



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

“Caracterización de la función de las proteínas Cbp3 y Cbp6 sobre la biogénesis de Cytb en mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*”

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
ALDO EDUARDO GARCÍA GUERRERO

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. XOCHITL PÉREZ MARTÍNEZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

COMITÉ TUTOR
DRA. SOLEDAD FUNES ARGÜELLO
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
DR. ÓSCAR FLORES HERRERA
FACULTAD DE MEDICINA

CD.MX., JUNIO 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECONOCIMIENTOS

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

Se agradece al Comité tutorial conformado por:

- Dra. Xochitl Pérez Martínez, Instituto de Fisiología Celular
- Dra. Soledad Funes Argüello, Instituto de Fisiología Celular
- Dr. Óscar Flores Herrera, Facultad de Medicina

por su valiosa asesoría, apoyo y comentarios a este trabajo.

Se agradece al Jurado integrado por:

- Presidente: Dr. Roberto Coria Ortega, Instituto de Fisiología Celular
- Secretario: Dra. Soledad Funes Argüello, Instituto de Fisiología Celular
- Vocal: Dra. María Alicia González Manjarrez, Instituto de Fisiología Celular
- Vocal: Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar, Facultad de Química
- Vocal: Dra. Emma Bertha Gutiérrez Cirlos Madrid, FES Iztacala

Se agradece de manera especial la asesoría técnica e invaluable participación en este trabajo, especialmente en la elaboración de la Figura 21 a la Dra. Yolanda Camacho Villasana, Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Se agradece la participación de la Dra. Angélica Zamudio Ochoa en la elaboración de la Figura 20 y por sus invaluable comentarios durante la realización de todo mi doctorado.

Se agradece la invaluable asesoría y participación durante la realización de este trabajo al Dr. Dennis R. Winge, School of Medicine, University of Utah

Se agradece la asesoría técnica de:

- Dra. Emma Bertha Gutierrez Cirlos Madrid, FES Iztacala
- M.C. Tecilli Cabellos Avelar, FES Iztacala
- Dra. Teresa Lara Ortiz, Instituto de Fisiología Celular
- Q.B.P. Miriam Vázquez-Acevedo, Instituto de Fisiología Celular
- Dra. Laura Ongay Larios
- Biol. Guadalupe Códiz Huerta
- M.C. Minerva Mora Cabrera
- M.V.Z. Claudia V. Rivera Cerecedo
- M.V.Z. Héctor Malagón Rivera
- Juan Manuel Barbosa Castillo
- Ivette Rosas Arciniega

Este trabajo fue apoyado por los financiamientos:

- CONACyT: 47514
- PAPIIT (UNAM): IN204414 e IN209217

Durante la realización de este trabajo recibí la beca de doctorado por parte de:

- CONACyT: 255917
- PAPIIT (UNAM): IN204414 e IN209217

CONTENIDO

ABREVIATURAS	8
RESUMEN	10
ABSTRACT	12
INTRODUCCIÓN	14
1. La mitocondria	14
2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudios mitocondriales	15
3. El genoma mitocondrial de <i>S. cerevisiae</i>	15
3.1. La mitocondria contiene su propia maquinaria de mantenimiento y expresión del genoma mitocondrial	15
3.2. Contenido del genoma mitocondrial en <i>S. cerevisiae</i>	17
4. La cadena respiratoria mitocondrial de <i>S. cerevisiae</i>	19
4.1. Los componentes de la cadena respiratoria mitocondrial en <i>S. cerevisiae</i>	19
4.2. Los complejos respiratorios forman supercomplejos	21
5. El complejo <i>bc₁</i>	22
5.1. El ensamblaje del complejo <i>bc₁</i> involucra la formación de distintos subcomplejos	24
6. La síntesis de <i>Cytb</i> en mitocondrias de <i>S. cerevisiae</i>	26
6.1. El proceso de maduración del transcrito de <i>COB</i>	26
6.2. El mRNA de <i>COB</i> necesita de activadores traduccionales	26
6.3. Modelo propuesto de la regulación de la síntesis de <i>Cytb</i>	27
7. Diversas cepas de <i>S. cerevisiae</i> se utilizan como modelo de estudio	28
JUSTIFICACION	32
HIPÓTESIS	34
OBJETIVO	34
OBJETIVOS PARTICULARES	34
RESULTADOS	36
• En la cepa D273-10b la síntesis de <i>Cytb</i> no depende de Cbp3 y Cbp6	36
• En la cepa BY4742 la síntesis de <i>Cytb</i> depende de Cbp3 y Cbp6	37

• En la cepa D273-10b, <i>Cytb</i> y la proteína Rieske (Rip1) son estables en la ausencia de Cbp3 y Cbp6	44
• <i>Cytb</i> y Rip1 se asocian a supercomplejos en la ausencia de Cbp3 y Cbp6 en la cepa D273-10b	47
• Cbp3 y Cbp6 asisten la hemilación de <i>Cytb</i>	52
• Cbp3 y Cbp6 se asocian al ribosoma mitocondrial y se unen físicamente al mRNA de <i>COB</i>	54
• La síntesis de <i>Cytb</i> en las cepas BY4742 y D273-10b es diferente debido a polimorfismos en el genoma nuclear	60
• Dos genes están involucrados en la función diferencial de Cbp3 y Cbp6 sobre la síntesis de <i>Cytb</i>	63
• La proteína Smt1 no parece ser responsable de la regulación diferencial de la síntesis de <i>Cytb</i>	65
DISCUSIÓN	68
• Sobre la función de Cbp3 y Cbp6 en la activación traduccional del RNA mensajero de <i>COB</i>	69
• Sobre la función de Cbp3 y Cbp6 como chaperonas de la biogénesis de <i>Cytb</i>	75
CONCLUSIONES	81
PERSPECTIVAS	82
MATERIALES Y MÉTODOS	84
Generación de mutantes nucleares de <i>S. cerevisiae</i>	84
• Diseño de casetes para generar mutaciones nucleares	84
• Fusión de la etiqueta de hemaglutinina (HA) en el extremo carboxilo terminal de Cbp3	86
• Clonación del gen <i>SMT1</i> de la cepa D273-10b	87
• Generación de la construcción <i>COB(1-385)::pARG8^m</i>	87
• Generación de la construcción <i>cobΔ::ARG8^m</i>	90
• Purificación de productos de PCR	90
• Extracción de DNA plasmídico por kit	91

• Medios de cultivo utilizados en este estudio	91
• Diluciones seriadas	92
• Transformación de levadura	93
• Purificación de DNA total de levadura	94
• Extracción de DNA plasmídico	95
• Transformación de <i>Escherichia coli</i>	96
• Transformación de células quimiocompetentes de <i>Escherichia coli</i> por choque térmico	97
• Transformación mitocondrial por biobalística	97
• Citoinducción	101
• Obtención de la fracción mitocondrial cruda	101
• Purificación de mitocondrias crudas en gradiente de Nicodenz	103
• Cuantificación de proteínas por método de Lowry	105
• Análisis de agregados proteicos	106
• Separación de ribosomas con gradiente de sacarosa	107
• Inmunoprecipitación de complejos proteína-RNA	108
• RT-PCR	110
• Síntesis y marcaje radioactivo <i>in vivo</i> de proteínas mitocondriales (ivTL)	112
• Geles de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE)	114
• Análisis de los complejos proteicos mitocondriales mediante electroforesis nativa azul (BN-PAGE)	116
• Actividad <i>in gel</i> de la CcO	118
• Western blot	118
• Generación de anticuerpos contra <i>Cytb</i>	121
• Preparación de membranas de mitocondrias de levadura	121
- Purificación del complejo <i>bc₁</i> de <i>S. cerevisiae</i>	122
- Generación de anticuerpos α - <i>Cytb</i>	124
• Espectros de hemocromos mitocondriales	125
• Cuantificación de hemo <i>b</i> por HPLC	125
- Extracción de hemos totales	125

- Condiciones HPLC	125
APÉNDICE	127
• Oligonucleótidos utilizados en este estudio	127
• Anticuerpo utilizados en este estudio	128
• Cepas utilizadas en este estudio	129
BIBLIOGRAFÍA	133
PUBLICACIONES DURANTE ESTUDIOS DE DOCTORADO	140
• Cbp3 and Cbp6 are dispensable for synthesis regulation of Cytochrome <i>b</i> in yeast mitochondria. Journal of Biological Chemistry. 2018. Aldo E. García-Guerrero; Yolanda Camacho-Villasana; Angélica Zamudio-Ochoa; Dennis R. Winge; y Xochitl Pérez-Martínez.	140
• Chapter: Evolution of Translation in Mitochondria. G. Hernández and R. Jagus (eds.), Evolution of Protein Synthesis Machinery and Its Regulation. 2016. Aldo E. García-Guerrero, Angélica Zamudio-Ochoa, Yolanda Camacho-Villasana, Rodolfo García-Villegas, Adrián Reyes-Prieto and Xochitl Pérez-Martínez	155
• A Novel Function of Pet54 in Regulation of Cox1 Synthesis in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Mitochondria. JBC. 2016. Juan Pablo Mayorga-Juarez, Yolanda Camacho-Villasana, Miguel Shingú-Vázquez, Rodolfo García-Villegas, Angélica Zamudio-Ochoa, Aldo E. García-Guerrero, Greco Hernández, and Xochitl Pérez-Martínez	178
• The Pet309 pentatricopeptide repeat motifs mediate efficient binding to the mitochondrial <i>COX1</i> transcript in yeast. RNA Biology. 2014. Angélica Zamudio-Ochoa, Yolanda Camacho-Villasana, Aldo E. García-Guerrero, and Xochitl Pérez-Martínez	179

ABREVIATURAS

3'UTR	Región 3' no traducida del mRNA
5'UTR	Región 5' no traducida del mRNA
ADP	Adenosil difosfato
apoCytb	Apocitocromo <i>b</i>
APS	Persulfato de amonio
arg ⁻	Cepa sin fenotipo de crecimiento en medio sin arginina
arg ⁺	Cepa con fenotipo de crecimiento en medio sin arginina
ATP	Adenosil trifosfato
ATP6	Gen de la subunidad Atp6 de la ATP sintasa
ATP8	Gen de la subunidad Atp8 de la ATP sintasa
ATP9	Gen de la subunidad Atp9 de la ATP sintasa
AUG	Codón de inicio de la traducción
Bis-tris	1,3-bis(tris(hydroxymethyl)methylamino)propane
BN-PAGE	Gel de acrilamida en condiciones nativas
BSA	Albumina bovina sérica
CcO	Citocromo <i>c</i> oxidasa
cDNA	Ácido desoxirribonucleíco complementario
COB	Gen que codifica para la subunidad citocromo <i>b</i> del complejo <i>bc₁</i>
COX1	Gen que codifica para la subunidad 1 de la CcO
COX2	Gen que codifica para la subunidad 2 de la CcO
COX3	Gen que codifica para la subunidad 3 de la CcO
Cytb	Citocromo <i>b</i>
Cytc	Citocromo <i>c</i>
Cytc ₁	Citocromo <i>c</i> ₁
DEAE-Biogel	Dietilaminoetil celulosa
dH ₂ O	Agua destilada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxi-nucleótidos tri-fosfatados
DTT	Ditiotreitol
ECL	Quimioluminiscencia aumentada (Enhanced chemiluminescence)
EDTA	Ácido etilendiamintetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción por enzimas (Enzyme-linked immunosorbent assay)
FAD ⁺	Flavin adenin dinucleótido oxidado
FADH ₂	Flavin adenin nucleótido reducido
G418	Antibiótico genético
Gal	Galactosa
HA	Hemaglutinina
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinotanosulfónico
HPLC	Cromatografía líquida de altaeficacia (High performance liquid chromatography)
IP	Inmunoprecipitado
met	Metionina
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
mtDNA	Genoma mitocondrial
NAC	Complejo asociado al péptido naciente (Nascent polypeptide associated complex)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
Nde1	NADH deshidrogenasa alterna (matriz mitocondrial)
Nde2	NADH deshidrogenasa alterna (matriz mitocondrial)
Ndi1	NADH deshidrogenasa alterna (espacio intermembranal)
nt	Nucleótido
oligo	Oligonucleótido
O/N	Toda la noche (over night)
orf	Marco de lectura abierto (open reading frame)

P	Botón (pellet)
<i>pARG8^m</i>	Gen de la enzima acetilornitina aminotransferasa (Arg8)
PCR	Reacción en cadena en polimerasa
PDB	Banco de datos de proteínas (Protein Data Base)
PEG	Polietilen glicol
<i>pef⁻</i>	Cepa con fenotipo respiratorio
<i>pef⁺</i>	Cepa con fenotipo no respiratorio
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonato
PPR	Repetición de pentatricopéptido
PVDF	Polifloruro de vinilideno
Q	Ubiquinina
Q*	Radical semiquinona
QH ₂	Ubiquinol
Rip1	Proteína Rieske
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
RT-PCR	Reacción de polimerasa en cadena reversa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes
SN	Sobrenadante
TaqPol	Polimerasa de <i>Termus aquaticus</i>
TCA	Ácido tricloro acético
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etano-1,2-diamina
TLCK	N α -Tosil-Lys-clorometilcetona
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
<i>tRNA^{glu}</i>	Ácido ribonucleico de transferencia para ácido glutámico
UV	Ultravioleta
<i>VAR1</i>	Gen que codifica para la proteína Var1 de la subunidad chica ribosomal mitocondrial
VIH+	Positivo al virus de la inmunodeficiencia humana
WT	Silvestre (wild-type)

