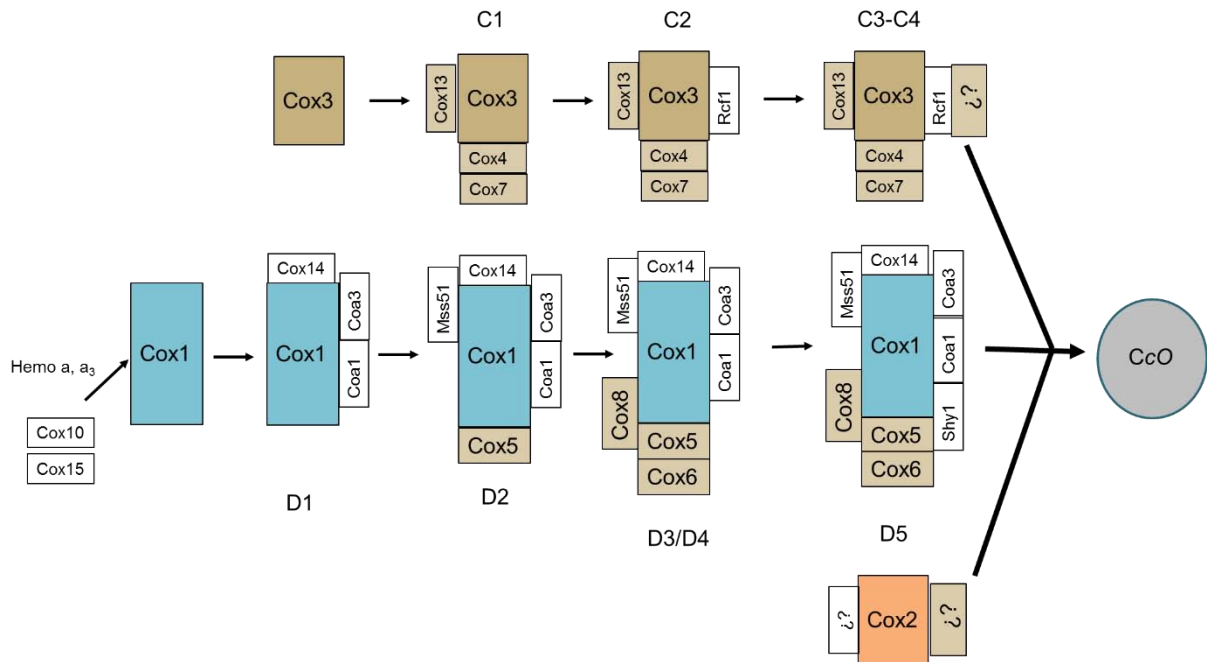


Figura 4. Modelo propuesto para el ensamblaje de la CcO. El ensamblaje de la CcO comienza con tres módulos, el de Cox1, el de Cox2 y el de Cox3. Se muestran los pasos sucesivos del ensamblaje de la CcO y la adición de los grupos hemo a, hemo a<sub>3</sub>. Basado en Su CH, 2014 y en Mcstay GP 2013. Las subunidades se muestran en color y las chaperonas en cuadros blancos.

### La subunidad Cox1 de la CcO

La subunidad I (Cox1) del complejo IV cuenta con doce cruces transmembranales, contiene dos grupos hemo *a* y un átomo de cobre, Cu<sub>B</sub>, que participan en la reducción del oxígeno a agua (Figura 5). En la levadura, el residuo His<sup>72</sup> en la segunda hélice y la His<sup>378</sup> en la hélice 10 coordinan al grupo hemo *a*, y la His<sup>376</sup> sirve de ligando al grupo hemo a<sub>3</sub> (Bestwick M *et al* 2010). El Cu<sub>B</sub> está unido a Cox1 mediante la His<sup>190</sup>. Los extremos carboxilo y amino terminal de Cox1 están expuestos hacia la matriz mitocondrial (Tsukihara T *et al*, 1996). Cox1 contiene las vías para translocar los protones hacia el espacio intermembranal (Tsukihara T *et al*, 1996) y es el centro de nucleación para el ensamblaje de la CcO (Mick DU *et*

*al*, 2012). Cox1 tiene 514 aminoácidos y forma el centro catalítico junto con las subunidades 2 y 3. En el modelo cristalográfico de bovino se observa que además de estas dos subunidades, en la CcO, Cox1 sólo entra en contacto con las subunidades de origen nuclear Cox8 y Cox5a, mientras que el resto de las subunidades rodean este subcomplejo Cox1-Cox5a-Cox8 (Tsukihara T *et al*, 1996).

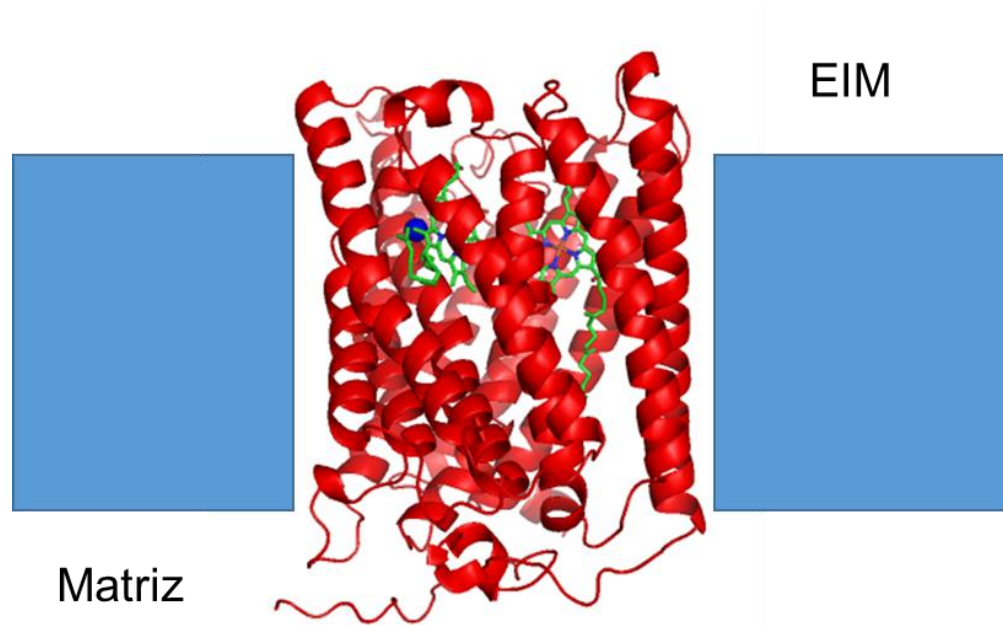


Figura 5. Modelo cristalográfico de Cox1 de bovino. En rojo se observan sus doce cruces transmembranales. En verde se muestran los grupos hemo a y hemo a<sub>3</sub>. En azul se indica el átomo de cobre. PDB 1OCC (Tsukihara T *et al*, 1996).

El ensamblaje de la CcO requiere de una regulación estricta para evitar la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) dañinas para las células. La mayor fuente de producción de ROS, principalmente como superóxido, es la cadena respiratoria a través de los complejos I, II y III. Los ROS son producidos cuando los electrones escapan de los grupos prostéticos de la cadena respiratoria y reaccionan directamente con el oxígeno (Dröse S and Brandt U, 2012). Se ha propuesto que el hemo a de Cox1 mal ensamblado podría tener

actividad de peroxidasa, y por lo tanto producir especies pro-oxidantes (Khalimonchuk O *et al*, 2007).

Cox1 es una de las subunidades cuya biogénesis es muy regulada. La cantidad y estequiometría de Cox1 se controla por dos medios principalmente: su degradación proteolítica, mediada por las proteasas mitocondriales AAA ATP-dependientes (Arnold I *et al*, 2002) y por metalopeptidasas como Oma1 (Käser M *et al*, 2003), y mediante el control de la síntesis de Cox1. Esta forma de regulación es la que nos interesa estudiar en este trabajo.

La síntesis de Cox1 se coordina con su inserción y su ensamblaje dentro de la membrana interna mitocondrial mediante un proceso muy complejo. Nuestro grupo y otros laboratorios han observado que la síntesis de Cox1 disminuye en mutantes que no ensamblan a la CcO (Poutre CG *et al* 1987; Calder KM *et al*, 1991; Shingú-Vázquez M *et al*, 2010). Algunos de los factores involucrados en esta regulación se describen a continuación:

1.- *Activación traduccional*: Mss51 y Pet309 llevan a cabo la activación traduccional del mRNA de COX1 actuando en el extremo 5'UTR del mRNA para promover la traducción. Mutantes nulas de estas dos proteínas no respiran debido a que Cox1 no se puede sintetizar (Manthey GM *et al*, 1995; Decoster E *et al*, 1990; Perez-Martinez X *et al*, 2009). Los mRNA mitocondriales no poseen una secuencia Shine-Dalgarno ni dependen de un mecanismo de scanning para posicionar al ribosoma mitocondrial en el AUG de inicio, como sucede en bacterias y en el citosol, respectivamente. Por ello se propone que los activadores traduccionales llevan a cabo esta función (Fox TD, 1996).

Pet309 es una proteína de origen nuclear que se asocia de manera periférica a la membrana interna, mirando hacia la matriz mitocondrial (Tavares-Carreón F *et al*, 2008). Cuenta con 965 aminoácidos y contiene en su secuencia motivos Pentatricopeptide Repeat (PPR por sus siglas en inglés). Sabemos que Pet309 actúa en el extremo 5'UTR del mRNA de COX1 (Manthey GM *et al*, 1995; Pérez-Martínez X *et al*, 2009) e interacciona físicamente con el extremo mRNA de COX1

(Zamudio-Ochoa *et al*, 2014). Además, se ha observado que Pet309 interacciona con el ribosoma mitocondrial a través del extremo amino terminal (Zamudio-Ochoa *et al*, manuscrito en preparación).

Mss51 es una proteína que se importa a la mitocondrial desde el citosol, consta de 436 aminoácidos y al igual que Pet309, se asocia periféricamente a la membrana interna mirando hacia la matriz mitocondrial (Siep *et al*, 2000). A diferencia de Pet309, Mss51 contiene al menos dos sitios de acción, uno en el extremo 5'UTR del mRNA de *COX1* y otro en la región codificante. Ambos sitios de acción son necesarios para la síntesis de Cox1, por lo que se ha sugerido que Mss51 tiene un papel de activador traduccional y como factor de elongación en la síntesis de Cox1 (Pérez-Martínez X *et al*, 2003; Pérez-Martínez X *et al*, 2009). Adicionalmente Mss51 interacciona físicamente con la proteína Cox1 recién sintetizada (Pérez-Martínez X *et al*, 2003) y una pequeña porción interacciona con el ribosoma (Zamudio-Ochoa *et al*, manuscrito en preparación). Hasta el momento no se ha demostrado la asociación de Mss51 con el mRNA de *COX1* (Zamudio-Ochoa *et al*, 2014).

2.- *Acoplamiento entre el ensamblaje de Cox1 recién sintetizada y su síntesis*: La proteína Cox1 recién sintetizada se asocia con varias chaperonas para formar complejos de alto peso molecular, conocidos como complejos COA. Se propone que estos complejos monitorean el estado de ensamblaje de la CcO dentro de la membrana (Soto I *et al*, 2012).

Además de su función como activador traduccional, Mss51 se asocia a Cox1 recién sintetizada, sirviéndole como chaperona (Pérez-Martínez X *et al*, 2003). Estas dos proteínas forman parte de los complejos COA que incluyen a Cox14, Coa3, Coa1 y Shy1. El tamaño de estos complejos en geles nativos va de 250-450 kDa (Mick DU *et al*, 2010) y en gradientes de sacarosa muestran una masa molecular de 450 kDa (Fontanesi F *et al*, 2009).

Cox14, considerado un regulador negativo de la síntesis de Cox1, interacciona con Mss51 y con Cox1 recién sintetizada y es indispensable para una unión estable de

estas dos últimas proteínas (Barrientos A *et al*, 2004; Pérez-Martínez X *et al*, 2009). Cox14 tiene un tamaño de 7.9 kDa, se encuentra embebida en la membrana interna mitocondrial (Glerum DM *et al*, 1995) y es indispensable para el crecimiento de la levadura en medios respiratorios. Las mutantes nulas de este gen sintetizan Cox1 normalmente, a pesar de que la CcO no se ensambla. Lo mismo se observa si se combina una mutante *cox14* con una interrupción de cualquier otro gen necesario para el ensamblaje de la CcO (Barrientos A *et al*, 2004). Se piensa que Cox14 es una chaperona que sigue el ensamblaje de la CcO hasta sus últimas etapas ya que se ha encontrado en supercomplejos (Mick DU *et al*, 2010).

Coa3, también se considera un regulador negativo de la síntesis de Cox1. Se encuentra embebida en la membrana interna mitocondrial. Se ha demostrado su interacción con el complejo que contiene a Cox1, Mss51, Cox14 y Shy1, y además con supercomplejos (Mick DU *et al*, 2010). Además, presenta el mismo fenotipo que la mutante  $\Delta$ *cox14*, es decir, restablece la síntesis de Cox1 en mutantes de ensamblaje de la CcO (Mick DU *et al*, 2010; Fontanesi F *et al*, 2011).

El modelo actual para explicar la regulación de la síntesis de Cox1 se describe a continuación (Figura 6) (revisado en Herrmann JM *et al*, 2012; Soto IC *et al*, 2012; Mick DU *et al*, 2012): 1) Mss51 y Pet309 activan la traducción del mRNA de COX1. Estas proteínas asisten al ribosoma mitocondrial a localizar el codón de inicio (Zambrano A *et al*, 2007; Zamudio-Ochoa A *et al*, 2014). 2) Mss51 además interacciona con Cox1 para formar parte de los complejos COA. El extremo carboxilo terminal de la proteína Cox1 es importante para mediar esta interacción (Shingú-Vázquez M *et al*, 2010). Dentro de estos complejos se encuentra también Cox14 y Coa3. De esta manera se forman complejos COA de alto peso molecular que involucran por lo menos a Mss51-Cox14-Coa3-Cox1. 3) Mss51 queda atrapado en este complejo hasta que Cox1 adquiera sus grupos prostéticos y se agregue el resto de subunidades de la CcO. Se propone que la asociación de Mss51 depende de la conformación del extremo C-terminal de Cox1, la cual podría ir cambiando conforme se ensambla la CcO (Shingú-Vázquez M *et al*, 2010;

García-Villegas *et al*, manuscrito en preparación). Se ha sugerido que la síntesis de Cox1 disminuye en mutantes que bloquean el ensamblaje de la CcO porque Mss51 queda atrapado en los complejos COA, lo que evita que pueda llevar a cabo su papel como activador traduccional. En este modelo Cox14 y Coa3 son los encargados de estabilizar la unión de Mss51 al complejo COA para “atraparlo” e impedir su función como activador traduccional. Es por esto que mutantes nulas  $\Delta\text{cox14}$  y  $\Delta\text{coa3}$  no regulan la síntesis de Cox1, de tal forma que la síntesis es normal aunque la CcO no se pueda ensamblar (Mick DU *et al*, 2010; Fontanesi F *et al*, 2011; Barrientos A *et al*, 2004).



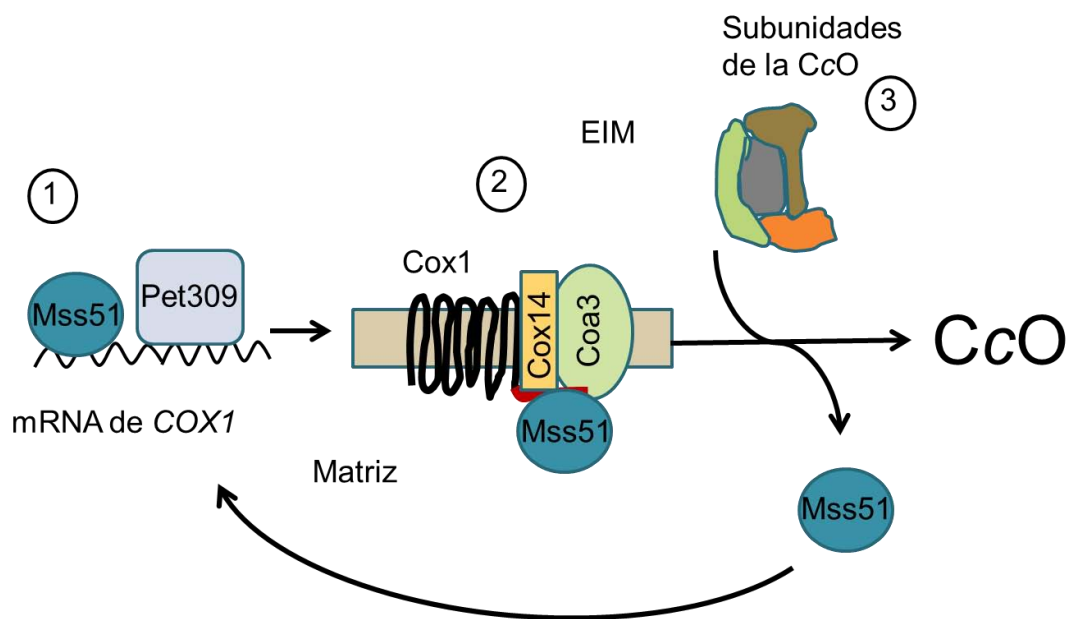


Figura 6. Modelo para la regulación de la síntesis de Cox1. El ciclo comienza con Mss51 y Pet309 activando la traducción del mRNA de COX1 (1). Posteriormente, Mss51 se asocia con Cox1 recién sintetizada y otras chaperonas de ensamblaje de la CcO para formar complejos COA (2). Conforme se agregan las subunidades de la CcO, Mss51 queda libre de este complejo y puede llevar a cabo un nuevo ciclo de traducción (3). El extremo C-terminal de Cox1 (rojo) podría monitorear el estado de ensamblaje de Cox1 y permitir la liberación de Mss51 del complejo COA. EIM, espacio intermembranal.

Otro factor importante para la regulación de la síntesis de Cox1 es su propio extremo carboxilo terminal. Es la parte más soluble de la proteína y mira hacia la matriz mitocondrial. Se ha observado que es importante para estabilizar la interacción entre Mss51 y Cox14. En mutantes de ensamblaje en las que Cox1 carece de los últimos 15 amino ácidos del extremo carboxilo terminal (Cox1 $\Delta$ C15), la síntesis de Cox1 es muy similar a lo observado en una cepa silvestre (Shingú-Vázquez *et al*, 2010), indicando que la regulación se ha perdido. Este efecto es

muy similar al observado para una mutante  $\Delta\text{cox14}$  o  $\Delta\text{coa3}$ . Por lo anterior, se propuso que Mss51 interacciona con Cox14 a través del extremo carboxilo terminal de Cox1. Conforme se agregan las subunidades de la CcO, este extremo carboxilo terminal cambia de conformación y Mss51 pierde su interacción con el complejo COA, pudiendo así llevar a cabo un nuevo ciclo de traducción del mRNA de COX1.

### **La proteína Pet54**

Pet54 es una proteína de origen nuclear, cuenta con 293 aminoácidos y es importada a la mitocondria aunque no se ha identificado una presecuencia que la dirija al organelo. Se asocia de forma periférica a la membrana interna mitocondrial y se localiza hacia la matriz mitocondrial (McMullin TW and Fox TD, 1993). Contiene en su secuencia un dominio RRM (RNA recognition motif). Este es el dominio más abundante en proteínas que unen RNA y consta de aproximadamente 90 aminoácidos. Se han descrito dos regiones conservadas en este dominio necesarias para la unión de RNA: la región RNP1, en que participan principalmente tres aminoácidos aromáticos, y la región RNAP2 (Maris C *et al*, 2005). Su estructura característica es de tipo  $\beta_1\alpha_1\beta_2\beta_3\alpha_2\beta_4$  (Figura 7). Donde las cuatro laminas  $\beta$  sirven de superficie de unión de dos a 8 nucleótidos de RNA (Cléry A *et al*, 2008). Además de su función en la interacción con RNA se ha observado que los dominios RRM sirven de unión a proteínas y otros dominios. Incluso se ha demostrado que algunos dominios RRM no unen RNA sino que su única función es unirse a otras proteínas (Fribourg S *et al*, 2003). La conformación de este motivo tiene una amplia diversidad para unir secuencias de RNA por lo que no se ha encontrado una secuencia conservada de unión de RNA (Cléry A *et al*, 2008).

Pet54 interacciona físicamente con Pet122 y Pet494 para llevar a cabo la activación traduccional del mRNA mitocondrial COX3 (Brown NG *et al*, 1994), que codifica para la subunidad 3 de la CcO. En mutantes nulas de cualquiera de estos



intrón ai5 $\beta$  mediante 66 nucleótidos que incluyen 3 nucleótidos del exón en su extremo 3'. La similitud entre estas dos secuencias es significativa ya que son extremadamente ricas en los nucleótidos AU (Kaspar B *et al*, 2008).

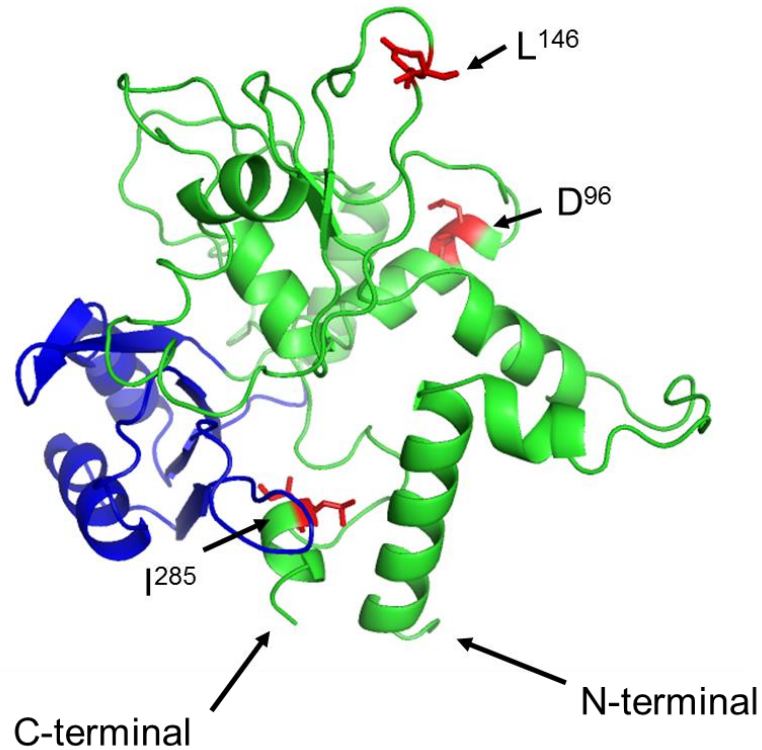


Fig. 8. Modelo de Pet54 de acuerdo al software I-TASSER (Zhang Y *et al*, 2008). En azul se muestra el dominio RRM, en rojo se muestran los aminoácidos en los que se realizaron inserciones y que afectan la expresión de COX1.

En este trabajo descubrimos que Pet54 tiene una tercera función regulando la síntesis de Cox1. Esta función es independiente de la presencia de intrones del transcrito de COX1. Si bien Pet54 no es absolutamente indispensable para sintetizar a Cox1, sí es necesaria para obtener niveles óptimos de su síntesis. En este trabajo describimos cómo se descubrió esta tercera función, qué características posee y discutimos su posible mecanismo de acción

## JUSTIFICACIÓN

Como se mencionó, el ensamblaje de la CcO es un proceso complejo dado el origen tanto nuclear como mitocondrial de sus subunidades. Su ensamblaje involucra varias etapas, así como diversas chaperonas que participan en estas etapas. Se ha observado que la síntesis de la subunidad Cox1 es altamente regulada (Mick DU *et al*, 2010), de tal manera que cuando existe un defecto en el ensamblaje de la CcO la síntesis de Cox1 disminuye, evitando que se formen intermediarios mal ensamblados. Sin embargo, cuando a Cox1 se le elimina el extremo carboxilo terminal o cuando los reguladores negativos de la síntesis de Cox1, Cox14 y Coa3, son eliminados, los niveles de Cox1 se restablecen, incluso cuando CcO no se puede ensamblar porque falta una subunidad o una chaperona (Barrientos A *et al*, 2004; Mick DU *et al* 2010; Shingú-Vázquez *et al*, 2010).

En el laboratorio nos encontrábamos estudiando si el papel regulador del extremo carboxilo terminal de Cox1 se conservaba en presencia de diferentes mutaciones que afectaban el ensamblaje de la CcO. Para ello se generaron mutaciones en que se eliminaban diversas subunidades de la enzima, así como chaperonas de ensamblaje que participan en diferentes etapas (Shingú-Vázquez *et al*, 2010). En todos los casos se encontró que, como era de esperarse, si la CcO no se ensamblaba entonces la síntesis de Cox1 disminuía. Cuando además se eliminaba el extremo C-terminal de Cox1 (Cox1 $\Delta$ C15), la síntesis de Cox1 se recuperaba, aunque la CcO no se ensamblara (Shingú-Vázquez M *et al.*, 2010). Lo anterior indica que el extremo C-terminal de Cox1 regula su propia síntesis en todas las mutantes del ensamblaje de la CcO. Sin embargo, llamó nuestra atención que la única mutante que se comportó diferente era la mutante  $\Delta$ pet54. En este caso la síntesis de Cox1 $\Delta$ C15 no se recuperó. Este efecto es específico para Pet54, y no se debe a la ausencia de Cox3 ya que al estudiar la mutante  $\Delta$ pet122 (otro activador traduccional de COX3), la síntesis de Cox1 $\Delta$ C15 se recuperó a niveles normales como se observa para la mayor parte de las mutantes. Este comportamiento es independiente de la presencia de los intrones de COX1. Todo esto indica que aparte de la función de Pet54 como activador

traduccional del mRNA de COX3, como factor de splicing del intrón al5 $\beta$  de COX1, esta proteína posee una tercera función, en este caso regulando la síntesis de Cox1 (Shingú-Vázquez M *et al.*, 2010).

El objetivo de este trabajo es estudiar cuál es el mecanismo por el cual Pet54 llevaría a cabo esta nueva función reguladora.

## **HIPÓTESIS**

Dado que en la mutante  $\Delta pet54$  los niveles de síntesis de Cox1 disminuyen y no se restablecen en las cepas con Cox1 $\Delta C15$ , entonces Pet54 debe tener una nueva función en la síntesis de Cox1, posiblemente como un regulador positivo.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Estudiar el mecanismo por el cual Pet54 regula la síntesis de Cox1.

### **Objetivos particulares**

1. Llevar a cabo una caracterización del efecto de Pet54 sobre la síntesis de Cox1:

- Estudiar si la disminución de la síntesis de Cox1 se debe específicamente a la ausencia de Pet54 o este efecto es debido a una ausencia de Cox3.

- Demostrar si la disminución en la cantidad de Cox1 observada en las mutantes  $\Delta pet54$  se debe a una disminución en su síntesis o a un aumento en su degradación.

- Analizar si la regulación de Pet54 depende de las chaperonas Cox14 y Coa3.

2. Estudiar si el papel de Pet54 es a nivel de la activación traduccional de Cox1:

- Estudiar si el efecto de la mutante  $\Delta pet54$  se localiza en los extremos UTR's del mRNA de COX1.
- Explorar si la estabilidad de los activadores traduccionales del mRNA de COX1, Pet309 y Mss51 se ve afectada en la mutante  $\Delta pet54$ .

3. Estudiar si Pet54 actúa sobre el complejo COA de alto peso molecular.

- Estudiar si Pet54 interacciona con Mss51 o con Cox1.
- Estudiar si Pet54 comigra con los complejos COA de alto peso molecular de Mss51.
- Estudiar si la migración de Mss51 en los complejos de alto peso molecular cambia en la mutante  $\Delta pet54$ .

## **MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas.**

Éstas se encuentran descritas en el apéndice I.

### **Medios de cultivo.**

#### **YPD (1 litro):**

Extracto de levadura	10 g
Peptona	20 g
Dextrosa	20 g
Adenina	0.03 g

Para medio sólido agregar 20 g de agar. Esterilizar en autoclave.

#### **YPGal (1 litro):**

Extracto de levadura	10 g
Peptona	20 g
Galactosa	20 g
Adenina	0.03 g

Para medio sólido agregar 20 g de agar. Esterilizar en autoclave.

#### **YPEG (1 litro):**

Extracto de levadura	10 g
----------------------	------



Peptona	20 g
Glicerol	30 ml
Etanol	30 ml

(Adicionar después de esterilizar y cuando el medio este a 50 °C)

Adenina	0.03 g
Agar	20 g

Esterilizar en autoclave.

**Medio mínimo Gal/-Met (1 litro):**

Base nitrogenada sin aminoácidos	6.7 g
Dextrosa o galactosa	20 g
Mezcla de suplementos	
Medio -Met	0.75 g

Para medio sólido agregar 20 g de agar. Esterilizar en autoclave.

**Generación de mutantes nucleares (Amberg D et al, 2005).**

Las mutantes nucleares en las que se eliminó un gen que codifica para una proteína se obtuvieron reemplazando el gen en el *locus* original con casetes de resistencia a kanamicina (*KANMX4*) o de marcadores de auxotrofia (*LEU2* o *URA3*). El gen de eliminación (*KanMX4*, *LEU2* o *URA3*) se amplificó por PCR a partir de DNA total de levadura, en el cual el gen ya se encontraba sustituido, utilizando un juego de oligonucleótidos específicos para cada gen ubicados aproximadamente 300 nucleótidos río arriba del codón de inicio o 300 nucleótidos río abajo del codón de paro. Los productos de PCR se separaron en un gel de

agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y se purificaron siguiendo las instrucciones del sistema comercial de QIAGEN. Las células se transformaron con estos productos de PCR y las deleciones se integraron al cromosoma mediante recombinación homóloga.

### **Transformación de las levaduras (Burke Dan, 2000).**

- Se cultivaron dos o tres colonias de levadura en 2 ml de medio YPD toda la noche a 30°C en agitación.
- A la mañana siguiente se adicionaron 2 ml más de medio YPD e incubaron 2 horas más a 30°C en agitación.
- Se centrifugaron 600 µl de los cultivos a transformar por 1 min a 13200 g a temperatura ambiente. Se eliminó completamente el sobrenadante.
- Se resuspendió el botón celular en 52.5 µl de amortiguador de transformación.
- Se adicionó el DNA (desde 100 ng a varios µg).

- Estrategia para las transformaciones en donde el DNA debe integrarse al genoma (productos de PCR):

- Cada muestra de botón celular con amortiguador de transformación se incubó 30 min a 30°C, posteriormente se calentó 15 min a 42°C.
- Se agitó ligeramente cada 10 min.
- Se adicionó 1 ml de medio YPD y se incubó 2 horas a 30°C.
- Se centrifugó 1 min a 13200 g, a temperatura ambiente. Se eliminaron 900 µl del medio YPD.

- Estrategia para las transformaciones por medio de plásmidos:

- Cada muestra de botón celular con amortiguador de transformación se incubó 30 min a 42°C agitando ligeramente en vórtex cada 10 min.
- Se plaqueó la mezcla en el medio sólido de selección necesario.

**Amortiguador de transformación** (para una transformación):

PEG 3350 50%	40 µl
DTT 1M	5 µl
Acetato de litio 2M	5 µl
DNA de esperma de salmón 10 mg/ml	2.5 µl

(Antes de usar hervir 10 minutos y mantener en hielo)

**Purificación de DNA total de las levaduras** (Burke Dan, 2000).

- Se cultivaron dos o tres colonias de levadura en 2 ml de medio YPD toda la noche a 30 °C.
- Los cultivos se centrifugaron 1 min a 13200 g a temperatura ambiente.
- Las células se lavaron con 500 µl de agua y se recuperaron por medio de centrifugación, como en el paso anterior.
- El botón celular se resuspendió en 200 µl de amortiguador de lisis.
- Se adicionaron 200 µl de una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1).
- Se agitó en el vórtex por 3 min a velocidad máxima a temperatura ambiente.
- La mezcla se centrifugó 5 min a 13200 g, a temperatura ambiente.

- Se separó la fase acuosa (fase superior) y se colocó en un tubo nuevo. Se precipitó adicionando 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3M pH 5.3 y 3 volúmenes de etanol al 100%. Se incubó 10 minutos a -20°C.
- La mezcla anterior se centrifugó 10 min a 13200 g a 4 °C.
- El botón de DNA se lavó con 1 ml de etanol al 70% previamente enfriado a -20°C.
- Se centrifugó 1 min a 13200 ga 4°C. Se dejó secar la muestra al aire.
- Se resuspendió en 50 µl de agua estéril.

**Amortiguador de lisis (20 ml):**

Tritón X-100	400 µl
SDS 20%	1 ml
NaCl 5 M	400 µl
Tris-HCL 2 M pH 8.0	100 µl
EDTA-Na 0.5 M pH 8.0	40 µl
Agua	18.06 ml

**Purificación de mitocondrias**, modificado de (Glick BS and Pon LA, 1995).

- Se cultivaron dos o tres colonias de levadura en 2 ml de medio YPGal toda la noche a 30°C.
- Se sembraron en 25 ml de medio YPGal e incubaron a 30°C toda la noche (dos noches para cepas que no respiran).

- Del cultivo anterior se resembraron 15 ml en 500 ml de medio YPGal, y se incubó toda la noche a 30°C hasta una absorbancia a 600nm entre 1.4 y 1.6.
- Se centrifugó a 2831 g por 10 min a temperatura ambiente.
- El botón de cada tubo se lavó una vez con agua fría y se juntaron todos en un tubo de centrifuga previamente pesado.
- Se centrifugaron a 2831 g por 10 min a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se pesó.
- Se resuspendió el botón en amortiguador TD (2 ml/g de peso húmedo).
- Se agitó 10 min a 30°C.
- Se centrifugó 5 min a 1927 g a temperatura ambiente.
- Se lavó el botón con amortiguador MP2 (7 ml/g de peso húmedo).
- Se centrifugó 5 min a 1927 g.
- Se resuspendió el botón en amortiguador MP2 (7 ml/g de peso), y se adicionó zimoliasa (3 mg/g de 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:

En tubos de vidrio se compararon 2 ml de agua contra 2 ml de sorbitol 1.2 M en donde se agregaron 50 µl de células, posteriormente se agitaron en vórtex. Cuando se formaron los esferoplastos el tubo con agua se observó claro comparado con el tubo con sorbitol que se observó turbio.

A partir de este punto todo se hizo a 4°C y sin usar vórtex.

- Se centrifugó a 1106 g por 5 min a 4°C.

- Se resuspendió en 1/4 del volumen requerido de amortiguador de homogenización (70 ml por cada cepa).
- Se homogenizó 10 veces usando un homogenizador y pistilo de vidrio.
- Se centrifugó 5 min a 1106 g a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se repitió la centrifugación.
- El sobrenadante se centrifugó 12 min a 17418 g a 4°C (en el botón se encuentran las mitocondrias crudas).
- Se resuspendió el botón en 10 ml de amortiguador SEH (primero se resuspendió en 2 ml, con la punta de la micropipeta cortada).
- Se centrifugó 5 min a 1106 g a 4°C. Se recuperó el sobrenadante.
- Se centrifugó el sobrenadante a 12 min a 17418 g a 4°C.
- Se resuspendió el botón en 300-500 µl de amortiguador SEH (con la punta de la micropipeta cortada).
- Se hicieron alícuotas de 25 o 30 µl de solución de mitocondrias, se congelaron en nitrógeno líquido y guardaron a -70°C hasta su uso.