RESUMEN

En la mitocondria, el complejo III respiratorio o complejo *bc₁* oxida el ubiquinol, reduce al citocromo *c* y transfiere 4 protones (H^+) al espacio intermembranal. El complejo *bc₁* en *Saccharomyces cerevisiae* está conformado por 10 subunidades de las cuales el citocromo *b* (*Cytb*) es la única subunidad codificada en el genoma mitocondrial. El ensamblaje del complejo *bc₁* se divide en 3 distintas etapas: temprana, intermedia y tardía (1). En la etapa temprana del ensamblaje del complejo *bc₁*, las subunidades, *Cytb*, *Qcr7* y *Qcr8* forman el primer subcomplejo. Es en esta etapa que *Cytb* adquiere sus grupos hemo *b* (2). Las chaperonas *Cbp3*, *Cbp6* y *Cbp4* tienen una función en la formación del subcomplejo *Cytb-Qcr7-Qcr8* (3-5). La traducción del mRNA de *Cytb* (*COB*) es asistido por 5 activadores traduccionales, entre ellos *Cbp3* y *Cbp6*. Estas dos acoplan la traducción del mRNA de *COB* y el ensamblaje de *Cytb* (6,7). En el presente trabajo, descubrimos que la función de *Cbp3* y *Cbp6* varía según la cepa de *S. cerevisiae* que se utilice como modelo de estudio. En la cepa BY4742, *Cbp3* y *Cbp6* regulan la síntesis de *Cytb*, pero en la cepa D273-10b no funcionan como activadores traduccionales. Esto nos permitió evaluar con mayor detalle las funciones de *Cbp3* y *Cbp6* en la síntesis de *Cytb*. Aunque, *Cbp3* y *Cbp6* no tengan una función sobre la síntesis de *Cytb* en la cepa D273-10b, descubrimos que *Cbp3* y *Cbp6* se asocian al mRNA de *COB*, sugiriendo que esta interacción no es suficiente para que se lleve a cabo la síntesis de *Cytb*. Nuestros datos indican que dos nuevos factores sin identificar (“X” y “Y”) de origen nuclear están involucrados en esta diferencia. Consideramos que estos factores asisten a *Cbp3* y *Cbp6* en la activación de la traducción del mRNA de *COB*.

A pesar de que en la cepa D273-10b, *Cbp3* y *Cbp6* no participan en la síntesis de *Cytb*, encontramos que las mutantes nulas son incapaces de respirar, indicando que aún son necesarias como chaperonas de la biogénesis de *Cytb*. Reportes previos y nuestros datos confirmaron que *Cbp3* y *Cbp6* son chaperonas necesarias para que *Cytb* adquiriera sus grupos hemo *b* (8). Encontramos que en las cepas BY4742 y D273-10b, *Cbp3* interactúa con el mitorribosoma, confirmando observaciones previas que sugieren

que Cbp3 y Cbp6 interactúan con el túnel de salida ribosomal (6). Consideramos que Cbp3 y Cbp6 interactúan con *Cytb* recién sintetizado para que *Cytb* se mantenga en una conformación accesible para adquirir sus grupos hemo *b*.

En nuestro trabajo también observamos que la citocromo *c* oxidasa (CcO) se asocia con el complejo bc_1 en etapas tempranas del ensamblaje para la formación de supercomplejos (III_2/IV_2 y III_2/IV), y descubrimos que este proceso no depende de que *Cytb* se encuentre hemilado ni de la función de Cbp3 y Cbp6.

Nuestro estudio permitió descubrir que existen otros dos nuevos factores que son modulados por Cbp3 y Cbp6 para permitir la síntesis de *Cytb*. Adicionalmente caracterizamos con mayor detalle la función de Cbp3 y Cbp6 como chaperonas de la biogénesis de *Cytb*.

ABSTRACT

Mitochondrial respiratory complex III or *bc₁* complex oxidizes ubiquinol, reduces cytochrome *c* and pumps 4 protons (H⁺) to the intermembrane space. In *Saccharomyces cerevisiae* complex *bc₁* is made of 10 subunits, where cytochrome *b* (*Cytb*) is the only mitochondrial encoded subunit. The assembly of *bc₁* complex is divided in three different phases: early, intermediate and late stages (1). At the early assembly stage, *Cytb* acquires its 2 hemes *b* and interacts with subunits Qcr7 and Qcr8, forming the first assembly subcomplex (2). The chaperones Cbp3, Cbp6 and Cbp4 have a role in the formation of the *Cytb*-Qcr7-Qcr8 subcomplex (3-5). Translation of *Cytb* mRNA (*COB*) is assisted by 5 translational activators, including Cbp3 and Cbp6, which are proposed to couple translation of the *COB* mRNA with *Cytb* assembly (6,7). In this project, we found strain-specific differences in the function of Cbp3 and Cbp6. In the BY4742 strain, Cbp3 and Cbp6 regulate *Cytb* synthesis, while Cbp3 and Cbp6 do not affect *COB* mRNA translation in the D273-10b strain. This observation allowed us to characterize the specific function of Cbp3 and Cbp6 in *Cytb* synthesis. Although Cbp3 and Cbp6 lack a role on *Cytb* synthesis in the D273-10b strain, we observed that these proteins interacted with *COB* mRNA in both strains, indicating that this interaction is not sufficient for activation of *Cytb* synthesis. Our data predicts the existence of two new nuclear-origin factors ('X' and 'Y') which are involved in the difference between the D273-10b and BY4742 yeast strains. We consider that these two factors assist Cbp3 and Cbp6 in translational activation of the *COB* mRNA.

Although the null mutants, $\Delta cbp3$ and $\Delta cbp6$ in the D273-10b background present normal *Cytb* synthesis, a respiratory phenotype was absent. This indicates an important role of Cbp3 and Cbp6 as chaperones of *Cytb* biogenesis. Consequently, we further characterized the role of Cbp3 and Cbp6 as chaperones. Our data confirmed that Cbp3 and Cbp6 have an important role for *Cytb* hemylation as it was previously reported (8). We considered that Cbp3 and Cbp6 interact early with *Cytb*, because these chaperones associate with the mitoribosomal tunnel exit in both, D273-10B and BY4742 strains, as it

was previously reported (6). This interaction may be necessary to maintain *Cytb* in an accessible conformation for hemes *b* assembly.

In addition, we observed that cytochrome *c* oxidase (CcO) interacts with the *bc*₁ complex at early assembly stages for supercomplex formation (III₂/IV₂ y III₂/IV), and this process does not depend on *Cytb* hemylation or Cbp3 and Cbp6 function.

Our study allowed us to discover that there are at least two new factors which are modulated by Cbp3 and Cbp6 to activate *Cytb* synthesis. Additionally, we characterized in better detail the function of Cbp3 and Cbp6 as chaperones of *Cytb* biogenesis.

INTRODUCCIÓN

1. La mitocondria

La mitocondria es un organelo celular que contiene dos membranas, una membrana externa permeable a moléculas pequeñas y a iones (< 5 kDa), los cuales se mueven libremente entre la membrana externa a través de canales transmembranales (porinas) y una membrana interna mitocondrial impermeable, la cual es selectiva a la mayoría de los iones, incluyendo a los protones (H^+). Las membranas separan dos distintos compartimentos, el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial (9).

En la membrana interna mitocondrial se localizan los complejos respiratorios que forman el gradiente electroquímico entre el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial. Adicionalmente la membrana interna mitocondrial se ha dividido en dos áreas distintas: la membrana interna cercana a la membrana externa, donde se localiza la maquinaria de importación mitocondrial (10); y la membrana interna de las crestas mitocondriales, donde se localizan los complejos respiratorios y la ATP sintasa (11).

Las funciones de la mitocondria en la célula eucarionte son esenciales y variadas. Por ejemplo, es el principal proveedor energético de la célula a través de la síntesis de ATP mediante la fosforilación oxidativa. La mitocondria provee a la célula de metabolitos esenciales derivados de vías metabólicas exclusivas de la mitocondria para la formación de aminoácidos, grupos hemo y bases nitrogenadas. Este organelo degrada los ácidos grasos y produce ATP mediante la β -oxidación (9). La mitocondria también regula diversas funciones celulares que van desde la modulación de la síntesis de ATP ante diferentes estímulos (12), responde a cambios en los niveles de calcio (Ca^{2+}) dentro de ciertas vías de señalización (13), y desempeñan un papel importante en la apoptosis (12) y en modulación de las respuestas inflamatorias ante patógenos (14).

La mitocondria forma una red dentro de la célula, la cual es altamente dinámica por procesos de fusión y fisión. Esta dinámica también está regulada, controla el estado energético de la célula (15).

2. *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudios mitocondriales

Saccharomyces cerevisiae es un hongo unicelular cuyo hábitat común es la superficie de las frutas. De forma industrial y biotecnológica, *S. cerevisiae* se utiliza en la fabricación de bebidas alcohólicas, así como la elaboración de pan. En la actualidad, *S. cerevisiae* también es utilizado como modelo experimental por su fácil manipulación, su ciclo de vida corto, porque es capaz de crecer en diversas condiciones, y porque la selección, tamizaje, identificación y creación de nuevas mutantes, involucra técnicas sencillas de realizar. Pero una de las principales características que han hecho a *S. cerevisiae* un modelo experimental importante es la relativa facilidad para la manipulación del genoma nuclear y mitocondrial (16). Adicionalmente *S. cerevisiae* ha sido ampliamente utilizada en estudios mitocondriales debido a que se pueden generar mutantes que afecten la capacidad respiratoria sin afectar la viabilidad de la célula.

Aunque es un organismo simple, *S. cerevisiae* comparte funciones celulares similares con eucariontes superiores como los seres humanos. Por ejemplo, presenta procesos similares de replicación, reparación y recombinación del DNA, transcripción, traducción, tráfico vesicular, autofagia, así como vías enzimáticas conservadas en el metabolismo general y biogénesis mitocondrial (17,18).

3. El genoma mitocondrial de *S. cerevisiae*

3.1. La mitocondria contiene su propia maquinaria de mantenimiento y expresión del genoma mitocondrial

Debido al origen endosimbionte de la mitocondria, ésta contiene su propio material genético, así como la maquinaria para su manutención, replicación, transcripción y traducción (19). En *S. cerevisiae* se ha observado que la mayor regulación genética está en el proceso de traducción, además de que la maquinaria traduccional está altamente especializada en la síntesis de proteínas hidrofóbicas y en su ensamblaje co-traduccional (20). Los ribosomas mitocondriales o mitoribosomas son homólogos a los ribosomas bacterianos, aunque la proporción RNA-proteína varía entre ellos (1:2 y 1:1

para mitocondria de levadura y bovino respectivamente, y 2:1 para bacteria) y los ribosomas mitocondriales a diferencia de los bacterianos están constantemente asociados a la membrana interna mitocondrial (21,22). Probablemente esta asociación se debe a que la traducción y la inserción en la membrana están acoplados en mitocondria; este acoplamiento entre ambos sistemas se debe a la asociación del ribosoma con el dominio carboxilo terminal de la translocasa de membrana Oxa1 (23), y a las chaperonas Mba1 y Mdm38 (22), así como a su asociación con los activadores traduccionales que también se localizan en la membrana interna mitocondrial (Figura 1) (24). Cada mRNA en mitocondria necesita de sus propios activadores traduccionales para que pueda proceder el inicio de la traducción. En *S. cerevisiae* cada mRNA mitocondrial contiene su propio grupo de activadores traduccionales. Por ejemplo, para el mRNA de *COB* se necesitan los activadores Cbs1, Cbs2, Cbp3, Cbp6 y Cbp1 (6,25,26); para *COX1*, Pet309, Mss51 y Pet54 (27-29); para *COX2*, Pet111 (30); para *COX3*, Pet54, Pet122 y Pet494 (31,32); para *ATP6/ATP8*, Atp22 y Smt1 (33,34); y para *ATP9*, Aep1 y Aep2 (35,36). Se piensa que la función de los activadores traduccionales es asistir al mitorribosoma para localizar el codón AUG de inicio, ya que a diferencia de los mRNAs en bacteria, los transcritos mitocondriales carecen de una secuencia señal tipo Shine-Dalgarno. La interacción física entre activadores traduccionales y su mRNA blanco se ha demostrado para Pet54 (29) y Pet309 (37).

Adicionalmente, los activadores traduccionales se localizan en la membrana interna mitocondrial, ya sea como proteínas integrales de membrana o como proteínas solubles asociadas a la misma. Por esto, se considera que los activadores traduccionales orientan al mitorribosoma en la membrana interna mitocondrial para que el ensamblaje de las proteínas sintetizadas en la membrana sea de manera co-traduccional (Figura 1) (24).

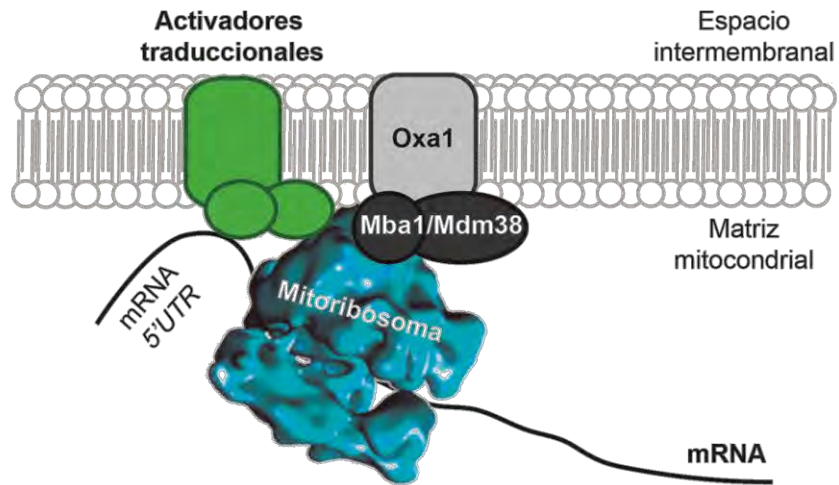


Figura 1. La maquinaria traduccional en mitocondria está asociada a la membrana interna. El mitorribosoma se asocia a la membrana interna mitocondrial, esta asociación permite que el ensamblaje de las proteínas a la membrana sea de manera co-traduccional. La asociación del mitorribosoma a la membrana está dada por la interacción física con los activadores traduccionales (VERDE), la translocasa de membrana Oxa1 y las chaperonas Mba1 y Mdm38.

3.2. Contenido del genoma mitocondrial en *S. cerevisiae*

En *S. cerevisiae* el genoma mitocondrial tiene un tamaño de 75 kb, está altamente concatenado, y su topología es lineal y heterogénea. Esto quiere decir que el genoma mitocondrial en *S. cerevisiae* es variable con moléculas de diferentes tamaños (38,39).

El genoma mitocondrial de *S. cerevisiae* contiene ocho genes, dos RNA ribosomales (15S y 21S rRNA), 24 RNA de transferencia (tRNA) y el componente de RNA de la RNasa P (9S RNA) y contiene una secuencia *ori* para el inicio de la replicación (Figura 2).

De los ocho genes en el genoma mitocondrial de levadura, siete codifican para subunidades hidrofóbicas de los complejos respiratorios mitocondriales, del complejo *bc₁*, COB; de la citocromo c oxidasa (CcO), COX1, COX2 y COX3; y de la ATP sintasa,

ATP6, *ATP8* y *ATP9*. Solo *VAR1*, codifica para una subunidad hidrofílica y ácida del ribosoma mitocondrial.

Adicionalmente, en *S. cerevisiae* los genes de *COX1*, *COB* y *21S* contienen intrones. Estos intrones son editados por el mecanismo de “self-splicing”, por lo que algunos intrones codifican para madurasas. Las madurasas son necesarias para que los la estructura terciaria de los intrones sea estable y pueda llevar a cabo la función de “self-splicing” (40).

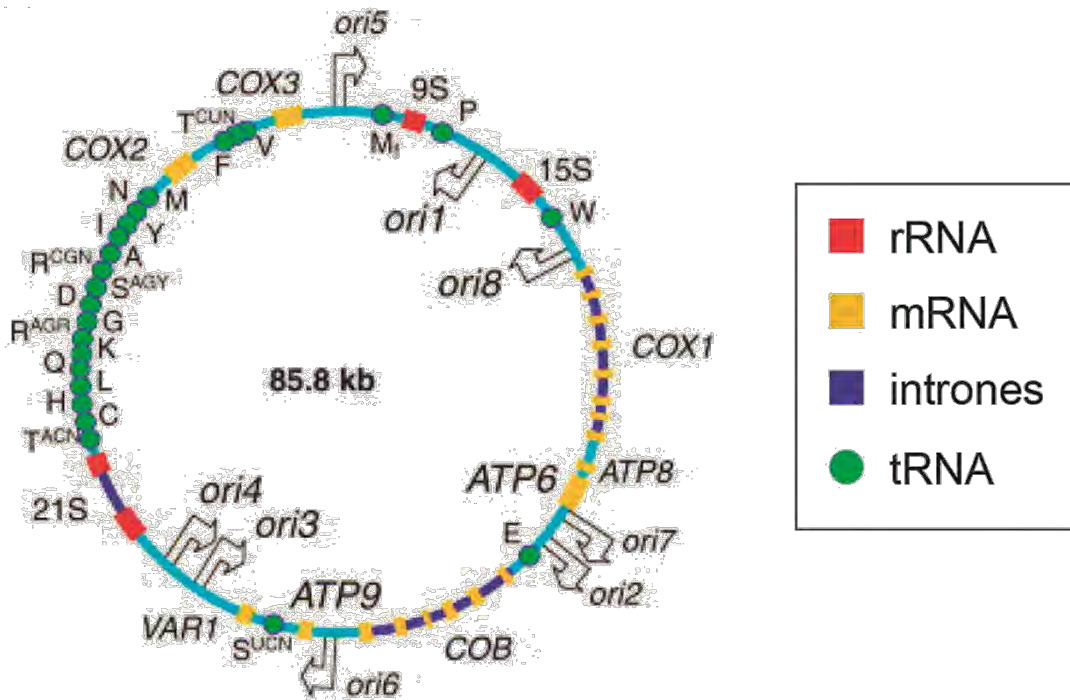


Figura 2. Genoma mitocondrial en *S. cerevisiae*. El genoma mitocondrial en *S. cerevisiae* tiene un tamaño aproximado de 85.8kb y codifica para 3 RNAs no codificantes (ROJO) de los cuales 2 corresponden a los componentes de RNA del mitorribosoma; 8 mRNAs (AMARILLO), de los cuales 2 contienen intrones (AZUL) y 24 tRNAs (VERDE). Modificado de (41).

4. La cadena respiratoria mitocondrial de *S. cerevisiae*

La cadena respiratoria mitocondrial está conformada por un grupo de complejos enzimáticos que a partir de la oxidación de los acarreadores energéticos NADH y FADH₂, sufren un proceso de óxido-reducción, canalizando los electrones hasta la reducción del oxígeno molecular (O₂) para formar agua (H₂O). Este proceso acopla el bombeo de H⁺ de la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal creando un gradiente electroquímico que es utilizado por la ATP sintasa para la síntesis de ATP (9).

4.1. Los componentes de la cadena respiratoria mitocondrial en *S. cerevisiae*

En *S. cerevisiae* la cadena respiratoria está conformada por los siguientes componentes (Figura 3):

1. A diferencia de la mayoría de los organismos eucariontes, *S. cerevisiae* carece del complejo I respiratorio (NADH deshidrogenasa), pero contiene tres deshidrogenasas alternas: una asociada de manera periférica a la cara interna de la membrana interna mitocondrial (Ndi1) y dos asociadas de manera periférica a la cara externa de la membrana interna (Nde1 y Nde2). A diferencia del complejo I, las deshidrogenasas alternas no transportan H⁺ hacia el espacio intermembranal, pero sí canalizan los electrones del NADH hasta la ubiquinona (Q) para la formación de ubiquinol (QH₂) (9).
2. Complejo II, succinato:ubiquinona oxidoreductasa o succinato deshidrogenasa. Este complejo está conformado por cuatro subunidades y cinco grupos prostéticos (FAD⁺, y tres centros Fe-S). Es la única enzima del ciclo de Krebs que forma parte de la cadena transportadora de electrones; oxida al succinato en fumarato, reduce el FAD⁺ en FADH₂ y finalmente reduce la Q en QH₂. Para este proceso de paso de electrones de FADH₂ a la Q es necesaria la presencia del centro Fe-S que contiene la enzima (9).
3. Complejo III, ubiquinona:citocromo *c* oxidoreductasa o complejo *bc*₁. Este complejo es un dímero obligado en el que cada monómero está conformado por diez subunidades y cuatro grupos prostéticos, dos hemo *b* (*b_H* y *b_L*), un hemo *c* y un centro Fe-S. El complejo *bc*₁ cataliza la reacción del ciclo Q, en el cual se

oxida el QH₂, se reduce el citocromo c y una Q, y se transfieren cuatro H⁺ hacia el espacio intermembranal (9).

- Complejo IV o citocromo c oxidasa (CcO). Está conformado por 12 subunidades y cinco grupos prostéticos: dos hemos *a* (*a* y *a*₃) y dos centros de cobre (Cu_A y Cu_B). Cataliza la reacción de oxidación del citocromo c y la reducción del O₂ en H₂O, y durante este proceso se transportan dos H⁺ de la matriz al espacio intermembranal (9).

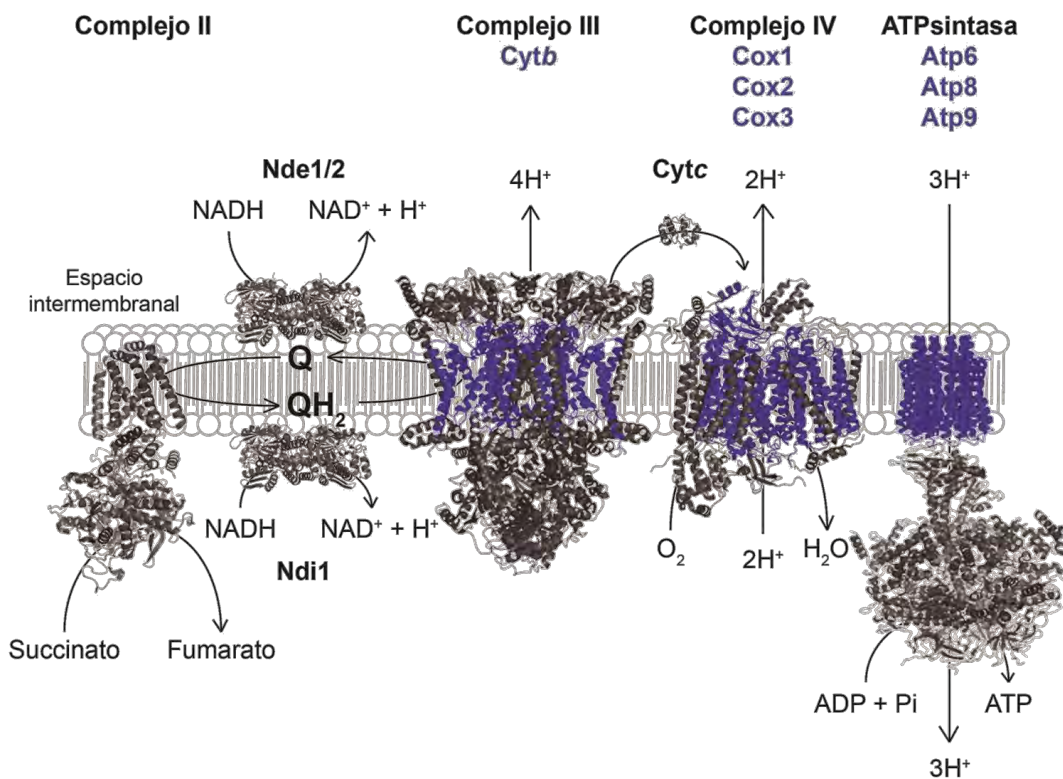


Figura 3. La cadena respiratoria de *S. cerevisiae*. La cadena respiratoria está compuesta por tres complejos (Complejo II, Complejo III y Complejo IV) y la ATP sintasa. Los complejos respiratorios transportan los electrones desde el NADH o FADH₂ hasta la reducción del O₂ en H₂O mediante el Complejo IV. *S. cerevisiae* no contiene un Complejo I pero tiene tres NADH deshidrogenasas alternas: dos hacia el espacio intermembranal (Nde1 y Nde2) y una hacia la matriz mitocondrial (Ndi1). Siete subunidades de los complejos respiratorios (III y IV) así como de la ATP sintasa son codificados en el genoma mitocondrial y corresponden a las subunidades más hidrofóbicas de estos complejos (AZUL). Estructuras terciarias tomadas de PDB: 4YTP (Succinato deshidrogenasa), 4G9K (NADH deshidrogenasa alterna), 1KY0 (complejo *bc*₁), 2OCC (citocromo *c* oxidasa) y 1QO1 (ATP sintasa).

4.2. Los complejos respiratorios forman supercomplejos

Los complejos respiratorios se asocian formando unidades multienzimáticas denominadas “respirasomas”, que pueden ser aislados y separados en condiciones nativas (42). La formación de supercomplejos es dinámica por lo que es probable que su existencia se deba a adaptaciones fisiológicas por el estado energético de la célula; por ejemplo, en levadura el cambio de medio fermentativo a respiratorio promueve la formación de supercomplejos (43). Se propone que la formación de supercomplejos asegura la canalización de las reacciones de óxido-reducción de manera más eficiente (44-46). La formación de supercomplejos y la canalización de las reacciones es un proceso conservado, ya que supercomplejos respiratorios se han descubierto en diversos grupos de organismos como mamíferos (43), plantas (47) y bacterias (48). En mamíferos los complejos respiratorios I, III y IV se asocian en las estequiometrías I_1/III_2 y $I_1/III_2/IV_{(1-4)}$ (43). *S. cerevisiae* carece del complejo respiratorio I, y sus complejos respiratorios III y IV se asocian en las estequiometrías III_2/IV_2 y III_2/IV (Figura 4) (43,49). Se han descubierto factores que están involucrados en la estabilidad y formación de los supercomplejos. En levadura las chaperonas Rcf1, Rcf2, Rcf3, Coi1, Cox26 y Oma1 se han propuesto como factores del ensamblaje de los supercomplejos (50-57). Adicionalmente se ha propuesto que en levadura la presencia de cardiolipina estabiliza la formación de los supercomplejos (58). En mamíferos, la importancia de la cardiolipina también se refleja en enfermedades mitocondriales en humanos asociadas a defectos en la formación de supercomplejos (59).

En algunos reportes se propone que los supercomplejos se pueden oligomerizar de maneras más complejas formando megacomplejos, los cuales son sensibles a los detergentes utilizados experimentalmente. Estos megacomplejos han sido detectados en papa por crio-microscopía electrónica (60), así como en *S. cerevisiae* pero solo afectando la biosíntesis de fosfatidil-etanolamina (61).