**Amortiguador TD (Tris-DTT):**

Tris-SO <sub>4</sub> pH 9.4	0.1 M
DTT	10 mM

**Amortiguador MP2:**

Sorbitol	1.2 M
Amortiguador de fosfatos (pH 7.4)	20 mM

Zimoliasa-20T 3 mg/g

(Seikagaku Biobusiness Cat. No. 120491)

**Amortiguador de homogeneización:**

Sorbitol	0.6 M
Tris pH 7.4	10 mM
EDTA	1 mM
Albúmina sérica bovina (libre de ácidos grasos)	0.2%
PMSF (preparar al momento en etanol)	1 mM
TLCK	50 µg/ml

**Amortiguador SEH**

HEPES pH 7.4	20 mM
Sorbitol	0.6 M
EDTA	1 mM

**Cuantificación de proteínas por el método de Lowry modificado** (Markwell MA *et al*, 1978).

Elaboración de la curva de calibración:

Se usó una solución de albúmina de 1 mg/ml.

Se prepararon soluciones de albúmina con 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 µg. Se llevó a 1 ml con agua.

- Se adicionaron 3 ml de solución C y se mezclaron en vórtex. Se incubaron 10 min a temperatura ambiente.
- Se adicionaron 300 µl de la solución D, se mezclaron en vórtex y se incubaron por 30 min a temperatura ambiente.
- Se determinó la absorbancia a 740 nm.

#### **Solución A:**

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	3% (p/v)
NaOH	0.4% (p/v)
Na <sub>2</sub> -tartrato	0.16% (p/v)
SDS	1% (p/v)

#### **Solución B:**

Cu <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	4% (p/v)
--	----------

#### **Solución C:**

Se mezclaron 100 volúmenes de solución A con 1 volumen de solución B (preparar al momento).

#### **Solución D**

Se mezcló 1 volumen de reactivo de Folin con 1 volumen de agua (preparar al momento)

**Traducción in *organello* (ioTL) y co-inmunoprecipitación (CoIP) a partir de mitocondrias puras** (Herrmann *et al*, 2001; Westermann *et al*, 2001).

- Se preparó 1 ml de amortiguador 1.5X ioTL con 0.2% (v/v) de piruvato cinasa.



- Se descongelaron en hielo 250 µg de proteína mitocondrial y se ajustó a un volumen de 25 µl con amortiguador SH en un tubo Eppendorf de 1.5ml.
- Se mezclaron 55 µl de amortiguador 1.5X ioTL con 25 µl de mitocondrias (10µg/µl).
- Se incubó 5 min a 30°C.
- Se adicionaron 25 µCi de [<sup>35</sup>S]-Met (Perkin Elmer)
- Se incubó 20 min a 30°C.
- Se tomaron 4 µl de cada reacción y se pasaron a otro tubo (esta fue la fracción total, que representaba el 5% de la reacción de inmunoprecipitación). Se agregó 1 ml de amortiguador SH y se centrifugó 10 min a 13200 g a 4°C. Se resuspendió en 20 µl de amortiguador de Laemmli 1X y se guardó en hielo.
- Al resto de la reacción de traducción se le agregó 1 ml de SH y se centrifugó 10 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante.
- Las mitocondrias se resuspendieron en 1 ml de amortiguador de lisis con la punta de la micropipeta cortada. Se incubaron 10 min en hielo (NO agitar en vórtex).
- Se centrifugó a 13200 g por 10 min a 4 °C. Se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo etiquetado.
- A cada sobrenadante se adicionaron 40 µl de anticuerpo acoplado a proteína A sefárosa.
- Se agitó en un agitador circular (Barnstead Internacional, Model 400110) durante 2 horas a 4°C.
- Se lavó dos veces con 500 µl de amortiguador de lisis.
- Se lavó 1 vez con 1 ml de Tris 20 mM, pH 7.4.

NOTA: Entre cada lavado se agitó 5 min en agitador circular a 4°C y se centrifugó 1 min a 600 g a 4°C.

- Después del último lavado se centrifugó 1 min a 13200 g a 4 °C, se eliminó completamente el sobrenadante.
- Se agregaron 20 µl de amortiguador de Laemmli 1X, y se agitó en vórtex por 15 min a temperatura ambiente.
- Se centrifugó por 15 s a 13200 g. El sobrenadante se cargó con microjeringa en un gel de SDS-acrilamida/Bis-acrilamida al 16%/0.15%. Se corrió el gel a 27 mA hasta que el frente alcanzó 7 cm de la interfase formada por los geles.
- Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF durante 1.5 h a 1.5 mA/cm<sup>2</sup>. Se dejó secar la membrana y se expuso para obtener una autoradiografía. Posteriormente se realizó western blot.

**Amortiguador 1.5X para traducción (1.5X ioTL) con 0.2% (v/v) de piruvato cinasa &.**

<b>Amortiguador</b>	<b>Solución concentrada</b>	<b>Adicionar para 1ml</b>
Sorbitol	2.4 M	375 µl
KCl	1 M	225 µl
Amortiguador de fosfatos, pH 7.2	1 M	22.5 µl
Tris-HCl, pH 7.4	1 M	30 µl
MgSO <sub>4</sub>	1 M	19 µl
Albúmina	100 mg/ml	45 µl
ATP	200 mM <sup>£</sup>	30 µl
GTP	50 mM <sup>£</sup>	15 µl
Aminoácidos (sin Met, Tyr y Cys)	2 mg/ml	9.1 µl
Cisteína	10 mM	10 µl
Tirosina	1 mg/ml	18.2 µl

Ácido $\alpha$ -ceto glutárico <sup>+</sup>		1.7 mg
Fosfoenol piruvato <sup>+</sup>		3.5 mg

Notas:

& Preparar en hielo. Adicionar 2  $\mu$ l justo antes de mezclar con las mitocondrias.

£ Adicionar al final.

+ Pesar el ácido  $\alpha$ -ceto glutárico y disolver en 200  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O, adicionar al fosfoenol piruvato y disolver. Adicionar a la mezcla para tener un volumen final de 1 ml.

#### **Amortiguador SH:**

Sorbitol	0.6 M
HEPES, pH 7.4	20 mM

#### **Amortiguador de lisis:**

Digitonina	1%
NaCl	100 mM
Tris-HCl, pH 7.4	20 mM

#### **Amortiguador de Laemmli 2X:**

Tris-HCl, pH 6.8	0.06 M
Glicerol	5%
SDS	2%
$\beta$ -Mercaptoetanol	4%
Azul de bromofenol	0.0025%

**Traducción *in vivo* (ivTL) a partir de células completas** (Bonney et al., 2001).

- Se cultivó una colonia en 2 ml de YPGal a 30°C toda la noche.
- Se inoculó 0.1 ml del cultivo anterior en 10 ml de YPGal, se incubó a 30°C toda la noche.
- A la mañana siguiente se adicionaron 10 ml de YPGal y se incubaron por 3 horas a 30°C.
- Se centrifugó en tubos con tapa de rosca previamente pesados a 3000 g por 5 min a temperatura ambiente.
- Se lavó dos veces con 1 ml de agua estéril. En el último lavado se pesaron los tubos y se eliminó la cantidad de agua/células necesaria para tener 0.12 g de células en todos los tubos.
- Se resuspendió en 500 µl con medio Gal-/Met. Se incubó 30 min a 30°C con agitación.
- Se adicionaron 5 µl de cicloheximida (10 mg/ml, disuelta en etanol). Se incubó 5 min a 30°C con agitación.
- Se adicionaron 5 µCi de [S<sup>35</sup>]-Met. Se incubó 10 min a 30°C con agitación.
- Inmediatamente se enfriaron las muestras en hielo/agua por 5 min.
- Se centrifugó a velocidad máxima a 4°C por 1 min en una centrífuga Eppendorf 5415D.
- Se eliminó el sobrenadante.
- Se lavó una vez con 500 µl de Gal-/Met con 2.5 mM de metionina no radioactiva.
- Se centrifugó a velocidad máxima a 4°C por 1 min en una centrífuga Eppendorf 5415D. Se eliminó el sobrenadante.

- Se lavó el botón con 200  $\mu$ l de SHP frío, con inhibidor de proteasas de SIGMA (3.3  $\mu$ l/10ml).
- Se resuspendió el botón en 200  $\mu$ l de SHP frío, con inhibidor de proteasas de SIGMA (3.3  $\mu$ l/10ml).
- Se adicionó un volumen de perlas de vidrio, previamente enfriadas a -20 °C.
- Se agitó en vórtex 30 s a velocidad máxima e incubó 30 s en hielo.
- Se repitió el paso anterior.
- Se centrifugó a 600 g por 5 min a 4 °C.
- Se tomó el sobrenadante y se colocó en hielo en un tubo Eppendorf etiquetado.
- Se adicionaron 200  $\mu$ l de SHP frío. Se repitió el ciclo vórtex/hielo dos veces.
- Se combinaron los sobrenadantes y se centrifugaron a velocidad máxima por 10 min a 4 °C en una centrífuga Eppendorf 5415D.
- Se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 40  $\mu$ l del amortiguador de Laemmli 1X. Se calentaron a 65°C por 5 min.
- Se cargaron 10  $\mu$ l en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 16%/0.15%, mientras que el resto se guardó a -70°C. Se corrieron las muestras a 27 mA hasta que el frente recorrió 7 cm de la interfase formada por los geles.
- Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF durante 1.5 h a 1.5 mA/cm<sup>2</sup> empleando un sistema semiseco en cámara FisherBiotech. La membrana se dejó secar y se expuso para una autorradiografía.

#### **Amortiguador SHP:**

Sorbitol	0.6 M
HEPES, pH 7.4	20 mM

Inhibidor de proteasas de SIGMA 3.3 µl por cada 10 ml

### **Gel de poliacrilamida para electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)**

A continuación se indica la composición del gel separador y concentrador.

	<b>Gel separador 16 %</b>	<b>Gel apilador 4 %</b>
<b>Acrilamida 30%</b>	9.0 ml	0.83 ml
<b>Bisacrilamida 0.8%</b>		
<b>Tris-HCl 2 M, pH 8.8</b>	3.28 ml	-
<b>Tris-HCl 2 M, pH 6.8</b>	-	150 µl
<b>SDS 20 %</b>	85 µl	50 µl
<b>Agua</b>	4.5 ml	4 ml
<b>APS 10%</b>	100 µl	25 µl
<b>TEMED</b>	20 µl	10 µl

#### **Amortiguador de corrida 5X:**

Tris-HCl, pH 8.2 0.125 M

Glicina 0.96 M

SDS 0.5%

Correr a 7 cm de la interfase formada por los geles a 27 mA constantes con amortiguador de corrida 1X.

#### **Solución para la transferencia de proteínas**

80 ml de solución de corrida para electroforesis en condiciones desnaturizantes

20 ml de metanol

### **Replica en Western Blot.**

- Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore) mediante un método semi-seco, de la siguiente manera:

3 hojas de papel filtro humedecidas en amortiguador de transferencia.

Gel humedecido en amortiguador de transferencia.

Membrana de PVDF humedecida en metanol y amortiguador de transferencia.

3 hojas de papel filtro humedecidas en amortiguador de transferencia.

Transferir de 1 a 2 horas a  $1.5 \text{ mA/cm}^2$ , cuidando que no pase de 10 V.

- La membrana con las proteínas se bloqueó toda la noche a  $4^\circ\text{C}$  o 2 h a temperatura ambiente con solución de bloqueo.

- Se incubó la membrana con solución de réplica, la cual contiene el anticuerpo adecuado, durante 1 h a temperatura ambiente.
- Se lavó la membrana con solución de lavado por 10 min, se repitió el lavado 2 veces más.

- Se reveló la presencia del anticuerpo unido a la proteína siguiendo las indicaciones del kit ECL plus (Amersham) o Millipore.
- La señal de quimioluminiscencia se detectó exponiendo la membrana a una película BioMAX XAR Film (Kodak).
- Se eliminó el anticuerpo unido a las proteínas de la membrana al incubarla con la solución de eliminación de anticuerpo por 30 min a 50°C.
- Se repitió desde el paso número dos con los anticuerpos necesarios.

**Solución de bloqueo (50 ml):**

Leche en polvo libre de grasas (Svelty)	5 g
Tris-HCl 1 M, pH 7.6	2.5 ml
NaCl 5 M	1.5 ml

**Solución de réplica (10 ml):**

Leche en polvo	0.1 g
Tris-HCl 1 M, pH 7.6	100 µl
NaCl 5 M	200 µl
EDTA 500 mM	20 µl
Tween-20 al 5%	200 µl

- Adicionar el anticuerpo indicado a la dilución apropiada.

**Solución de lavado (1000 ml):**

Tris-HCl 1 M, pH 7.6	10 ml
NaCl 5 M	20 ml



EDTA 500 mM	2 ml
Tween-20	1 ml

**Solución de eliminación del anticuerpo (100 ml):**

$\beta$ -mercaptoetanol	700 $\mu$ l
Tris HCl 1 M, pH 6.8	6.25 ml
SDS 10%	20 ml

**Ensayo de doble híbrido (James P *et al*, 1996)**

- Se cultivaron las células de PJ69-4a en medio YPD toda la noche.
- Se centrifugaron a 13200 g por 5 min.
- Se transformaron las células de acuerdo con el método de transformación de plásmidos.
- Se plaquearon en medios selectivos, -LEU/-URA, -LEU/-TRP
- Se dejaron crecer por 3 días.
- Se purificaron 3 colonias de cada transformación estriando en los mismos medios selectivos.
- Se seleccionaron las células a comparar y se realizaron diluciones seriadas en medios selectivos –leucina/-uracilo (3 mM de amino triazol) y –leucina/-triptofano.
- Se dejaron crecer por 7 días a 30°C.

**Electroforesis azul en condiciones nativas (BN-PAGE) (Wittig I *et al*, 2006).**

- Se descongelaron las mitocondrias en hielo por 5 min. Se tomaron 250  $\mu$ g de proteína mitocondrial con micropipeta de 200  $\mu$ l.
- Se resuspendieron en 250  $\mu$ l de amortiguador de lavado.

- Las mitocondrias se centrifugaron a 13200 g por 2min y se eliminó el sobrenadante.
- Se centrifugó nuevamente para eliminar completamente el sobrenadante.
- Se homogenizaron completamente las mitocondrias en 45 µl del amortiguador de muestra pipeteando suavemente 10 veces con punta de 2 µl-200 µl.
- Se agregaron 5 µl de digitonina al 10%, la cual se tenía preparada previamente y guardada a -20°C. Se incubó en hielo por 30 min.
- Se centrifugó por 12 min a 13200 rpm a 4°C en centrífuga de mesa.
- Se colectó el sobrenadante y se agregaron 2.5 µl de solución de Coomassie Serva G al 5%.
- Se corrió el gel 25 min a 17 mA con el amortiguador del cátodo al 0.02% de Coomassie Serva G (aproximadamente un tercio del gel).
- Se cambió el amortiguador del cátodo al 0.02% por el de 0.002% de azul de coomassie Serva G y se corrió a 7 mA por 2 h.
- Se usó metanol al 20% en amortiguador de electroforesis 1X para transferir las proteínas a una membrana PVDF por 2 h a 1.5 mA por cm<sup>2</sup> de membrana.
- Las membranas se lavaron con metanol al 100% por 3 min para eliminar el colorante. Se dejan secar por 15 min.
- Se bloquea la membrana toda la noche con solución de bloqueo (ver sección de Western blot).
- Se utilizan 20 µl de marcador de peso molecular de Amersham.

**Amortiguador de lavado (50 ml):**

Sorbitol                          250 mM

Bis-Tris                          50 mM

Ajustar el pH a 7.0 con HCl

**Amortiguador de muestra:**

Ácido amino-capróico            750 mM

Bis-tris 50 mM

Ajustar el pH a 7.0 con HCl

**Preparación del gel azul nativo:**

	<b>Acrilamida 4%</b>	<b>Acrilamida al 5%</b>	<b>Acrilamida al 13%</b>
<b>Acrilamida 48.5%- Bisacrilamida 3%</b>	125 µl	0.51 ml	1.34 ml
<b>Amortiguador de gel 3X</b>	0.5 ml	1.69 ml	1.69 ml
<b>Glicerol (80%)</b>	-	0.32 ml	1.28 ml
<b>Agua</b>	0.86 ml	2.5 ml	0.72 ml
<b>APS 10%</b>	8 µl	13.5 µl	13.5 µl
<b>TEMED</b>	2.25 µl	4.9 µl	4.9 µl
<b>Volumen total</b>	2.25 ml	9 ml	9 ml

**Solución de Coomassie Serva Blue G:**

Azul de Coomassie Serva G 5%

Disolver en 100 µl de amortiguador de muestra

**Amortiguador del gel 3X:**

Bis-Tris 150 mM

Ácido aminocaprónico 1.5 M

Ajustar el pH a 7.0 con HCl

**Amortiguador del cátodo (superior):**

Tricina	50 mM
Bis-Tris	15 mM
Azul de Coomassie Serva G	0.02%

**Amortiguador del cátodo (superior):**

Tricina	50 mM
Bis-Tris	15 mM
Azul de coomassie Serva G	0.002%

**Amortiguador de ánodo:**

Bis-tris	50 mM
----------	-------

Ajustar el pH a 7.0 con HCl

**Diluciones usadas para los anticuerpos:**

Anti citrato sintasa	1:1000	(Donado por el Dr. Thomas D. Fox, Universidad de Cornell, EUA)
Anti HA (Hemaglutinina)	1:10000	(Roche)
Anti cMYC	1:400	(Roche)
Anti conejo/peroxidasa	1:5000	(Invitrogen)
Anti ratón/peroxidasa	1:3000	(BioRad)

Anti Tom40	1:20000	(Donado por el Dr. Walter Neupert, Instituto de Bioquímica Max Planck, Alemania)
Anti Coa3	1:1000	(Donado por el Dr. Anthony Barrientos, Universidad de Miami, EUA)
Anti Cox1	1:30000	(Hecho en nuestro laboratorio)

## RESULTADOS

### 1. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE *Pet54* SOBRE LA SÍNTESIS DE *Cox1*.

#### 1.1 La mutante $\Delta pet54$ no recupera los niveles de la síntesis de $Cox1\Delta C15$ .

En un estudio previo de nuestro laboratorio se observó que en las mutantes de ensamblaje de la CcO, la síntesis de *Cox1* disminuía, sin embargo se recuperaba si la mutación se combinaba con una eliminación de los últimos 15 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de *Cox1* ( $Cox1\Delta C15$ ) (Shingú-Vázquez M *et al*, 2010). De entre todas las mutantes que bloquean el ensamblaje de la CcO que se analizaron, se encontró que únicamente la mutante  $\Delta pet54$  fue incapaz de reestablecer la síntesis de  $Cox1\Delta C15$  (Shingú-Vázquez M *et al*, 2010). *Pet54* es uno de los tres activadores traduccionales del mRNA de *COX3*. Para averiguar si este comportamiento era debido a la falta de *Cox3* o si era debido a un efecto específico de la mutante  $\Delta pet54$ , comparamos la síntesis de *Cox1* y  $Cox1\Delta C15$  en las mutantes de los otros dos activadores traduccionales del mRNA de *COX3*,  $\Delta pet122$ ,  $\Delta pet494$ .

Se llevó a cabo un ensayo de traducción de proteínas mitocondriales recién sintetizadas, en el que estas se marcaron con  $[S^{35}]$ -Met en presencia de cicloheximida como inhibidor de los ribosomas citoplásmicos. En este ensayo se incluyeron las tres mutantes  $\Delta pet54$ ,  $\Delta pet122$  y  $\Delta pet494$  en presencia de *Cox1* silvestre (*WT*) o carente de su extremo carboxilo terminal ( $Cox1\Delta C15$ ) (Figura 9). En las mutantes se observó que *Cox3* no se sintetizaba. Adicionalmente, *Cox1* silvestre disminuyó su síntesis, de acuerdo a lo reportado, ya que la CcO no se estaba ensamblando. Cuando se eliminó el extremo carboxilo terminal de *Cox1*, la síntesis de *Cox1* se recuperó a niveles silvestres en las mutantes  $\Delta pet122$  y  $\Delta pet494$ , justo como ocurre para otras mutantes descritas (Shingú-Vázquez M *et al*, 2010). Sin embargo, en el caso de la mutante  $\Delta pet54$ , la síntesis de *Cox1* no se recuperó, aun cuando se encuentra en combinación con  $Cox1\Delta C15$ . Para

visualizar mejor este fenómeno se realizó una cuantificación de la intensidad de las bandas por densitometría (Figura 9B y C). El comportamiento de la mutante  $\Delta pet54$  representa un caso muy particular, ya que hemos observado que en la mayoría de las mutaciones que afectan el ensamblaje de la CcO, la síntesis de Cox1 $\Delta$ C15 se restablece. Esto sugiere que Pet54 podría tener un papel como regulador positivo de la síntesis de Cox1 que no se ha descrito.

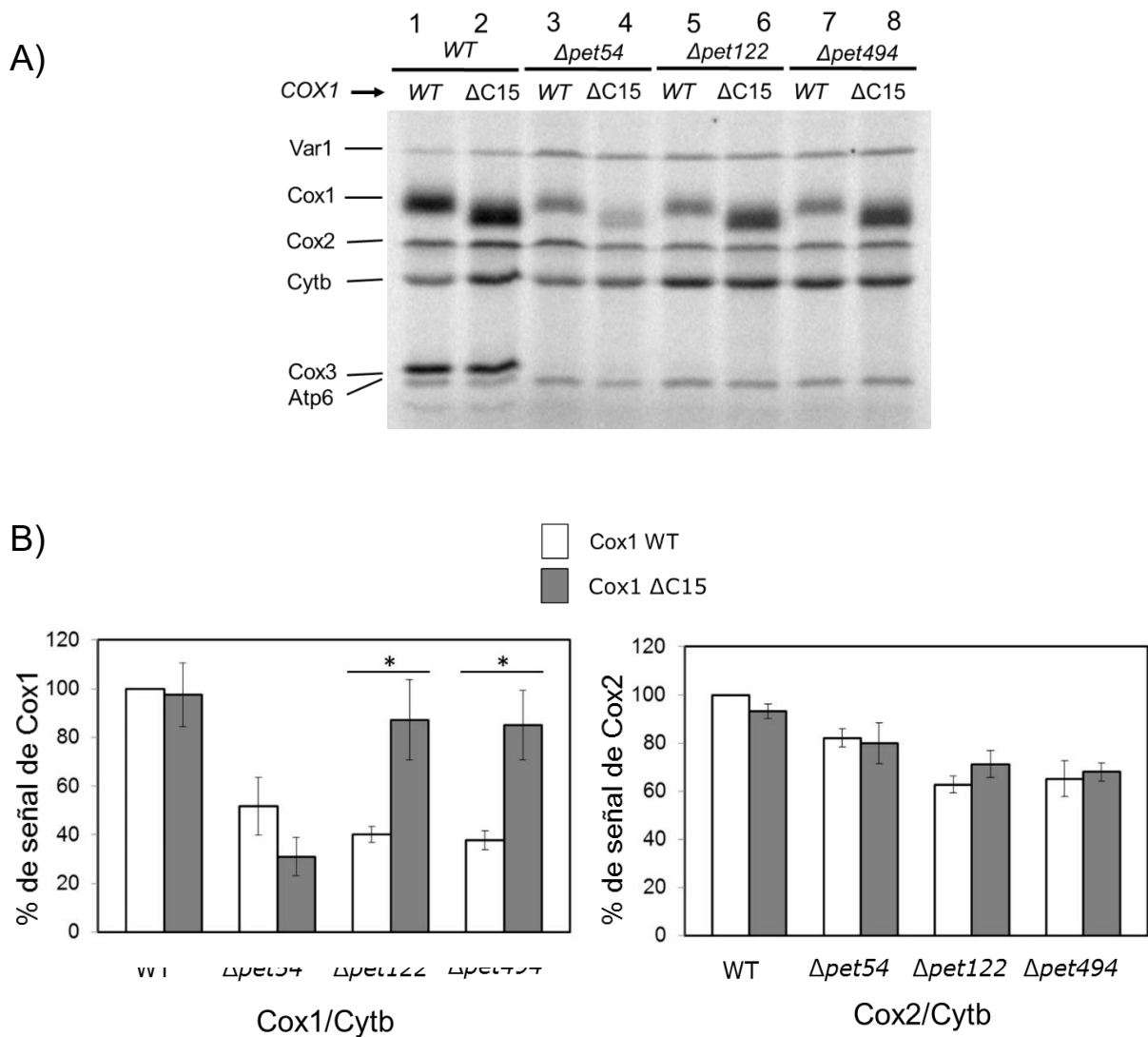


Figura 9. El efecto de la mutante  $\Delta pet54$  es independiente del extremo carboxilo terminal de Cox1. A) Traducción de proteínas mitocondrial marcadas radioactivamente con  $[S^{35}]$ -Met en presencia de cicloheximida en células completas. Después de que se realizó el ensayo de traducción se obtuvieron mitocondrias por el método de extracción con perlas de vidrio. Las proteínas se separaron en un gel de SDS-PAGE y las proteínas recién sintetizadas se detectaron por autoradiografía. Cada banda representa una de las proteínas codificadas en el DNA mitocondrial: Var1, subunidad del ribosoma mitocondrial; Cox1, subunidad 1 de la CcO; Cox2, subunidad 2 de la CcO; Cox3, subunidad 3 de la CcO; Cytb, subunidad de la Citocromo *c* oxido-reductasa; Atp6, subunidad de la ATP sintasa. B) Cuantificación por densitometría usando Image J de la señal de Cox1 respecto a la señal de Cytb. Se realizó una *t* de student con una  $p > 0.01$  como estadísticamente significativa con una  $n = 3$ . C) Como control de un efecto específico para Cox1 se realizó la cuantificación de Cox2 con respecto a Cytb.



## 1.2 El efecto de la mutante $\Delta pet54$ es independiente de Cox14 y Coa3.

Todas las mutantes de ensamblaje de CcO reportadas hasta el momento recuperan la síntesis de Cox1 cuando se combinan con una mutante  $\Delta cox14$  o una mutante  $\Delta coa3$ . Se propone que esto se debe a que en ausencia de Cox14 o Coa3, Mss51 se libera del complejo COA y queda disponible para activar la traducción del mRNA de *COX1*, por lo que se considera que ambos son reguladores negativos de la síntesis de Cox1 (Barrientos A *et al*, 2004; Mick DU *et al*, 2010).

Resultados de Shingú-Vázquez (2012) en el laboratorio indicaban que la doble mutante  $\Delta pet54/Cox1\Delta C15$  no recuperaba la síntesis de Cox1. Quisimos saber si las dobles mutantes  $\Delta pet54/\Delta cox14$  o  $\Delta pet54/\Delta coa3$  recuperaban la síntesis de Cox1. Para contestar esta pregunta se llevó a cabo un ensayo de traducción de proteínas mitocondriales en presencia de  $[S^{35}]$ -Met en mutantes sencillas o en dobles mutantes  $\Delta pet54/\Delta cox14$  o  $\Delta pet54/\Delta coa3$  (Figura 10A, B). En las mutantes sencillas  $\Delta pet54$  se observó que la síntesis de Cox1 disminuyó, como era de esperarse (Figura 10A, carril 3 y 7). Sin embargo, en el caso de las dobles mutantes con  $\Delta cox14$  o  $\Delta coa3$  no hubo recuperación de la síntesis de Cox1 o de Cox1 $\Delta C15$  (Figura 10A, carriles 4 y 8). Esto sugiere que el efecto de la mutante  $\Delta pet54$  es independiente de Cox14 o de Coa3.

El marcaje radioactivo de Cox1 observado en las mutantes de la Figura 9 se podría deber a dos posibilidades: una rápida degradación de la proteína recién sintetizada o a una disminución en su síntesis.

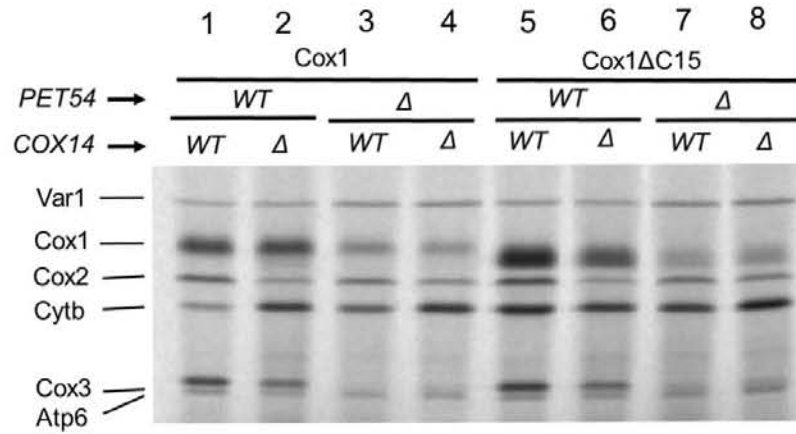
Para distinguir entre ambas posibilidades se utilizó el gen reportero de la traducción *ARG8<sup>m</sup>*, el cual se integró en el genoma mitocondrial. *ARG8* es un gen que originariamente se encuentra en el genoma nuclear y que codifica para una proteína que se importa a la mitocondria e interviene en la síntesis de arginina. Este gen se ha recodificado utilizando el uso de codones de la mitocondria, y se ha utilizado ampliamente como gen reportero de la traducción mitocondrial gracias a que no tiene una función en el ensamblaje de la CcO y por lo tanto permite

estudiar la cantidad de proteína traducida (Steele *et al*, 1996). En este caso se utilizó la construcción  $COX1(1-512)::ARG8^m$  en la cual el extremo carboxilo terminal de Cox1 se fusionó a la proteína Arg8<sup>m</sup>. El reportero contiene una presecuencia mitocondrial, por lo que la proteína de fusión Cox1-Arg8<sup>m</sup> contiene un sitio de corte entre los dos genes que al ser traducido separa a las dos proteínas. Si Cox1 fusionado a Arg8<sup>m</sup> se sintetizó, entonces la cepa crecerá en el medio mínimo sin arginina (-ARG). Esto nos hablará indirectamente de la cantidad de Cox1 sintetizada (Pérez-Martínez *et al*, 2003).

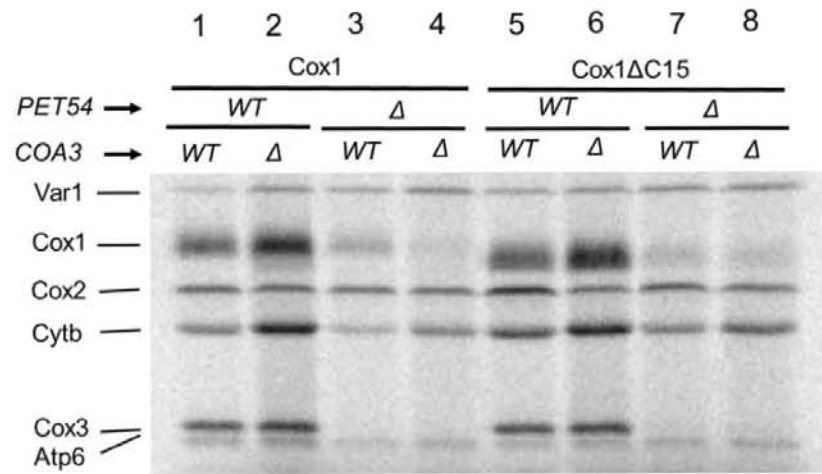
Analizamos cuál era el fenotipo de crecimiento en un medio sin arginina de las mutantes sencillas  $\Delta pet54$  o dobles  $\Delta pet54/\Delta cox14$ . Mediante un experimento de dilución seriada se observó que en la mutante  $\Delta pet54$  no había crecimiento en medio -ARG (Figura 10C). Esto sugiere que en esta mutante, la síntesis de Cox1 disminuye. Una vez que Cox14, regulador negativo de la síntesis de Cox1, es eliminado, la doble mutante  $\Delta pet54/\Delta cox14$  no recuperó el crecimiento en medio -ARG, el cual es un comportamiento diferente al que comúnmente se observa para otras mutaciones de ensamblaje de la CcO. Para ilustrar estas diferencias comparamos nuestros resultados con los de la mutante  $\Delta cox6$ , cuyo producto codifica para la subunidad 6 (Cox6) de la CcO. Como se ha reportado, la doble mutante  $\Delta cox6/\Delta cox14$  recuperó la traducción del mRNA reportero  $ARG^m$  fusionado a  $COX1$  (Shingú-Vázquez *et al*, 2010).

Por lo anterior se concluye que a diferencia de la mayoría de las mutantes que afectan el ensamblaje de la CcO, el efecto de la mutante  $\Delta pet54$  es independiente de Cox14 y Coa3. Esto apoya nuestra idea de que Pet54 tiene un papel como regulador positivo en la síntesis de Cox1.

A)



B)



C)

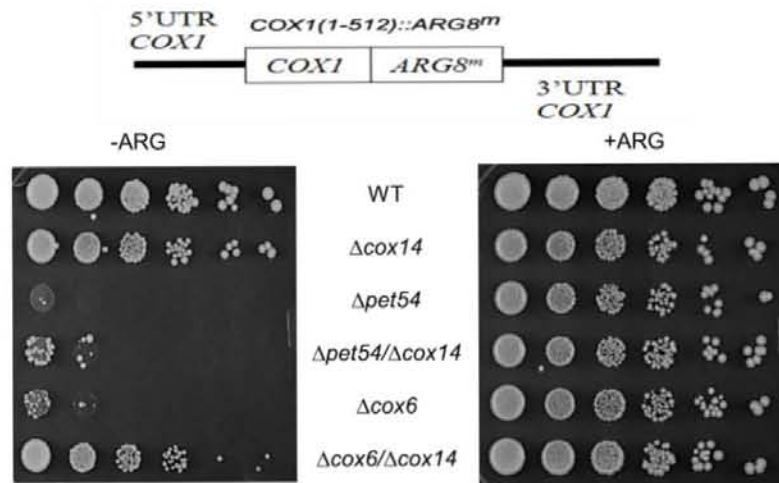


Figura 10. El efecto de regulación de Pet54 sobre la síntesis de Cox1 es independiente de Cox14 y Coa3. A) Traducción de proteínas mitocondriales *in vivo* con [ $S^{35}$ ]-Met en cepas  $\Delta cox14$ . Se indica el nombre de las mutantes, experimento realizado por Shingú-Vázquez, 2012, M. B) Traducción de proteínas mitocondriales *in vivo* con [ $S^{35}$ ]-Met en cepas  $\Delta coa3$ . Las mutantes se indican en la parte superior. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE al 16% y se revelaron por autoradiografía C) Diluciones seriadas (1/10) de las cepas de levadura que portan a Cox1 fusionado en su extremo carboxilo terminal al gen reportero de la traducción *ARG8<sup>m</sup>* (diagrama superior). Las diluciones seriadas se incubaron a 30°C en medio mínimo sin arginina (-ARG) o en medio sintético completo (+ARG) por dos días.