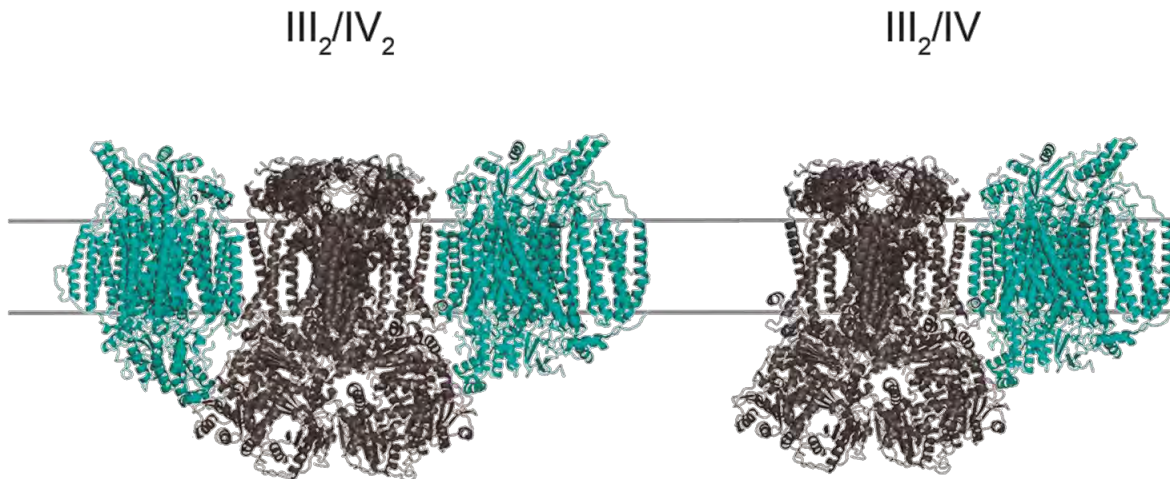


Figura 4. Modelo estructural de los supercomplejos respiratorios en *S. cerevisiae*. En *S. cerevisiae* existen dos diferentes tipos de supercomplejos, un dímero de complejo bc_1 (GRIS) con un dímero de la CcO (CIAN) (III_2/IV_2) y un dímero del complejo bc_1 con un monómero de la CcO (III_2/IV). Modelo basado en (44). PDB: 1KYO para complejo bc_1 y 2OCC para la CcO.

5. El complejo bc_1

El complejo III respiratorio o complejo bc_1 es la enzima encargada de oxidar al QH_2 en Q, reducir al citocromo c y translocan cuatro H^+ hacia el espacio intermembranal. El mecanismo enzimático del complejo bc_1 se realiza mediante el ciclo Q (9). En el ciclo Q, la molécula QH_2 dona dos electrones transformándose en Q y liberando dos protones en el espacio intermembranal; un electrón pasa por el centro Fe-S, al citocromo c_1 y finalmente al citocromo c; el otro electrón pasa hacia el hemo b_L , al hemo b_H y finalmente a una Q formando el radical semi-quinona (Q^*). Otro QH_2 es oxidado al donar un electrón por la vía Fe-S-Cytc₁-Cytc, el segundo por los hemos b_L - b_H y liberando otros dos H^+ en el espacio intermembranal. Finalmente se reduce completamente a la Q^* en QH_2 . Los protones para transformar esta Q^* en QH_2 se sustraen de la matriz mitocondrial (Figura 5) (9).

En *S. cerevisiae* el complejo bc_1 es un dímero obligado, del cual cada monómero contiene diez subunidades, nueve de origen citoplasmático y transportadas a la

mitocondria, mientras que solo citocromo *b* (Cyt*b*) se sintetiza en la mitocondria (Figura 3). Debido a que existen dos distintos orígenes de las subunidades que conforman el complejo *bc*₁, es necesario que existan mecanismos que modulen y orquesten el ensamblaje de las subunidades que se transportan del citoplasma así como el ensamblaje de la única subunidad de origen mitocondrial (62).

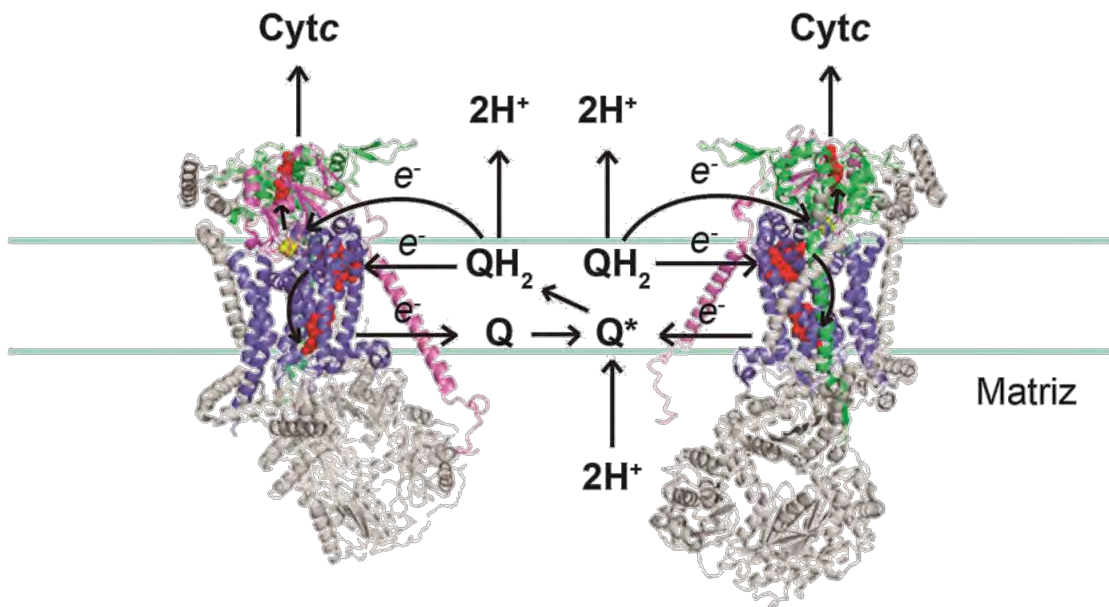


Figura 5. Mecanismo catalítico del complejo *bc*₁ (Ciclo Q). El complejo *bc*₁ oxida al ubiquinol (QH₂) mediante el ciclo Q. En la oxidación de QH₂, un electrón (e⁻) pasa por los grupos hemo (*b*_L-*b*_H) (ROJO) de citocromo *b* (AZUL) y reduce a una quinona (Q) produciendo el radical semiquinona (Q^{*}). El segundo e⁻ pasa por el centro Fe-S (AMARILLO) de la subunidad Rip1 (ROSA), el hemo *c* (ROJO) de la subunidad Cyt*c*₁ (VERDE) y reduce al citocromo *c* (Cyt*c*) en el espacio intermembranal. Otro QH₂ se oxida y los e⁻ pasan por el mismo mecanismo; un e⁻ reduce al radical Q^{*} en QH₂ y el segundo e⁻ reduce al Cyt*c* en el espacio intermembranal. En este mecanismo catalítico cuatro protones (H⁺) pasan al espacio intermembranal. Modelo modificado de (9). Estructura tridimensional tomada de PDB: 1KY0.

5.1. El ensamblaje del complejo bc_1 involucra la formación de distintos subcomplejos

Mediante la generación de dobles mutantes de las subunidades que conforman el complejo bc_1 en *S. cerevisiae*, se determinó que durante el ensamblaje del complejo bc_1 , existe la formación de diversos intermediarios, los cuales son conocidos como subcomplejos (2). El ensamblaje del complejo bc_1 se divide en 3 distintas etapas (Figura 6):

- Etapa temprana: En esta etapa se ensambla *Cytb*, la única subunidad de origen mitocondrial. Durante este proceso ocurre la adición de los grupos hemo b_H y b_L (8). Adicionalmente se ensamblan las subunidades *Qcr7* y *Qcr8*, formando el primer subcomplejo *Cytb-Qcr7-Qcr8* (1). Este subcomplejo fue el primero en ser caracterizado, ya que la ausencia de cualquiera de las tres subunidades compromete la estabilidad de las otras dos proteínas (63). En la formación de éste subcomplejo están involucradas las chaperonas *Cbp3*, *Cbp6* y *Cbp4* (5,7). En esta misma etapa, paralelamente se ensamblan las subunidades *Cytc₁*, *Cor1* y *Cor2*, formando un segundo subcomplejo estable e independiente al de *Cytb-Qcr7-Qcr8* (2).
- Etapa intermedia: Durante esta etapa, se forma un subcomplejo de 500kDa conformado por las subunidades *Cytb*, *Qcr7*, *Qcr8*, *Qcr6*, *Cytc₁*, *Cor1* y *Cor2* (2); además se observa que este subcomplejo ya se encuentra en estado dimérico (64).
- Etapa tardía: En ésta etapa las últimas subunidades como *Qcr9*, *Rip1* y *Qcr10* se ensamblan para formar el complejo bc_1 completo y activo catalíticamente. Se han descubierto chaperonas que están involucradas en el proceso de ensamblaje de *Rip1*, las cuales estabilizan (*Mzm1*) e insertan (*Bcs1*) a *Rip1* en la membrana interna mitocondrial y posteriormente en el complejo bc_1 (65-67). Si existe algún defecto durante el ensamblaje del complejo bc_1 , como la ausencia de alguna subunidad, la estabilidad de *Rip1* y *Qcr10* se ve comprometida, por lo que se ha establecido que este paso es también crucial y altamente regulado durante el ensamblaje del complejo bc_1 (67).

Aunque se conocen las distintas etapas de ensamblaje del complejo bc_1 , poco se sabe sobre los mecanismos de regulación durante este proceso o si existen más chaperonas que median las diferentes etapas de ensamblaje. En este trabajo caracterizamos la función de las chaperonas Cbp3 y Cbp6 en la biogénesis del complejo bc_1 .

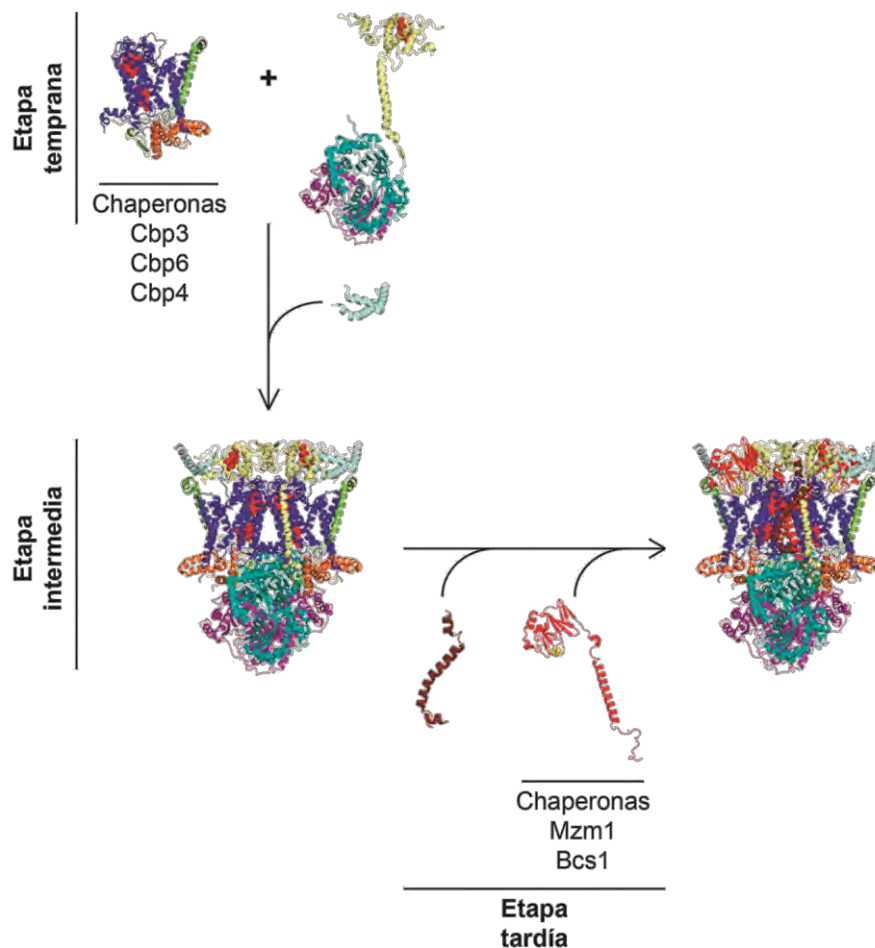


Figura 6. Etapas de ensamblaje del complejo bc_1 . El ensamblaje del complejo bc_1 está dividido en tres distintas etapas: Etapa temprana, formación del subcomplejo Cytb-Qcr7-Qcr8 (AZUL, NARANJA y VERDE), en donde las chaperonas Cbp3, Cbp6 y Cbp4 tienen una función importante en el ensamblaje y el subcomplejo Cytc₁-Cor1-Cor2 (AMARILLO, AZUL TURQUESA y MORADO). Etapa intermedia, formación del subcomplejo de 500kDa conformado por las subunidades Cytb-Qcr7-Qcr8-Cytc₁-Cor1-Cor2-Qcr6 (AZUL, NARANJA, VERDE, AMARILLO, AZUL TURQUESA, MORADO y AZUL CLARO), este subcomplejo ya se encuentra en estado dimérico. Etapa tardía, ensamblaje de las subunidades Qcr9 (CAFÉ) y Rip1 (ROJO), en donde las chaperonas Mzm1 y Bcs1 tienen una función en su ensamblaje, para formar el complejo bc_1 completo.