## 2. POSIBLES SITIOS DE ACCIÓN DE Pet54 EN LA SÍNTESIS DE Cox1

Existen tres posibles sitios de acción de Pet54 que podrían explicar la regulación positiva de la síntesis de Cox1, la cual es independiente del extremo C-terminal de Cox1, de Coa3 y de Cox14:

1.- Pet54 podría actuar directamente sobre el extremo 5'UTR como activador traduccional, o indirectamente, estabilizando/estimulando a los activadores traduccionales del mRNA de *COX1*: Pet309 y Mss51. De esta manera se explicaría que en ausencia de Pet54 los niveles de Pet309 y Mss51 activos disminuirían y sería imposible recobrar la síntesis de Cox1 independiente de su extremo carboxilo terminal o de Cox14/Coa3 (Figura 11A).

2.- Pet54 podría actuar a nivel postraduccional, desestabilizando la unión de Mss51 al complejo COA. El modelo actual propone que Mss51 necesita liberarse del complejo COA para poder llevar a cabo un nuevo ciclo de traducción del mRNA de *COX1*. Si Pet54 tuviera una función ayudando a liberar a Mss51 de este complejo, en la mutante  $\Delta pet54$  la cantidad de Mss51 libre disminuiría y de esta manera sería imposible que recuperara la síntesis de Cox1 $\Delta C15$  (Figura 11B).

Adicionalmente, Pet54 podría estabilizar al mRNA de *COX1* ya que contiene un dominio RRM que une RNA. En este caso, en la mutante  $\Delta pet54$  el mRNA de

*COX1* disminuiría sus niveles evitando que se traduzca con eficiencia. Sin embargo experimentos de northern blot realizados por Angélica Zamudio en el laboratorio indicaron que los niveles del mRNA de *COX1* no se afectan en la mutante  $\Delta pet54$ .

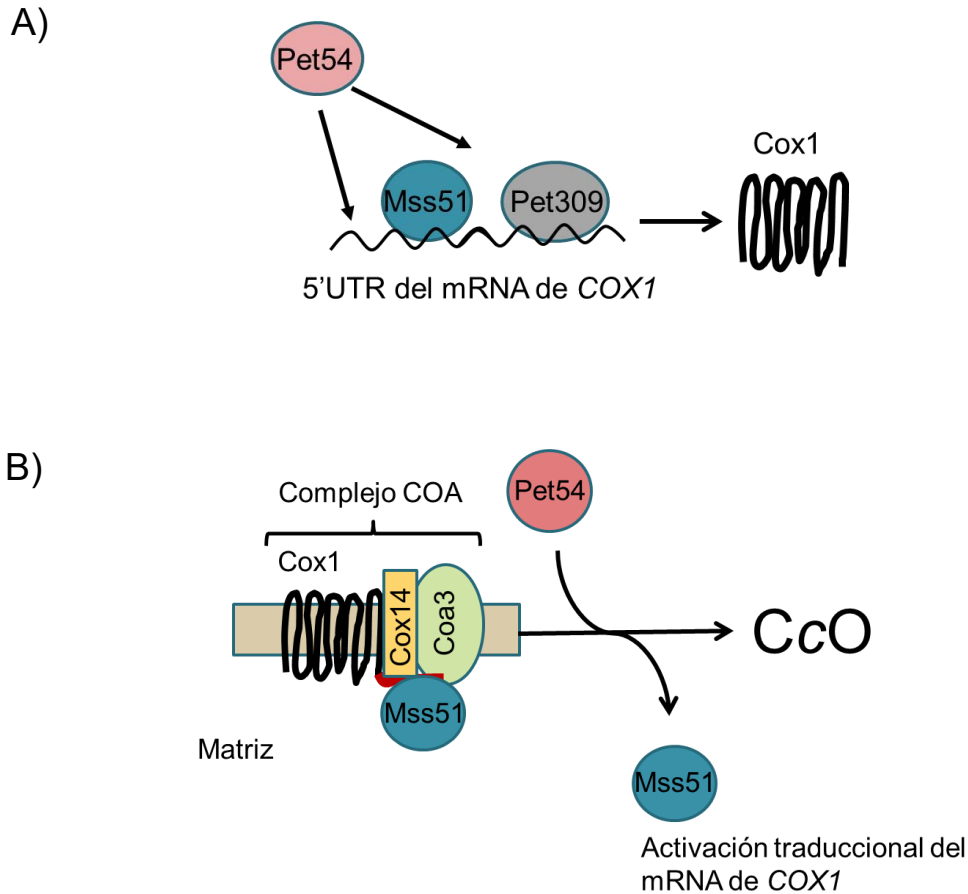


Figura 11. Modelos sobre los posibles sitios de acción de Pet54 en la regulación de la síntesis de Cox1. A) Pet54 podría actuar en el extremo 5'-UTR del mRNA de *COX1* activando/estabilizando a Mss51 y/o Pet309. Alternativamente, podría actuar directamente sobre el mRNA como un activador traduccional. B) Pet54 podría hacer que la liberación de Mss51 del complejo COA fuera más eficiente para poderla reciclar una vez que la CcO prosigue su ensamblaje. Sin embargo, este papel sería independiente del extremo C-terminal de Cox1 o de Cox14 y Coa3.

### 3. Pet54 ACTÚA EN LOS EXTREMOS UTR's DEL mRNA DE COX1.

#### 3.1 El efecto de la mutante $\Delta pet54$ depende de la presencia de Cox1

La función de Pet54 podría localizarse en las regiones UTR del mRNA de COX1, ya que estas regiones de los mRNAs mitocondriales, en especial el extremo 5'-UTR, es blanco de muchas proteínas que regulan la traducción, tal es el caso de Mss51 y Pet309. Adicionalmente, Mss51 también tiene sitios de acción en la región codificante de COX1. Para identificar el sitio de acción de Pet54 en el DNA mitocondrial, se empleó la misma construcción mitocondrial utilizada para identificar los sitios de acción de Pet309 y Mss51. Por un lado, en este mtDNA se eliminó completamente al gen COX1 y se reemplazó con los codones de ARG8<sup>m</sup>. La expresión de este gen reportero nos indicaría si Pet54 actúa en los extremos UTR del mRNA de COX1, ya que en esta construcción no hay región codificante de COX1. Por otro lado, los codones de COX1 se insertaron a 295 nucleótidos río arriba al gen COX2 y se flanqueó por los extremos 5'UTR y 3'UTR de COX2. Este mtDNA se conoce como "ectópico quimérico". En este caso COX1 se encuentra bajo el control del activador traduccional Pet111, específico para el 5'-UTR del mRNA de COX2 (Figura 12A) (Pérez-Martínez X *et al*, 2003). Un western blot para detectar a la proteína Cox1 indicó que en esta construcción se produce una menor cantidad de Cox1 comparado con mitocondrias que tienen mtDNA silvestre. Como era de esperarse, Cox1 no se sintetizó en una mutante  $\Delta pet111$ , ya que el mRNA de COX1 no se tradujo (Figura 12A). A continuación se eliminó a Pet54 en una cepa que contenía mitocondrias con el mtDNA ectópico quimérico. Al seguir el crecimiento en medio -ARG de células con este mtDNA se observó que la mutante  $\Delta pet54$  disminuye su crecimiento en comparación con la cepa silvestre y las mutantes  $\Delta pet122$  y  $\Delta pet494$ , activadores traduccionales de COX3, y  $\Delta pet111$ . Este dato sugiere que Pet54 actúa en los extremos UTR del mRNA de COX1.

Sorprendentemente, encontramos que el defecto en el crecimiento en medio -ARG de mutantes  $\Delta pet54$  se perdió al combinar con la mutación  $\Delta pet111$  (Figura 12B). Como se mencionó con anterioridad, en este mtDNA la síntesis de Cox1 depende del extremo 5'-UTR de COX2, y por lo tanto de Pet111. Este dato sugiere que el

efecto de la mutante  $\Delta pet54$  sobre la síntesis de Arg8 depende de que esté presente la proteína Cox1. Esta idea se reforzó al sobre-expresar a *PET111*. Una mayor cantidad de Pet111 conlleva a una mayor cantidad de Cox1. Como era de esperarse, en este caso el defecto en el crecimiento en medio -ARG en mutantes  $\Delta pet54$  volvió a aparecer, ya que aumentó la cantidad de Cox1 (Figura 12C).

Para corroborar que el efecto de  $\Delta pet54$  sobre los extremos UTR del mRNA de *COX1* depende de la presencia de la proteína Cox1, se analizaron cepas con un nuevo mtDNA. En este caso sólo se eliminó por completo la región codificante de *COX1* y se sustituyó por *ARG8<sup>m</sup>*, pero en este caso no se reintrodujo el gen *COX1* ectópico, de tal manera que no hay codones de *COX1* presentes en este mtDNA. Observamos que en esta construcción mitocondrial, una mutante  $\Delta pet54$  creció en medio -ARG de manera similar a la cepa silvestre y las mutantes  $\Delta pet122$  y  $\Delta pet494$  (Figura 12D). Todo lo anterior sugiere que Pet54 tiene una función en los extremos UTR del mRNA de *COX1* y que el efecto de la mutante  $\Delta pet54$  depende de la presencia de la proteína Cox1.

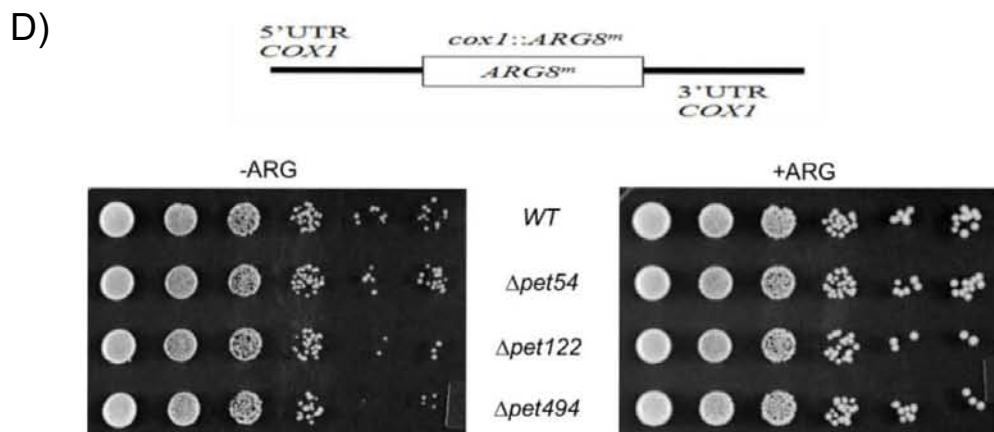
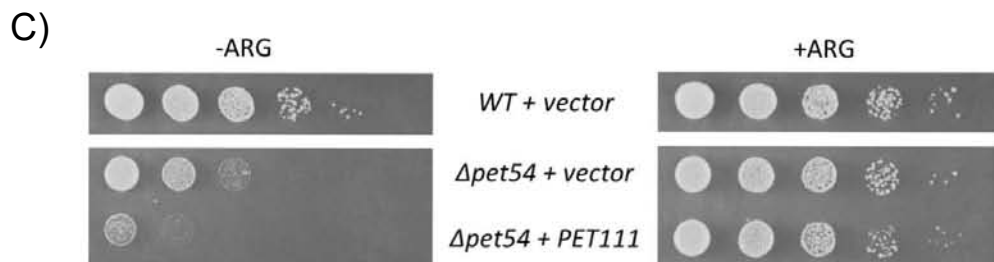
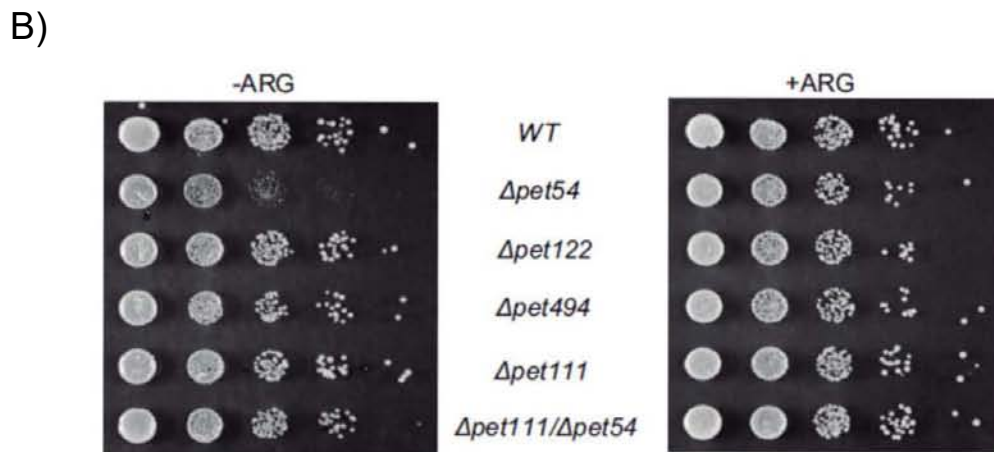
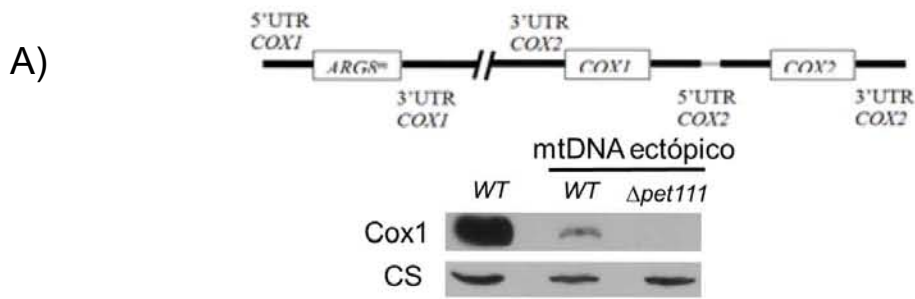




Figura 12. El efecto de la mutante  $\Delta pet54$  depende de la presencia de Cox1. A) Fondo mitocondrial ectópico quimérico y western blot de Cox1. La citrato sintasa (CS) se utilizó como control de carga. B) Diluciones seriadas (1/10) de cepas con DNA mitocondrial ectópico quimérico. *COX1* se encuentra sustituido por el gen reportero de la traducción *ARG8<sup>m</sup>* y el ORF de *COX1* se encuentra flanqueado por los UTR's de *COX2*. C) Diluciones seriadas (1/10) de cepas con fondo mitocondrial ectópico en donde se sobre-expresó a *PET111*. D) Diluciones seriadas (1/10) de las cepas de levadura que portan al gen reportero de la traducción *ARG8<sup>m</sup>* reemplazando completamente a *COX1*.

### 3.2 Pet54 actúa a través del 5'UTR del mRNA de COX1

Hasta la fecha se ha descrito que los activadores traduccionales actúan a través del 5'UTR del mRNA de *COX1*. Para determinar si Pet54 actuaba sobre el 5'UTR o sobre el 3'UTR del mRNA de *COX1* Rodolfo García-Villegas en nuestro laboratorio, creo cepas en que se intercambió el extremo 5'-UTR y el 3'UTR de *COX1* por el 5'UTR y 3'UTR de *COX2*, respectivamente (Figura 13). Sólo cuando se conserva el 5'UTR de *COX1* se pudo observar una disminución en el crecimiento de la mutante  $\Delta pet54$  en medio  $-ARG$ . En el caso en el cual se intercambio el 5'UTR de *COX1* por el 5'UTR de *COX2* no se observo ninguna diferencia de crecimiento en medio  $-ARG$  entre la silvestre y la mutante  $\Delta pet54$ . Esto sugiere que el sitio de acción de Pet54 es el 5'UTR del mRNA de *COX1*. Este dato no sorprende, ya que sabemos que los activadores traduccionales del mRNA de *COX1*, Pet309 y Mss51, actúan en el extremo 5'UTR de este mRNA (Manthey GM *et al*, 1995; Pérez-Martínez X *et al*, 2009).

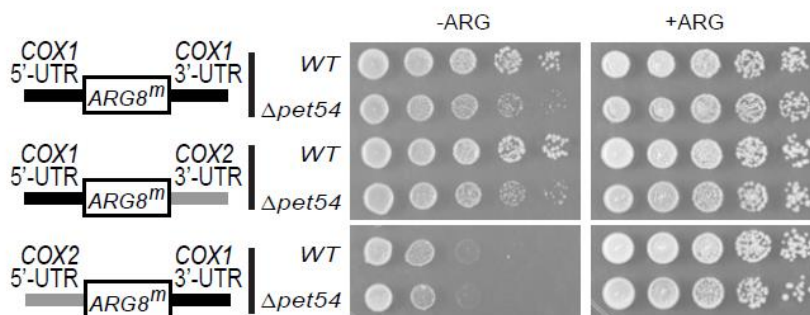


Figura 13. Pet54 actúa en el extremo 5'UTR de COX1. Se utilizó el gen reportero *ARG8<sup>m</sup>* para monitorear la síntesis de Cox1 dependiente del extremo 5'-UTR o 3'-UTR. Las cepas contienen un fondo mitocondrial similar al de la Fig. 12, excepto que el gen *cox1Δ::ARG8<sup>m</sup>* se flanqueó por ambos UTR's de COX1 (construcción superior), por el 5'UTR de COX1 el 3'UTR de COX2 (construcción media), o por el 5'UTR de COX2 y el 3'UTR de COX1 (construcción inferior). Las cepas *PET54* y *Δpet54* se crecieron en diluciones seriadas en medio -ARG y +ARG y se incubaron de 2 a 4 días a 30°C. Las barras negras indican las regiones UTR de COX1; las barras grises indican los UTR de COX2. Para reemplazar el extremo 3'UTR de COX1, 525 pb de la secuencia río a bajo de COX1 se sustituyeron por 118 pb de la secuencia río a bajo de COX2. Para la sustitución del extremo 5'UTR de COX1, 505 pb de la secuencia río arriba se reemplazaron por 73 pb de la secuencia río arriba del 5'UTR de COX2 (Pérez-Martínez X et al, 2009).

### 3.3 Pet54 no afecta los niveles de las proteínas Mss51 y Pet309.

Mss51 y Pet309 son proteínas indispensables para la activación traduccional del mRNA de COX1. Actúan en el extremo 5'-UTR de este mensajero y en su ausencia no hay traducción, por lo que las cepas no pueden respirar (Manthey GM *et al*, 1995; Decoster E *et al*, 1990; Pérez- Martínez *et al*, 2009). Se ha observado que Pet309 y Mss51 existen en cantidades limitantes en la célula, regulando de esta manera la traducción del mRNA de COX1 (Pérez-Martínez X *et al*, 2009). Una disminución en los niveles de Mss51 o Pet309, podría explicar la disminución en la síntesis de Cox1 observada en una mutante *Δpet54*. Para explorar esta posibilidad, generamos mutantes *Δpet54* y analizamos los niveles de Mss51 y de Pet309 mediante inmunorélicas tipo western blot (Figura 14). Para poder

visualizar a las proteínas utilizamos cepas en que se les fusionó un triple epítipo de hemaglutinina en el extremo carboxilo terminal (Mss51-3xHA o Pet309-3xHA). Estos epítopes no afectaron la capacidad respiratoria de las células (Tavares-Carreón F *et al*, 2009; Pérez-Martínez X *et al*, 2003). Al realizar el ensayo de western blot se encontró que no hubo cambios en la abundancia de Pet309 o de Mss51 en ausencia de Pet54. Esto indica que Pet54 no tiene un papel en la estabilidad ni en la expresión de estos activadores traducionales (Figura 14).

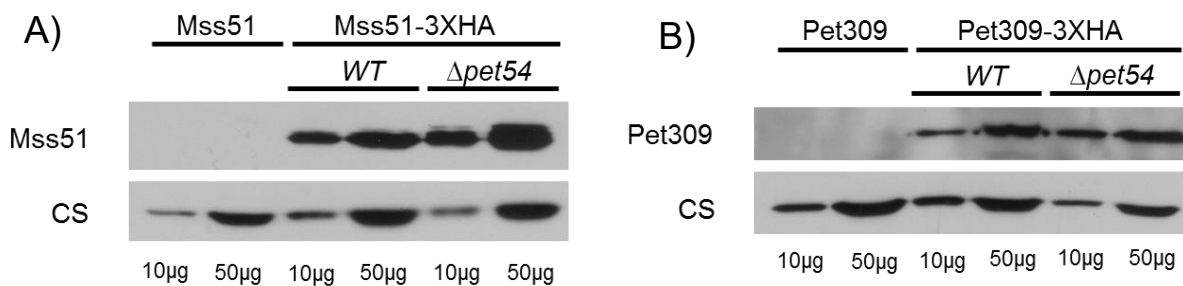


Figura 14. La mutante  $\Delta pet54$  no afecta la estabilidad de los activadores traducionales del mRNA de COX1: Mss51 y Pet309. 10μg y 50μg de proteínas mitocondriales se separaron por SDS-PAGE al 16% y se transfirieron a una membrana de PVDF. Western blot de proteínas mitocondriales. A) Se observan los niveles de Mss51-3xHA en la mutante  $\Delta pet54$ . B) Se muestran los niveles de Pet309-3xHA en la mutante  $\Delta pet54$ . Como control de carga se utilizó citrato sintasa (CS).

### 3.4 Pet54 interacciona genéticamente con Mss51

Se ha observado que muchas mutantes que disminuyen la síntesis de Cox1 recuperan esa síntesis si Mss51 es sobrepresado (Barrientos A *et al*, 2004). El modelo actual indica que esto se debe a que en una mutante que no ensambla la CcO, Mss51 no está disponible como activador traducional ya que se encuentra atrapado en el complejo COA. Al aumentar la cantidad de Mss51 existe mayor disponibilidad de esta proteína y por lo tanto se puede recuperar la síntesis de

Cox1. Para probar esta idea se utilizaron cepas con un mtDNA en que los codones de COX1 se fusionaron a los de ARG8<sup>m</sup> (COX1(1-512)::ARG8<sup>m</sup>), y se monitoreó el crecimiento de las células en medio sin arginina. Estas células se transformaron con un vector vacío o con un vector de 2μ que sobre-expresa a MSS51 (Figura 15). Dado que Pet309 es el otro activador traduccional de COX1, igualmente decidimos sobre-expresar esta proteína. Se encontró que la sobreexpresión de Pet309 no pudo recuperar el crecimiento en medio –ARG. En contraste, la sobreexpresión de Mss51 recuperó parcialmente el crecimiento en este medio, lo que indica que existe una interacción genética entre Pet54 y Mss51, no así con Pet309. Para fines de comparación se incluyó a la mutante Δcox6, la cual presenta el comportamiento típico de la mayoría de las mutantes del ensamblaje de la CcO: la sobre-expresión de Mss51 recupera parcialmente la síntesis de Cox1 (Barrientos A *et al*, 2002). Como era de esperarse, se encontró que la sobre-expresión de Mss51 hace que la mutante Δcox6 recupere parcialmente su crecimiento en medio -ARG.

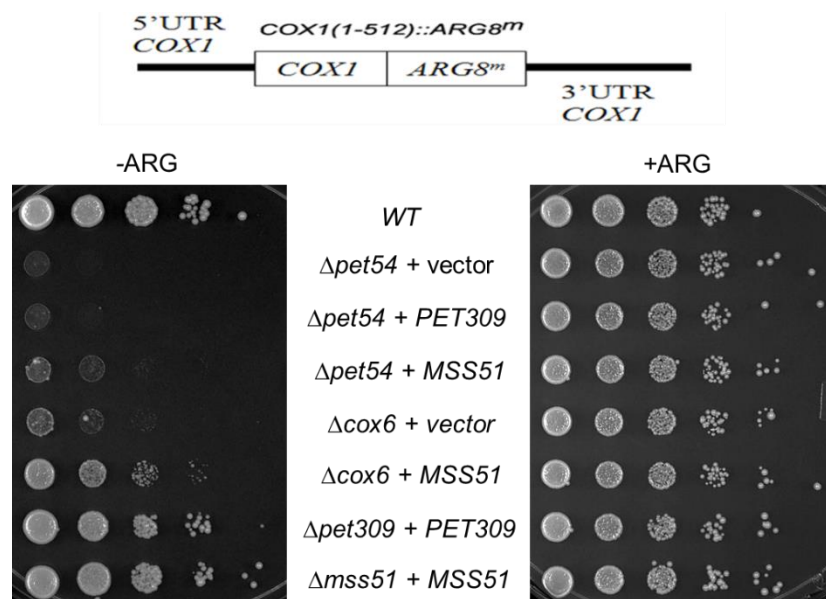


Figura 15. Pet54 y Mss51 presentan una interacción genética moderada. Diluciones seriadas (1/10) de las cepas de levadura que portan a Cox1 fusionado en su extremo carboxilo terminal al reportero de la traducción Arg8. Las células se transformaron con plásmidos que sobre-expresan a

los activadores traduccionales del mRNA de *COX1* (*PET309* y *MSS51*) y con un plásmido vacío (vector). Las diluciones se incubaron a 30°C en medio mínimo (-ARG) o en medio sintético completo (+ARG) por dos días. Las cepas  $\Delta pet309$  y  $\Delta mss51$  se transformaron con plásmidos conteniendo *PET309* o *MSS51*, respectivamente, para comprobar que los plásmidos codifican proteínas funcionales (las cepas  $\Delta pet309$  y  $\Delta mss51$  son -ARG (Pérez-Martínez X *et al*, 2003)).

#### **4. Pet54 ES NECESARIA PARA ACTIVAR EFICIENTEMENTE LA TRADUCCIÓN DEL mRNA DE COX1.**

##### **4.1 Pet54 migra en un complejo de alto peso molecular diferente a los de Mss51.**

Debido a que se había detectado una moderada interacción genética entre *Mss51* y *Pet54*, nos interesó analizar si también existía una interacción física entre estas proteínas, para ello se analizó su migración mediante BN-PAGE. Estos geles tienen la ventaja de que no contienen un agente desnaturante y por lo tanto podemos observar a las proteínas formando complejos (Wittig *et al*, 2006). Para detectar a *Pet54* se fusionó en su extremo C-terminal un triple epítoto C-MYC (*Pet54-3xMYC*), el cual no afectó el crecimiento respiratorio de la cepa (datos no mostrados). Se aislaron mitocondrias que contenían a *Pet54-3xMYC* y/o *Mss51-3xHA*, se solubilizaron con digitonina al 1% y se corrieron en BN-PAGE. Este gel se transfirió a membrana de PVDF y se incubó con un anticuerpo anti-MYC para detectar a *Pet54-3xMYC*. Luego se eliminó el anticuerpo con una solución con  $\beta$ -mercaptoetanol y se incubó con un anticuerpo anti-HA para identificar a *Mss51-3xHA*. Posteriormente se repitió el proceso y se incubó con un anticuerpo anti-Tom40, como control de carga. Por último se realizó una incubación con un anticuerpo contra *Cox1*. Se observó que *Pet54* migraba en un complejo de aproximadamente de 190 kDa (Figura 16A, carril 2, 3, 4 y 5). Adicionalmente se utilizó una cepa sin epítoto MYC en *Pet54* como control negativo para detectar señales inespecíficas del anticuerpo (Figura 16A, carril 1). Cuando se incubó esta membrana con un anticuerpo contra el epítoto HA se encontró, como se ha reportado, que *Mss51* migra formando al menos tres complejos de alto peso

molecular de 180 kDa y de 250-450 kDa (Mick DU *et al*, 2010) (Figura6, carriles 6 y 7). Sin embargo, ninguno de estos complejos comigra con Pet54. Cuando la membrana se incubó con un anticuerpo contra Cox1, se observó la presencia de esta proteína en supercomplejos, así como una pequeña porción en comigración con la banda de 250-450 kDa de los complejos COA donde aparece Mss51 (Figura 16A, carriles 11 y 12); sin embargo tampoco se observó comigración de Pet54 con ninguna de las bandas de Cox1.

Adicionalmente, se determinó si Mss51 podría afectar al complejo detectado de Pet54. Para ello analizamos mitocondrias de una mutante  $\Delta mss51$  (Figura 16A, carril 3). Se observó que la banda de Pet54 de 190 kDa disminuye su intensidad, más no su migración, con respecto a una cepa silvestre. Este resultado sugiere que aunque no se detecta interacción entre Pet54 y Mss51 por este método, la cantidad de complejo Pet54 si se ve afectado por ausencia de Mss51.

Se ha descrito que Pet54 interacciona con Pet309 (Towpik J. 2005). Para saber si la mutante nula  $\Delta pet309$  modificaba la migración de Pet54, se solubilizaron mitocondrias de la mutante  $\Delta pet309$  y se corrieron en un gel azul nativo. Posteriormente se llevó acabo un western blot contra Pet54-3xMYC. No se mostró ningún cambio en el patrón de migración o en la intensidad de la banda de Pet54 (figura 16A, carril 4). Este dato corrobora lo antes observado. A continuación se incubó la membrana contra Mss51-3xHA y se observó que se encontraba exclusivamente en la población de activador traduccional, como se ha reportado (Pierrel F, *et al*. 2007) (Figura 16A, carril 9). Posteriormente se incubó a la membrana con un anticuerpo contra Cox1 y como se esperaba, no se observó ninguna reacción (figura 16A, carril 14).

Adicionalmente se ha reportado que Pet54 interacciona con Pet122 y Pet494 (Brown NG *et al*, 1994). Para observar si el complejo de Pet54 de 190 kDa está formado por estas proteínas se corrió en un gel azul nativo la mutante  $\Delta pet494$  (figura 16A, carril 5). El complejo observado mediante Western blot no cambió su patrón de migración, sugiriendo que dicho complejo no depende de Pet494 y que por lo tanto no es el complejo encargado de activar la traducción del mRNA de

COX3. Se observó que Mss51 en la mutante  $\Delta pet494$  se enriquecía en los complejos COA y la fracción que corresponde a su función de activador traduccional disminuía (Figura 16A, carril 10). Esto está de acuerdo con el modelo que propone que cuando existe un defecto en el ensamblaje de la CcO, Mss51 se encuentra atrapado en el complejo COA. La misma membrana decorada con anticuerpos anti-Cox1 demuestra que no se forman supercomplejos, sino sólo intermediarios del ensamblaje de la CcO (Figura 16A, carril 15).

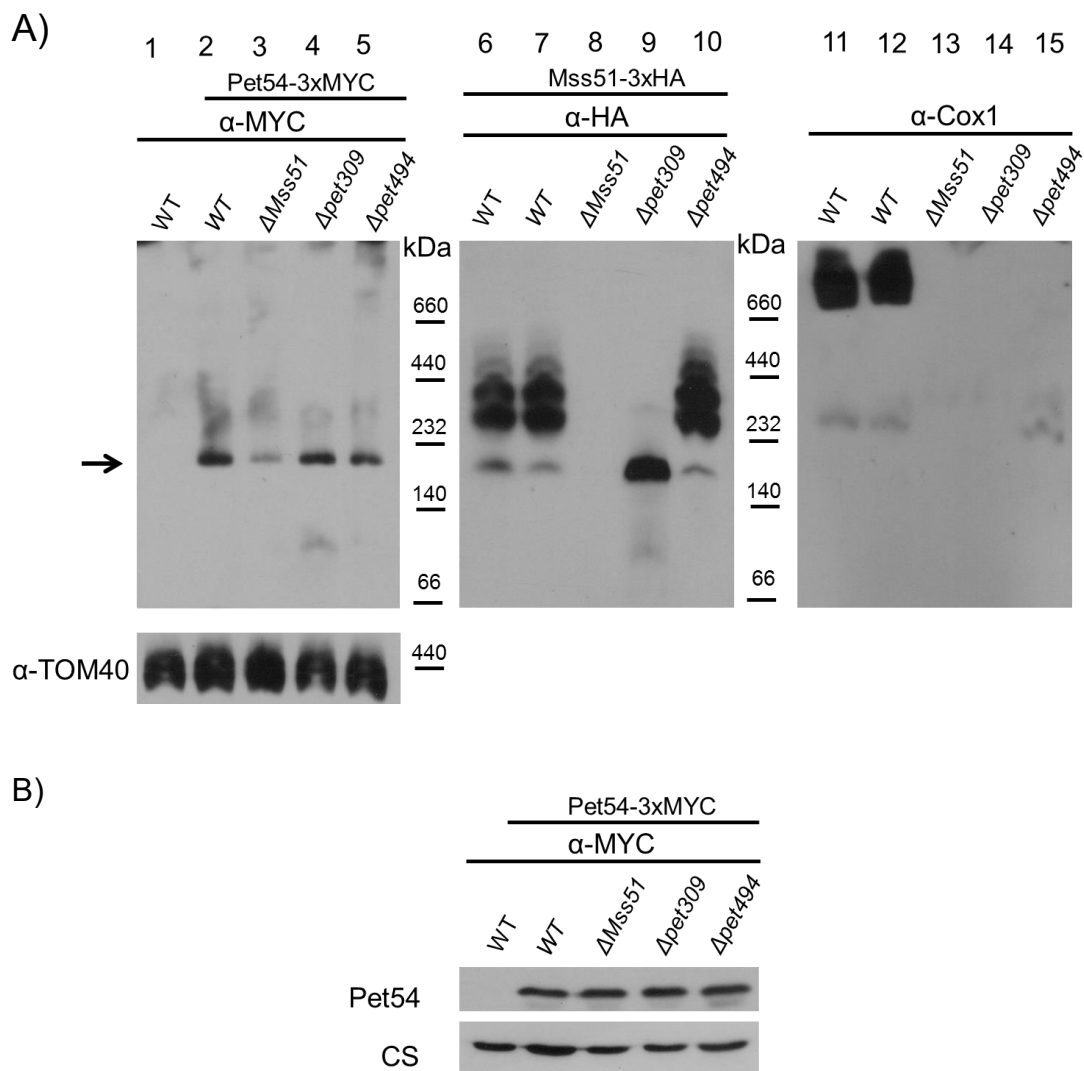


Figura 16. Pet54 no comigra con Cox1 ni con Mss51. A) 100  $\mu$ g de proteínas mitocondriales se solubilizaron con 1% de digitonina y se separaron en un gel azul nativo con gradiente 5%-13% de

acrilamida. Posteriormente se llevó a cabo la transferencia de proteínas del gel a una membrana de PVDF y se realizó Western blot con los anticuerpos indicados. Tom40 se uso como control de carga. La flecha negra indica el complejo de alto peso molecular que contiene a Pet54. B) Proteínas mitocondriales se separaron por medio de SDS-PAGE y posteriormente se transfirieron a una membrana de PVDF y se realizó Western blot con los anticuerpos indicados. La citrato sintasa (CS) fue utilizado como control de carga.