6. La síntesis de *Cytb* en mitocondrias de *S. cerevisiae*

6.1. El proceso de maduración del transcrito *COB*

La subunidad *Cytb* está codificada en el genoma mitocondrial por el gen *COB*. Este gen contiene cinco intrones y es co-transcrito con un tRNA para el aminoácido glutamato (*tRNA^{glu}*) el cual se localiza 1099 nt río arriba del codón de inicio (AUG) del mRNA de *COB*. Durante el proceso de maduración del mRNA de *COB*, la RNasaP corta y libera el *tRNA^{glu}*. Posteriormente la RNasa Pet127 hidroliza el mRNA del extremo *5'UTR* hasta el nucleótido 955 río arriba del AUG de *COB*, dejando el mRNA de *COB* maduro para la traducción (68). Durante este proceso la proteína Cbp1 actúa en el extremo *5'UTR* de *COB* para evitar que Pet127 degrade completamente el mRNA (69).

Llama la atención que de los cinco intrones de *COB*, tres de ellos codifican para madurasas, necesarias para la edición de los mismos intrones (40). Además el intrón *bl4* codifica para una madurasa que es necesaria para la edición del intrón *al4* del mRNA de *COX1* (70). Los intrones de *COB* son editados por el mecanismo “self-splicing”, cuatro intrones de tipo I y uno de tipo II, por lo que las madurasas asisten este proceso ayudando al RNA a estabilizar la estructura terciaria para llevar a cabo su actividad autocatalítica (71).

6.2. El mRNA de *COB* necesita de activadores traduccionales

Para que el mRNA de *COB* se traduzca por los mitorribosomas, es necesaria la participación de cinco activadores traduccionales. Aún se desconoce el mecanismo exacto por el cual los activadores traduccionales modulan la traducción del mensajero, pero se conoce que actúan en el extremo *5'UTR* de *COB*. Los activadores traduccionales de *COB* son:

- Cbp1: Es una proteína de 76 kDa, asociada a la membrana interna mitocondrial de forma periférica, que contiene 13 motivos de repetición de pentatricopéptido (PPR) de unión a RNA. Las funciones descritas para esta proteína son proteger al mRNA de *COB* durante su edición (69), y activar la traducción del mRNA de *COB*, aunque su mecanismo aún se desconoce (26).

- Cbs1: Es una proteína integral de la membrana interna mitocondrial de 27 kDa que además se asocia al mitorribosoma. Datos genéticos indican que activa la traducción de *COB* actuando en el extremo *5'UTR* del mensajero, aunque no se ha demostrado una interacción física directa con este mRNA. Su ausencia provoca una total falta de síntesis de *Cytb* (25).
- Cbs2: Es una proteína de 45 kDa asociada de forma periférica a la membrana interna mitocondrial y al mitorribosoma. Cbs2 también actúa en el extremo *5'UTR* de *COB* y su ausencia provoca una falta de síntesis de *Cytb* (25). Tampoco existe evidencia de interacción directa con el mRNA de *COB*.
- Cbp3 y Cbp6: Cbp3 y Cbp6 son proteínas de 39 y 19 kDa respectivamente, asociadas a la membrana interna mitocondrial de manera periférica, que funcionan de forma cooperativa por lo que la ausencia de una afecta la función de la otra. Se asocian al túnel de salida del mitorribosoma interactuando físicamente con la proteína ribosomal Mrpl4 (6). Se ha propuesto que activan la traducción del mRNA de *COB* actuando en el extremo *5'UTR* del RNA mensajero, aunque su mecanismo de acción se desconoce. Tampoco se ha detectado una interacción física con el mRNA de *COB*, ni se han mapeado los sitios de acción de estas proteínas. Actúan además como chaperonas interactuando con *Cytb* recién sintetizado, y se ha propuesto que estas proteínas modulan el ensamblaje de *Cytb* y su hemilación con la activación traduccional del mRNA *COB* (6,8).

6.3. Modelo propuesto de la regulación de la síntesis de *Cytb*

A partir de diversos estudios sobre la función de Cbp3 y Cbp6 se propuso un modelo de regulación de la síntesis de *Cytb* (7). En el modelo, Cbp3 y Cbp6 junto con Cbs1 y Cbs2 activan la traducción del mRNA de *COB* actuando en el extremo *5'UTR*. Parece que Cbp3 y Cbp6 activan la traducción de manera distinta e independiente a Cbs1 y Cbs2, debido a que no se ha detectado interacción física entre Cbp3 y Cbp6 con Cbs1 y Cbs2; además Cbs1 y Cbs2 no modulan la traducción de *COB* con el ensamblaje de *Cytb* (6) y no parecen interaccionar físicamente con *Cytb*. En contraste, Cbp3 y Cbp6 interactúan con *Cytb* recién sintetizada posiblemente en el momento en que el péptido

sale por el túnel de salida. Esta interacción continúa cuando *Cytb* se ensambla por completo en la membrana interna mitocondrial y no se pierde hasta que las subunidades Qcr7, Qcr8 y la chaperona Cbp4 interactúan con *Cytb* (7). Se considera que una vez que Cbp3 y Cbp6 quedan libres pueden iniciar una nueva ronda de activación traduccional (7). Además de modular el ensamblaje con la traducción, Cbp3 y Cbp6 también modulan el estado de hemilación de *Cytb* debido a que Cbp3 y Cbp6 no se liberan de *Cytb* hasta que no se encuentre completamente hemilado (8). Se propone que Cbp3 y Cbp6 forman con *Cytb* dos intermediarios de ensamblaje temprano, el intermediario I° que es el complejo de apocitocromo *b* (*Cytb* sin grupos hemo) con Cbp3 y Cbp6, y el intermediario I^I que es el complejo de *Cytb* semihemilado (hemo *b_L*) con Cbp3 y Cbp6. La propuesta de que Cbp3 y Cbp6 acoplan la hemilación con la traducción se comprobó mutando los sitios de hemilación *b_L* y *b_H* de *Cytb* y se observó que la síntesis de *Cytb* disminuyó dramáticamente, concluyendo que esto se debe a que Cbp3 y Cbp6 se quedan unidas a apocitocromo *b* y son incapaces de pasar del estado I° o I^I al estado I^{II} en el que se forma el primer subcomplejo de ensamblaje (*Cytb*-Qcr7-Qcr8) junto con la chaperona Cbp4 (Figura 7).

7. Diversas cepas de *S. cerevisiae* se utilizan como modelo de estudio

Durante el desarrollo de estudios científicos en *S. cerevisiae*, se han generado distintas cepas para el entendimiento de diversos mecanismos celulares (72). La mayoría de las cepas de *S. cerevisiae* que se utilizan en los distintos laboratorios se generaron mediante cruces entre diversas cepas y fueron obtenidas por los laboratorios de Winge, Lidengren y Sherman (72).

En realidad, muchas de las cepas que se utilizan en el laboratorio no son completamente silvestres debido a que todas son derivadas de distintos linajes que involucran cepas mutantes o cepas con marcadores genéticos. Esta diversidad de cepas de levadura provoca que exista incompatibilidad entre ellas aunque todas sean de la misma especie (73). Esta incompatibilidad se puede ver reflejada en funciones celulares, así como en el mantenimiento del genoma mitocondrial (74).

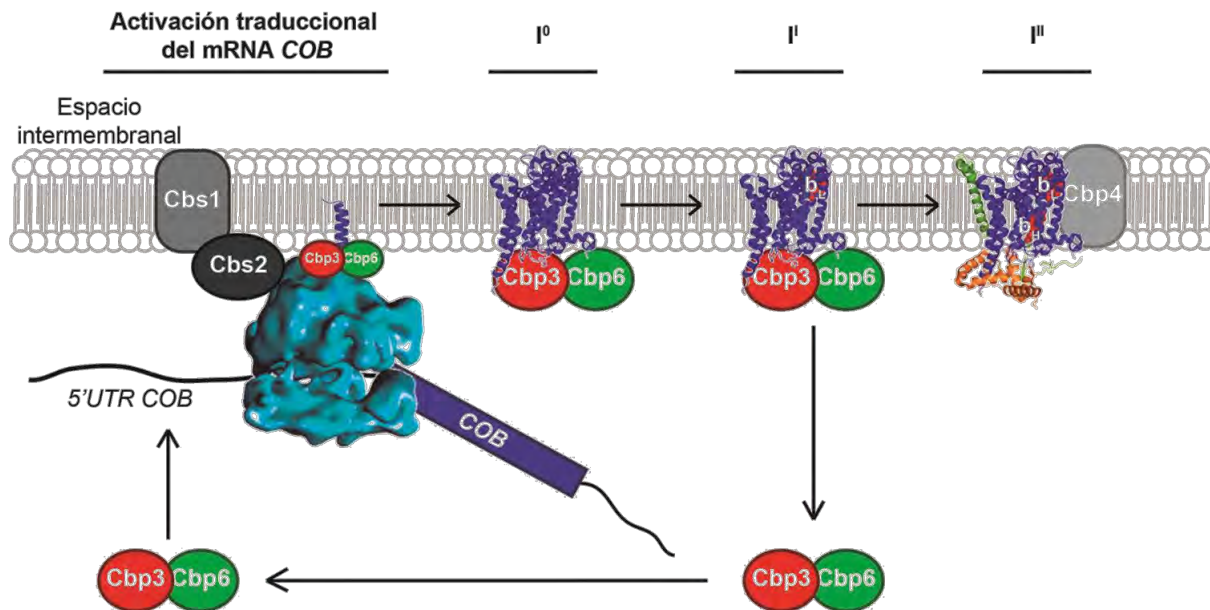


Figura 7. Modelo de regulación de la síntesis y ensamblaje de *Cytb* en *S. cerevisiae*. La síntesis y ensamblaje de *Cytb* se divide en tres distintas etapas: Activación traduccional, Cbs1, Cbs2 y Cbp3/Cbp6 actúan en el extremo 5'UTR del mRNA de *COB*, además de que interactúan con el mitorribosoma (AZUL CLARO). Etapa I⁰, en esta etapa Cbp3 y Cbp6 interactúan con apoCytb (AZUL) recién sintetizada. Etapa I¹, en esta etapa ocurre la hemilación del sitio b_L de *Cytb*. Etapa I², en esta etapa *Cytb* está completamente hemilada, interactúa con las subunidades Qcr7 (NARANJA), Qcr8 (VERDE), y con la chaperona Cbp4. En esta etapa Cbp3 y Cbp6 pierden la interacción con *Cytb*. En este proceso Cbp3 y Cbp6 modulan y acoplan la síntesis de *Cytb* con el ensamblaje, funcionando como activadores traduccionales y como chaperonas.

Actualmente, existen diferentes cepas que son utilizadas dependiendo de los propósitos experimentales. Muchas de ellas comparten ancestros en común, aunque cada una de ellas contiene características particulares, además de diversos marcadores para auxotroffías. Las principales cepas utilizadas en diversos estudios científicos incluyen a las cepas: S288c, BY4743, Σ 1278b, W303-1A, D273-10b, FL-100, SEY6210/SEY6211 y YJM789 (Tabla I)

En el presente estudio encontramos que la regulación de la síntesis de *Cytb* varía según la cepa de laboratorio que se utilice como modelo. En la cepa BY4742, Cbp3 y Cbp6 activan y regulan la traducción del mRNA de *COB*. Sin embargo, en la cepa D273-10b Cbp3 y Cbp6 solo actúan como chaperonas y no como activadores traduccionales.

Tabla I. Cepas comúnmente utilizadas de *S. cerevisiae* en el laboratorio.

Cepa	Origen	Características	Referencia
S288c	Isogénica a la cepa EM-193 aislada de higos podridos.	<ul style="list-style-type: none"> • Genoma completamente secuenciado. • No floculante. • Necesidades nutricionales mínimas. • Alta inestabilidad del genoma mitocondrial. 	(75,76)
*BY4743 (BY4741/BY4742)	Generada para obtener diferentes marcadores para auxotrofías. Cepa empleada en múltiples bibliotecas a la venta.	<ul style="list-style-type: none"> • Isogénica a S288c • Cepa utilizada para la generación del banco de mutantes de cada gen de <i>S. cerevisiae</i>. 	(77)
Σ1278b	Desconocido	<ul style="list-style-type: none"> • Identidad de 47% con W303-1A • Presenta floculencias. • Utilizada comúnmente para estudios de morfología de colonia. 	(78)
W303-1A	Desconocido	<ul style="list-style-type: none"> • Identidad de 85.4% con S288c y 47% con Σ1278b • Comúnmente utilizada para estudios de envejecimiento celular y de función mitocondrial. 	(78)
D273-10b	Generada para obtener cepas de <i>S. cerevisiae</i> con alta estabilidad del genoma mitocondrial	<ul style="list-style-type: none"> • Comúnmente utilizada para estudios de biogénesis mitocondrial por su baja inestabilidad del genoma mitocondrial. 	(79)
FL-100	D273-10b	<ul style="list-style-type: none"> • Isogénica a D273-10b • Generada para el estudio de vía de biosíntesis de pirimidinas. 	(80)
SEY6210/SEY6211	Generada para el tamizaje de genes involucrados en el tráfico vesicular.	<ul style="list-style-type: none"> • Utilizada para estudios de tráfico vesicular. 	(81)
YJM789	Aislada de un paciente VIH+ con neumonía	<ul style="list-style-type: none"> • Divergencia con la cepa S288c de 0.6% • Resistente a altas temperaturas. • Utilizada como modelo de patogénesis fúngica 	(82)

*BY4743 cepa diploide de BY4741 (Mata) y BY4742 (Mat α)

JUSTIFICACIÓN

El ensamblaje de los complejos respiratorios en mitocondria es un proceso altamente regulado, el cual involucra la síntesis y transporte de las subunidades de origen citosólico, así como la síntesis y ensamblaje de las subunidades que se sintetizan dentro de la mitocondria. Diversos estudios han determinado que la traducción de los mRNAs mitocondriales está regulada según el estado de ensamblaje del complejo respiratorio que conformen. En el caso de la Citocromo c oxidasa (CcO), éste contiene 3 subunidades de origen mitocondrial (Cox1, Cox2 y Cox3), y defectos en el ensamblaje del complejo afectan la traducción del mRNA de *COX1* (83). También la ATP sintasa sufre el mismo fenómeno: las subunidades de la porción Fo (Atp6, Atp8 y Atp9) son de origen mitocondrial y cuando existen defectos en el ensamblaje de la porción F₁, en particular las subunidades α y β , la traducción del mRNA policistrónico de *ATP6/ATP8* disminuye dramáticamente (84). Ésta regulación está dada por la participación y la función dual de algunos activadores traduccionales que actúan en el mRNA blanco y a la vez interaccionan con el péptido recién sintetizado.

El complejo *bc₁* contiene una subunidad de origen mitocondrial (*Cytb*) y la traducción de su mRNA (*COB*) se regula por cinco activadores traduccionales, de los cuales dos, Cbp3 y Cbp6, modulan la traducción del mRNA de *COB* con el estado de ensamblaje de *Cytb*. Se ha propuesto que Cbp3 y Cbp6 tienen una función dual, como activadores traduccionales del mRNA de *COB* y como chaperonas en la biogénesis de *Cytb* (6,7).

En el presente trabajo nos interesó profundizar más en el conocimiento acerca de los mecanismos que regulan la síntesis y el ensamblaje de *Cytb* en la mitocondria. Para ello, analizamos dos diferentes cepas de levadura, entendiendo que los fenotipos no siempre son idénticos entre distintas cepas. Encontramos que la función de Cbp3 y Cbp6 como activadores traduccionales no está conservada entre las dos distintas cepas de *S. cerevisiae*. En la cepa BY4742, Cbp3 y Cbp6 se requieren como activadores traduccionales del mRNA de *COB* y como chaperonas de *Cytb*, pero en la cepa D273-10b solo la función de chaperonas esta conservada.

Ésta observación nos permitió ampliar el conocimiento sobre las funciones de Cbp3 y Cbp6 sobre la biogénesis de *Cytb*. Esto debido a que en la cepa D273-10b la ausencia de Cbp3 o Cbp6 no afectó la síntesis de *Cytb* ni su estabilidad. Por ello, nos preguntamos lo siguiente: 1. ¿Qué provoca la diferencia en la regulación de la síntesis de *Cytb* entre las cepas BY4742 y D273-10b? 2. ¿Por qué en la cepa D273-10, a pesar de que *Cytb* se sintetiza sin Cbp3 y Cbp6, el complejo *bc₁* no es funcional?

Este trabajo ayuda a comprender los mecanismos de la síntesis de *Cytb* y como son regulados por su ensamblaje en la membrana interna mitocondrial. La diferencia entre las dos distintas cepas de laboratorio, así como su caracterización, nos permitió entender las funciones de las proteínas Cbp3 y Cbp6 en la biogénesis de *Cytb*.

HIPÓTESIS

Si la función de Cbp3 y Cbp6 sobre la modulación en la traducción del mRNA de COB varía entre distintas cepas de levadura, entonces existen otros factores involucrados en este proceso y la función principal de Cbp3 y Cbp6 es en la hemilación de Cytb

OBJETIVO

Mediante el análisis de dos cepas distintas de laboratorio, BY4742 y D273-10b. Determinar la función de Cbp3 y Cbp6 en la biogénesis de Cytb.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1. Analizar la función diferencial de Cbp3/Cbp6 sobre la traducción del mRNA de COB en las cepas BY4742 y D273-10b.**
 - 1.1. Estudiar la síntesis de Cytb en las mutantes nulas $\Delta cbp3$ y $\Delta cbp6$, así como en ausencia de las distintas subunidades del complejo bc_1 y de la chaperona $\Delta cbp4$.
 - 1.2. Utilizar al gen reportero de la traducción $pARG8^m$ para monitorear la síntesis de Cytb en las mutantes nulas $\Delta cbp3$, $\Delta cbp6$, $\Delta qcr7$, $\Delta qcr8$ y $\Delta cbp4$.
 - 1.3. Estudiar si la unión de Cbp3 con el mitoribosoma está conservada entre las cepas BY4742 y D273-10b.
 - 1.4. Evaluar si Cbp3 se asocia físicamente con el mRNA de COB y si ésta asociación está conservada en las cepas BY4742 y D273-10b.
 - 1.5. Caracterizar genéticamente la diferencia en la regulación de la síntesis de Cytb entre las cepas BY4742 y D273-10b

2. Estudiar la función de Cbp3 y Cbp6 como chaperonas de ensamblaje en la cepa D273-10b.

- 2.1. Evaluar la estabilidad de *Cytb* en las mutantes $\Delta cbp3$, $\Delta cbp6$, $\Delta qcr7$ y $\Delta cbp4$.
- 2.2. Evaluar la estabilidad de las subunidades *Qcr7*, *Qcr8*, *Cytc₁*, *Cor1*, *Cor2*, *Rip1* y *Qcr10* en las mutantes $\Delta cbp3$ y $\Delta cbp6$.
- 2.3. Estudiar el estado de hemilación de *Cytb* en las mutantes $\Delta cbp3$ y $\Delta cbp6$.
- 2.4. Evaluar si en las mutantes $\Delta cbp3$ y $\Delta cbp6$, el complejo *bc₁* forma supercomplejos con la citocromo *c* oxidasa.

RESULTADOS

En la cepa D273-10b la síntesis de *Cytb* no depende de Cbp3 o Cbp6

Para estudiar y entender las funciones de Cbp3 y Cbp6 sobre la biogénesis de *Cytb*, utilizamos inicialmente a la cepa de laboratorio D273-10b de *S. cerevisiae*. Esta cepa ha sido ampliamente utilizada para estudiar la función mitocondrial, debido a que presenta una tasa baja de pérdida del genoma mitocondrial y su respiración es robusta (79). Para ello, generamos las mutantes $\Delta cbp3$ y $\Delta cbp6$, e incluimos a mutantes que afectan el ensamblaje de *Cytb* como la delección de la subunidad Qcr7 ($\Delta qcr7$) y de la chaperona Cbp4 ($\Delta cbp4$) (7). Como control negativo se empleó la mutante del activador traduccional $\Delta cbs1$, ya que se ha visto que esta mutante carece completamente de *Cytb* (25). Analizamos el efecto de las mutantes sobre la síntesis de *Cytb* mediante un ensayo *in vivo* de síntesis y marcaje radioactivo de proteínas de origen mitocondrial. Incubamos las células con cicloheximida para inhibir los ribosomas citoplasmáticos, adicionamos ^{35}S -metionina e incubamos a 30°C por 15 minutos. Se aislaron mitocondrias, se resolvieron por SDS-PAGE y las proteínas recién sintetizadas se analizaron por autoradiografía. Contrario a lo que se había reportado (6), observamos que a excepción de la mutante $\Delta cbs1$, los niveles en porcentaje de *Cytb* no se alteraron negativamente en ninguna de las mutantes analizadas con respecto a la cepa silvestre (WT) (Figura 8A). A pesar que el marcaje de *Cytb* no se afectó en ninguna de las mutantes analizadas, observamos que éstas carecían de capacidad respiratoria ya que no crecieron en un medio con Etanol/Glicerol (Figura 8B). Esto sugiere que aún se requiere de las chaperonas Cbp3 y Cbp6 para alguna función postraduccional de *Cytb*. Estos resultados también nos indicaron que en la cepa D273-10b, Cbp3 y Cbp6 no están involucradas en la síntesis de *Cytb*. También nos indicaron que la síntesis no se regula cuando existen defectos en el ensamblaje, ya que la mutante $\Delta qcr7$ mostró niveles silvestres de *Cytb*. Este dato lo confirmamos con la doble mutante $\Delta cbp3/\Delta cbp6$ en la cepa D273-10b, donde también observamos que *Cytb* se sintetizó como la cepa silvestre (Dato no presentado). Este resultado también es diferente a lo previamente

reportado en cepas W303, en que se observó que la síntesis de *Cytb* disminuye en mutantes $\Delta qcr7$ (7).

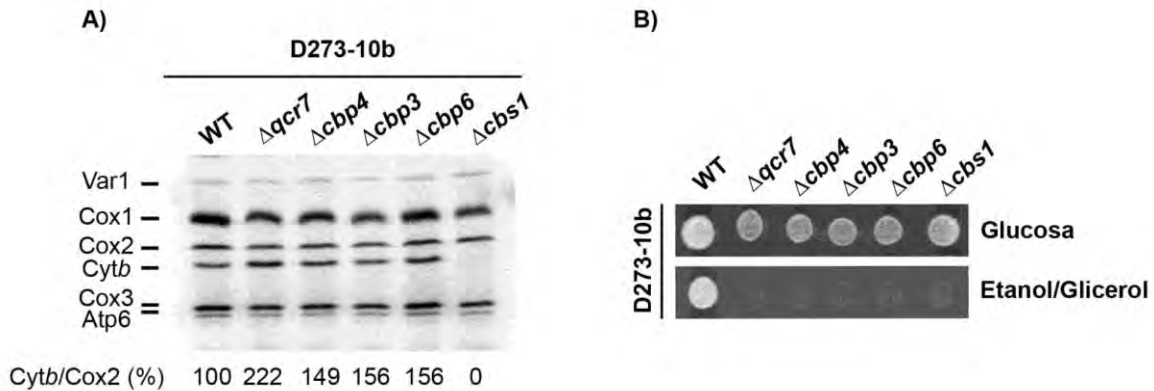


Figura 8. En la cepa D273-10b la ausencia de Cbp3 y Cbp6 no afectan el marcaje radioactivo de *Cytb*. A) Autoradiografía del ensayo de marcaje radioactivo con ^{35}S -metionina *in vivo*. Células completas de la cepa D273-10b con las mutaciones indicadas, se incubaron con ^{35}S -metionina en presencia de cicloheximida. Se resolvió por SDS-PAGE (16%) y por autoradiografía. En el ensayo se pueden observar las subunidades de los complejos respiratorios: *Cytb* (Complejo bc_1), *Cox1*, *Cox2* y *Cox3* (CcO); *Atp6* (ATP sintasa); y *Var1* (Subunidad chica mitoribosomal). El porcentaje de *Cytb* se analizó por densitometría de banda y se calculó con relación a la densitometría de la proteína *Cox2*. Pesos moleculares: *Cox1* 59 kDa; *Cox2* 29 kDa; *Cytb* 44 kDa; *Cox3* 30 kDa; *Atp6* 29 kDa B) Análisis de crecimiento por goteo de las mutantes indicadas en la cepa D273-10b en medio fermentativo (Glucosa) y respiratorio (Etanol/Glicerol). Incubación por 3 días a 30°C. En esta figura concluimos que *Cbp3* y *Cbp6* no están involucradas en la síntesis de *Cytb* y además no se regula por su estado de ensamblaje en la cepa D273-10b.

En la cepa BY4742 la síntesis de *Cytb* depende de *Cbp3* y *Cbp6*

Debido a que en la cepa D273-10b observamos que no existe una regulación de la síntesis de *Cytb* mediado por *Cbp3* y *Cbp6*, y que este fenotipo era diferente al reportado previamente para la cepa W303 (6,7), decidimos utilizar una cepa distinta de laboratorio (BY4742). Esto nos permitió evaluar si el efecto es diferencial según la cepa de laboratorio que se utilice. Generamos las mutantes $\Delta qcr7$, $\Delta cbp3$, $\Delta cbp6$, $\Delta cbp4$ y

$\Delta cbs1$. Se llevó a cabo el ensayo de síntesis de proteínas mitocondriales *in vivo* con ^{35}S -metionina y cicloheximida como se describió anteriormente. Contrario a lo observado en la cepa D273-10b, en la cepa BY4742 la presencia de *Cytb* fue casi indetectable en las mutantes $\Delta cbp3$ y $\Delta cbp6$ con respecto a la cepa WT (1%). De igual manera, el marcaje de *Cytb* disminuyó en un 98 y 92% en las mutantes $\Delta qcr7$ y $\Delta cbp4$ respectivamente, indicando que en la cepa BY4742 la síntesis de *Cytb* depende de Cbp3 y Cbp6, y que ésta se regula cuando existen defectos en el ensamblaje, como se observó en las mutantes $\Delta qcr7$ y $\Delta cbp4$ (Figura 9A). Como era de esperarse, en la mutante $\Delta cbs1$ no detectamos la presencia de *Cytb*. Las mutantes fueron incapaces de crecer en medio respiratorio (Etanol/Glicerol), aunque la mutante $\Delta cbp4$ (en la cepa BY4742) creció ligeramente después de varios días de incubación comparado con las mutantes $\Delta qcr7$, $\Delta cbp3$ y $\Delta cbp6$ (Figura 9B y C). Como control positivo se incluyó a la mutante $\Delta qcr10$ en la cual no está afectada la capacidad respiratoria de la célula (85). Los resultados sobre el efecto de Cbp3 y Cbp6 sobre la síntesis de *Cytb* son consistentes con datos previamente reportados para la cepa W303 (6,7), y confirmaron que la regulación de la síntesis de *Cytb* y la función de Cbp3 y Cbp6 como activadores traduccionales varía según la cepa que se utilice como modelo de estudio.