Para discernir si la disminución de intensidad observada en el complejo de Pet54 de 190 kDa en la mutante  $\Delta mss51$  se debía a la inestabilidad de la Pet54 se analizaron los niveles en estado estacionario de Pet54 mediante geles de acrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE). No se observó cambio alguno en los niveles de Pet54 en ninguno de los casos (Figura 16B). Esto sugiere que la disminución del complejo de Pet54 observado en la mutante  $\Delta mss51$  no se debe a la inestabilidad de Pet54 sino a una disminución en la formación del complejo de alto peso molecular.

En conclusión, Pet54 no comigra con Mss51 sino que forma un complejo de alto peso molecular diferente a los formados por Mss51. El complejo de Pet54 no se altera en mutantes de genes cuyos productos se han descrito que interactúan con Pet54, como Pet309 o Pet494. Esto puede indicar que el complejo observado de Pet54 realiza otra función que la de activador traduccional o la de su asociación con Pet309. Se observó que Mss51 es necesario para otorgar estabilidad al complejo de Pet54.

#### **4.2 Pet54 interactúa físicamente con Mss51.**

Si bien los resultados anteriores nos indican que existe una interacción genética entre Pet54 y Mss51, no contamos con evidencia de que estas proteínas interactúen físicamente. Para observar una posible interacción física entre estas dos proteínas se llevó a cabo un ensayo de doble híbrido (James P *et al*, 1996) Para ello se clonaron los marcos de lectura de *PET54* y *MSS51* fusionados con el



dominio de activación de *GAL4* (Pet54-AD y Mss51-AD); adicionalmente se clonaron ambos genes fusionados al dominio de unión de *GAL4* (Pet54-BD y Mss51-BD). Con estos plásmidos se transformaron las cepas de levadura en sus diferentes combinaciones (Pet54-AD con Mss51-BD y Pet54 BD con Mss51-AD), y se examinó el crecimiento en un medio sin histidina con 3 mM de aminotriazol (-HIS 3mM AT) y medio sin adenina (-ADE). Como control positivo utilizamos cepas que expresan a Pet122-BD y a Pet54-AD, ya que sabemos que estos activadores traduccionales interaccionan físicamente (Naithani S *et al* 2003). Como controles negativos utilizamos cepas transformadas con los plásmidos vacíos. Sólo en la combinación de Pet54-AD con Mss51-BD se pudo observar un crecimiento moderado en medio -HIS, no así en medio -ADE (figura 17). Se ha reportado que el medio -HIS es más sensible y menos astringente que el medio -ADE (Leung GP *et al*, 2011). De hecho, se observó que el control positivo (Pet122-AD/Pet54-BD) presentó un menor crecimiento en medio -ADE. De igual manera, llama la atención que sólo se presentara crecimiento en la combinación Pet54-AD/Mss51-BD, y no en la combinación inversa. Sin embargo, esto se puede deber a que una interacción débil o transitoria podría perderse al alterar la secuencia de las proteínas a probar al cambiar su fusión de AD a BD (o viceversa). Ejemplos de este comportamiento se han detectado con anterioridad (Leung GP *et al*, 2011; Zhao X *et al*, 1998).

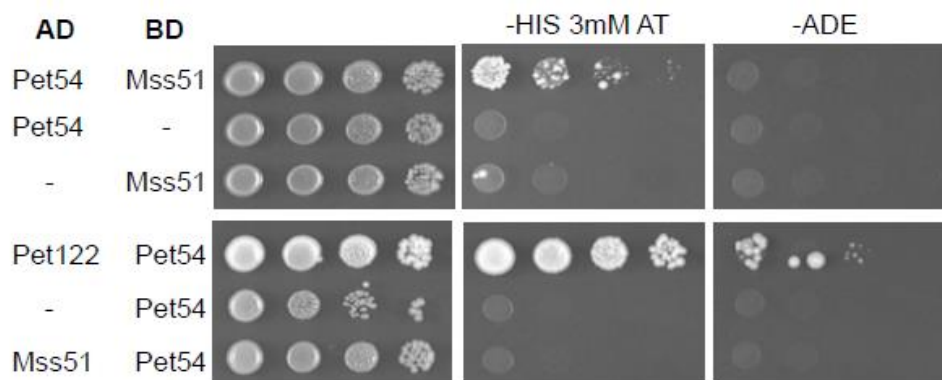


Figura 17. Pet54 interacciona débilmente con Mss51. Plásmidos para ensayos de doble híbrido conteniendo las regiones codificantes de Pet54, Mss51 y Pet122 fueron clonadas en el dominio de activación (AD) y de unión (BD) de GAL4, y co-transformados en la cepa Pj69-4A (James P *et al*, 1996). Las co-transformaciones fueron seleccionadas en medio –leucina y –uracilo o –leucina y –triptofano. El crecimiento fue examinado mediante crecimiento de diluciones seriadas en medio –histidina 3 mM de aminotriazol (AT) y en medio –adenina. Las diluciones seriadas se incubaron por 7 días a 30°C. El crecimiento de las células que contenían a Pet122-AD y Pet54-BD se usó como control positivo de dos proteínas que se ha descrito que interaccionan entre sí (Naithani S *et al* 2003).

Para confirmar la interacción física entre Mss51 y Pet54 observada por doble híbrido se llevaron a cabo co-inmunoprecipitaciones de ambas proteínas. Para ello se purificaron mitocondrias con Mss51-3xHA y Pet54-3xMYC. Para adicionalmente intentar detectar una interacción de Pet54 con el péptido Cox1 naciente, se realizó un ensayo de traducción de proteínas mitocondriales en presencia de S<sup>35</sup>-[Met] antes de solubilizar a las mitocondrias con digitonina al 1%. El solubilizado se incubó con anticuerpo anti-MYC (Figura 18A) o con anti-HA (Figura 18B) acoplados con proteína A sefarosa para precipitar a Pet54-3xMYC o a Mss51-3xHA. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de PVDF y se analizaron mediante autoradiografía para ver a Cox1 recién sintetizada. Posteriormente se hicieron inmunorréplicas tipo Western blot para detectar a Pet54-3xMYC y a Mss51-3xHA.

Primero se llevó a cabo la inmunoprecipitación de Pet54-3xMYC. Como control negativo se usó una cepa sin epítipo en Pet54. Se observó mediante autorradiografía que a pesar de tener una buena inmunoprecipitación de Pet54-MYC no obtuvimos una co-inmunoprecipitación de Cox1. Mediante Western blot no se pudo demostrar una interacción entre Pet54 y Mss51. Para confirmar que la co-inmunoprecipitación se realizó correctamente se utilizó como control positivo la inmunoprecipitación de la proteína Cox14-3xMYC, ya que se ha descrito que interacciona con Cox1 y con Mss51 (Barrientos A *et al*, 2004).

En segundo lugar se realizó la inmunoprecipitación de Mss51-HA. Se observó mediante Western blot que Mss51 inmunoprecipitó correctamente, sin embargo mediante este método no pudimos demostrar una interacción de Pet54 con Mss51 o Cox1. En este caso, el control positivo fue la inmunoprecipitación entre Mss51-3xHA y Cox1 (Pérez-Martínez *et al*, 2003).

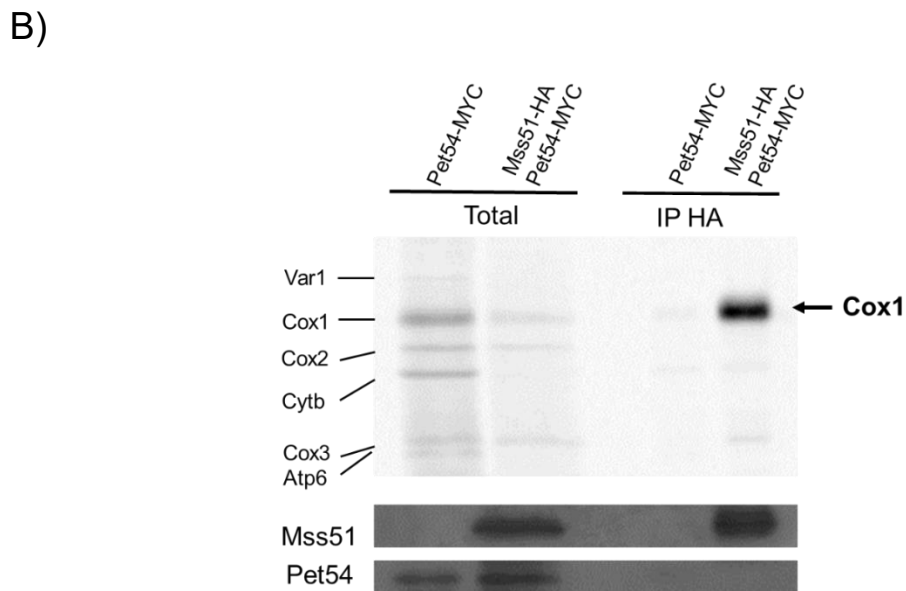
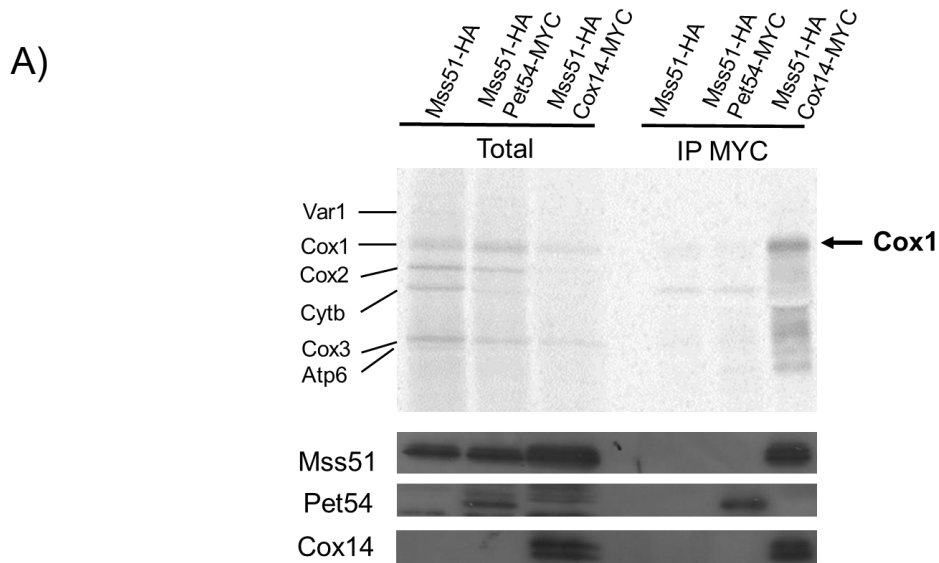


Figura 18. No se detectó inmunoprecipitación de Pet54 con Cox1 o con Mss51. Se realizó una traducción *in organello* con mitocondrias aisladas. Posteriormente se solubilizaron y se inmunoprecipitó a Pet54-3xMYC (A) o a Mss51-3xHA (B). Las proteínas mitocondriales se separaron por SDS-PAGE y se detectaron por autoradiografía. Posteriormente se realizó Western blot con los anticuerpos indicados. A) Se inmunoprecipitó a Pet54-3xMYC para buscar a Cox1 o a Mss51. Como control positivo se utilizó la interacción entre Cox14-3xMYC y Mss51-3xHA. B) Se inmunoprecipitó a Mss51 para buscar a Pet54-3xMYC. Como control positivo se utilizó la interacción entre Mss51-3xHA y Cox1. La fracción total representa el 5% del volumen inmunoprecipitado.

En conclusión, Pet54 y Mss51 interaccionan físicamente entre ellas, sin embargo, nuestros datos sugieren que esta interacción es muy débil y/o transitoria, por lo que sólo se detecta por doble híbrido, mas no mediante BN-PAGE o inmunoprecipitación.

#### **4.3 La mutante $\Delta pet54$ altera la migración de Mss51**

A pesar de que hasta el momento no hemos podido detectar una interacción física entre Mss51 y Pet54, nuestros datos indican que existe una interacción genética de estas proteínas. Por ello decidimos analizar si la mutante  $\Delta pet54$  alteraba la migración de los complejos de Mss51 en geles azules nativos. El modelo establecido dice que en una mutante del ensamblaje de la CcO se disminuyen los niveles de Cox1 porque Mss51 queda atrapado con Cox1 formando complejos COA (con un peso entre 250 y 400 kDa), evitando así que pueda llevar a cabo su papel como activador traduccional. Se ha propuesto que la población de Mss51 que está activa traduccionalmente migra con un peso menor al de los complejos COA, de aproximadamente 180 kDa (Mick D, *et al*, 2010). Para observar los complejos de Mss51 se purificaron mitocondrias con Mss51-3xHA (o sin epítipo como control negativo) y se solubilizaron con digitonina. Las proteínas se separaron por BN-PAGE (Figura 19). De acuerdo a lo reportado en la literatura, Mss51 migró en complejos de 250-400 kDa (representando complejos COA) y de 180 kDa (representando el complejo traduccionalmente activo) (Figura 19, carril 3).

Se observó que en la mutante  $\Delta pet54$  (Figura 19, carril 4) la fracción libre de Mss51 se encuentra en cantidad muy parecida a la silvestre (Figura 19, carril 3). Como referencia se analizaron dos mutantes que bloquean el ensamblaje de la CcO: Pet122, activador traduccional del mRNA de COX3 (Kloeckener-Gruissem B *et al*, 1988), y Cox1, una chaperona esencial para proporcionar el Cu a Cox1 (Car HS, *et al* 2002). De acuerdo a lo esperado, tanto en la mutante  $\Delta pet122$  como en la  $\Delta cox11$  (Figura 19, carriles 5 y 6) se observó un enriquecimiento de los complejos de Mss51 de 250-450 kDa, mientras que el complejo traduccionalmente activo disminuye en ambas mutantes (180 kDa) (Figura 19, carriles 3 y 4). Esto sugiere que la causa por la que la síntesis de Cox1 disminuye en mutantes  $\Delta pet54$  es diferente a lo sugerido para otras mutantes de ensamblaje "tradicionales". Esto también sugiere que la fracción libre de Mss51 en mutantes  $\Delta pet54$  es incapaz de promover la traducción del mRNA de COX1 con eficiencia, y que no basta con que Mss51 esté enriquecido en complejos de 180 kDa.

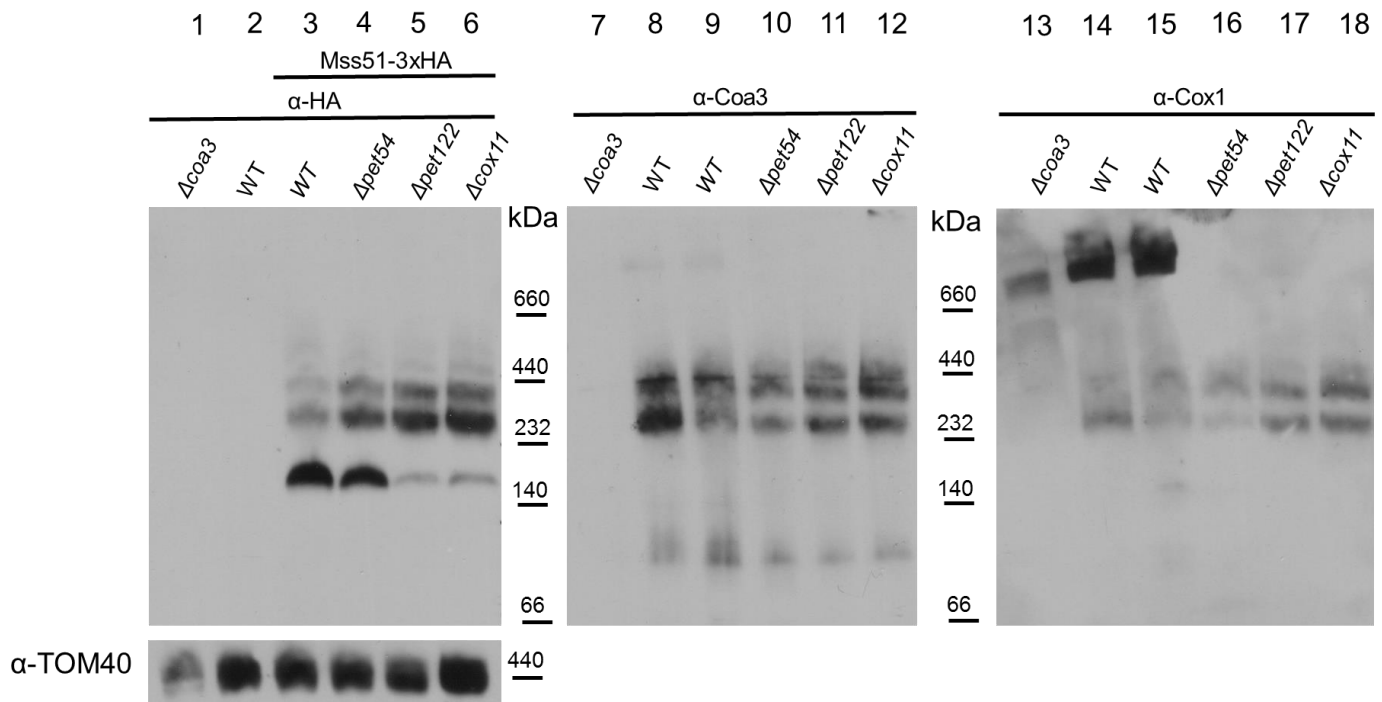


Figura 19. La mutante  $\Delta pet54$  no cambia el patrón de migración de los complejos de Mss51. Se purificaron mitocondrias de las cepas indicadas y 100  $\mu$ g de proteínas mitocondriales se solubilizaron con 1% de digitonina. Se separaron en un gel azul nativo con gradiente 5% al 13% de acrilamida. Posteriormente se llevó a cabo la transferencia de proteínas del gel a una membrana de PVDF y se realizó Western blot con anticuerpos anti-HA ( $\alpha$ -HA), anti-Coa3 ( $\alpha$ -Coa3) o anti-Cox1 ( $\alpha$ -Cox1). Como control negativo de señales inespecíficas se utilizaron mitocondrias en que Mss51 no poseía epítipo. El anticuerpo anti-Tom40 se usó como control de carga.

Por otro lado, quisimos evaluar la integridad de los complejos COA. Esto se realizó detectando mediante Western blot a Coa3. Esta proteína se ha descrito como parte de los complejos COA y junto con Cox14 son reguladores negativos de la síntesis de Cox1. Además se ha descrito que interacciona con los supercomplejos respiratorios (Mick DU, *et al.* 2010). Se utilizó como control negativo de las señales inespecíficas una cepa mutante  $\Delta coa3$  (Figura 19, carril 7). Se observó que Coa3 migraba en complejos de entre 250-450 kDa en todos los casos analizados. Este tamaño corresponde al de los complejos COA (Figura 19, carriles 8-12). Adicionalmente, en el caso de las cepas silvestres se observó una banda de alrededor de 900 kDa que comigra con supercomplejos respiratorios (Figura 19, carriles 8 y 9).

Debido a que el efecto de la mutante  $\Delta pet54$  depende de la presencia de Cox1, quisimos analizar la migración de esta proteína en la mutante  $\Delta pet54$ . Se observó que la mutante  $\Delta coa3$  (Figura 19, carril 13) mostraba un barrido que probablemente corresponde a agregados de Cox1 con otras proteínas, como se ha descrito (McStay GP, *et al.* 2012). En las cepas silvestres se observan complejos de alto peso molecular de alrededor de 250-450 kDa que corresponden a intermediarios de ensamblaje de la CcO (complejos COA) y una banda de alrededor de 900 kDa que corresponde a la formación de supercomplejos (Figura 19, carriles 14 y 15). En las cepas mutantes  $\Delta pet54$ ,  $\Delta pet122$  y  $\Delta cox11$  sólo se observan intermediarios (Figura 19, carriles 16-18).

En conclusión, la mutante  $\Delta pet54$  cambia el patrón de migración de Mss51 de manera diferente a otras mutantes que afectan el ensamblaje de la CcO. En la mutante  $\Delta pet54$ , Mss51 se encuentra en su forma de activador traduccional de manera muy similar a una cepa silvestre y en mayor cantidad a otras mutantes del ensamblaje estudiadas ( $\Delta pet122$  y  $\Delta cox11$ ). Sin embargo no existe mayor síntesis de Cox1 (Figura 12D).

Además, se encontró que la mutante  $\Delta pet54$  no incremento la interacción de Mss51 a los complejos COA. Este comportamiento es diferente al reportado en la Figura 19 para otras mutantes, en que los complejos COA (250-450 kDa) se enriquecen. En la mutante  $\Delta pet54$  el complejo de Mss51, representando su función de activador traduccional, se encuentra en niveles iguales a lo observado en condiciones silvestres. Esto sugiere que Pet54 se requiere para "activar" a Mss51 en su función traduccional.

Dado que la ausencia de Pet54 no afectó la migración de Coa3 en complejos COA, nuestros datos corroboran que Pet54 no afecta a estos complejos. Su función apunta hacia la activación de Mss51 presente en el complejo de 180 KDa.

#### **4.4 Mss51 se encuentra mayoritariamente libre de los complejos COA en las mutantes $\Delta pet54/\Delta cox14$ y $\Delta pet54/Cox1\Delta C15$**

Nuestros datos apoyaban la hipótesis de que en la mutante  $\Delta pet54$ , Mss51 se distribuye entre los complejos COA (250-400 kDa) y traduccional (180 kDa) igual que en la cepa WT (Figura 19). Sin embargo, Mss51 en el complejo traduccional no está activa. Es decir, nuestros datos apoyan que Pet54 se requiere para hacer que Mss51 sea competente en la traducción. Para comprobar esta hipótesis usamos cepas en que todo Mss51 se encuentra en el complejo traduccional de 180 kDa. Para ello utilizamos la mutante  $\Delta cox14$ . En este caso sabemos que toda Mss51 se encuentra en su forma traduccionalmente activa, pues los complejos COA pierden estabilidad (Barrientos et al, 2004). Posteriormente combinamos la mutación  $\Delta cox14$  con la mutación  $\Delta pet54$  y analizamos cómo migraban los

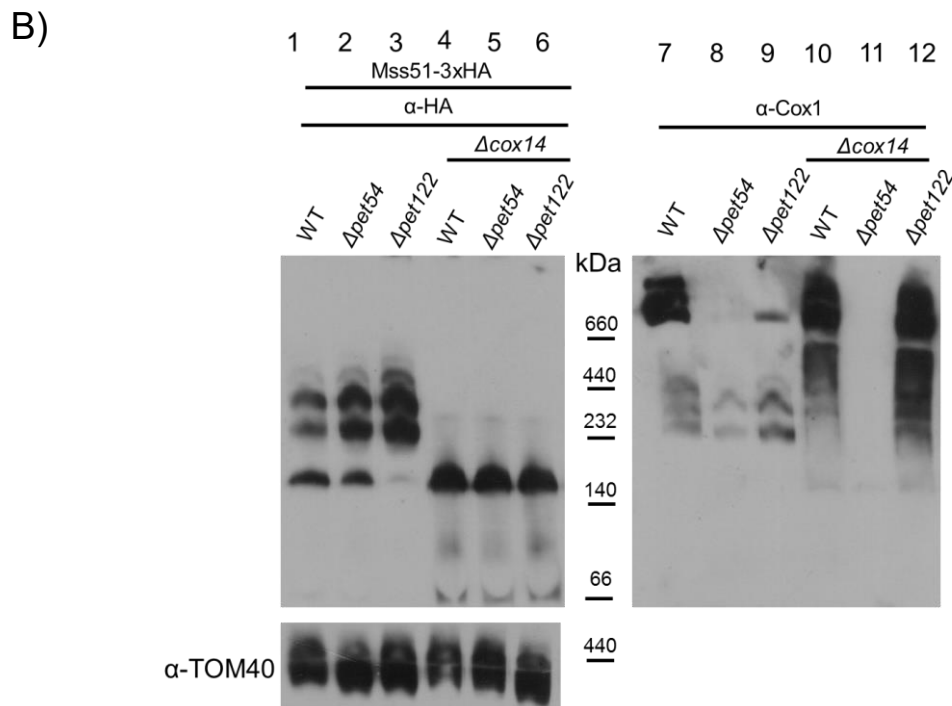
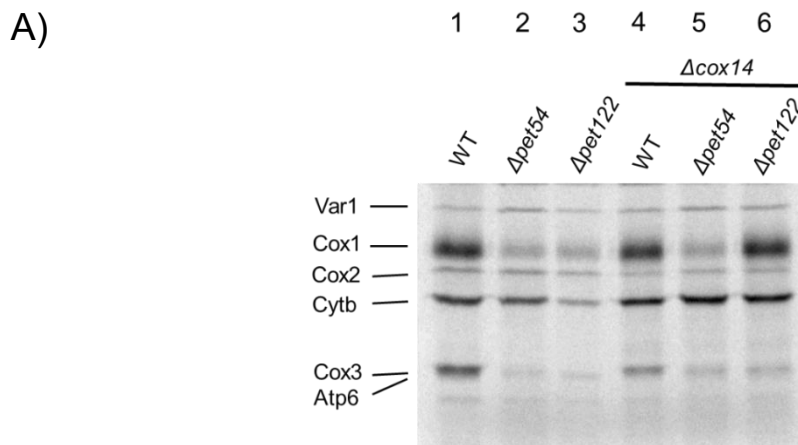
complejos de Mss51. También se comparó la migración de Mss51 en BN-PAGE de las dobles mutantes  $\Delta\text{cox14}/\Delta\text{pet122}$ , ya que  $\Delta\text{pet122}$  representa al comportamiento de la mayoría de mutantes de ensamblaje de la CcO (Figura 20). De acuerdo a la literatura, en un experimento de traducción *in vivo* se observó que las mutantes  $\Delta\text{pet54}$  y  $\Delta\text{pet122}$  disminuyen la síntesis de Cox1 (Figura 20A, carriles 2 y 3). Sin embargo, la doble mutante  $\Delta\text{pet54}/\Delta\text{cox14}$  no recuperó la síntesis de Cox1 (Figura 20A, carril 5), a diferencia de la doble mutante  $\Delta\text{pet122}/\Delta\text{cox14}$  (Figura 20A, carril 6), en donde sí se recuperó la síntesis de Cox1. La distribución de Mss51-3xHA en las dobles mutantes  $\Delta\text{pet54}/\Delta\text{cox14}$  y  $\Delta\text{pet122}/\Delta\text{cox14}$ , se analizó mediante BN-PAGE. Se encontró que en las mutantes  $\Delta\text{cox14}$ ,  $\Delta\text{pet54}/\Delta\text{cox14}$  y  $\Delta\text{pet122}/\Delta\text{cox14}$ , Mss51 se encuentra libre formando el complejo de 180 kDa (Figura 20B, carriles 4, 5 y 6). En el caso de las mutantes  $\Delta\text{cox14}$  y  $\Delta\text{pet122}/\Delta\text{cox14}$ , esta condición parece ser suficiente para que la síntesis de Cox1 se reactive a niveles silvestres, aunque la CcO no se ensamble. En contraste, la mutante  $\Delta\text{pet54}/\Delta\text{cox14}$  sigue presentando una baja eficiencia en la síntesis de Cox1.

Esta membrana se incubó con el anticuerpo anti-Cox1. Las mutantes  $\Delta\text{cox14}$  y  $\Delta\text{pet122}/\Delta\text{cox14}$  mostraron la presencia de agregados de Cox1 (carril 10 y 12) con Var1, Cox2 y Cytb, que previamente se reportaron como consecuencia de eliminar a Cox14 (McStay GP, *et al* 2013). Llama la atención que en el caso de la mutante  $\Delta\text{pet54}/\Delta\text{cox14}$  no se detectó señal de Cox1, sugiriendo una gran inestabilidad de Cox1 en dicha mutante (Figura 20A, carril 5 y Figura 20B carril 11).

La ausencia de señal de Cox1 en BN-PAGE podía deberse a una gran inestabilidad de Cox1 en la doble mutante  $\Delta\text{pet54}/\Delta\text{cox14}$ , o podría deberse a que los epítopos que reconoce el anticuerpo anti-Cox1 se encuentran ocultos en el gel nativo, tal vez debido a que Cox1 cambia de conformación en ausencia de Cox14 y Pet54. Por ello se analizaron las mismas muestras de la Figura 20A y B en un gel desnaturizante SDS-PAGE y Western blot (Figura 20C). Como era de esperarse, la cantidad de Cox1 bajó en todas las mutantes respecto a la cepa silvestre. Sin embargo, la mutante doble  $\Delta\text{pet54}/\Delta\text{cox14}$  no mostró señal alguna



de Cox1 (carril 5). Este dato corrobora nuestra observación de que en geles nativos no se detecta Cox1 en esta mutante doble, e indica que esto se debe a una mayor inestabilidad de Cox1. Esto podría deberse a que la poca Cox1 que se sintetiza en la mutante  $\Delta pet54$  es degradada rápidamente en la ausencia de la chaperona Cox14, ya que la doble mutante  $\Delta pet54/\Delta cox14$  es incapaz de recuperar la síntesis de Cox1. Esto está de acuerdo con la ausencia de Cox1 en geles nativos. Cox2 muestra mayor inestabilidad que Cox3 en estas mutantes de ensamblaje, al contrario que Cytb, en el que no se detectó ninguna alteración en sus niveles de expresión.



C)

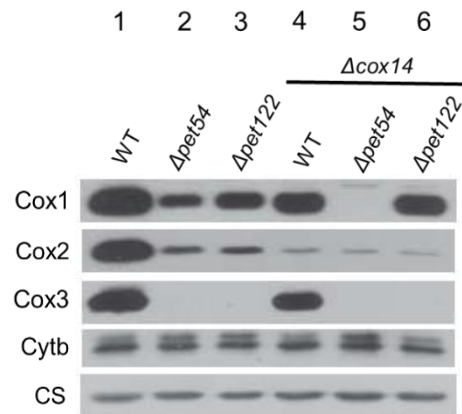


Figura 20. Pet54 se requiere para activar la forma traduccional de Mss51. A) Traducción de proteínas mitocondriales con  $[S^{35}]$ -Met. Se separaron las proteínas mitocondriales mediante SDS-PAGE, se transfirieron a membrana PVDF y se detectaron por autoradiografía. B) Se purificaron mitocondrias de las cepas indicadas y 100  $\mu\text{g}$  de proteínas mitocondriales se solubilizaron con digitonina al 1% y se cargaron en un gel azul nativo del 5% al 13%. Se transfirieron a membrana PVDF y se realizó western blot con los anticuerpos indicados. C) Western blot de las cepas de A y B).

Adicionalmente las cepas  $\Delta\text{cox14}$  y  $\Delta\text{coa3}$ , se ha observado que una cepa que carece de los últimos 15 amino ácidos en Cox1 tampoco regula la síntesis de Cox1 (Shingú-Vázquez et al, 2010). Lo primero que quisimos averiguar fue si Mss51 se distribuía de manera diferente en una cepa Cox1 $\Delta$ C15 respecto a la silvestre. Y después nos preguntamos si la mutante  $\Delta\text{pet54}/\text{Cox1}\Delta\text{C15}$  afectaba la distribución de los complejos de Mss51.

Para ello se aislaron mitocondrias de las cepas silvestres y de la mutante Cox1 $\Delta$ C15 y se solubilizaron con digitonina al 1%. Al analizar por western blot geles BN-PAGE encontramos que la mutante Cox1 $\Delta$ C15 presentó un mayor enriquecimiento del complejo de 180 kDa que la cepa silvestre (Figura 21, carriles 1 y 2). Al combinar Cox1 $\Delta$ C15 con la mutación  $\Delta\text{pet54}$  o  $\Delta\text{pet122}$  se observó que

la banda de 180 kDa seguía enriquecida de manera similar a lo observado en Cox1 $\Delta$ C15 (Figura 21, carriles 3 y 4). En el caso de Pet122 este enriquecimiento explica por qué la mutante  $\Delta$ pet122/Cox1 $\Delta$ C15 sintetiza a Cox1 a niveles silvestres (Figura 9). Sin embargo, la mutante  $\Delta$ pet54/Cox1 $\Delta$ C15 no fue capaz de recuperar la síntesis de Cox1 (Figura 9). Estos datos corroboran que en ausencia de Pet54, Mss51 se encuentra, en el complejo de 180 kDa, en cantidad suficiente para activar potencialmente la traducción del mRNA de COX1. Sin embargo esta proteína no se encuentra capacitada para sintetizar eficientemente a Cox1.

Adicionalmente, se observó que Cox1 y Cox1 $\Delta$ C15 forman supercomplejos (Figura 21, carriles 5 y 6), mientras que en ausencia de Pet54 o Pet122 no hay supercomplejos (Figura 21, carriles 7,8), como era de esperarse dado que la CcO no se ensambla.

En conclusión, nuestros datos indican que Pet54 se requiere para activar traduccionalmente a Mss51. En ausencia de Pet54, la síntesis de Cox1 es muy reducida.

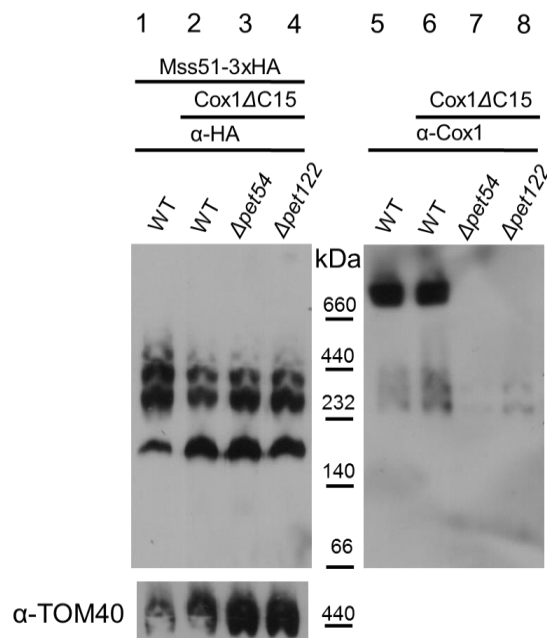


Figura 21. La eliminación del extremo C-terminal de Cox1 no es suficiente para restaurar la síntesis de Cox1 en las mutantes  $\Delta$ pet54. Se purificaron mitocondrias de las cepas indicadas y 100  $\mu$ g de

proteínas mitocondriales solubilizadas con digitonina al 1% se cargaron en un gel azul nativo del 5% al 13% de acrilamida. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF y se realizó el Western blot con los anticuerpos indicados.

### 5. La mutante *mss51*<sup>F199I</sup> recupera la síntesis de Cox1 en la mutante $\Delta$ *pet54*

Recientemente se describió que Mss51 une grupos hemo *b* mediante dos motivos CP (CPX). Si se mutaban las cisteínas de dichos motivos la síntesis de Cox1 disminuía dramáticamente. Al igual que lo observado en las mutantes  $\Delta$ *pet54*, dicha disminución no se recuperaba al eliminar a Cox14 o al extremo C-terminal de Cox1 (Soto IC *et al*, 2012). Se sabe que la hemilación de Mss51 afecta la estructura de Mss51, y que a su vez, el grado de hemilación de Mss51 depende del estado redox (Soto IC *et al*, 2016). La pregunta era si Pet54 y la hemilación de Mss51 podrían ser parte de una misma vía dado que compartían fenotipo. Previamente se demostró que una mutación puntual en Mss51 (F199I) podía compensar la mutación de los motivos CPX, logrando una recuperación de la eficiencia de síntesis de Cox1 (Soto IC *et al*, 2012). Aldo E. García-Guerrero, en nuestro laboratorio, encontró que *Mss51*<sup>F199I</sup> podía también compensar a una mutante  $\Delta$ *pet54*, recuperando la síntesis de Cox1 a niveles silvestres (Figura 22) (Mayorga JP *et al*, 2016). Esta observación sugiere que Pet54 puede modular la estructura de Mss51 o su estado de hemilación para transformarla en una proteína activa en traducción.