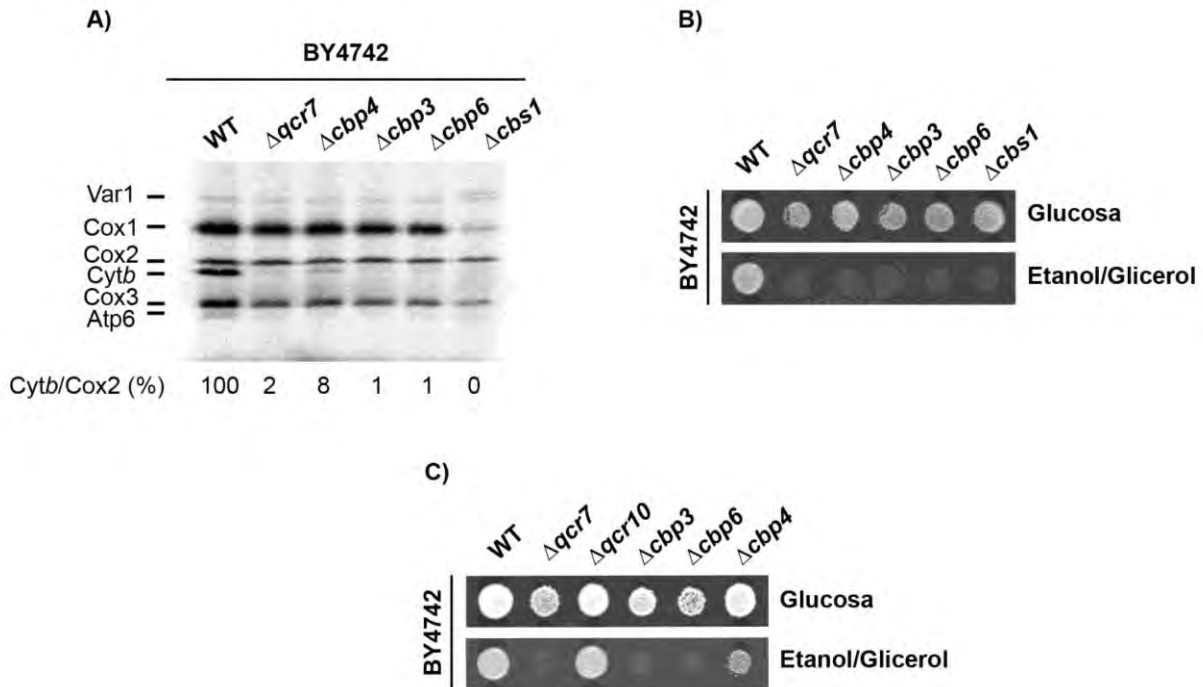


Figura 9. En la cepa BY4742 el marcaje de *Cytb* disminuye en la ausencia de Cbp3-Cbp6. A) Análisis por autoradiografía del ensayo de marcaje radioactivo con ^{35}S -metionina *in vivo*. Células completas de la cepa BY4742 con las mutaciones indicadas se incubaron con ^{35}S -metionina en presencia de cicloheximida. Se resolvió por SDS-PAGE (16%) y se reveló por autoradiografía. El porcentaje de *Cytb* se analizó por densitometría de banda y se calculó con relación a la densitometría de la proteína Cox2. B) y C) Ensayo de crecimiento de las mutantes indicadas por análisis de goteo en medio fermentativo (Glucosa) y medio respiratorio (Etanol/Glicerol). Incubación por 3 días a 30°C en B) y 4 días a 30°C en C). En esta figura concluimos que el efecto de Cbp3 y Cbp6 sobre la síntesis y regulación de *Cytb* depende de la cepa de *S. cerevisiae* que se estudie.

La disminución del marcaje radioactivo de *Cytb* en las diferentes mutantes puede deberse a dos razones; 1) que la síntesis de la proteína disminuyó o 2) que su estabilidad se encontró comprometida y durante los 15 minutos del ensayo de traducción, la proteína se degradó. Para diferenciar entre los dos fenómenos, utilizamos al gen reportero de la traducción *ARG8^m*. *ARG8^m* es un reportero ampliamente utilizado para monitorear la síntesis de proteínas de origen mitocondrial debido a que su producto proteico, Arg8, está involucrado en la biosíntesis de arginina, su función se localiza en la matriz mitocondrial y no está relacionada con la actividad de los complejos

respiratorios (86). Evaluamos la traducción de *ARG8^m* por la capacidad de la célula de crecer en un medio sin arginina; esto quiere decir, si la síntesis de *ARG8^m* se afecta, la célula será incapaz de crecer en un medio sin arginina. Bajo este contexto, realizamos dos distintas construcciones mitocondriales, una que codifica para la fusión de Arg8 al extremo carboxilo terminal de *Cytb*, conservando la pre-secuencia de edición de Arg8 (*COB(1-385)::pARG8^m*) (Figura 10A); y en la otra construcción se reemplazó el *orf* completo de *COB* con *ARG8^m* (*cobΔ::ARG8^m*) (Figura 11A). En ambas construcciones se conservaron las regiones 5' y 3'UTR de *COB*.

En el contexto mitocondrial *COB(1-385)::pARG8^m* evaluamos la síntesis del gen reportero por su capacidad en crecimiento en medio sin arginina, en las mutantes $\Delta qcr7$, $\Delta cbp4$, $\Delta cbp3$, $\Delta cbp6$ y $\Delta cbs1$ en las cepas D273-10b y BY4742. En la cepa D273-10b observamos que todas las mutantes con excepción de la mutante $\Delta cbs1$, crecieron de manera similar a la cepa WT en un medio sin arginina. Esto indica que *Cytb* se sintetizó aún en la ausencia de Cbp3 y Cbp6 (Figura 10B). Además, se observó que no existe ninguna regulación de la síntesis de *Cytb* por ensamblaje, ya que también las mutantes $\Delta qcr7$ y $\Delta cbp4$ fueron capaces de crecer en medio sin arginina (Figura 10B). Estos datos nos confirmaron que en la cepa D273-10b no existe regulación de la síntesis de *Cytb* por defectos de ensamblaje, además de que Cbp3 y Cbp6 sólo funcionan como chaperonas de la biogénesis de *Cytb*, y no así como activadores traduccionales. De manera contraria, en la cepa BY4742, las mutantes $\Delta cbp3$, $\Delta cbp6$ y $\Delta cbs1$ fueron incapaces de crecer en medio sin arginina, indicando que estos genes son necesarios para la síntesis de *Cytb* (Figura 10C). La mutante $\Delta qcr7$ tampoco creció en un medio sin arginina, sugiriendo que en la cepa BY4742 se regula la síntesis de *Cytb* según su estado de ensamblaje; si la subunidad Qcr7 no se encuentra, entonces la síntesis de *Cytb* disminuye. En el caso de la mutante $\Delta cbp4$, observamos que la mutante fue capaz de crecer en un medio sin arginina de manera similar a la cepa WT, por lo que la chaperona Cbp4 no parece tener una función sobre la regulación de la síntesis de *Cytb*. Para evaluar si el efecto negativo sobre la síntesis de *Cytb* sólo ocurre en la ausencia de Qcr7, eliminamos a la subunidad Qcr8, que es otra subunidad que interactúa con *Cytb* en etapas tempranas. Observamos que la mutante $\Delta qcr8$ crece

mejor en un medio sin arginina en comparación a la mutante $\Delta qcr7$, aunque menos que la cepa WT (Figura 10 C). Esto nos indicó que las subunidades Qcr7 y Qcr8 afectan la síntesis de *Cytb*, aunque con distinta intensidad.

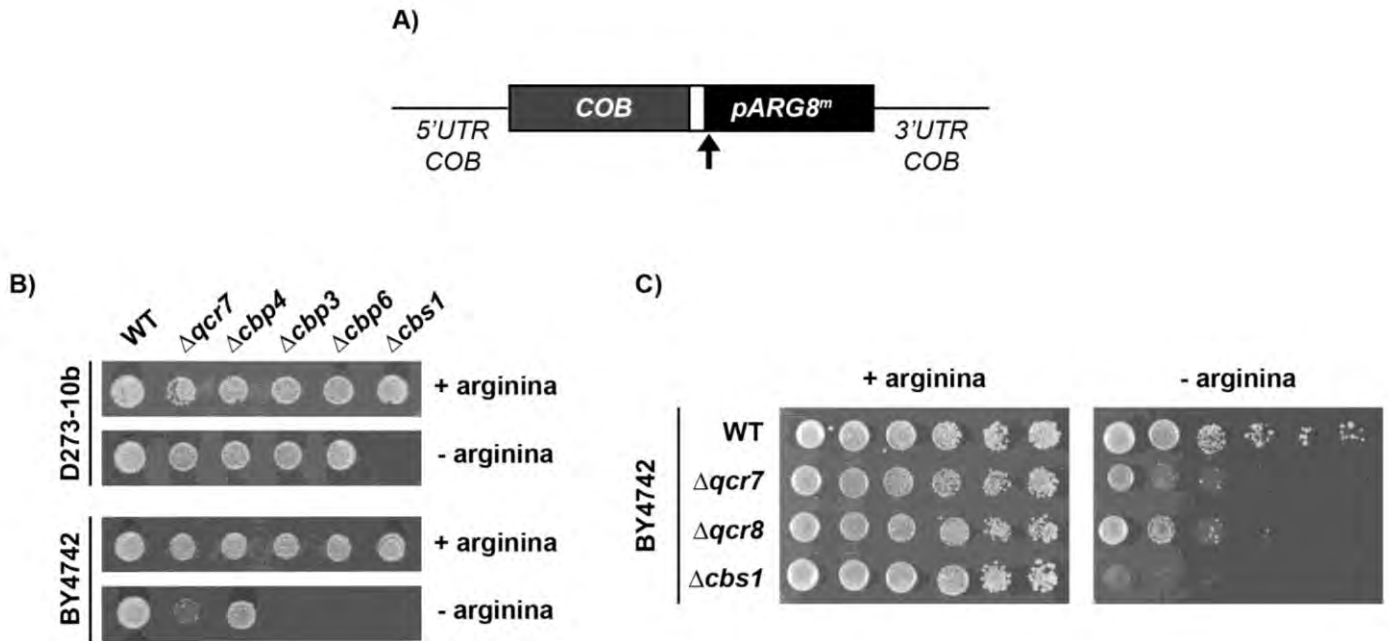


Figura 10. En la cepa D273-10b Cbp3-Cbp6 funcionan sólo como chaperonas en la biogénesis de *Cytb* pero no regulando su síntesis. A) Estructura de la construcción (*COB(1-385)::pARG8^m*). El gen reportero *ARG8^m* se fusionó al final del *orf* de *COB*, conservando su secuencia de edición (FLECHA), y los extremos 5' y 3' UTR de *COB*. B) y C) Bajo el contexto mitocondrial de *COB(1-385)::pARG8^m* se analizó el fenotipo de crecimiento de las cepas D273-10b y BY4742 con las mutantes indicadas en medio mínimo sintético con glucosa, con y sin arginina. Se analizó el crecimiento de las células por goteo en B y por diluciones seriadas en C con incubación por 4 días a 30°C. En esta figura concluimos que Cbp3 y Cbp6 funcionan en la regulación de la síntesis de *Cytb* de manera diferencial dependiendo de la cepa de *S. cerevisiae* que se utilice.

Nos preguntamos si estos resultados dependían de la presencia de la región codificante de *COB*, ya que al menos para el gen mitocondrial *COX1* es importante la presencia de la región codificante para que se lleve a cabo el mecanismo de regulación síntesis-ensamblaje (28). Para resolver esto utilizamos otra construcción mitocondrial, en la que el gen *ARG8^m* reemplazó el *orf* completo de *COB* (Figura 11A), bajo la regulación de los

extremos 5' y 3' UTR de *COB*. En este contexto mitocondrial, analizamos las mutantes $\Delta qcr7$, $\Delta cbp4$, $\Delta cbp3$, $\Delta cbp6$ y $\Delta cbs1$ en las cepas D273-10b y BY4742. En la cepa D273-10b observamos que todas las mutantes con excepción de la mutante $\Delta cbs1$ crecieron igual que la cepa WT en medio sin arginina (Figura 11B). Esto corroboró nuestro dato anterior con la construcción *COB(1-385)::pARG8^m* en donde observamos que Cbp3 y Cbp6 no son necesarias para la síntesis de *Cytb* (Figura 10B). Además concluimos que la región codificante de *COB* es importante para regular la síntesis-ensamblaje de *Cytb*, ya que la mutante $\Delta qcr7$ presentó niveles silvestres de crecimiento en un medio sin arginina. En la cepa BY4742, observamos que las mutantes $\Delta cbp3$ y $\Delta cbp6$ aunque de manera disminuida, fueron capaces de crecer en un medio sin arginina, indicando que es necesaria la presencia del *orf* de *COB* para llevar a cabo su función como activadores traduccionales de manera eficiente. Sin embargo la mutante $\Delta cbs1$ fue incapaz de crecer en medio sin arginina (Figura 11B); esto indica y confirma que Cbp3 y Cbp6 activan la traducción de *COB* mediante una vía distinta e independiente a la vía de Cbs1. Además, nuestros resultados sugieren que la función de Cbp3 y Cbp6 en la regulación de la síntesis de *Cytb* por ensamblaje depende de la región codificante de *Cytb* incluso en la cepa BY4742, ya que la mutante $\Delta qcr7$ creció igual que la cepa WT en medio sin arginina.