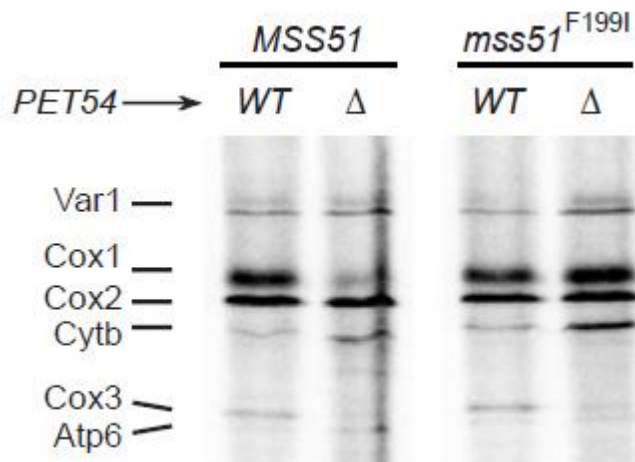


Figura 22. Pet54 podría modular la conformación o hemilación de Mss51. Se realizó un ensayo de traducción *in vivo* de cepas silvestres y de la mutante  $\Delta pet54$  conteniendo a Mss51 y Mss51<sup>F199I</sup>. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE y resueltas por autoradiografía como en la Fig. 9.

## 6. Pet54 interactúa físicamente con el mRNA de COX1

Debido a que Pet54 es una proteína de la familia RRM, era factible que pudiera interactuar físicamente con el extremo 5'-UTR del mRNA de COX1, sitio de acción de Pet54. Yolanda Camacho-Villasana, en nuestro laboratorio, inmunoprecipitó a Pet54-3xMYC, aisló RNA y analizó la presencia de COX1 mediante transcripción reversa y PCR (Figura 23) (Mayorga JP *et al*, 2016). Se encontró que Pet54 interactúa con el mRNA de COX1, y que dicha interacción no depende de la presencia o ausencia de Mss51.

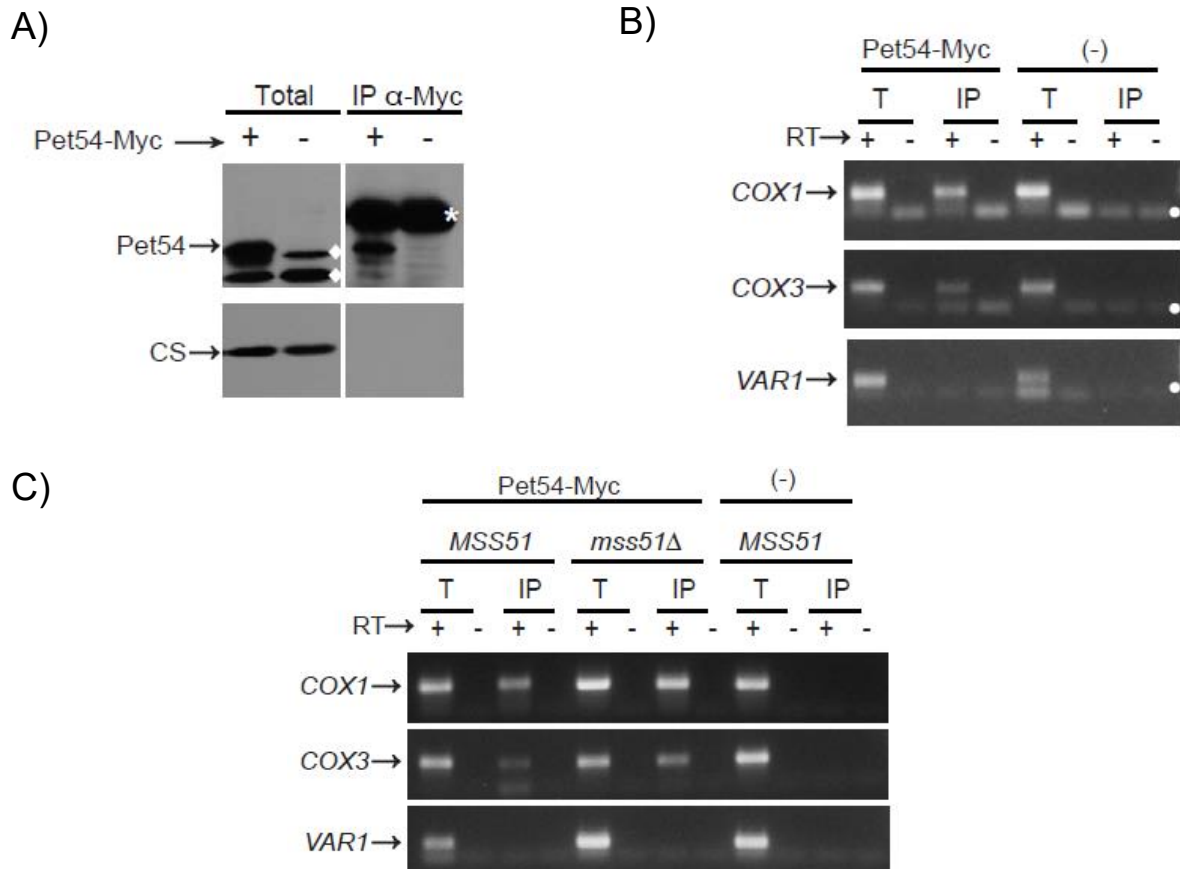


Figura 23. Pet54 interacciona con el mRNA de COX1 y esta interacción es independiente de Mss51. A) Las mitocondrias con Pet54-3xMYC o Pet54 (-) se solubilizaron con dodecil maltosido. El extracto se inmunoprecipitó con un anticuerpo anti-MYC. Una cuarta parte del inmunoprecipitado (IP) se separó mediante SDS-PAGE y se analizó por western blot con anticuerpos anti-MYC y anti-citrato sintasa (como control de una proteína que no tiene que interaccionar con Pet54). La fracción total representa el 5% del extracto mitocondrial usado para la inmunoprecipitación. Los asteriscos indican bandas inespecíficas para la IP (\*). Los rombos indican bandas inespecíficas cuando se usó el anticuerpo anti-Myc. B) Se extrajo RNA de la fracción total (T) y de los inmunoprecipitados (IP). Cada fracción se dividió en dos, y el cDNA se preparó en presencia (+) o en ausencia (-) de la enzima transcriptasa reversa (RT) usando primers para los extremos 5'UTR de *COX1*, *COX3* (control positivo de interacción) y *VAR1* (control negativo de interacción). Los productos se separaron en un gel de agarosa. C) Se llevó a cabo un experimento similar al de A) y B), pero esta vez se incluyó una cepa  $\Delta mss51$ .

## DISCUSIÓN

Cox1 es el primer intermediario del ensamblaje de la CcO, y su degradación y síntesis están muy reguladas. Cuando existe un defecto del ensamblaje de la CcO la cantidad de Cox1 disminuye para evitar que se formen intermediarios que produzcan especies reactivas de oxígeno dañinas para la célula (Khalimonchuk, O, *et al* 2007). Sabemos que la síntesis de Cox1 tiene un mecanismo de regulación muy complejo, donde intervienen por lo menos 5 proteínas específicas (Mick DU *et al*, 2012). En este trabajo demostramos que Pet54 es un factor adicional involucrado en permitir que el mRNA de COX1 se traduzca con eficiencia. Pet54 se describió originalmente como activador de la traducción del mRNA de COX3 (Brown NG *et al*, 1994) y como factor necesario para el procesamiento del intrón al5 $\beta$  del transcrito de COX1 (Valencik M *et al*, 1989).

En la primera parte de este trabajo describimos cómo se identificó esta tercera función de Pet54. La mayoría de las mutantes de ensamblaje de la CcO disminuyen la síntesis de Cox1 y la recuperan cuando su extremo carboxilo terminal se elimina (Cox1 $\Delta$ C15) (Shingú-Vázquez *et al*, 2010). Analizando si este fenómeno se daba en una amplia gama de mutantes que bloquean el ensamblaje de la CcO nos encontramos con que  $\Delta$ pet54 era la única mutante analizada que se comportaba diferente. En este caso, la síntesis de Cox1 $\Delta$ C15 no se recuperaba (Shingú-Vázquez *et al*, 2010). Encontramos que este efecto no se debió a la falta de Cox3 ya que al eliminar a Pet122 y a Pet494, los otros dos activadores traduccionales del mRNA de COX3, Cox1 $\Delta$ C15 sí recuperaba sus niveles de síntesis. De esta forma pensamos que Pet54 tendría un papel específico regulando la síntesis de Cox1. Cabe mencionar que Pet54 no es absolutamente requerido para que Cox1 se sintetice, ya que en una mutante  $\Delta$ pet54 se detectan niveles muy bajos de síntesis. Esta proteína se requiere para que la traducción del mRNA de COX1 sea eficiente, y se dé a niveles silvestres.

El ciclo regulador que coordina la síntesis de Cox1 con su ensamblaje depende no sólo del extremo carboxilo terminal de Cox1, sino también de las proteínas Cox14 y Coa3. En ausencia de estas proteínas la síntesis de Cox1 tiene niveles silvestres

aunque no haya ensamblaje de la CcO, probablemente al perder la capacidad de retener a Mss51 en los complejos COA (Barrientos A *et al*, 2004; Mick DU *et al*, 2010). En este trabajo encontramos que el efecto de la mutante  $\Delta pet54$  no sólo es independiente del extremo C-terminal de Cox1, sino también de Cox14 y Coa3. Es decir, las mutantes  $\Delta pet54/\Delta cox14$  y  $\Delta pet54/\Delta coa3$  no recuperaron la síntesis de Cox1.

De manera sorprendente, en este trabajo encontramos que el efecto de la mutante  $\Delta pet54$  sobre los UTR's de COX1 dependía de la cantidad de proteína Cox1 presente. Mientras más Cox1 había, mayor era el efecto de Pet54 sobre su síntesis. Esto nos llevó a proponer un modelo en donde la activación/desactivación de la forma traduccional de Mss51 depende de la proteína Cox1 (Figura 24, más adelante).

En el modelo actual de regulación de la síntesis de Cox1 se plantea que lo que importa es que Mss51 esté libre de los complejos COA para ser activo traduccionalmente (Barrientos A *et al*, 2004). Sin embargo nuestros resultados demuestran que hay otros requerimientos para que Mss51 sea competente como activador traduccional. Nuestros experimentos sugieren que en condiciones en que Mss51 se encuentra separada de los complejos COA, esta proteína no traduce con eficiencia al mRNA de COX1 si no está Pet54. Lo que sigue es comprender qué hace Pet54 a Mss51 para activarla.

Con todos nuestros descubrimientos llegamos a un modelo de acción de Pet54:

1.- Primero Mss51, en su forma libre, activa la traducción del mRNA de COX1. 2.- Posiblemente al interactuar con Cox1 (dentro del complejo COA conformado también por Cox14 y Coa3), Mss51 modifique su conformación actuando como chaperona. Esta conformación le impediría actuar como activador traduccional (se desactiva). Esto explicaría por qué se requiere de la presencia de la proteína Cox1 para observar el fenotipo de mutantes  $\Delta pet54$ . 3.- Conforme se van adheriendo las subunidades de la CcO, Mss51 se libera pero aún en su forma inactiva en



traducción. 4.- Pet54 tendría la función de reorganizar la conformación de Mss51 (o la hemilación de Mss51) para activarla en traducción. 5.- Mss51 llevaría a cabo un nuevo ciclo de traducción del mRNA de COX1, posiblemente ayudado por la interacción de Pet54 con el mRNA de COX1 (Figura 24).

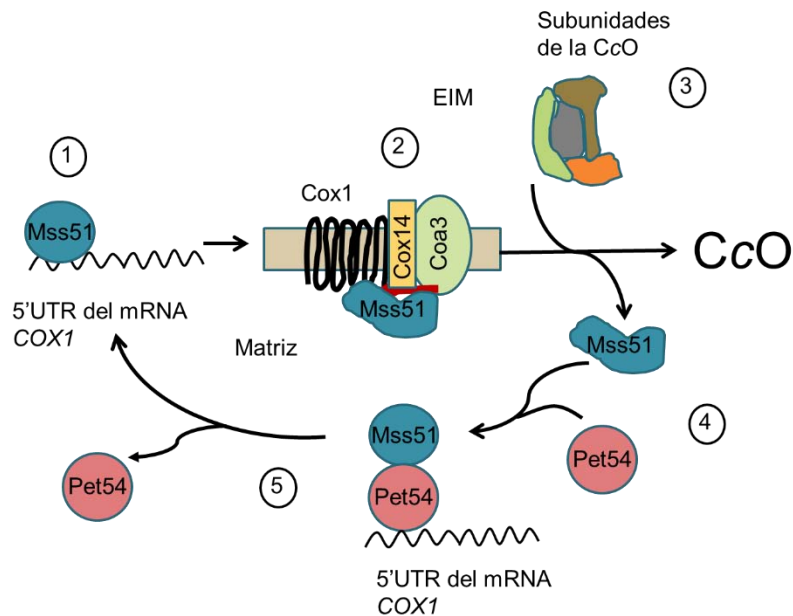


Figura 24. Modelo de la función de Pet54 en la síntesis de Cox1. Pet54 tendría el papel de reorganizar la conformación de Mss51 para que esta proteína pueda llevar a cabo la activación traduccional del mRNA de COX1.

Recientemente se describió una tercera mutante,  $\Delta mam33$ , que no recupera la síntesis de Cox1 $\Delta$ C15. Mam33 es una proteína mitocondrial a la que no se le había encontrado una función. Sin embargo, se descubrió que actúa como un activador traduccional del mRNA de COX1. En la mutante  $\Delta mam33$ , la síntesis de Cox1 disminuye, sobre todo, en fuentes de carbono fermentables (Roloff GA and Henry MF 2015). Con el descubrimiento de esta proteína y de la nueva función de Pet54 aquí descrita se hace aún complejo el sistema de regulación de la síntesis de Cox1.

En la mitocondria existe una interrelación muy compleja entre los factores que tienen que ver con el ensamblaje de la CcO. Se ha descrito que muchos de los activadores traduccionales interaccionan entre sí de manera que podría coordinarse para un correcto ensamblaje de la CcO. Pet54 se ha encontrado que interacciona con Pet309, activador traduccional del mRNA de COX1, y con Pet111, activador traduccional del mRNA de COX2 (Towpik J 2005). Esto sugiere que esta interacción es funcional, y que serviría para coordinar el ensamblaje de los tres módulos cuyos centros de nucleación son las subunidades mitocondriales Cox1, Cox2 y Cox3.

Pet54 podría tener funciones adicionales en la biogénesis de la CcO. Esta proteína se encuentra formando parte de supercomplejos III-IV (Vukotic, M *et al*, 2012). Además, en este trabajo se demostró que la proteína Cox1 es particularmente inestable en la mutante doble  $\Delta pet54/\Delta cox14$ . Cox14 es indispensable para evitar que Cox1 se agregue entre sí y con otras proteínas mitocondriales como Var1 (McStay GP *et al*, 2013). Tal vez Pet54 también desempeña un papel estabilizando a Cox1 agregada, y por eso las dobles mutantes  $\Delta pet54/\Delta cox14$  contienen cantidades inusualmente bajas de la proteína Cox1.

El control sobre la síntesis de Cox1 esta conservado ampliamente en diversos organismos. Se ha encontrado que muchos ortólogos de los factores que regulan la síntesis de Cox1, desde levaduras hasta humanos. Recientemente se ha descrito un ortólogo de Cox14 en humano llamado C12orf62, y que tiene una función estabilizando tanto a Cox1 como a Cox2 y Cox4 (Szklarczyk R *et al*, 2012). Mss51 se encuentra conservado en el reino de los hongos y se ha propuesto un ortólogo en humano llamado ZMYND17 (Soto IC *et al*, 2012). Sin embargo, se ha observado que en ratones es un factor que regula el metabolismo del músculo esquelético (Moyer AL y Wagner KR, 2015). Hasta la fecha no se ha encontrado un ortólogo de Pet54 en humano.

La regulación de la síntesis de proteínas codificadas en el genoma nuclear no es exclusiva de las proteínas de la CcO. Se ha observado que citocromo *b*, la única subunidad codificada en el genoma mitocondrial del complejo III, también muestra una regulación en su síntesis similar a la de Cox1. Cbp3 y Cbp6 tienen una función dual ya que promueven la síntesis del mRNA de COB y además interaccionan con la proteína Cob recién sintetizada. Conforme se van agregando las subunidades del complejo III Cbp3 y Cbp6 se liberan de Cob y pueden llevar a cabo un nuevo ciclo de traducción del mRNA de COB (Gruschke S *et al*, 2011; Herrmann J *et al*, 2012; Gruschke S *et al*, 2012).

Recientemente se han descrito casos en los que una proteína tiene más de una función. A estas proteínas se las ha dado el nombre de proteínas “moonlighting” o multifuncionales. Estas proteínas son aquellas que utilizan diferentes regiones en su secuencia para llevar a cabo diferentes funciones, la mayoría regulatorias o estructurales (Khersonsky O and Tawfik DS, 2010). Existe una amplia descripción de proteínas moonlighting en levadura pero un caso muy particular se da en la mitocondria con la aconitasa. Esta enzima forma parte de ciclo de los ácidos tricarboxílicos y además se encuentra asociada con los nucleoides mitocondriales (Chen XJ *et al*, 2005). Mutantes  $\Delta aco1$  muestran inestabilidad de mtDNA y se vuelven incapaces de crecer en un medio respiratorio. Sin embargo, existen mutantes de Aco1 sin actividad catalítica pero que pudieron mantener estable el mtDNA. Nuevas funciones están siendo descritas para proteínas y es de esperar que aparezcan nuevas funciones para proteínas mitocondriales.

Otro ejemplo de proteína multifuncional mitocondrial es la NAD<sup>+</sup>-isocitrato deshidrogenasa. Esta enzima forma parte del ciclo de Krebs, llevando a cabo la descarboxilación oxidativa del isocitrato. Además de esta función se demostró que se unía a los 5'UTR de los ocho transcritos mitocondriales (Elzinga SD *et al*, 1993). Esta unión disminuía los niveles de expresión de las proteínas codificadas en el genoma mitocondrial. Así mismo, se demostró que la unión del 5'UTR de COX2 inhibía significativamente la actividad de la NAD<sup>+</sup>-isocitrato deshidrogenasa

(Sondra L *et al*, 2000). Esto demuestra la capacidad de ciertas proteínas de realizar varias funciones y en especial la NAD<sup>+</sup>-isocitrato deshidrogenasa muestra otra forma de regular la expresión de los genes mitocondriales dependiendo del estado del ciclo de Krebs.

Pet54 es una proteína multifuncional y contiene un dominio RRM. Estos son el dominio de unión a RNA más abundante en los organismos. Estos dominios existen tanto en virus y bacterias hasta en células eucariontes (Maris C *et al*, 2005). Se ha observado que no sólo son importantes para la unión a RNA si no que también son necesarios para la unión de proteínas. Incluso se ha observado en algunas proteínas que los dominios RRM no unen RNA sino que unen exclusivamente proteínas (Fribourg S *et al*, 2003). De esta manera los motivos RRM son muy versátiles y ampliamente utilizados en todos los organismos. Ya que en Pet54 no se predicen otros dominios funcionales, se puede pensar que el dominio RRM en Pet54 cumpla otras funciones además de unir RNA.

## Conclusiones

- La síntesis de Cox1 disminuye dramáticamente en mutantes  $\Delta pet54$ , y esta disminución es independiente de Cox14 y de Coa3.
- Pet54 actúa sobre los extremos UTR del mRNA de COX1, pero su función depende de la presencia y cantidad de proteína Cox1.
- Pet54 migra en un complejo de 190 KDa cuya estabilidad depende parcialmente de Mss51.
- Pet54 interacciona débilmente con Mss51.
- Pet54 regula la distribución de complejos proteicos de Mss51. Una mutante  $\Delta pet54$  aumenta la población de Mss51 que tiene la función de activar la traducción del mRNA de COX1.
- La doble mutante  $\Delta pet54/\Delta cox14$  y la mutante  $\Delta pet54/Cox1\Delta C15$  mantienen mayoritariamente a Mss51 en su fracción de activador traduccional. Sin embargo, esta fracción de Mss51 es incapaz de traducir al mRNA de COX1 eficientemente.

## Perspectivas

- Investigar los factores con los cuales Pet54 forma complejos de alto peso molecular. La elucidación de este complejo puede llevar a un mayor esclarecimiento de su función. Para ello, propongo realizar un experimento de pulldown de pet54 y por medio espectrometría de masas identificar qué proteínas se encuentran asociadas a Pet54.
- Estudiar si en la mutante  $\Delta pet54$ , Mss51 presenta un defecto en la unión a hemo. Las mutantes de Mss51 de unión a grupo hemo son las únicas descritas hasta la fecha que se comportan como la mutante  $\Delta pet54$ . Esto sugiere una posible relación entre los dos fenotipos. Para ello, propongo realizar un pulldown de Mss51 en cepas con la mutante  $\Delta pet54$  y detectar si el espectro de los grupos hemo de Mss51 se encuentra afectado.
- Identificar las regiones de Pet54 que llevan a cabo la regulación de la síntesis de Cox1. Se ha demostrado que Pet54 contiene diferentes regiones que afectan la expresión de COX1 y la expresión de COX3. Para ello, propongo hacer mutaciones al azar de Pet54 e identificar que mutantes sólo afectan la síntesis de Cox1.
- Identificar el sitio de unión de Pet54 al 5'UTR del mRNA de COX1. Para ello, propongo que se sobre-exprese y purifique a la proteína Pet54 para realizar ensayos de interacción con fragmentos del extremo 5'UTR de COX1 y analizarlos mediante retraso en la movilidad en geles.



## A Novel Function of Pet54 in Regulation of Cox1 Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondria\*

Received for publication, February 14, 2016; Published, JBC Papers in Press, February 29, 2016; DOI 10.1074/jbc.M116.721985

Juan Pablo Mayorga<sup>1</sup>, Yolanda Camacho-Villasana<sup>1</sup>, Miguel Shingú-Vázquez<sup>2</sup>, Rodolfo García-Villegas<sup>1</sup>, Angélica Zamudio-Ochoa<sup>1</sup>, Aldo E. García-Guerrero<sup>1</sup>, Greco Hernández<sup>3</sup>, and Xochitl Pérez-Martínez<sup>5</sup>

From the <sup>1</sup>Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico, the <sup>2</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Biomedical Sciences Monash University, Clayton, Victoria 3800, Australia, and the <sup>3</sup>Division of Basic Research, National Institute of Cancer (INCan), Mexico City 14080, Mexico

**AQ: A** Cytochrome *c* oxidase assembly requires the synthesis of the mitochondria-encoded core subunits, Cox1, Cox2, and Cox3. In yeast, Pet54 protein is required to activate translation of the *COX3* mRNA and to process the *als5β* intron on the *COX1* transcript. Here we report a third, novel function of Pet54 on Cox1 synthesis. We observed that Pet54 is necessary to achieve an efficient Cox1 synthesis. Translation of the *COX1* mRNA is coupled to the assembly of cytochrome *c* oxidase by a mechanism that involves Mss51. This protein activates translation of the *COX1* mRNA by acting on the *COX1* 5'-UTR, and, in addition, it interacts with the newly synthesized Cox1 protein in high molecular weight complexes that include the factors Coa3 and Cox14. Deletion of Pet54 decreased Cox1 synthesis, and, in contrast to what is commonly observed for other assembly mutants, double deletion of *cox14* or *coa3* did not recover Cox1 synthesis. Our results show that Pet54 is a positive regulator of Cox1 synthesis that renders Mss51 competent as a translational activator of the *COX1* mRNA and that this role is independent of the assembly feedback regulatory loop of Cox1 synthesis. Pet54 may play a role in Mss51 hemylation/conformational change necessary for translational activity. Moreover, Pet54 physically interacts with the *COX1* mRNA, and this binding was independent of the presence of Mss51.

**Tn3** Cytochrome *c* oxidase (C<sub>o</sub>O)<sup>3</sup> is the last electron acceptor of the mitochondrial respiratory chain. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, this enzyme contains 12 subunits, three of which (Cox1, Cox2, and Cox3) are encoded by the mitochondrial

DNA. Assembly of C<sub>o</sub>O is a complex process regulated by more than 25 factors and chaperones (for reviews, see Ref. 1). The first steps of C<sub>o</sub>O biogenesis involve the translational activation of the mitochondria-encoded mRNAs *COX1*, *COX2*, and *COX3* by mRNA-specific proteins. Translational activation of the *COX1* mRNA depends on Pet309 and Mss51 (2, 3), whereas *COX2* translation depends on Pet111 (4, 5), and *COX3* mRNA translation depends on Pet54, Pet122, and Pet494 (6–9). These proteins act on the target mRNA 5'-UTRs to allow translation by the mitochondrial ribosomes. They interact with each other and with the mitochondrial inner membrane and are thought to tether translation initiation close to the assembly sites of C<sub>o</sub>O in the membrane (for a review, see Ref. 10) (11). The mitochondria-encoded Cox1, Cox2, and Cox3 subunits are proposed to assemble from three different modules, each containing a specific subset of nucleus-encoded subunits (12–14).

Cox1, the largest subunit of the C<sub>o</sub>O, carries the heme *aa*<sub>3</sub>-Cu<sub>B</sub> center to reduce oxygen. Synthesis of Cox1 inside mitochondria is highly regulated. If C<sub>o</sub>O assembly is blocked by mutations on either integral subunits or accessory chaperones, Cox1 synthesis is down-regulated (15, 16). It is proposed that by this mechanism, mitochondria avoids accumulation of pro-oxidant Cox1 intermediates (17). In addition to its role as translational activator of *COX1* mRNA, Mss51 also physically interacts with Cox1 protein to form the first high molecular weight intermediates (COA complexes) that include the chaperones Cox14 and Coa3 (15, 18–20). The current model (reviewed in Refs. 1 and 21) states that if C<sub>o</sub>O assembly is defective, then Mss51 is sequestered on COA intermediates to reduce the effective concentration of Mss51 as a translational activator of the *COX1* mRNA, resulting in a decrease of Cox1 synthesis. In this context, Cox14 and Coa3 are negative regulators, because their deletion restores Cox1 synthesis when assembly of C<sub>o</sub>O is deficient (15, 18, 19). The C-terminal end of Cox1 is also a negative regulator of Cox1 synthesis. Deletion of the last 11–15 residues of the Cox1 C-terminal end results in normal Cox1 synthesis even if C<sub>o</sub>O is not assembled (16). In addition to the first intermediates formed by Cox1, Mss51, Cox14, and Coa3, subunit 1 forms subsequent intermediates (12, 22) that include proteins like Coa1 (23, 24), Shy1 (23, 25, 26), subunits Cox5/Cox6 (19), Coa2 (25), and Cox15 (26). Moreover, the Hsp70 chaperone Ssc1 is associated with both Mss51 and Mss51-containing complexes and regulates Cox1 synthesis as well (27). Mss51 contains two heme-regulating motifs. These motifs are

\* This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Grant 47514 (to X. P.-M.) and Fellowships 238399 (to J. P. M.), 298994 (to A. Z.-O.), 255917 (to A. E. G.-G.), and 250726 (to R. G.-V.); the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica; Universidad Nacional Autónoma de México Grants IN208711 and IN204414 (to X. P. M.); the Fundación Miguel Alemán, A.C. (to X. P. M.); and the National Institute of Cancer (to G. H.). This manuscript is part of the Ph.D. thesis of J. P. M. from the Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

<sup>1</sup> Both authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed. Tel.: 52-55-5622-56662; Fax: 52-55-5622-5630; E-mail: xperez@ifc.unam.mx.

<sup>3</sup> The abbreviations used are: C<sub>o</sub>O, cytochrome *c* oxidase; ARG<sup>69</sup>, mitochondria-encoded acetylornithine aminotransferase; RRM, RNA recognition motif; Mss51<sup>h</sup>, translation-effective Mss51; Mss51<sup>i</sup>, translational inactive Mss51; BN-PAGE, blue native PAGE; BisTris, 2-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-2-hydroxymethylpropane-1,3-diol; COA, cytochrome oxidase assembly.

**AQ: MM**

### Pet54 Regulates COX1 Translation

important for hemylation of the protein and are involved in Cox1 regulation by Mss51 (28).

AQ:K

During the investigation of the role of the Cox1 C-terminal end in the Cox1 synthesis regulatory loop, we observed that Pet54 showed an unusual pattern. Deletion of *PET54* down-regulated Cox1 synthesis; however, in contrast to what was observed for most assembly mutants, deletion of the Cox1 C-terminal end did not recover Cox1 synthesis (16), indicating that Pet54 plays an additional role in this process.

AQ:L

Pet54 is a nuclear encoded, RNA recognition motif (RRM) protein located on the matrix face of the inner mitochondrial membrane as a peripheral protein (29). In addition to its role as translational activator of the *COX3* mRNA (7), Pet54 is required for splicing of the *at5b* intron on the *COX1* pre-mRNA (30). *In vitro* experiments demonstrated that Pet54 binds with the *COX1* pre-mRNA *at5b* intron and the *COX3* mRNA 5'-UTR, both regions sharing 56% identity (31). In the present work, we demonstrated that Pet54 plays a third, novel role in Cox1 synthesis regulation that is independent of Cox14, Coa3, and the Cox1 C-terminal end. We also provide data showing that Pet54 is necessary for activation of translational competent Mss51, probably by binding to the *COX1* mRNA and by modulating the hemylation state and/or conformation of Mss51.

### Experimental Procedures

AQ:M

**Yeast Strains and Genetic Methods**—*S. cerevisiae* strains used in this study are listed in Table 1. Genetic manipulation methods and media were as described previously (32). Strains were cultured in a complete fermentable medium, YPD or YPGal (1% yeast extract, 2% Bacto-peptone, and 2% glucose or 2% galactose), or synthetic complete medium (0.67% yeast nitrogen base, 2% glucose) lacking the indicated amino acids. Nuclear deletion constructs with *URA3*, *I::LL2*, or *KanMX4* cassettes were made by PCR. In all cases, correct integration of the different constructs into the nuclear genome was confirmed by PCR. For two-hybrid experiments, the plasmids used were as follows: Pet54-AD, pNGB8 (33); Pet54-BD, pNGB67 (29); and Pet122-AD, pNGB11 (33). Mss51-AD and Mss51-BD were cloned onto the ClaI site of pGAD-C1 and pGBDU-C1, respectively (34). Constructs were transformed in the yeast strain Pj69-4a (34), and double-transformed cells were selected on medium lacking leucine and tryptophan or leucine and uracil. Protein interactions were tested by plating on medium lacking histidine supplemented with 3 mM amino-1,2,4-triazole or lacking adenine.

AQ:O

**Analysis of Mitochondrial Proteins**—Cells were grown in YPGal medium until late log phase. Mitochondria were isolated by disruption of cells with glass beads or by zymolyase 201 treatment as described (35). Proteins were resolved by SDS-PAGE on 12% gels (36) and detected by immunoblotting with antibodies to HA (Roche Applied Science), c-Myc (Roche Applied Science), Cox1, Cox2, Cox3, cytochrome *b*, Coa3, Tom40, or citrate synthase. Secondary goat IgG anti-mouse or anti-rabbit (Sigma) conjugated to horseradish peroxidase was detected with the ECL (GE Healthcare) or Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore).

AQ:P

**Synthesis of Mitochondrial Proteins**—*In vivo* labeling of cells in the presence of [<sup>35</sup>S]methionine was performed as described previously (20). After 20 min of pulse labeling, cells were chilled on ice and disrupted by vortexing with glass beads to obtain mitochondria by centrifugation. Mitochondrial proteins were resolved on a 16% polyacrylamide gel, transferred to a polyvinylidene fluoride membrane, and analyzed with a Typhoon 8600 PhosphorImager (GE Healthcare).

**Blue Native PAGE (BN-PAGE)**—BN-PAGE was performed as described previously (37). Samples (100 μg) of mitochondrial protein were washed with 250 mM sorbitol, 50 mM BisTris and lysed with 750 mM aminocaproic acid, 50 mM BisTris, and 1% digitonin for 30 min on ice. Mitochondrial extracts were cleared at 13,200 rpm for 12 min, and the supernatants were mixed with 2.5 μl of 5% Coomassie solution (750 mM aminocaproic acid, 50 mM BisTris). Extracts were loaded on a 5–13% polyacrylamide gel and transferred to a polyvinylidene fluoride membrane. Proteins were detected by immunoblotting with the respective antibodies.

**RNA Immunoprecipitation Assay**—This technique was performed as described previously (38). Briefly, mitochondria (1 mg) were lysed with 0.7% *n*-dodecyl-β-D-maltoside, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, RNaseOUT (Invitrogen), and Minicomplete protease inhibitors (Roche Applied Science). After a clarifying spin, the solubilized fractions were incubated with an anti-Myc antibody coupled to protein A-agarose (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). After centrifugation, immunoprecipitates were washed twice with 500 μl of lysis buffer and twice with 1 ml of 20 mM HEPES-KOH, pH 7.4, and then resuspended in 150 μl of the same buffer. One-fourth of the precipitate fractions were saved for Western blotting analysis, and the remainder were used for RNA extraction. RNA from total and immunoprecipitated fractions was extracted by incubation with TRIzol® reagent (Invitrogen). 20 ng of RNA were treated with 1 unit of DNase I (Invitrogen). The first strand of cDNAs were prepared by the addition of primers for *COX1*, *COX3*, or *VAR1* in the presence of SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen). The resulting cDNAs were used as template for PCRs to amplify *COX1*, *COX3*, or *VAR1* 5'-UTRs. Note that under these conditions, RT-PCRs are not quantitative.

### Results

**Pet54 Regulates Synthesis of Cox1**—We have previously demonstrated that the C-terminal end of Cox1 is involved in the regulation of its own synthesis. In mutants that block CcO assembly, synthesis of Cox1 is down-regulated; however, deletion of the last 15 residues of Cox1 (Cox1ΔC15) recovered normal levels of Cox1 synthesis (16). This pattern was observed in many different mutants on either CcO subunits or chaperones that participate in enzyme assembly. The only exception was a deletion of *pet54*. In this mutant, synthesis of Cox1 is down-regulated, but deletion of the C-terminal end of Cox1 does not recover synthesis (16).

Pet54 activates translation of the mitochondrially coded *COX3* mRNA (7) and also promotes splicing of an intron found in the *COX1* transcript of most yeast strains (39). However, Pet54 was not thought to affect expression of *COX1* genes lacking this intron (39). In order to investigate whether or not Pet54



Pet54 Regulates COX1 Translation

TABLE 1  
Strains used in this study

All of these strains are congenic or isogenic to DZ3-10B. Mitochondrial genotypes are shown in parenthesis. ΔΣai represents an intronless COX1 gene. *cox1Δ::ARG8<sup>tr</sup>* has a replacement of the COX1 3'-UTR by the COX2 3'-UTR. *cox1Δ::ARG8<sup>tr</sup>-2* has a replacement of the COX1 5'-UTR by the COX2 5'-UTR (6).

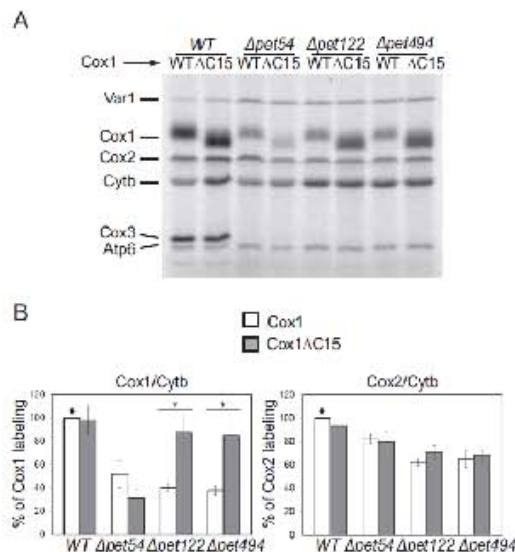
Strain	Nuclear (mitochondrial) genotype	Reference/Source
XPM10b	Mato, <i>arg8::hisG, leu2-3,112, lys2, ura3-52</i> (p, <i>cox1Δ::ARG8<sup>tr</sup></i> )	Ref. 20
XPM11	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112</i> (p, <i>COX1(1-512)::ARG8<sup>tr</sup></i> )	Ref. 20
XP448	<i>Alata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, Δcoa3::LEU2</i> (p, <i>COX1(1-512)::ARG8<sup>tr</sup></i> )	Ref. 20
XPM171	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112</i> (p, <i>cox1Δ::ARG8<sup>tr</sup>, cox1Δ::COX1, COX2<sup>tr</sup></i> )	Ref. 20
XPM182	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, Δpet11::URA3</i> (p, <i>cox1Δ::ARG8<sup>tr</sup>, cox2Δ::COX1, COX2<sup>tr</sup></i> )	Ref. 20
XPM201	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112</i> (p, ΔΣai)	Ref. 16
XPM209	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112</i> (p, ΔΣai, COX1ΔC15)	Ref. 16
XPM295	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3ΔIA</i> (p, ΔΣai)	Ref. 16
XPM298	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3ΔIA</i> (p, ΔΣai, COX1ΔC15)	Ref. 16
XPM315	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, Δpet54::KANMX4</i> (p, <i>COX1(1-512)::ARG8<sup>tr</sup></i> )	Ref. 16
XPM316	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, Δpet54::KANMX4</i> (p, ΔΣai)	Ref. 16
XPM317	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, Δpet54::KANMX4</i> (p, ΔΣai, COX1ΔC15)	Ref. 16
YC61	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, Δcoa3::KANMX3</i> (p, <i>COX1(1-512)::ARG8<sup>tr</sup></i> )	Ref. 16
YC75	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, cox14Δ::URA3</i> (p, ΔΣai)	Ref. 16
YC76	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, cox14Δ::URA3</i> (p, ΔΣai, COX1ΔC15)	Ref. 16
YC77	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, Δpet54::KANMX4</i> (p, ΔΣai), <i>Δcoa3::URA3</i>	This work
YC78	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, Δpet54::KANMX4, cox14Δ::URA3</i> (p, ΔΣai, COX1ΔC15)	Ref. 16
YC100	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3ΔHA, Δpet54::KANMX4</i> (p, ΔΣai)	This work
YC102	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, Δpet494::KANMX4</i> (p, ΔΣai)	This work
YC103	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, Δpet494::KANMX4</i> (p, ΔΣai, COX1ΔC15)	This work
YC104	Mato, <i>arg8::hisG, leu2-3, 112, lys2, ura3-52, Δpet494::KANMX4</i> (p, <i>cox1Δ::ARG8<sup>tr</sup></i> )	This work
YC105	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, Δpet194::KANMX4</i> (p, <i>cox1Δ::ARG8<sup>tr</sup>, cox2Δ::COX1, COX2</i> )	This work
YC106	Mato, <i>arg8::hisG, leu2-3, 112, lys2, ura3-52, Δpet122::KANMX4</i> (p, <i>cox1Δ::ARG8<sup>tr</sup></i> )	This work
YC109	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3ΔHA, PEF54-3x/hyc</i> (p, ΔΣai)	This work
YC112	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, Δcoa3::LEU2</i> (p, ΔΣai)	This work
YC113	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, Δcoa3::LEU2</i> (p, ΔΣai, COX1ΔC15)	This work
YC114	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, Δpet54::KANMX4, Δcoa3::LEU2</i> (p, ΔΣai, COX1ΔC15)	This work
YC118	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, Δpet54::KANMX4, Δcoa3::FLP2</i> (p, ΔΣai)	This work
LSR13	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, Δpet122::KANMX4</i> (p, ΔΣai)	Ref. 16
LSR28	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, Δpet122::KANMX4</i> (p, ΔΣai, COX1ΔC15)	Ref. 16
LSR33	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, Δpet54::KANMX4</i> (p, <i>cox1Δ::ARG8<sup>tr</sup>, cox2Δ::COX1, COX2</i> )	This work
LSR39	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, Δcoa3::URA3</i> (p, <i>COX1(1-512)::ARG8<sup>tr</sup></i> )	This work
LSR43	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, Δcoa3::KANMX4</i> (p, <i>COX1(1-512)::ARG8<sup>tr</sup></i> )	Ref. 16
LSR14	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, Δpet122::KANMX4</i> (p, <i>cox1Δ::ARG8<sup>tr</sup>, cox2Δ::COX1, COX2</i> )	This work
SR5	Mato, <i>adi2, lys2, Δura3, PEF309::3xHA</i> (p <sup>tr</sup> )	Ref. 60
IPM18	Mato, <i>arg8::hisG, leu2-3, 112, lys2, ura3-52, Δpet54::KANMX4</i> (p, <i>cox1Δ::ARG8<sup>tr</sup></i> )	This work
IPM21	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, Δpet54::URA3</i> (p, <i>COX1(1-512)::ARG8<sup>tr</sup></i> )	This work
IPM23	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, Δcoa3::URA3, Δpet54::KANMX4</i> (p, <i>COX1(1-512)::ARG8<sup>tr</sup></i> )	This work
IPM30	Mato, <i>ade2, lys2, Δura3, PEF309 3xHA, Δpet54::KANMX4</i> (p <sup>tr</sup> )	This work
IPM40	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3ΔIA, Δcoa3::URA3</i> (p, ΔΣai)	This work
IPM42	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3ΔIA, Δpet54::KANMX4, Δcoa3::URA3</i> (p, ΔΣai)	This work
IPM43	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, Δpet11::URA3, Δpet54::KANMX4</i> (p, <i>cox1Δ::ARG8<sup>tr</sup>, cox2Δ::COX1, COX2</i> )	This work
IPM44	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3ΔHA, PEF54-3x/hyc, Δms51Δ::LEU2</i> (p, ΔΣai)	This work
IPM49	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3ΔIA, Δpet122::KANMX4</i> (p, ΔΣai)	This work
IPM50	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3ΔIA, Δcoa3::KANMX4</i> (p, ΔΣai)	This work
IPM52	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3ΔIA, PEF54-3x/hyc, Δpet194::URA3</i> (p, ΔΣai)	This work
IPM53	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3ΔHA, PEF54-3x/hyc, Δpet109::URA3</i> (p, ΔΣai)	This work
IPM55	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3ΔHA, Δpet122::KANMX4</i> (p, ΔΣai)	This work
IPM56	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3ΔIA, Δpet54::KANMX4</i> (p, ΔΣai, COX1ΔC15)	This work
IPM57	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3ΔHA, Δpet122::KANMX4</i> (p, ΔΣai, COX1ΔC15)	This work
XPM330	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112</i> (p, <i>cox1Δ::ARG8<sup>tr</sup>-1, cox2Δ::COX1, COX2<sup>tr</sup></i> )	This work
RGV125	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, Δpet54::KANMX4</i> (p, <i>cox1Δ::ARG8<sup>tr</sup>-1, cox2Δ::COX1, COX2<sup>tr</sup></i> )	This work
XPM329	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112</i> (p, <i>cox1Δ::ARG8<sup>tr</sup>-2, cox2Δ::COX1, COX2<sup>tr</sup></i> )	This work
RGV124	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, Δpet54::KANMX4</i> (p, <i>cox1Δ::ARG8<sup>tr</sup>-2, cox2Δ::COX1, COX2<sup>tr</sup></i> )	This work
AGG81	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, LEU2::Yplac128-<i>ms51<sup>tr</sup></i></i> (p, ΔΣai)	This work
AGG82	Mato, <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, Δpet54::KANMX4 1.FLP2::Yplac128-<i>ms51<sup>tr</sup></i></i> (p, ΔΣai)	This work

\* Ectopic insertion of the chimeric COX1 gene upstream of the COX2 gene.

played an additional role in Cox1 synthesis, we analyzed mitochondrial translation products by *in vivo* labeling with [<sup>35</sup>S]methionine in the presence of cycloheximide to inhibit cytoplasmic translation. We observed that absence of Pet54 reduced by 50% the labeling of wild-type Cox1 encoded by the intronless COX1 gene used here (Fig. 1). This was the only mutant analyzed whose Cox1 labeling was not increased by C-terminal truncation of Cox1, suggesting that this effect might not be due simply to the lack of CxO assembly. Indeed, deletion of Pet122 or Pet194, the other COX3 mRNA translational activators, resulted in a Cox1 labeling pattern similar to that observed for general CxO assembly factor mutants reported previously (16). In CxO assembly mutants, synthesis of Cox1 is down-regulated;

however, additional elimination of COX14 or COA3 recovers Cox1 synthesis, even if CxO assembly is impaired (15, 18, 19). To investigate whether Pet54 might be directly promoting Cox1 synthesis, we eliminated the assembly-mediated regulation of Cox1 by removing Cox14 or Coa3. The reduced labeling of Cox1 and Cox1ΔC15 in the double mutants (*Δpet54/Δcox14* and *Δpet54/Δcoa3*) showed a bypass of Cox14 and Coa3 synthesis control (Fig. 2, A and B), in contrast to what has been observed for a *Δcoa3* mutant (16) or other mutants affecting Cox1 assembly (15, 18, 19). A similar result was observed with strains containing introns in COX1 (data not shown), strongly suggesting that the role of Pet54 in translation of the COX1 mRNA is independent of the role in COX1 intron splicing.

**Pet54 Regulates COX1 Translation**



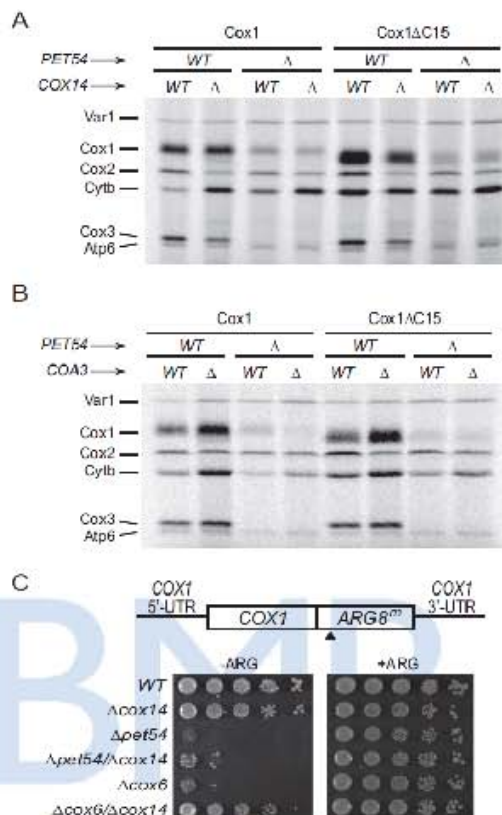
**FIGURE 1. Down-regulation of Cox1 synthesis in  $\Delta pet54$  mutants is independent of the Cox1 C-terminal end.** A, mitochondrial translation products from strains carrying the wild-type Cox1 (WT) or the Cox1 lacking the last 15 residues of the C-terminal end ( $\Delta C15$ ) were pulse-labeled with [<sup>35</sup>S]methionine in the presence of cycloheximide and analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. The  $\Delta pet54$ ,  $\Delta pet122$ , and  $\Delta pet494$  mutants were introduced as indicated. Cytb, cytochrome b; Atp6, subunit 6 of ATPase; Var1, ribosomal protein. B, the intensity of the Cox1 labeling in A was quantified using the ImageJ software and normalized to the cytochrome b signal. It was expressed as a percentage of the wild-type Cox1 signal (♦). Error bars, S.D. values from three independent experiments. We also compared the signals of Cox2 with the cytochrome b signal. In these cases, no significant difference was observed. The relevant significant differences between strains (\*) were determined by Student's t test. A p value of <0.01 was considered statistically significant.

AQ: II

AQ: JJ

AQ: R

To confirm that reduction of Cox1 labeling after elimination of assembly-mediated regulation was due to a defect in translation, we used the *COX1(1-512)::ARG8<sup>tr</sup>* reporter inserted at the *COX1* locus. This reporter has been extensively used to differentiate between translation and post-translational defects in Cox1 (16, 20, 25, 28). In this construct, the reporter *ARG8<sup>tr</sup>*, which codes for an enzyme involved in arginine biosynthesis, is fused in frame to the C-terminal end of Cox1. Because it codes for a mitochondrial targeting and processing sequence, accumulation of mature Arg8 should not be affected by the stability of Cox1. The Cox1 moiety encoded by *COX1(1-512)::ARG8<sup>tr</sup>* is assembled into active CcO complexes, supporting normal respiratory growth (20). Thus, we combined the  $\Delta pet54$  and  $\Delta cox14$  mutations with the *COX1(1-512)::ARG8<sup>tr</sup>* construct. As observed previously (16), the  $\Delta pet54$  strain showed reduced growth in medium lacking arginine as compared with wild-type or  $\Delta cox14$  cells (Fig. 2C). In agreement with the [<sup>35</sup>S]methionine labeling pattern of Cox1, growth of the double mutant  $\Delta pet54/\Delta cox14$  on medium lacking arginine was only slightly improved as compared with the single  $\Delta pet54$  mutant. In contrast, and as previously observed (16), a  $\Delta cox6$  mutant showed reduced growth on medium lacking arginine, but the double



**FIGURE 2. Down-regulation of Cox1 synthesis in  $\Delta pet54$  mutants is independent of Cox14 and Coa3.** Cox1 or Cox1 $\Delta C15$  cells with a deletion in *PET54*, *COX14* (A), or *COA3* (B), as indicated, were pulse-labeled with [<sup>35</sup>S]methionine in the presence of cycloheximide. The mitochondrial products were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. C, growth phenotype of strains bearing the *COX1(1-512)::ARG8<sup>tr</sup>* mitochondrial construct. The *ARG8<sup>tr</sup>* gene was fused in frame to the complete *COX1* codons, and the black triangle indicates the processing site for the pre-Arg8 matrix-targeting signal. Mutation  $\Delta pet54$ ,  $\Delta cox14$ , or  $\Delta cox6$  was introduced as indicated. Cells were spotted as serial dilutions on medium with arginine (+ARG) or lacking arginine (-ARG) and grown for 2 days at 30 °C.

AQ: K

deletion  $\Delta cox6/\Delta cox14$  recovered normal growth levels. These observations show that the CcO assembly defect caused by the loss of *Pet54* reduced synthesis of the reporter fused to Cox1 and that this reduction is not recovered on  $\Delta cox14$  cells.

Taken together, our data indicate that deletion of *Pet54* reduced Cox1 synthesis and that this reduction was not dependent on the assembly-regulatory C-terminal end of Cox1 or Cox14/Coa3 regulatory factors, as observed for most CcO assembly mutants. Our results strongly support the idea that *Pet54* has a previously undetected direct positive role in promoting Cox1 synthesis.

AQ: S

*Pet54 Acts on the 5'-Untranslated Region of COX1 mRNA*—*Pet54* could regulate synthesis of Cox1 at two different sites. (i) It could have a positive role in *COX1* mRNA untranslated

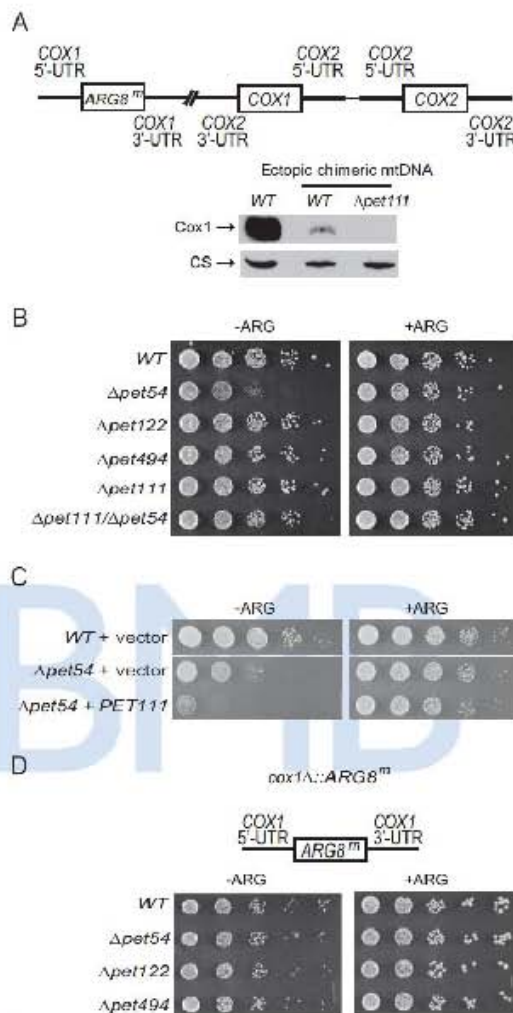
**Pet54 Regulates COX1 Translation**

regions; this activity could be either directly or indirectly related to Mss51 and Pet309, which are translational activators of *COX1* mRNA. (ii) It could act on the COA complexes, where it could contribute to Mss51 release and recycling for translational activation. However, this activity should be independent of both the Cox1 C-terminal end and the Cox14/Cox3-mediated feedback assembly regulatory loop.

To test whether Pet54 regulates Cox1 synthesis by acting through the untranslated regions of the *COX1* mRNA, we examined the growth on medium lacking arginine of a strain whose *COX1* coding sequence was replaced by the *ARG8<sup>m</sup>* gene (*cox1Δ::ARG8<sup>m</sup>*). In addition, this strain has the *COX1* coding region flanked by both *COX2* UTRs inserted at an ectopic site on the mtDNA. In this mtDNA, the levels of Cox1 protein are low as compared with a strain with wild-type mitochondrial DNA (Fig. 3A), and its synthesis depends on the translational activator Pet111 (20). We deleted *PET54* as well as the *PET122*, *PET494*, and *PET111* genes and examined the growth of cells in medium lacking arginine. We observed that *Δpet122*, *Δpet494*, and *Δpet111* mutants showed a similar growth as compared with a wild-type strain with the *cox1Δ::ARG8<sup>m</sup>* construct (Fig. 3B). This is consistent with the idea that in low levels or in the absence of Cox1, Mss51 is not sequestered and therefore is available to support normal *COX1* 5'-UTR translational activation despite the absence of COX assembly (15). In contrast, expression of the *cox1Δ::ARG8<sup>m</sup>* reporter was reduced by *Δpet54* mutation, suggesting that the site of action of Pet54 is in the untranslated region of the mRNA, probably the *COX1* 5'-UTR. Surprisingly, in the double mutant *Δpet54Δpet111*, where Cox1 is not synthesized, expression of the *cox1Δ::ARG8<sup>m</sup>* reporter was similar to wild-type levels, suggesting that the effect of Pet54 on the *COX1* mRNA untranslated regions depends on the presence of Cox1 protein. To confirm this idea, we first overexpressed *PET111*, and we observed a decreased growth on medium lacking arginine after *pet54* deletion (Fig. 3C). Second, we eliminated *PET54* on a *cox1Δ::ARG8<sup>m</sup>* strain where the *COX1* coding region was absent. In this case, the *Δpet54* mutant showed growth levels on medium lacking arginine similar to those of the wild-type, *Δpet122*, and *Δpet494* cells (Fig. 3D).

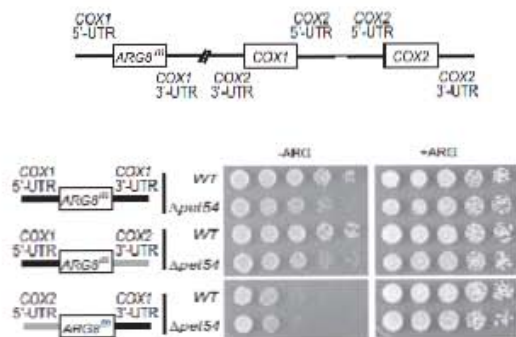
To determine whether the *COX1* 5'-UTR or 3'-UTR are targets *in vivo* for Pet54, we created strains with mitochondrial constructs similar to the one indicated in Fig. 3A, except that either the *COX1* 5'- or 3'-UTR flanking the *ARG8<sup>m</sup>* reporter was exchanged with the *COX2* 5'- or 3'-UTR, respectively. Strains with a wild-type nuclear genome supported growth on medium lacking arginine (Fig. 4), although cells with the substituted *COX1* 5'-UTR had a weaker growth, probably because in these mitochondria, three copies of the *COX2* 5'-UTR are present, and therefore Pet111 is limiting for *ARG8<sup>m</sup>* expression. Deletion of *pet54* did not affect growth in arginine of the strain bearing the *COX2* 5'-UTR, suggesting that the target of Pet54 was lost in this construct. In contrast, the *Δpet54* strain containing the *COX2* 3'-UTR showed reduced growth in medium lacking arginine. Thus, our data show that the target of Pet54 is localized to the *COX1* 5'-UTR.

Mss51 and Pet309 act on the *COX1* mRNA 5'-UTR (2, 40), and both proteins are limiting for translation (40). We investi-



**FIGURE 3. Pet54 plays a role in *COX1* mRNA untranslated regions that depends on the presence of the Cox1 protein.** A, the *cox1Δ::ARG8<sup>m</sup>* construct was inserted at the *COX1* locus, where the *ARG8<sup>m</sup>* reporter replaced the coding sequence of *COX1*. In addition, the *COX1* coding sequence flanked by the *COX2* UTRs was inserted at an ectopic site, 295 bp upstream of *COX2* on the mtDNA (20). Mitochondria from cells carrying the wild-type mtDNA or the ectopic chimeric mtDNA were analyzed by SDS PAGE and Western blotting. The membrane was probed with an antibody for Cox1 and afterward for citrate synthase (CS) as a loading control. The *Δpet111* mutation was introduced as indicated. B, serial dilutions of the indicated mutants bearing the ectopic chimeric mtDNA were spotted on medium lacking (–ARG) or containing (+ARG) arginine and were grown for 2 days at 30 °C. C, cells carrying the ectopic chimeric mtDNA and either an empty plasmid or a plasmid expressing a high copy number of *PET111* were grown on medium lacking (–ARG) or containing (+ARG) arginine. Serial dilutions were grown for 2 days at 30 °C. D, the *COX1* coding region was replaced by the reporter gene *ARG8<sup>m</sup>* (*cox1Δ::ARG8<sup>m</sup>*); however, in this construct, no chimeric *COX1* construct was inserted. The indicated mutants bearing this mtDNA were grown on serial dilutions as in B.

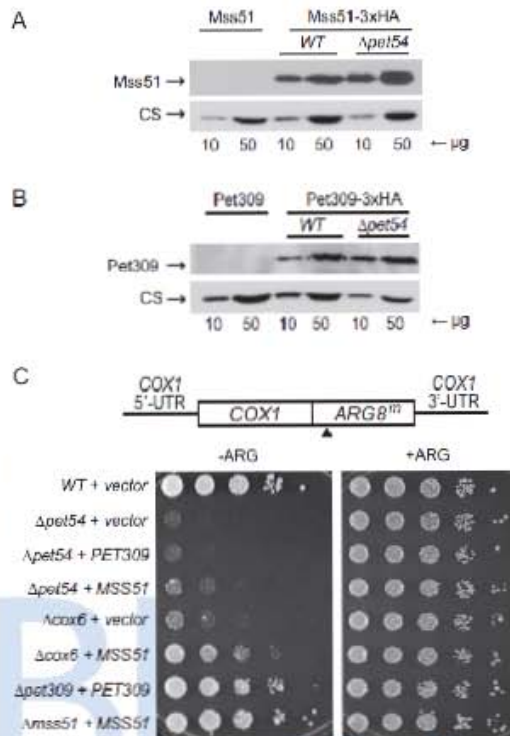
### Pet54 Regulates COX1 Translation



**FIGURE 4. Pet54 acts on the COX1 5'-UTR.** Cells containing wild-type Pet54 or the  $\Delta pet54$  mutation were spotted on serial dilutions on medium lacking ( $-ARG$ ) or containing ( $+ARG$ ) arginine and incubated for 2–4 days at 30 °C. The cells contained similar mitochondrial genomes as the one shown in Fig. 3A, except that the  $cox1\Delta::ARG8^{m}$  gene was flanked by native COX1 5'- and 3'-UTRs (*top construct*), flanked by the native COX1 5'-UTR and the COX2 3'-UTR (*middle*), or flanked by the COX2 5'-UTR and the native COX1 3'-UTR (*bottom*). *Black bars*, COX1 untranslated regions; *gray bars*, COX2 untranslated regions. For COX1 3'-UTR replacement, 525 bp of the COX1 downstream sequence were replaced by 118 bp of the COX2 downstream sequence. For COX1 5'-UTR replacement, 505 bp of the COX1 upstream sequence were replaced by 73 bp of the COX2 upstream sequence ( $\times 10$ ).

gated whether the steady state levels of these proteins could be affected by deletion of Pet54. Mitochondria from strains with triple hemagglutinin tags fused to the C-terminal end of Pet309 or Mss51 were isolated. These strains did not show any respiratory growth deficiency due to the presence of the tags (data not shown). Western blotting analyses of Mss51-3xHA or Pet309-3xHA revealed that protein levels were not affected by the absence of Pet54 (Fig. 5, A and B). In addition, we asked whether Pet54 might show any genetic interaction with Pet309 or Mss51. As previously observed, the growth in medium lacking arginine of a  $\Delta pet54$ ,  $COX1(1-512)::ARG8^{m}$  strain was highly reduced (Fig. 2C). We asked whether this phenotype could be alleviated by overexpression of *PET309* or *MSS51*. Each gene was cloned into a 2 $\mu$  plasmid, and they were used to transform  $\Delta pet54$ ,  $COX1(1-512)::ARG8^{m}$  cells. Overexpression of *PET309* had no compensatory effect, whereas overexpression of *MSS51* showed only a very mild effect (Fig. 5C). In contrast, overexpression of *MSS51* in a  $\Delta cox6$  mutant recovered growth on medium lacking arginine, consistent with the observation that the assembly-feedback regulation of Cox1 synthesis can be overcome by expression of additional copies of *MSS51* (15).

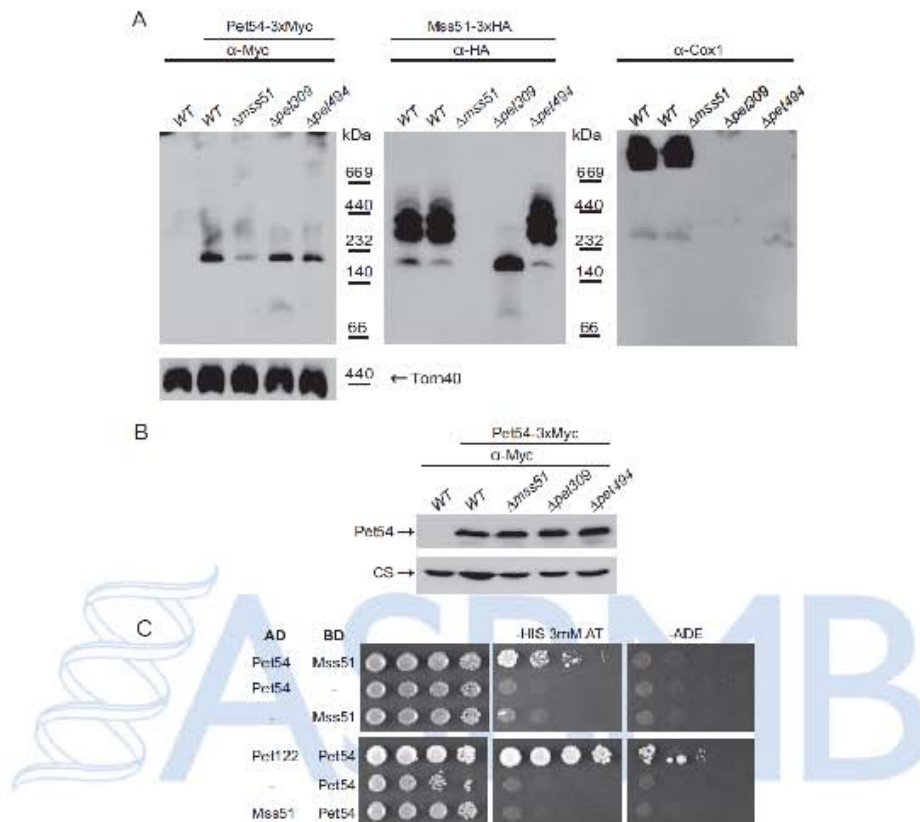
Our results suggest that Pet54 acts on the COX1 mRNA 5'-UTR to promote expression. This effect was observed only if Cox1 protein is present, even in small amounts, suggesting that Mss51 could be related to Pet54 function. The absence of Pet54 does not affect steady state levels of the translational activators Pet309 and Mss51, whose activities are limiting for Cox1 synthesis. Moreover, a mild genetic interaction between *PET54* and *MSS51* was detected because overexpression of the translational activator slightly compensated the growth phenotype of the  $COX1(1-512)::ARG8^{m}$  reporter in the absence of Pet54.



**FIGURE 5. Pet54 does not affect the levels of Pet309 and Mss51 proteins and shows a mild genetic interaction with Mss51.** A sample of 10 and 50  $\mu$ g of mitochondrial protein from strains expressing the Mss51-3xHA (A) or Pet309-3xHA (B) as well as the untagged versions of these genes were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting. The membranes were probed with antibodies anti-3xHA and anti-citrate synthase (CS) as a loading control. C, cells carrying the  $COX1(1-512)::ARG8^{m}$  construct were transformed with empty plasmid (vector) or with the indicated genes cloned on YEp352 plasmid. The transformants were spotted on synthetic complete medium lacking ( $-ARG$ ) or containing ( $+ARG$ ) arginine. 10-fold serial dilutions were grown for 3 days at 30 °C. The black arrow indicates the processing site for the pre-Arg8 matrix-targeting signal.

**Pet54 Could Promote Mss51 Recycling for Translational Activation**—So far, our results have suggested that Pet54 promotes efficient Cox1 synthesis through a mechanism independent of Cox14/Cox3 and the Cox1 C-terminal end. This role involves the COX1 mRNA 5'-UTR. Because the effect of Pet54 on the COX1 5'-UTR was observable only in the presence of the Cox1 protein, there was a possibility that Pet54 could affect either Mss51 or the COA complexes. COA complexes depend on the presence of Cox1 protein, and Mss51 activity in translation activation depends on how much of this activator is released from the COA complexes (1, 15, 19, 21). Therefore, we first analyzed by BN-PAGE whether Mss51 and Pet54 co-migrate. Mss51 has been observed in at least two different complexes, one of ~120–180 kDa, which has been associated with the translational activator form of Mss51 (translation-effective Mss51, Mss51<sup>TE</sup>), and two or three complexes from ~250 to 450 kDa that form the first assembly intermediates of the CoI

## Pet54 Regulates COX1 Translation



**FIGURE 6. Pet54 migrates into a high molecular weight complex that is different from that of the Mss51 complexes.** A, a sample of 100  $\mu$ g of mitochondrial proteins from cells carrying the Mss51-3xHA and Pet54-3xMyc or the untagged proteins was solubilized with 1% digitonin and separated on a 5–13% acrylamide blue native gel. Western blotting was performed with the indicated antibodies after consecutive antibody stripping treatments. An antibody against Tom40 was used as a loading control. B, mitochondria from the strains in A were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting using antibodies against the  $\alpha$ -Myc epitope (to detect Pet54-3xMyc) and citrate synthase as a loading control (CS). C, yeast two-hybrid plasmids containing the Pet54, Mss51, and Pet122 coding regions fused in frame with the activation domain (AD) or binding domain (BD) of *Gal4* were co-transformed into the yeast two-hybrid strain PJ69-4a (34) as indicated. The double transformants were selected on medium lacking leucine and uracil or leucine and tryptophan. Growth was tested on medium lacking histidine (in the presence of 3 mM 3-aminotriazole) and medium lacking adenine. 10-Fold serial dilutions were grown at 30 °C for 7 days. Growth of cells containing Pet122-AD and Pet54-BD was used as a positive control of two proteins previously demonstrated to interact (29, 33).

AQ: LL

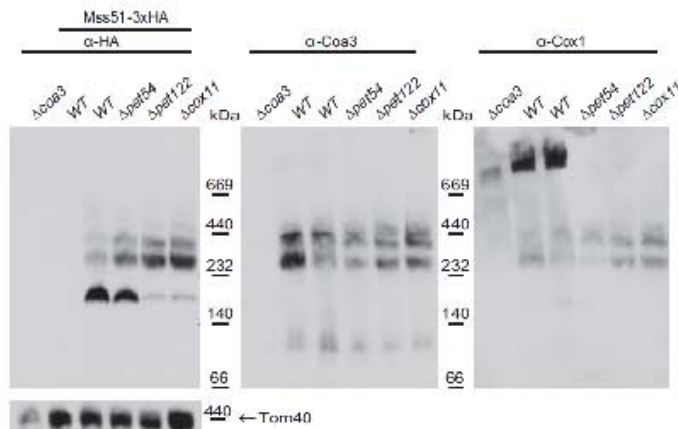
F6

and represent the COA complexes (19, 24, 27). To detect Pet54, we attached a triple Myc epitope to the C terminus of Pet54. The respiratory competence of the Pet54-3xMyc strain was comparable with wild-type levels, indicating that the tagged protein was functional (data not shown). After BN-PAGE of purified mitochondria, transferring to a PVDF membrane, and Western blotting, Pet54-3xMyc was detected as a ~190 kDa band that did not co-migrate with any of the complexes observed for Mss51-3xHA (Fig. 6A). Deletion of Mss51 did not affect Pet54 migration; however, we observed a decrease in the band intensity, suggesting that the Pet54 population in the ~190 kDa band decreased in the absence of Mss51. This decrease was not due to a reduction in the steady state levels of Pet54 on a  $\Delta$ mss51 mutant, as observed in SDS-PAGE and Western blotting (Fig. 6B). Pet54 is associated with the other

COX3 translational activators, namely Pet122 and Pet494 (33), and with Pet309 (29). However, the migration of the ~190 kDa band of Pet54 was not modified after the deletion of Pet494 or Pet309, indicating that this is a different complex (Fig. 6A). As expected, deletion of Pet309 produced only the ~180-kDa complex of the translational competent Mss51 (19), whereas deletion of Pet494, which blocks CxO assembly, stalled Mss51 on COA complexes. Western blotting experiments of the same membrane using an antibody against Cox1 revealed that super-complexes were only observed on WT cells, whereas on  $\Delta$ pet494, only assembly intermediaries were detected. We also investigated whether a physical interaction between Mss51 and Pet54 exists. Yeast two-hybrid experiments showed a weak interaction between Pet54-AD and Mss51-BD (Fig. 6C). This interaction was only observable by growth on medium lacking

AQ: V

**Pet54 Regulates COX1 Translation**



**FIGURE 7. Absence of Pet54 has a wild-type migration pattern of Mss51 complexes on blue native PAGE.** Mitochondria bearing the untagged Mss51 or the Mss51-3xHA proteins with the indicated mutations  $\Delta pet54$ ,  $\Delta pet122$ , or  $\Delta cox11$  were separated by BN-PAGE. The membrane was probed with antibodies against the HA epitope, Coa3, Cox1, and Tom40 antibodies.

histidine and was undetectable on the more stringent medium lacking adenine. These observations are consistent with a rapid, transient or weak but biologically significant protein-protein interaction, as has been described for different proteins (41, 42).

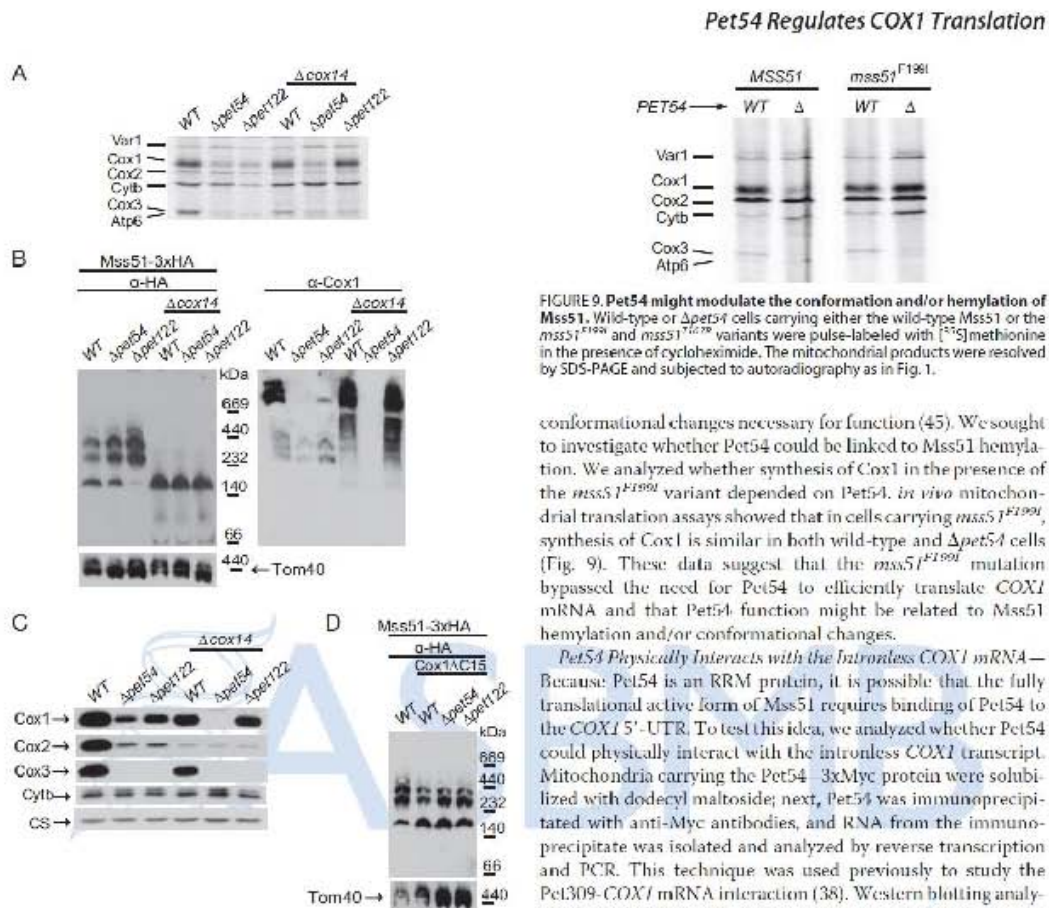
We next asked how Mss51 complexes are affected when Pet54 is deleted. Surprisingly, on a  $\Delta pet54$  mutant, the ~180-kDa complex made up by the translational activator form of Mss51 (Mss51<sup>TE</sup>) was present in similar intensity as compared with the observed levels on wild-type cells (Fig. 7). This is in contrast to the migration of Mss51 on  $\Delta pet122$  or  $\Delta cox11$  mutants, where Cox1 synthesis is regulated by the feedback assembly loop (15, 16, 27). In this case, the majority of Mss51 is present on the high molecular mass COA complexes (~250–450 kDa) and therefore unavailable to promote efficient COX1 mRNA translational activation. This suggests that, in contrast to other mutants blocking CcO assembly, deletion of Pet54 did not trap the most Mss51 on the COA complexes. The same membrane was next decorated with antibodies against Coa3 and Cox1. The migration of Coa3 on COA complexes on BN-PAGE showed a similar pattern in the mutants and in wild-type mitochondria. As reported (19), Cox1 migrated in supercomplexes, together with a population of Coa3 on wild-type cells, whereas in the mutants, only Cox1 assembly intermediaries were observed. In agreement with previous reports, Cox1 migrated with a diffused pattern in the  $\Delta coa3$  mutant (22).

According to the assembly feedback regulatory model, in the absence of Coa3 or Cox14, Mss51 forms the translational active complex. As consequence, the levels of Cox1 synthesis become normal, even if CcO assembly is blocked. An example of this phenotype is observed with the  $\Delta pet122$  mutant, where synthesis of Cox1 decreased, and after elimination of Cox14, labeling of Cox1 showed normal levels (Fig. 8A). However, as previously demonstrated, an exception was the  $\Delta pet54$  mutant, where synthesis of Cox1 was not recovered after elimination of Coa3 or Cox14. Thus, we investigated how Mss51 was distributed between the translational active complex and the COA com-

plexes in the double mutant  $\Delta pet54/\Delta cox14$ . Purified mitochondria from single  $\Delta pet54$  and  $\Delta pet122$  mutants, or combined with the  $\Delta cox14$  deletion were analyzed by BN-PAGE and Western blotting. In the  $\Delta cox14$  cells as well as in the double  $\Delta pet54/\Delta cox14$  and  $\Delta pet122/\Delta cox14$  mutants, Mss51 was present as the ~180-kDa complex representing the translational activator form (Fig. 8B), demonstrating that even when the double mutant  $\Delta pet54/\Delta cox14$  renders Mss51 in the ~180-kDa form, this protein is not efficiently translating the COX1 mRNA.

The same membrane was next decorated with an antibody against Cox1. As expected, whereas supercomplexes were only present on the high molecular mass COA complexes in the wild-type strains, intermediary assembly complexes of Cox1 were observed in the mutants lacking Pet54 and Pet122. In the  $\Delta cox14$  and the  $\Delta pet122/\Delta cox14$  mutants, Cox1 was present as diffuse bands corresponding to aggregation of Cox1 protein with other mitochondrial gene products (22). Interestingly, in the  $\Delta pet54/\Delta cox14$  double mutant, no Cox1 signal was detected. This was confirmed by analyzing the steady-state levels of Cox1 by SDS-PAGE and Western blotting experiments. In this case, whereas a reduction of Cox1 levels was observed for the  $\Delta pet54$ ,  $\Delta pet122$ , and  $\Delta pet122/\Delta cox14$  mutants, no signal of Cox1 was detected in the double deletion of Pet54 and Cox14 (Fig. 8C), even when Cox1 was synthesized at similar levels compared with the single  $\Delta pet54$  mutant (Fig. 8A).

The assembly feedback regulatory loop of Cox1 synthesis can be interrupted by deletion of Cox14 (15) or the Cox1 C-terminal end (16); however, in the absence of Pet54, synthesis of Cox1 cannot recover. In the Cox1 $\Delta$ C15 mitochondria, Mss51 was enriched on the ~180-kDa complex as compared with a strain bearing wild-type Cox1, although some Mss51 is present on the ~250–450-kDa complexes (43) (Fig. 8D). A  $\Delta pet54$  mutant carrying Cox1 $\Delta$ C15 showed a similar enrichment of Mss51 on the ~180-kDa complex (Fig. 8D), supporting the idea that even



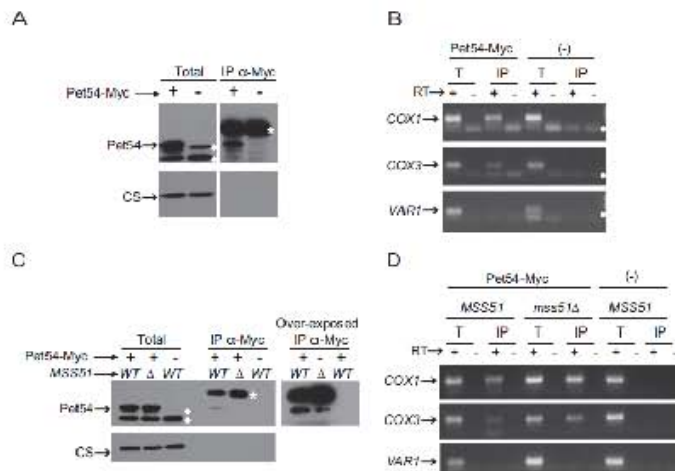
conformational changes necessary for function (45). We sought to investigate whether Pet54 could be linked to Mss51 hemylation. We analyzed whether synthesis of Cox1 in the presence of the  $mss51^{T199V}$  variant depended on Pet54. *in vivo* mitochondrial translation assays showed that in cells carrying  $mss51^{T199V}$ , synthesis of Cox1 is similar in both wild-type and  $\Delta pet54$  cells (Fig. 9). These data suggest that the  $mss51^{T199V}$  mutation bypassed the need for Pet54 to efficiently translate COX1 mRNA and that Pet54 function might be related to Mss51 hemylation and/or conformational changes.

**Pet54 Physically Interacts with the Intronless COX1 mRNA**—Because Pet54 is an RRM protein, it is possible that the fully translational active form of Mss51 requires binding of Pet54 to the COX1 5'-UTR. To test this idea, we analyzed whether Pet54 could physically interact with the intronless COX1 transcript. Mitochondria carrying the Pet54-3xMyc protein were solubilized with dodecyl maltoside; next, Pet54 was immunoprecipitated with anti-Myc antibodies, and RNA from the immunoprecipitate was isolated and analyzed by reverse transcription and PCR. This technique was used previously to study the Pet309-COX1 mRNA interaction (38). Western blotting analysis showed that Pet54-3xMyc immunoprecipitated. In contrast, the unrelated mitochondrial citrate synthase (negative control) was absent from the immunoprecipitate fraction, indicating that the immunoprecipitation was specific (Fig. 10A). To test whether the COX1 mRNA was associated with Pet54, RNA was purified from the immunoprecipitated Pet54-Myc fraction. Next, it was analyzed by reverse transcription using primers for the COX1 5'-UTR, and the cDNA was amplified by PCR. As a positive control, we analyzed whether COX3 mRNA was also amplified because it was previously reported by *in vitro* experiments that Pet54 interacts with the COX3 5'-UTR (31). As a negative control, we also amplified VAR1, because translation of this mRNA is independent of Pet54. COX1 mRNA was present in the Pet54-3xMyc immunoprecipitation fraction as well as in the total fraction (Fig. 10B); however, it was absent from the immunoprecipitation fraction from untagged Pet54 mitochondria. As expected, COX3 mRNA was also amplified from the Pet54-3xMyc immunoprecipitate, whereas VAR1 mRNA was absent from the immunoprecipitate. We next asked whether the interaction of Pet54-3xMyc with COX1 mRNA is affected by Mss51. To address this question, Pet54-3xMyc was immunoprecipitated from mitochondria carrying an  $\Delta mss51$

if Mss51 is more available for translational activation, Pet54 is necessary to fully activate Mss51.

Mss51 binds heme b, and hemylation is linked to the role of Mss51 in regulation of COX1 mRNA translation. If hemylation of Mss51 is affected by mutation of two heme-binding CPX motifs or by depletion of heme, then synthesis of Cox1 is decreased (28). However, the  $mss51^{T167R}$  and  $mss51^{T199V}$  variants, originally identified as respiratory suppressors of  $\Delta shy1$  mutants (44), can bypass the need for Mss51 hemylation. In this case, synthesis of Cox1 has wild-type levels even if hemylation is hampered (28). The binding of hemes to Mss51 can induce

### Pet54 Regulates COX1 Translation



**FIGURE 10. Pet54 interacts with COX1 mRNA, and this interaction is independent of Mss51.** A, mitochondria were solubilized with dodecyl maltoside, and Pet54-3xMyc or untagged Pet54 (-) was subjected to immunoprecipitation with antibody anti Myc. One-fourth of the immunoprecipitate (IP) was resolved by SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane for Western blotting. The membrane was probed with anti-Myc antibody and with anti-citrate synthase antibody (CS) as a negative control for interaction. The total fraction represents 5% of the mitochondrial extract used for immunoprecipitation. \*, nonspecific bands from the immunoglobulin heavy chain used for immunoprecipitation. ◆, nonspecific bands when the anti-Myc antibody was used. B, RNA was extracted from the total (T) and immunoprecipitate fractions. Each fraction was divided in two, and cDNA was prepared in the presence (+) or absence (-) of reverse transcriptase (RT) using primers for the COX1 and VAR1 5'-UTRs. The (-) RT lanes represent a negative control for DNA contamination. The PCR products were run on an agarose gel. ●, bands due to primer dimers. C and D, mitochondria from cells carrying Pet54-3xMyc or the untagged Pet54 and either the wild type Mss51 or the  $\Delta$ mss51 deletion were treated and analyzed as in A and B.

mutation. RNA analysis from this fraction showed that the COX1 mRNA was still present in the immunoprecipitate, indicating that Pet54 binds to the COX1 mRNA even in the absence of Mss51 (Fig. 10, C and D).

Together, our data suggest that in the absence of Pet54, Mss51 is enriched for the translational activator form. However, the protein is not competent to promote efficient translation of COX1 mRNA. Because Pet54 interacts with the COX1 mRNA, this interaction could be important for the activation of Mss51. In addition, the complex formed by the assembly feedback regulator Coa3 was not altered by the  $\Delta$ pet54 mutation. This is not surprising because the phenotype caused by elimination of Pet54 was independent of Coa3/Cox14. Moreover, it was observed that newly made Cox1 is highly unstable after the combined deletion of Pet54 and Cox14.

#### Discussion

Pet54 was initially described as a translational activator specific for COX3 mRNA (7) and as a factor necessary for COX1 intron  $\alpha$ 5 $\beta$  splicing (39). Here we demonstrated that Pet54 plays a third role that is independent of the previous ones. Although this protein is not absolutely required, it promotes efficient Cox1 synthesis.

It is well established that COX1 mRNA translation is reduced in mutants that block CcO assembly (for reviews, see Refs. 18 and 19) and that this regulation can be suppressed by deletion of Cox14 (15) or elimination of the last 15 residues from the C-terminal end of Cox1 (Cox1 $\Delta$ C15) (16). The third function of Pet54 was discovered because, in contrast to what is observed for most CcO assembly mutants (including the  $\Delta$ pet122 and

$\Delta$ pet193 mutants that, as  $\Delta$ pet54, also impair COX3 mRNA translation), a deletion of Pet54 did not recover Cox1 $\Delta$ C15 synthesis. This observation suggested that Pet54 could be a positive regulator of Cox1 synthesis, whose function is independent of the Cox1 C-terminal end. Similarly, the function of Pet54 seems to be independent of Cox14 and Coa3 because a double deletion  $\Delta$ pet54 $\Delta$ cox14 or  $\Delta$ pet54 $\Delta$ coa3 did not recover Cox1 synthesis to normal levels.

We reasoned that Pet54 might act at two different levels of the Cox1 synthesis pathway: (i) Pet54 could affect the formation of the COA complexes by promoting an efficient release of Mss51 from these complexes to be active for COX1 mRNA translation. In the absence of Pet54, Mss51 would be more stably associated with Cox1 and the COA complexes and therefore not accessible as translational activator. However, this possibility is unlikely because we observed in blue native gel electrophoresis that Mss51 is present on the COA complexes similarly in the presence or absence of Pet54. (ii) A possible site of action of Pet54 could involve COX1 5'-UTR, the target for translational activation, which is driven by Pet309 and Mss51 (2, 20, 40). One possibility was that in the absence of Pet54, Mss51 and Pet309 levels decreased, and because these factors are limiting for Cox1 synthesis (40), this would affect the efficiency of COX1 mRNA translation. Alternatively, COX1 mRNA levels could be reduced in the absence of Pet54, decreasing the efficiency of translation. However, none of these possibilities was the case (Fig. 6) (data not shown), indicating that Pet54 did not affect stability of the COX1 translational activators or COX1 transcript. We observed that deletion of Pet54 reduced expression



### Pet54 Regulates COX1 Translation

of the reporter *ARG8<sup>off</sup>* inserted instead of the *COX1* codons. This suggests that Pet54 function is related to the *COX1* mRNA UTRs. Indeed, we demonstrated that the function of Pet54 mapped to the *COX1* 5'-UTR, which is the site of action of Pet309 and Mss51 (2, 40). This effect is observed only in the presence of Cox1 protein, suggesting that Mss51 could be the target for Pet54 function because Mss51 is regulated as a translational activator through the interaction with Cox1 protein and the COA complexes. In addition, we observed a weak genetic interaction between Pet54 and Mss51 rather than with Pet309; overexpression of Mss51 slightly compensated the growth deficiency on medium lacking arginine of  $\Delta$ pet54 mutants with *ARG8<sup>off</sup>* located at the *COX1* locus.

In the present study, we concluded that Pet54 is necessary for activation of Mss51 as a translational activator and that this function is not related to the role of Mss51 as part of COA complexes. On BN-PAGE and sucrose gradient centrifugation experiments, Mss51 was detected as two different forms: one of high molecular mass (250–450 kDa) that is associated with the COA complexes in early Cox1 assembly intermediates and one of smaller size (around 120–180 kDa) corresponding to a translation-effective Mss51 (Mss51<sup>1E</sup>), where Mss51 promotes translational activation of the *COX1* mRNA (19, 27). In this work, we observed that the sizes and distribution of both Mss51 populations were not affected by the absence of Pet54, indicating that the levels of Mss51<sup>TT</sup> were similar to wild-type levels. This is in contrast to what is reported for other mutants, like  $\Delta$ pet122 and  $\Delta$ cox11, where the Mss51 population associated with COA complexes is enriched (present work) (27). To confirm our model in which Pet54 positively affects Cox1 synthesis via a mechanism that does not involve assembly intermediates, we observed that when the assembly-feedback regulatory loop is disrupted by a combined deletion of Pet54 and Cox14, Mss51 was exclusively present as the Mss51<sup>1E</sup> form, yet it is not competent to activate translation, thereby reducing Cox1 synthesis. Moreover, deficiency of Cox1 synthesis in the absence of Pet54 was not compensated by overexpression of *PET309* and was slightly compensated by overexpression of *MSS51*, suggesting that this effect is not only due to a decreased affinity of the translational machinery components Pet309 and Mss51 for the *COX1* mRNA. Altogether, our results suggest that Pet54 is necessary to recycle/reactivate Mss51 from the COA state to the "translation-committed" form.

Two examples of similar phenotypes of decreased Cox1 synthesis, even in the presence of  $\Delta$ cox14 or Cox1 $\Delta$ C15, are reported. The first example is a mutation on the general mitochondrial insertase Oxa1, where Mss51 was observed mainly as the "translation effective" form (15, 27). However, it is unlikely that Pet54 function is related to Oxa1 because in  $\Delta$ pet54 mutants, Mss51 and Cox1 were on COA complexes, which are thought to be inserted in the membrane (27) (present study). The second example includes the point mutations C85S and C96S on Mss51 that alter two CPX motifs. These heme-binding motifs are important for Mss51 function (28). Affinity of heme binding to Mss51 can be modulated by the redox state. Upon oxidation, Mss51 introduces a disulfide bond between Cys-85 and Cys-96 that decreases Mss51 heme affinity (45). In addition,

binding of hemes to Mss51 induces conformational changes that may be necessary for function (45).

Pet54 could play a role in the heme addition to Mss51 or could induce a conformational change in Mss51 necessary for translational activation. This idea is supported by the fact that deficiency of *COX1* mRNA translation in  $\Delta$ pet54 mutants is bypassed by the presence of the allele *mss51<sup>1E/90E</sup>*. This variant suppressed defects on Cox1 synthesis due to lack of Mss51 hemylation (28).

Pet54 could directly interact with the *COX1* mRNA to mediate a more efficient or competent interaction of Mss51 with the translational machinery. In the present work, we have demonstrated that Pet54 physically interacts with the *COX1* mRNA. The detected interaction could be either direct or mediated by additional, unknown proteins. However, a direct interaction is more plausible because Pet54 is an RRM protein that directly interacts with both *COX3* 5'-UTR and the *COX1* *at5b* intron (31). We observed that the Pet54-*COX1* mRNA interaction was not affected by the absence of Mss51, suggesting that the binding of Pet54 to the mRNA is independent of Mss51, probably occurring before Mss51 activates translation.

The role of Pet54 in enhancing Cox1 synthesis does not seem to be related to the generation of mp15, an aberrant peptide derived from the *COX1* transcript that is detectable on  $\Delta$ mss51 mutants. This peptide is proposed to be the result of a suboptimal translation initiation by Pet309, maybe by positioning the ribosome on a different translation initiation site on the *COX1* transcript (38, 46). In our hands, mp15 was not detectable on  $\Delta$ pet54 cells (not shown), indicating that in the absence of Pet54, translation initiation of *COX1* starts on the correct AUG codon.

Our data support the notion that binding of translation-effective Mss51 (Mss51<sup>1E</sup>) to newly synthesized Cox1 forms the COA complex. Formation of COA complex in turn renders Mss51<sup>TT</sup> translational inactive (hereby termed Mss51<sup>TI</sup>) (Fig. 11, step 1). The existence of Mss51<sup>TI</sup> was proposed previously (19, 21). Mss51 inactivation could be mediated by heme modifications (45) and/or by chaperone Coa1 (19). Assembly of CoO triggers Mss51<sup>TI</sup> release (Fig. 11, step 2). Because interaction of Pet54 with *COX1* mRNA does not require Mss51 (present work), and a physical interaction between Mss51 and *COX1* mRNA has not been detected (38), Pet54 might bridge an interaction between Mss51 and *COX1* mRNA (Fig. 11, step 3). Binding of Pet54 to the *COX1* 5'-UTR might be necessary to further activate Mss51<sup>TI</sup> into its active form (*i.e.* Mss51<sup>1E</sup>). Thus, Pet54 might reactivate Mss51<sup>1E</sup>, probably by mediating hemylation/conformational changes in Mss51 (Fig. 11, step 4). As shown previously, many RRM proteins bind RNA along with other proteins for activity (*e.g.* see Refs. 47 and 48), making it possible that both, Mss51 and the *COX1* mRNA are direct targets of Pet54. In the absence of Pet54, Mss51 remains in its inactive form, resulting in a very low *COX1* translation. This explains the decreased synthesis of Cox1 observed in the double mutants  $\Delta$ cox14/ $\Delta$ pet54,  $\Delta$ coa3/ $\Delta$ pet54, and *COX1* $\Delta$ C15/ $\Delta$ pet54, where Mss51 is free but in an inactive state. This model also explains why the presence of the Cox1 protein is necessary to detect a phenotype on  $\Delta$ pet54 mutants, because if Cox1 is absent, then Mss51<sup>TI</sup> is not inactivated; thus, Pet54 is not

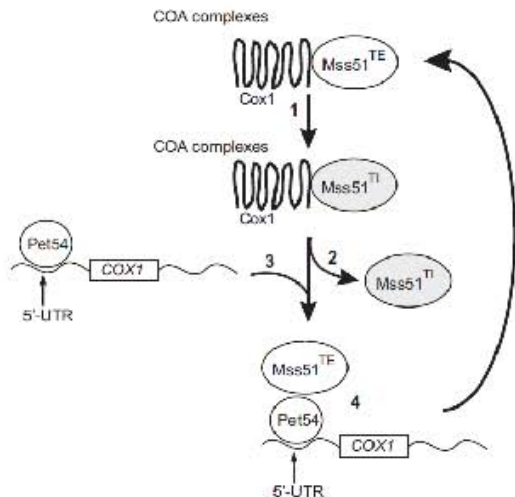
AQ:DD

AQ:EE

AQ:FF

F11

**Pet54 Regulates COX1 Translation**



**FIGURE 11. Model of the role of Pet54 on regulation of Cox1 synthesis.** Interaction between translational-effective Mss51<sup>TE</sup> and Cox1 renders Mss51 inactive (Mss51<sup>TI</sup>, depicted in gray). This might happen in a heme- and/or conformation-dependent manner (step 1). Upon CcO assembly, Mss51<sup>TI</sup> is released from COA complex (step 2). Pet54 interacts with the COX1 mRNA 5'-UTR (step 3). Via its interaction with Mss51<sup>TI</sup>, Pet54 may drive Mss51<sup>TI</sup> reactivation, thus bridging an interaction of Mss51<sup>TI</sup> with COX1 mRNA (step 4). In the absence of Pet54, Mss51<sup>TI</sup> is released from the COA complex but is unable to be recycled toward a Mss51<sup>TF</sup> conformation.

required to induce a hemylation-dependent conformational change on Mss51<sup>TI</sup>.

Pet54 is a multifunctional protein with at least three functions. This is not the first case of multifunctional proteins inside mitochondria. Cytochrome *c* is part of the respiratory chain and also participates in apoptosis (49). Aconitase is involved in mitochondrial DNA maintenance and in the tricarboxylic acid cycle (50, 51). Suv3 is part of the mitochondrial RNA degradosome and is also involved in mitochondrial DNA maintenance and COX1 *at5B* intron splicing (52–54). (NAD<sup>+</sup>) dependent isocitrate dehydrogenase is known to bind *in vitro* to mitochondrial mRNAs and probably can modulate translation (55–58). In addition to the three described roles for Pet54, it could be possible that this protein has some function in the assembly of the CcO because it has been detected in supercomplexes (59). As in the case of isocitrate dehydrogenase, we cannot discard the possibility that Pet54 has a broader function and modulates translation of all of the mitochondrial mRNAs.

**Author Contributions**—X. P.-M. conceived and coordinated the study, analyzed the results, and wrote the manuscript. J. P. M. performed and analyzed the experiments shown in Figs. 1–7 together with M. S.-V. (Fig. 1–3). Y. C.-V. constructed yeast strains, participated in experiments shown in Figs. 1–3, and performed experiments shown in Fig. 10. R. G.-V. created strains and carried out the experiments shown in Fig. 4 and discussed ideas; A. F. G.-G. performed experiments shown in Fig. 9 and discussed ideas; A. Z.-O. performed Northern blotting experiments and discussed ideas; G. H. discussed ideas and wrote parts of the manuscript. All authors analyzed the results and approved the final version of the manuscript.

**Acknowledgments**—We thank Antoni Barrientos, Luisa Sandoval-Romero, Gabriel del Río-Guerra, and Teresa Lara-Ortiz for the gift of yeast strains; Miryam Vázquez-Acevedo and Araceli Hernández for technical assistance; and Thomas D. Fox, Antoni Barrientos, and Walter Neupert for the gift of antisera.

**References**

1. Sotz, L. C., Fontanesi, F., Liu, J., and Barrientos, A. (2012) Biogenesis and assembly of eukaryotic cytochrome *c* oxidase catalytic core. *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 883–897.
2. Manthey, G. M., and Melowen, J. E. (1995) The product of the nuclear gene PET309 is required for translation of mature mRNA and stability or production of intron-containing RNAs derived from the mitochondrial COX1 locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14, 4031–4043.
3. Stop, M., van Oosterum, K., Neufelgus, H., van der Spek, H., and Grwell, L. A. (2000) Mss51p, a putative translational activator of cytochrome *c* oxidase subunit-1 (COX1) mRNA, is required for synthesis of Cox1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 37, 213–220.
4. Poutre, C. G., and Fox, T. D. (1987) PET111, a *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene required for translation of the mitochondrial mRNA encoding cytochrome *c* oxidase subunit II. *Genetics* 115, 637–647.
5. Mulero, L. J., and Fox, T. D. (1993) PET111 acts in the 5' leader of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial COX2 mRNA to promote its translation. *Genetics* 133, 509–516.
6. Cabral, F., and Schatz, G. (1978) Identification of cytochrome *c* oxidase subunits in nuclear yeast mutants lacking the functional enzyme. *J. Biol. Chem.* 253, 4396–4401.
7. Costanzo, M. C., Sawyer, E. C., and Fox, T. D. (1986) At least two nuclear gene products are specifically required for translation of a single yeast mitochondrial mRNA. *EMBO J.* 5, 3637–3641.
8. Costanzo, M. C., and Fox, T. D. (1986) Product of *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene PET491 activates translation of a specific mitochondrial mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 6, 3694–3703.
9. Kloeckener-Grussem, B., McEwen, J. E., and Poyton, R. O. (1988) Identification of a third nuclear protein-coding gene required specifically for posttranscriptional expression of the mitochondrial COX3 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 170, 1399–1402.
10. Herrmann, J. M., Woellhaf, M. W., and Bonnefoy, N. (2013) Control of protein synthesis in yeast mitochondria: the concept of translational activators. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 286–293.
11. Oll, M., Armanis, A., and Brown, A. (2016) Organization and regulation of mitochondrial protein synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 85, 11467–11483. doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014334
12. McStay, G. P., Su, C. H., Thomas, S. M., Xu, J. T., and Tzagoloff, A. (2013) Characterization of Cox1p assembly intermediates in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 288, 36546–36556.
13. McStay, G. P., Su, C. H., and Tzagoloff, A. (2013) Modular assembly of yeast cytochrome oxidase. *Mol. Biol. Cell* 24, 440–452.
14. Su, C. H., McStay, G. P., and Tzagoloff, A. (2014) The Cox1p assembly module of yeast cytochrome oxidase. *Mol. Biol. Cell* 25, 965–976.
15. Barrientos, A., Zambrano, A., and Tzagoloff, A. (2004) Mss51p and Cox14p jointly regulate mitochondrial Cox1p expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 23, 5472–5482.
16. Shingú-Vázquez, M., Camacho-Villasana, Y., Sandoval-Romero, L., Butler, C. A., Fox, T. D., and Pérez-Martínez, X. (2010) The carboxyl-terminal end of Cox1 is required for feedback assembly regulation of Cox1 synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *J. Biol. Chem.* 285, 34382–34389.
17. Khalimonchuk, O., Bird, A., and Winge, D. R. (2007) Evidence for a pro-oxidant intermediate in the assembly of cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem.* 282, 17942–17949.
18. Fontanesi, F., Clemente, P., and Barrientos, A. (2011) Cox25 teams up with Mss51, Ssc1, and Cox14 to regulate mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I expression and assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 286, 557–566.
19. Mick, D. U., Vukotic, M., Pichura, H., Meyer, H. L., Wanscheid, B., Dockers,

## Pet54 Regulates COX1 Translation

- W., and Rehling, P. (2010) Cox1 and Cox14 are essential for negative feedback regulation of COX1 translation in mitochondria. *J. Cell Biol.* 191, 141–154.
19. Perez-Martinez, X., Broadley, S. A., and Fox, T. D. (2003) Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. *EMBO J.* 22, 8961–8961.
21. Mick, D. U., Fox, T. D., and Rehling, P. (2011) Inventory control: cytochrome *c* oxidase assembly regulates mitochondrial translation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 14–20.
22. McStay, G. P., Su, C. H., and Trzagaloff, A. (2013) Stabilization of Cox1p intermediates by the Cox14p-Cox1p complex. *PLoS One* 8, 943–949.
23. Mick, D. U., Wagner, K., van der Laan, M., Frazier, A. E., Perschil, L., Pawlas, M., Meyen, H. L., Warscheid, B., and Rehling, P. (2007) Sly1 couples Cox1 translational regulation to cytochrome *c* oxidase assembly. *EMBO J.* 26, 4347–4358.
24. Pierrat, F., Bestwick, M. L., Cobine, P. A., Khalimonchuk, O., Cecchi, J. A., and Winge, D. R. (2007) Coa1 links the Mss51 post-translational function to Cox1 cofactor insertion in cytochrome *c* oxidase assembly. *EMBO J.* 26, 4356–4366.
25. Pierrat, F., Khalimonchuk, O., Cobine, P. A., Bestwick, M., and Winge, D. R. (2008) Coa2 is an assembly factor for yeast cytochrome *c* oxidase biogenesis facilitating the maturation of Cox1. *Mol. Cell Biol.* 28, 4977–4989.
26. Barsh, B., Demerlein, S., Mick, D. U., Nikolas, M., Urlaub, H., and Rehling, P. (2013) The heme synthase Cox15 associates with cytochrome *c* oxidase assembly intermediates during Cox1 maturation. *Mol. Cell Biol.* 33, 4128–4137.
27. Fontanesi, F., Soto, L. C., Horn, D., and Barrientos, A. (2010) Mss51 and Ssc1 facilitate translational regulation of cytochrome *c* oxidase biogenesis. *Mol. Cell Biol.* 30, 247–259.
28. Soto, L. C., Fontanesi, F., Myers, R. S., Hamel, P., and Barrientos, A. (2012) A heme-sensing mechanism in the translational regulation of mitochondrial cytochrome *c* oxidase biogenesis. *Cell Metab.* 16, 801–813.
29. Naithani, S., Saracco, S. A., Butler, C. A., and Fox, T. D. (2003) Interactions among COX1, COX2, and COX3 mRNA specific translational activator proteins on the inner surface of the mitochondrial inner membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 14, 324–333.
30. Valencik, M. L., Kloeckener-Gruissem, R., Poyton, R. O., and McTwen, J. L. (1989) Disruption of the yeast nuclear P1754 gene blocks excision of mitochondrial intron  $\alpha 5 \beta$  from pre-mRNA for cytochrome *c* oxidase subunit I. *EMBO J.* 8, 3899–3904.
31. Kaspar, R. L., Bitano, A. L., and Capra, M. G. (2008) A shared RNA-binding site in the Pet54 protein is required for translational activation and group I intron splicing in yeast mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 36, 2958–2968.
32. Burke, D., Dawson, D., and Stearns, T. (2000) *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
33. Brown, N. G., Costanzo, M. C., and Fox, T. D. (1994) Interactions among three proteins that specifically activate translation of the mitochondrial COX3 mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 14, 1045–1053.
34. James, P., Halladay, I., and Craig, F. A. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144, 1425–1436.
35. Dekker, K., de Krom, A. L., Kispal, G., and Lill, R. (2001) Isolation and subtraction of mitochondria from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Cell Biol.* 65, 57–51.
36. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
37. Wittig, I., Braun, H. P., and Schägger, H. (2006) Blue native PAGE. *Nat. Protoc.* 1, 418–426.
38. Zamudio-Ochoa, A., Camacho-Villasana, Y., García-Guerrero, A. L., and Pérez-Martínez, X. (2014) The Pet509 pentatricopeptide repeat motifs mediate efficient binding to the mitochondrial COX1 transcript in yeast. *RNA Biol.* 11, 953–967.
39. Valencik, M. L., and McTwen, J. L. (1991) Genetic evidence that different functional domains of the PET54 gene product facilitate expression of the mitochondrial genes COX1 and COX3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 11, 2399–2405.
40. Pérez-Martínez, X., Butler, C. A., Shingu-Vázquez, M., and Fox, T. D. (2009) Dual functions of Mss51 couple synthesis of Cox1 to assembly of cytochrome *c* oxidase in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Mol. Biol. Cell* 20, 4371–4380.
41. Leung, G. P., Lee, L., Schmidt, T. J., Shirahige, K., and Kobayashi, M. S. (2011) Rhl107 is required for recruitment of the SMC5/6 complex to DNA double strand breaks. *J. Biol. Chem.* 286, 26250–26257.
42. Zhan, X., Müller, T. G., and Rothstein, R. (1998) A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools. *Mol. Cell* 2, 329–340.
43. Khalimonchuk, O., Kim, H., Watts, T., Pérez-Martínez, X., and Winge, D. R. (2012) Oligomerization of heme *s* synthase in cytochrome oxidase biogenesis is mediated by cytochrome oxidase assembly factor Coa2. *J. Biol. Chem.* 287, 26715–26726.
44. Barrientos, A., Korr, D., and Trzagaloff, A. (2009) Sly1p is necessary for full expression of mitochondrial COX1 in the yeast model of Leigh's syndrome. *EMBO J.* 21, 43–52.
45. Soto, L. C., and Barrientos, A. (2016) Mitochondrial cytochrome *c* oxidase biogenesis is regulated by the redox state of a heme-binding translational activator. *Antioxid. Redox Signal.* 24, 281–298.
46. Zambrano, A., Fontanesi, F., Solans, A., de Oliveira, R. L., Fox, T. D., Trzagaloff, A., and Barrientos, A. (2007) Aberrant translation of cytochrome *c* oxidase subunit I mRNA species in the absence of Mss51p in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 18, 523–535.
47. Chuang, T. W., Chang, W. L., Lee, K. M., and Yarn, W. Y. (2013) The RNA-binding protein Y14 inhibits mRNA decapping and modulates processing body formation. *Mol. Biol. Cell* 24, 1–13.
48. Lau, C. K., Diem, M. D., Dreyfuss, G., and Van Duyn, G. D. (2000) Structure of the Y14 Magyil core of the mitoribosome complex. *Curr. Biol.* 13, 933–941.
49. Jia, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome *c*. *Cell* 86, 147–157.
50. Chen, X. J., Wang, X., and Butow, R. A. (2007) Yeast aconitase binds and provides metabolically coupled protection to mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 13758–13763.
51. Chen, X. J., Wang, X., Kaufman, B. A., and Butow, R. A. (2005) Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance. *Science* 307, 714–717.
52. Golik, P., Szecepanek, T., Bartnik, E., Stopin, P. P., and Lazowska, I. (1995) The *S. cerevisiae* nuclear gene SUV3 encoding a putative RNA helicase is necessary for the stability of mitochondrial transcripts containing multiple introns. *Gen. Genet.* 28, 217–224.
53. Turk, E. M., and Capra, M. G. (2010) Splicing of yeast  $\alpha 5 \beta$  group I intron requires SUV3 to recycle MRS1 via mitochondrial degradation-promoted decay of excised intron ribonucleoprotein (RNP). *J. Biol. Chem.* 285, 8585–8594.
54. Guo, X. L., Chen, C. J., Wang, D. D., Modrek, A. S., Phan, V. H., Lee, W. H., and Chen, P. L. (2011) Uncoupling the roles of the SUV3 helicase in maintenance of mitochondrial genomic stability and RNA degradation. *J. Biol. Chem.* 286, 38783–38794.
55. Dekker, P. L., Stuurman, J., van Oosterum, K., and Grivell, L. A. (1992) Determinants for binding of a 40 kDa protein to the leaders of yeast mitochondrial mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 20, 2647–2655.
56. Phang, S. D., Bestuzov, A. L., van Oosterum, K., Dekker, P. L., and Grivell, L. A. (1999) Yeast mitochondrial NAD<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase is an RNA-binding protein. *Nucleic Acids Res.* 21, 5328–5331.
57. Papadopoulos, B., Dekker, P., Blom, J., and Grivell, L. A. (1990) A 40 kD protein binds specifically to the 5'-untranslated regions of yeast mitochondrial mRNAs. *EMBO J.* 9, 4135–4143.
58. de Jong, L., Phang, S. D., McCammon, M. T., Grivell, L. A., and van der Spek, H. (2000) Increased synthesis and decreased stability of mitochondrial translation products in yeast as a result of loss of mitochondrial (NAD<sup>+</sup>)-dependent isocitrate dehydrogenase. *FEBS Lett.* 483, 62–66.
59. Vukotic, M., Oeljeklaus, S., Wisse, S., Vögtle, I. N., Meisinger, C., Meyer, H. T., Ziesenis, A., Katschinski, D. M., Jans, D. C., Jakobs, S., Warscheid, B., Rehling, P., and Dekkers, M. (2012) Rcf1 mediates cytochrome oxidase assembly and respirasome formation, revealing heterogeneity of the enzyme complex. *Cell Metab.* 15, 336–347.
60. Iñáñez-Carreón, F., Camacho-Villasana, Y., Zamudio-Ochoa, A., Shingu-Vázquez, M., Torres Larios, A., and Pérez-Martínez, X. (2008) The pentatricopeptide repeats present in Pet509 are necessary for translation but not for stability of the mitochondrial COX1 mRNA in yeast. *J. Biol. Chem.* 283, 14722–14729.

AQ: HH

## APÉNDICE II

### Cepas de *S. cerevisiae* que se usaron en este trabajo,

Cepa	Genotipo nuclear (mitocondrial)	Referencia
XPM10b	<i>Mata</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>lys2</i> , <i>ura3-52</i> ( $\rho+$ , <i>cox1</i> <i>delta::ARG8<sup>m</sup></i> )	(Perez-Martinez et al., 2003)
XPM11	<i>Mata</i> , <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3, 112</i> ( $\rho+$ , <i>COX1(1-512)::ARG8<sup>m</sup></i> , $\Delta\Sigma ai^a$ )	(Perez-Martinez et al., 2003)
XPM48	<i>Mata</i> , <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3, 112</i> , $\Delta mss51::LEU2$ ( $\rho+$ , <i>COX1(1-512)::ARG8<sup>m</sup></i> )	(Shingú-Vázquez et al., 2010)
XPM171	<i>Mata</i> , <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3, 112</i> , ( $\rho+$ , $\Delta cox1::ARG8m$ , $\Delta cox2::COX1$ , <i>COX2</i> )	(Perez-Martínez et al., 2003)
XPM182	<i>Mata</i> , <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3, 112</i> , , $\Delta pet111::URA3$ ( $\rho+$ , $\Delta cox1::ARG8m$ , $\Delta cox2::COX1$ , <i>COX2<sup>b</sup></i> )	(Pérez-Martínez et al., 2003)
XPM201	<i>Mata</i> , <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3, 112</i> , ( $\rho+$ , $\Delta\Sigma ai$ )	(Shingú-Vázquez et al., 2010)
XPM209	<i>Mata</i> , <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3, 112</i> , ( $\rho+$ , $\Delta\Sigma ai$ , <i>COX1</i> $\Delta C15$ )	(Shingú-Vázquez et al., 2010)
XPM295	<i>Mata</i> , <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3, 112</i> , <i>MSS51-3xHA</i> , ( $\rho+$ , $\Delta\Sigma ai$ )	(Shingú-Vázquez et al., 2010)
XPM298	<i>Mata</i> , <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3, 112</i> , <i>MSS51-3xHA</i> , ( $\rho+$ , $\Delta\Sigma ai$ , <i>COX1</i> $\Delta C15$ )	(Shingú-Vázquez et al., 2010)
XPM315	<i>Mata</i> , <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3, 112</i> , $\Delta pet54::KanMX4$ , ( $\rho+$ , <i>COX1(1-512)::ARG8<sup>m</sup></i> , $\Delta\Sigma ai$ )	(Shingú-Vázquez et al., 2010)
XPM316	<i>Mata</i> , <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3, 112</i> , $\Delta pet54::KanMX4$ ( $\rho+$ , $\Delta\Sigma ai$ )	(Shingú-Vázquez et al., 2010)
XPM317	<i>Mata</i> , <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3, 112</i> , $\Delta pet54::KanMX4$ ( $\rho+$ , $\Delta\Sigma ai$ ,	(Shingú-Vázquez et al., 2010)

	COX1ΔC15)	
YC61	Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, Δcox6::KANMX, (ρ+, COX1(1-512)::ARG8 <sup>m</sup> , ΔΣai	(Shingú-Vázquez <i>et al.</i> , 2010)
YC75	Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, Δcox14::URA3 (ρ+, ΔΣai)	(Shingú-Vázquez <i>et al.</i> , 2010)
YC76	Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, Δcox14::LEU2 (ρ+, ΔΣai, COX1ΔC15)	(Shingú-Vázquez <i>et al.</i> , 2010)
YC77	Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, Δpet54::KANMX (ρ+, ΔΣai), Δcox14::URA3	Este trabajo
YC78	Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, Δpet54::KANMX, Δcox14::LEU2 (ρ+, ΔΣai, COX1ΔC15)	(Shingú-Vázquez <i>et al.</i> , 2010)
YC100	Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, Δpet54::KANMX (ρ+, ΔΣai)	Este trabajo
YC101	Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, PET309-3xHA, Δpet54::KANMX (ρ+, ΔΣai)	Este trabajo
YC102	Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, Δpet494::KANMX (ρ+, ΔΣai)	Este trabajo
YC 103	Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, Δpet494::KANMX (ρ+, ΔΣai, COX1ΔC15)	Este trabajo
YC104	Mata, arg8::hisG, leu2-3, 112, lys2, ura3-52 Δpet494::KANMX (ρ+, Δcox1::ARG8 <sup>m</sup> )	Este trabajo
YC105	Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, Δpet494::KANMX (ρ+, Δcox1::ARG8 <sup>m</sup> , Δcox2::COX1, COX2)	Este trabajo
YC106	Mata, arg8::hisG, leu2-3, 112, lys2, ura3-52 Δpet122::KANMX (ρ+, Δcox1::ARG8 <sup>m</sup> )	Este trabajo
YC109	Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, PET54-3xMYC (ρ+, ΔΣai)	Este trabajo
YC112	Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, Δcoa3::LEU2	Este trabajo

	( $\rho+$ , $\Delta\Sigma ai$ )	
YC113	Mata, <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3</i> , 112, $\Delta coa3::LEU2$ ( $\rho+$ , $\Delta\Sigma ai$ , COX1 $\Delta C15$ )	Este trabajo
YC114	Mata, <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3</i> , 112, $\Delta pet54::KANMX$ , $\Delta coa3::LEU2$ ( $\rho+$ , $\Delta\Sigma ai$ , COX1 $\Delta C15$ )	Este trabajo
YC118	Mata, <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3</i> , 112, $\Delta pet54::KANMX$ , $\Delta coa3::LEU2$ ( $\rho+$ , $\Delta\Sigma ai$ )	Este trabajo
LSR13	Mata, <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3</i> , 112, $\Delta pet122::KANMX$ ( $\rho+$ , $\Delta\Sigma ai$ )	(Shingú-Vázquez <i>et al.</i> , 2010)
LSR28	Mata, <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3</i> , 112, $\Delta pet122::KANMX$ ( $\rho+$ , $\Delta\Sigma ai$ , COX1 $\Delta C15$ )	(Shingú-Vázquez <i>et al.</i> , 2010)
LSR33	Mata, <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3</i> , 112, $\Delta pet54::KANMX$ ( $\rho+$ , $\Delta cox1::ARG8^m$ , $\Delta cox2::COX1$ , COX2)	Este trabajo
LSR39	Mata, <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3</i> , 112, $\Delta cox14::URA3$ ( $\rho+$ , COX1(1-512)::ARG8 <sup>m</sup> , $\Delta\Sigma ai$ )	Este trabajo
LSR43	Mata, <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3</i> , 112, $\Delta cox6::KANMX$ ( $\rho+$ , COX1(1-512)::ARG8 <sup>m</sup> )	(Shingú-Vázquez <i>et al.</i> , 2010)
LSR44	Mata, <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3</i> , 112, $\Delta pet122::KANMX$ ( $\rho+$ , $\Delta cox1::ARG8^m$ , $\Delta cox2::COX1$ , COX2)	Este trabajo
JPM18	Mata, <i>arg8::hisG</i> , <i>leu2-3</i> , 112, <i>lys2</i> , <i>ura3-52</i> , $\Delta pet54::KANMX$ ( $\rho+$ , $\Delta cox1::ARG8^m$ )	Este trabajo
JPM23	Mata, <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3</i> , 112, $\Delta cox14::URA3$ , $\Delta pet54::KANMX$ ( $\rho+$ , COX1(1-512)::ARG8 <sup>m</sup> , $\Delta\Sigma ai$ )	Este trabajo
JPM43	Mata, <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3</i> , 112, ( $\rho+$ , $\Delta cox1::ARG8^m$ , $\Delta cox2::COX1$ , COX2), $\Delta pet111::URA3$ , $\Delta pet54::KANMX$	Este trabajo
	Mata, <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-</i>	

JPM44	<i>52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, PET54-3xMYC, Δmss51::LEU2 (ρ+, ΔΣai)</i>	Este trabajo
JPM49	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, Δpet122::KANMX (ρ+, ΔΣai)</i>	Este trabajo
JPM50	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, Δcox11::KANMX (ρ+, ΔΣai)</i>	Este trabajo
JPM52	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, PET54-3xMYC, Δpet494::URA3 (ρ+, ΔΣai)</i>	Este trabajo
JPM53	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, PET54-3xMYC, Δpet309::URA3 (ρ+, ΔΣai)</i>	Este trabajo
JPM56	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, Δpet54::KANMX (ρ+, ΔΣai, COX1ΔC15)</i>	Este trabajo
JPM57	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, MSS51-3xHA, Δpet122::KANMX (ρ+, ΔΣai, COX1ΔC15)</i>	Este trabajo

Todas estas cepas son congénicas o isogénicas de D273-10B.

a: los genotipos mitocondriales son mostrados en paréntesis.  $\Delta\Sigma ai$  significa que *COX1* no contiene intrones.

b: Inserción ectópica de *COX1* río arriba de *COX2*.

## Referencias

Amberg, D., Burke, D. and Strathern, J. (2005) *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Arnold I, Langer T. (2002) Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1592, 89-96.

Barrientos, A., Korr, D. and Tzagoloff, A. (2002) Shy1p is necessary for full expression of mitochondrial COX1 in the yeast model of Leigh's syndrome. *Embo J*, 21, 43-52.

Barrientos, A., Zambrano, A. and Tzagoloff, A. (2004) Mss51p and Cox14p jointly regulate mitochondrial Cox1p expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J*, 23, 3472-3482.

Bestwick M, Khalimonchuk O, Pierrel F, Winge DR. (2010) The role of Coa2 in hemylation of yeast Cox1 revealed by its genetic interaction with Cox10. *Mol Cell Biol*, 30, 172-85.

Blandin G, Durrens P, Tekaiia F, Aigle M, Bolotin-Fukuhara M, Bon E, Casarégola S, de Montigny J, Gaillardin C, Lépingle A, Llorente B, Malpertuy A, Neuvéglise C, Ozier-Kalogeropoulos O, Perrin A, Potier S, Souciet J, Talla E, Toffano-Nioche C, Wésolowski-Louvel M, Marck C, Dujon B. (2000) Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 4. The genome of *Saccharomyces cerevisiae* revisited. *FEBS Lett*, 487, 31-36.

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

Bonnefoy, N. and Fox, T.D. (2002) Genetic transformation of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Methods Enzymol*, 350, 97-111.

Brown, N.G., Costanzo, M.C. and Fox, T.D. (1994) Interactions among three proteins that specifically activate translation of the mitochondrial COX3 mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 14, 1045-1053.

Burke Dan, D.D., Stearns Tim. (2000) *Methods in Yeast Genetics*.

Cabral, F. and Schatz, G. (1978) Identification of cytochrome c oxidase subunits in nuclear yeast mutants lacking the functional enzyme. *J Biol Chem*, 253, 4396-4401.



Carr, H.S., George, G.N. and Winge, D.R. (2002) Yeast Cox11, a protein essential for cytochrome c oxidase assembly, is a Cu(I)-binding protein. *J Biol Chem*, 277, 31237-31242.

Chen, X. J., Wang, X., Kaufman, B. A., and Butow, R. A. (2005) Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance. *Science*, 307, 714–717.

Church C, Goehring B, Forsha D, Wazny P, Poyton RO. (2004) A role for Pet100p in the assembly of yeast cytochrome c oxidase: interaction with a subassembly that accumulates in a pet100 mutant. *J Biol Chem*, 280, 1854-63.

Cléry A, Blatter M, Allain FH. (2008) RNA recognition motifs: boring? Not quite. *Curr Opin Struct Biol*, 18, 290-8.

Costanzo, M.C. and Fox, T.D. (1988) Specific translational activation by nuclear gene products occurs in the 5' untranslated leader of a yeast mitochondrial mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 2677-2681.

Costanzo, M.C. and Fox, T.D. (1990) Control of mitochondrial gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet*, 24, 91-113.

Costanzo, M.C. Seaver, E.C. and Fox, T.D. (1986) At least two nuclear gene products are specifically required for translation of a single yeast mitochondrial mRNA. *Embo J*, 5, 3637-3641.

Costanzo, M.C., Seaver, E.C. and Fox, T.D. (1989) The PET54 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: characterization of a nuclear gene encoding a mitochondrial translational activator and subcellular localization of its product. *Genetics*, 122, 297-305.

Decoster E. Simon M. Hatat D. and Faye G. (1990) The MSS51 gene product is required for the translation of the COX1 mRNA in yeast mitochondria. *Mol Gen Genet*. 224(1):111-8.

Dieckmann, C.L. and Staples, R.R. (1994) Regulation of mitochondrial gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int Rev Cytol*, 152, 145-181.

Elzinga S. Bednarz A. van Oosterum K. Dekker P and Grivell L. (1993) Yeast mitochondrial NAD<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase is an RNA-binding protein. *Nucleic Acids Research*. 21(23): 5328-5331.

Fontanesi, F. Soto I.C., Horn, D. and Barrientos, A. (2006) Assembly of mitochondrial cytochrome c-oxidase, a complicated and highly regulated cellular process. *Am J Physiol Cell Physiol*, 291, C1129-1147.

Fontanesi F. Soto IC, Barrientos A. (2008) Cytochrome c oxidase biogenesis: new levels of regulation. *IUBMB Life*, 60, 557-68.

Fontanesi F. Soto I.C., Horn, D. and Barrientos, A. (2009) Mss51 and Ssc1 facilitate translational regulation of cytochrome c oxidase biogenesis. *Mol Cell Biol*.

Fontanesi F. Clemente P and Barrientos A. (2011) Cox25 teams up with Mss51, Ssc1, and Cox14 to regulate mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 expression and assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 7;286(1):555-66.

Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N. and Purnelle, B. (1998) The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 440, 325-331.

Foury, F. and Kucej, M. (2002) Yeast mitochondrial biogenesis: a model system for humans? *Curr Opin Chem Biol*, 6, 106-111.

Fox, T.D. (1996) Genetic strategies for identification of mitochondrial translation factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol*, 264, 228-237.

Fox, T.D. (1996) Translational control of endogenous and recoded nuclear genes in yeast mitochondria: regulation and membrane targeting. *Experientia*, 52, 1130-1135.

Fribourg S, Gatfield D, Izaurrealde E, Conti E. (2003) A novel mode of RBD-protein recognition in the Y14-Mago complex. *Nat Struct Biol*, 10, 433-9.

Gao X. Wen X. Esser L. Quinn B. Yu L. Yu CA. Xia D. (2003) Structural basis for the quinone reduction in the bc1 complex: a comparative analysis of crystal structures of mitochondrial cytochrome bc1 with bound substrate and inhibitors at the Qi site. *Biochemistry*; 42(30):9067-80.

Giraud MF. Paumard P. Sanchez C. Brèthes D. Velours J. Dautant A. (2012) Rotor architecture in the yeast and bovine F1-c-ring complexes of F-ATP synthase. *J Struct Biol*;177(2):490-7.

Glerum, D.M., Koerner, T.J. and Tzagoloff, A. (1995) Cloning and characterization of COX14, whose product is required for assembly of yeast cytochrome oxidase. *J Biol Chem*, 270, 15585-15590.

Glick BS, Pon LA. (1995) Isolation of highly purified mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol*, 260, 213-23.

Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG. (1996) Life with 6000 genes. *Science*, 274, 546-567.

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(6):1101-14.

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(1):137-50

Herrmann, J.M., Westermann, B. and Neupert, W. (2001) Analysis of protein-protein interactions in mitochondria by coimmunoprecipitation and chemical cross-linking. *Methods Cell Biol*, 65, 217-230.

Herrmann, J.M. and Funes, S. (2005) Biogenesis of cytochrome oxidase sophisticated assembly lines in the mitochondrial inner membrane. *Gene*, 354, 43-52.

Herrmann JM, Longen S, Weckbecker D, Depuydt M. (2012) Biogenesis of mitochondrial proteins. *Adv Exp Med Biol*, 748, 41-64.

Horan, S., Bourges, I., Taanman, J.W. and Meunier, B. (2005) Analysis of COX2 mutants reveals cytochrome oxidase subassemblies in yeast. *Biochem J*, 390,703-708.

Hornig-Do HT, Tatsuta T, Buckermann A, Bust M, Kollberg G, Rötig A, Hellmich M, Nijtmans L, Wiesner RJ. (2012) Nonsense mutations in the COX1 subunit impair the stability of respiratory chain complexes rather than their assembly. *EMBO J*, 31, 1293-307.

James, P., Halladay, J., and Craig, E. A. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast *Genetics* 144(4), 1425-1436.

Kaspar, B.J., Bifano, A.L. and Caprara, M.G. (2008) A shared RNA-binding site in the Pet54 protein is required for translational activation and group I intron splicing in yeast mitochondria. *Nucleic Acids Res*, 36, 2958-2968.

Kaser M, Kambacheld M, Kisters-Woike B, Langer T. (2003) Oma1, a novel membrane-bound metallopeptidase in mitochondria with activities overlapping with the m-AAA protease. *J Biol Chem*, 278, 46414-23.

- Khalimonchuk, O., Bird, A. and Winge, D.R. (2007) Evidence for a pro-oxidant intermediate in the assembly of cytochrome oxidase. *J Biol Chem*, 282, 17442-17449.
- Khalimonchuk, O., Rigby, K., Bestwick, M., Pierrel, F., Cobine, P.A. and Winge, D.R. (2008) Pet191 is a cytochrome c oxidase assembly factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*, 7, 1427-1431.
- Khalimonchuk, O. Bestwick, M. Meunier B. Watts T.C. and Winge, D.R. (2010) Formation of the Redox Cofactor Centers during Cox1 Maturation in Yeast Cytochrome Oxidase. *Mol Cell Biol*.
- Khalimonchuk O. Jeong MY, Watts T, Ferris E, Winge DR. (2012) Selective Oma1 protease-mediated proteolysis of Cox1 subunit of cytochrome oxidase in assembly mutants. *J Biol Chem*; 287(10):7289-300.
- Khersonsky O, Tawfik DS. (2010) Enzyme promiscuity: a mechanistic and evolutionary perspective. *Annu Rev Biochem*, 79, 471-505.
- Kloeckener-Gruissem B, McEwen JE, Poyton RO, (1988) Identification of a third nuclear protein-coding gene required specifically for posttranscriptional expression of the mitochondrial COX3 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*. 1988 Mar;170(3):1399-402.
- Langer T, Käser M, Klanner C, Leonhard K. (2001) AAA proteases of mitochondria: quality control of membrane proteins and regulatory functions during mitochondrial biogenesis. *Biochem Soc Trans*, 29, 431-6.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Leung, G. P., Lee, L., Schmidt, T. I., Shirahige, K., and Kobor, M. S. (2011) Rtt107 is required for recruitment of the SMC5/6 complex to DNA double strand breaks. *J. Biol. Chem*. 286, 26250–26257.
- Lipinski, K.A., Kaniak-Golik, A. and Golik, P. (2010) Maintenance and expression of the *S. cerevisiae* mitochondrial genome-From genetics to evolution and systems biology. *Biochim Biophys Acta*.
- Manthey, G.M. and McEwen, J.E. (1995) The product of the nuclear gene PET309 is required for translation of mature mRNA and stability or production of intron-containing RNAs derived from the mitochondrial COX1 locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J*, 14, 4031-4043.

Maris C, Dominguez C, Allain FH. (2005) The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. FEBS J, 272, 2118-31.

Markwell, M.A., Haas, S.M., Bieber, L.L. and Tolbert, N.E. (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. Anal Biochem, 87, 206-210.

Mayorga JP, Camacho-Villasana Y, Shingú-Vázquez M, García-Villegas R, Zamudio-Ochoa A, García-Guerrero AE, Hernández G, Pérez-Martínez X. (2016) A Novel Function of Pet54 in Regulation of Cox1 Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondria. J Biol Chem. 2016 Apr 22;291(17):9343-55.

McMullin, T.W. and Fox, T.D. (1993) COX3 mRNA-specific translational activator proteins are associated with the inner mitochondrial membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 268, 11737-11741.

McStay GP, Su CH, Tzagoloff A. (2013) Stabilization of Cox1p intermediates by the Cox14p-Coa3p complex. FEBS Lett, 587, 943-9.

McStay GP, Su C. and Tzagoloff A. (2013). Modular assembly of yeast cytochrome oxidase. Mol Biol Cell; 24(4):440-52.

Mick DU, Vukotic M, Piechura H, Meyer HE, Warscheid B, Deckers M, Rehling P. (2010) Coa3 and Cox14 are essential for negative feedback regulation of COX1 translation in mitochondria. J Cell Biol, 191, 141-54.

Mick DU, Fox TD, Rehling P. (2012) Inventory control: cytochrome c oxidase assembly regulates mitochondrial translation. Nat Rev Mol Cell Biol, 12, 14-20.

Moyer AL, Wagner KR. (2015) Mammalian Mss51 is a skeletal muscle-specific gene modulating cellular metabolism. J Neuromuscul Dis. 2015;2(4):371-385.

Mulero, J.J. and Fox, T.D. (1993) Alteration of the *Saccharomyces cerevisiae* COX2 mRNA 5'-untranslated leader by mitochondrial gene replacement and functional interaction with the translational activator protein PET111. Mol Biol Cell, 4, 1327-1335.

Naithani, S., Saracco, S. A., Butler, C. A., and Fox, T. D. (2003) Interactions among COX1, COX2, and COX3 mRNA-specific translational activator proteins on the inner surface of the mitochondrial inner membrane of *Saccharomyces cerevisiae* Mol Biol Cell 14(1), 324-333.

Nakai T, Mera Y, Yasuhara T, Ohashi A. (1994) Divalent metal ion-dependent mitochondrial degradation of unassembled subunits 2 and 3 of cytochrome c oxidase. *J Biochem*, 116, 752-8.

Perez-Martinez, X., Broadley, S.A. and Fox, T.D. (2003) Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. *Embo J*, 22, 5951-5961.

Perez-Martinez, X., Butler, C.A., Shingu-Vazquez, M. and Fox, T.D. (2009) Dual Functions of Mss51 Couple Synthesis of Cox1 to Assembly of Cytochrome c Oxidase in *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondria. *Mol Biol Cell*.

Pierrel, F., Bestwick, M.L., Cobine, P.A., Khalimonchuk, O., Cricco, J.A. and Winge, D.R. (2007) Coa1 links the Mss51 post-translational function to Cox1 cofactor insertion in cytochrome c oxidase assembly. *Embo J*, 26, 4335-4346.

Poutre CG, Fox TD. (1987) PET111, a *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene required for translation of the mitochondrial mRNA encoding cytochrome c oxidase subunit II. *Genetics*, 115, 637-47.

Roloff GA, Henry MF. (2015) Mam33 promotes cytochrome c oxidase subunit I translation in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Mol Biol Cell*; 26(16):2885-94.

Ruzzenente B, Metodiev MD, Wredenberg A, Bratic A, Park CB, Cámara Y, Milenkovic D, Zickermann V, Wibom R, Hulthenby K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Brandt U, Stewart JB, Gustafsson CM, Larsson NG. (2011) LRPPRC is necessary for polyadenylation and coordination of translation of mitochondrial mRNAs. *EMBO J*, 31, 443-56.

Schäfer B. (2005) RNA maturation in mitochondria of *S. cerevisiae* and *S. pombe*. *Gene*; 354:80-5

Séraphin B, Boulet A, Simon M, Faye G. (1987) Construction of a yeast strain devoid of mitochondrial introns and its use to screen nuclear genes involved in mitochondrial splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 84(19):6810-4.

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, 34382-9.

Siep, M., van Oosterum, K., Neufeglise, H., van der Spek, H. and Grivell, L.A. (2000) Mss51p, a putative translational activator of cytochrome c oxidase subunit-1

(COX1) mRNA, is required for synthesis of Cox1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, 37, 213-220.

Sondra L. Anderson, Karyl I. Minard, and Lee McAlister-Henn. (2000) Allosteric Inhibition of NAD<sup>+</sup>-Specific Isocitrate Dehydrogenase by a Mitochondrial mRNA. *Biochemistry*.16;39(19):5623-9.

Soto IC, Fontanesi F, Liu J, Barrientos A. (2012) Biogenesis and assembly of eukaryotic cytochrome c oxidase catalytic core. *Biochim Biophys Acta*, 1817,883-97.

Soto IC and Barrientos A. (2016) Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Biogenesis Is Regulated by the Redox State of a Heme-Binding Translational Activator. *Antioxid Redox Signal*. 2016 Feb 20;24(6):281-98.

Steele, D.F., Butler, C.A. and Fox, T.D. (1996) Expression of a recoded nuclear gene inserted into yeast mitochondrial DNA is limited by mRNA-specific translational activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 5253-5257.

Dröse S, Brandt U. (2012) Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Adv Exp Med Biol*. 2012;748:145-69.

Su CH, McStay GP, Tzagoloff A. (2014) The Cox3p assembly module of yeast cytochrome oxidase. *Mol Biol Cell*. 25 (7); 965-76.

Sun F. Huo X. Zhai Y. Wang A. Xu J. Su D. Bartlam M. Rao Z. (2005). Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell*;121(7):1043-57.

Szklarczyk R, Wanschers BF, Cuyper TD, Esseling JJ, Riemersma M, van den Brand MA, Gloerich J, Lasonder E, van den Heuvel LP, Nijtmans LG, Huynen MA, (2012) Iterative orthology prediction uncovers new mitochondrial proteins and identifies C12orf62 as the human ortholog of COX14, a protein involved in the assembly of cytochrome c oxidase. *Genome Biol* 13(2):R12.

Taanman JW, Capaldi RA. (1993) Subunit VIa of yeast cytochrome c oxidase is not necessary for assembly of the enzyme complex but modulates the enzyme activity. Isolation and characterization of the nuclear-coded gene. *J Biol Chem*, 268, 18754-61.

Tavares-Carreón, F., Camacho-Villasana, Y., Zamudio-Ochoa, A., Shingu-Vázquez, M., Torres-Larios, A. and Pérez-Martínez, X. (2008) The pentatricopeptide repeats present in Pet309 are necessary for translation but not

for stability of the mitochondrial COX1 mRNA in yeast. *J Biol Chem*, 283, 1472-1479.

Towpik J. (2005) Regulation of mitochondrial translation in yeast. *Cell Mol Biol Lett*, 10, 571-94.

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

Tzagoloff A, Myers AM. (1986) Genetics of mitochondrial biogenesis. *Annu Rev Biochem*, 55,249-85

Valencik, M.L., Kloeckener-Gruissem, B., Poyton, R.O. and McEwen, J.E. (1989) Disruption of the yeast nuclear PET54 gene blocks excision of mitochondrial intron *al5 beta* from pre-mRNA for cytochrome c oxidase subunit I. *Embo J*, 8, 3899-3904.

Valencik, M.L. and McEwen, J.E. (1991) Genetic evidence that different functional domains of the PET54 gene product facilitate expression of the mitochondrial genes COX1 and COX3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 11, 2399-2405.

Vukotic M, Oeljeklaus S, Wiese S, Vögtle FN, Meisinger C, Meyer HE, Zieseniss A, Katschinski DM, Jans DC, Jakobs S, Warscheid B, Rehling P, Deckers M. (2012) Rcf1 mediates cytochrome oxidase assembly and respirasome formation, revealing heterogeneity of the enzyme complex. *Cell Metab*. 2012 Mar 7;15(3):336-47.

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

Williams, SL, Valnot I, Rustin P, Taanman JW. (2004) Cytochrome c oxidase subassemblies in fibroblast cultures from patients carrying mutations in COX10, SCO1, or SURF1. *J Biol Chem*,279, 7462-9.

Wittig, I, Braun, H.P. and Schagger, H. (2006) Blue native PAGE. *Nat Protoc*, 1, 418-428.

Zambrano, A, Fontanesi, F., Solans, A., de Oliveira, R.L., Fox, T.D., Tzagoloff, A. and Barrientos, A. (2007) Aberrant translation of cytochrome c oxidase subunit 1



mRNA species in the absence of Mss51p in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 18, 523-535.

Zamudio-Ochoa, A., Camacho-Villasana, Y., García-Guerrero, AE., Pérez-Martínez, X. (2014). The Pet309 pentatricopeptide repeat motifs mediate efficient binding to the mitochondrial COX1 transcript in yeast. *RNA Biol*;11(7):953-67.

Zhang, Y. (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9: 40.

Zhao, X., Muller, E. G., and Rothstein, R. (1998) A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools. *Mol. Cell* 2, 329–340.