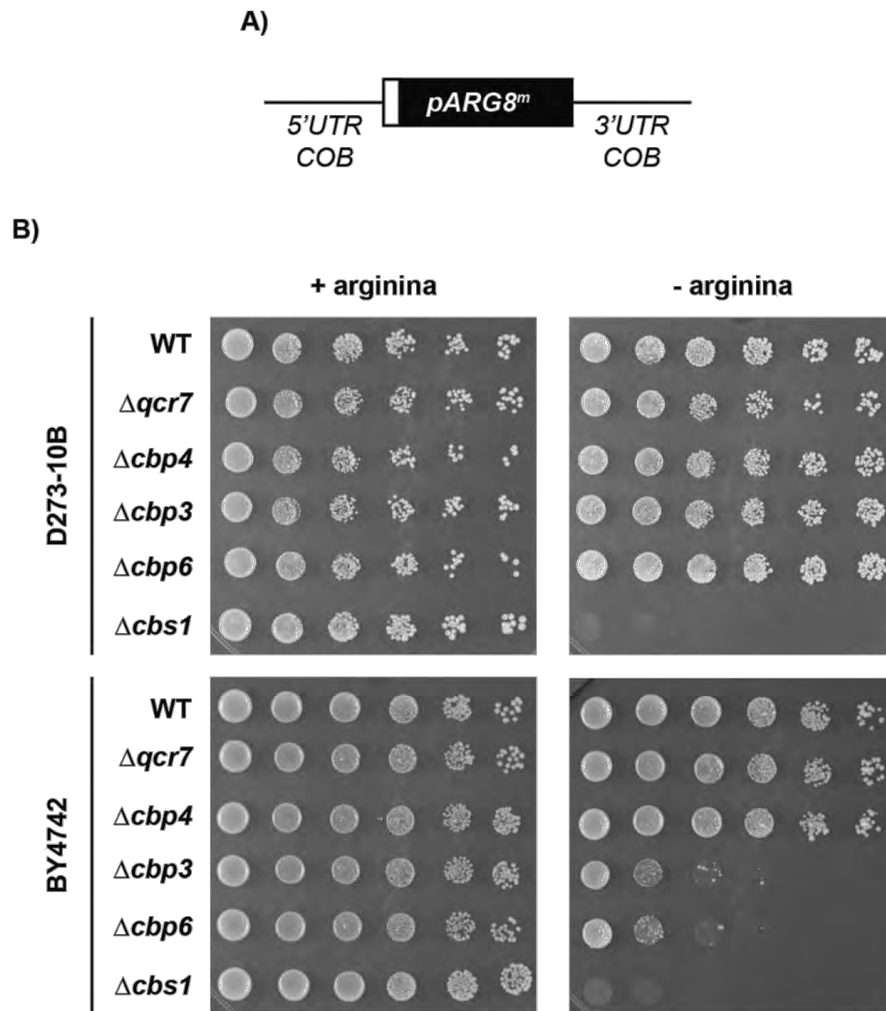


Figura 11. La función de Cbp3-Cbp6 como activadores traduccionales depende de la presencia del *orf* de *COB*. A) El *orf* completo de *COB* se reemplazó con el gen reportero de la traducción *ARG8^m* con su secuencia de edición (RECTÁNGULO BLANCO), pero conservó los extremos 5' Y 3' *UTR* de *COB*. B) Bajo el contexto mitocondrial de *cobΔ::pARG8^m* se analizó el fenotipo de crecimiento por diluciones seriadas de las cepas D273-10b y BY4742 con las mutaciones indicadas en medio mínimo sintético con glucosa, con y sin arginina. Crecimiento por 3 días a 30°C. En esta figura concluimos que el *orf* de *COB* desempeña una función importante para que Cbp3 y Cbp6 actúen de manera eficiente la activación traduccional del mRNA de *COB*.

En la cepa D273-10b, *Cytb* y la proteína Rieske (Rip1) son estables en la ausencia de Cbp3-Cbp6

Como vimos que *Cytb* se sintetizó al mismo nivel que la cepa silvestre en las mutantes $\Delta cbp3$ y $\Delta cbp6$ de la cepa D273-10b, decidimos evaluar los niveles en estado estacionario de *Cytb* mediante western blot. Analizamos los niveles de *Cytb* en las mutantes $\Delta qcr7$, $\Delta cbp4$, $\Delta cbp3$, $\Delta cbp6$ y $\Delta cbs1$ en las cepas D273-10b y BY4742. Se aislaron mitocondrias de cada cepa y se analizaron 20 μg de proteína total mediante SDS-PAGE y western blot. Observamos que los niveles de *Cytb* fueron de 91, 67 y 56% en las mutantes $\Delta cbp4$, $\Delta cbp3$ y $\Delta cbp6$ respectivamente en la cepa D273-10b con respecto a la cepa WT, mientras que, como se esperaba, en la mutante $\Delta cbs1$ no se detectó la presencia de *Cytb*; aunque en la mutante $\Delta qcr7$ se detectó la presencia de *Cytb*, ésta estaba 55% disminuida con respecto a la cepa WT, probablemente porque *Cytb* es inestable en la ausencia de Qcr7 (63) y es incapaz de continuar con el ensamblaje del complejo bc_1 (Figura 12A). Como se esperaba, en la cepa BY4742 no se observó la banda correspondiente de *Cytb* por ensayo de western blot en ninguna de las mutantes (Figura 12A).

Para entender por qué *Cytb* es estable en la ausencia de Cbp3 y Cbp6 en la cepa D273-10b, decidimos evaluar los niveles basales de otras subunidades del complejo bc_1 . Seleccionamos subunidades que corresponden a diferentes etapas del ensamblaje del complejo: Qcr7 y Qcr8 (etapa temprana); $Cytc_1$, Cor1 y Cor2 (etapa intermedia); Rip1 y Qcr10 (etapa tardía). Observamos que los niveles de las subunidades Cor1, Cor2 y $Cytc_1$ no disminuyeron por debajo del 50% con respecto a las cepas WT en ninguna de las mutantes en las dos cepas (Figura 12B). Posiblemente esto se debió a que estas tres subunidades forman un subcomplejo estable independiente de *Cytb* (2). Las subunidades Qcr7 y Qcr8 se observaron más estables en las mutantes $\Delta cbp3$ y $\Delta cbp6$ (> 50% con respecto a la cepa WT) en la cepa D273-10b y no así en la BY4742 (<10% con respecto a la cepa WT) (Figura 12B). Esto probablemente explique por qué *Cytb* es estable, ya que interactúa con Qcr7 y Qcr8 aunque el complejo bc_1 no sea funcional (2). Adicionalmente, observamos que la subunidad de Rieske (Rip1) se

encontró en niveles altos en las mutantes $\Delta cbp3$, $\Delta cbp6$ y $\Delta cbs1$ (>50%) con respecto a la cepa WT en la D273-10b (Figura 12B). Este dato fue sorprendente porque se sabe que mutantes que alteran el ensamblaje del complejo bc_1 , afectan la estabilidad de la subunidad Rip1 (67). Este fenómeno se puede observar en la cepa BY4742 en donde las mutantes $\Delta cbp3$, $\Delta cbp6$ y $\Delta cbs1$ comprometieron la estabilidad de Rip1 (<1% con respecto a la cepa WT). Como se esperaba la subunidad Qcr10 fue inestable en todas las mutantes en las dos cepas analizadas, debido a que defectos en el ensamblaje del complejo bc_1 comprometen la estabilidad de Qcr10 (Figura 12B) (67).

Como observamos que Cytb y Rip1 son estables en la ausencia de Cbp3 y Cbp6, nos preguntamos si este fenómeno se debe a que ambas subunidades forman agregados insensibles a la actividad de las proteasas mitocondriales. Para poder responder a esto, realizamos un ensayo de análisis de agregados proteicos (67). El experimento consiste en solubilizar a las mitocondrias en dos distintas fases. En la primera fase se solubilizó con digitonina, y por ultracentrifugación se separa la fase soluble del precipitado. En la segunda fase, el botón se solubilizó con tritón X-100 y por ultracentrifugación se separó la fase soluble del precipitado. La fase soluble de los dos tratamientos se combina. El precipitado y fase soluble se analizaron por SDS-PAGE y western blot. Aquellas proteínas que se mantengan en el precipitado después de la solubilización con los detergentes se consideran parte de los agregados. Analizando las mutantes $\Delta cbp3$ y $\Delta cbp6$ en la cepa D273-10b, observamos que Cytb y Rip1 se mantuvieron en la fase soluble, así como la citrato sintasa que se usó como control de una proteína que no se asocia en agregados (Figura 13). Este dato nos indicó que la estabilidad de Cytb y Rip1 no se debe a que formen agregados insensibles a proteasas mitocondriales.

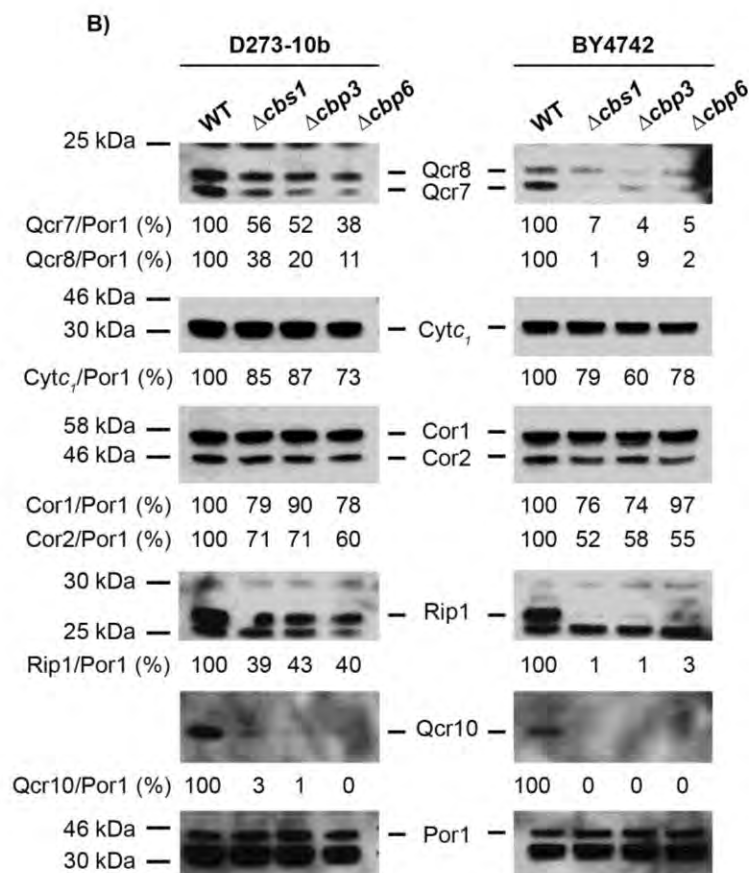
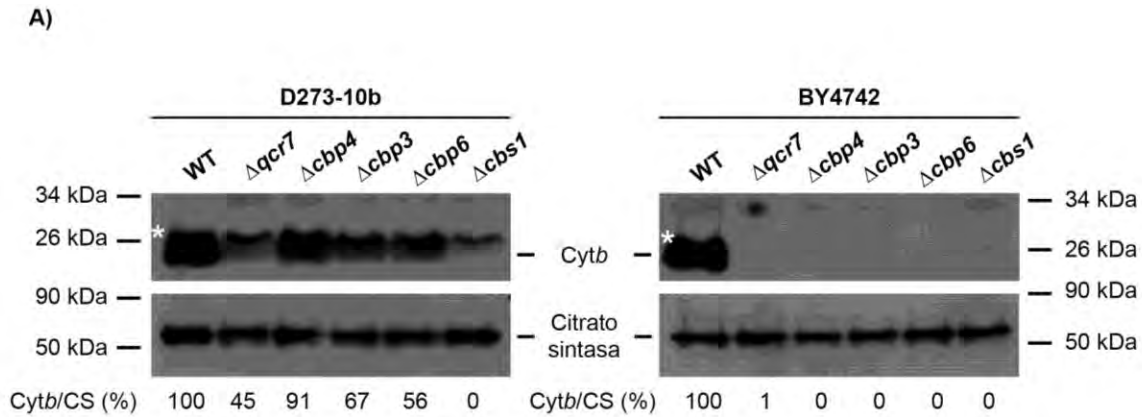


Figura 12. Cytb y la proteína Rieske (Rip1) son estables en la cepa D273-10b en la ausencia de Cbp3 y Cbp6. Muestras de 20 μ g de proteína mitocondrial de las mutantes indicadas se analizaron por SDS-PAGE y western blot con anticuerpos específicos contra A) citocromo *b* (Cytb) y citrato sintasa como control de carga, y B) las subunidades Qcr7, Qcr8, Cytc₁, Cor1, Cor2, Rip1 y Qcr10, así como Por1 como control de carga. El porcentaje de cada subunidad se midió por la densitometría de la banda con relación a la densitometría de su control de carga. En esta figura concluimos que en la ausencia de Cbp3 y Cbp6, Cytb y Rip1 se mantienen estables en la cepa D273-10b y no así en la cepa BY4742.

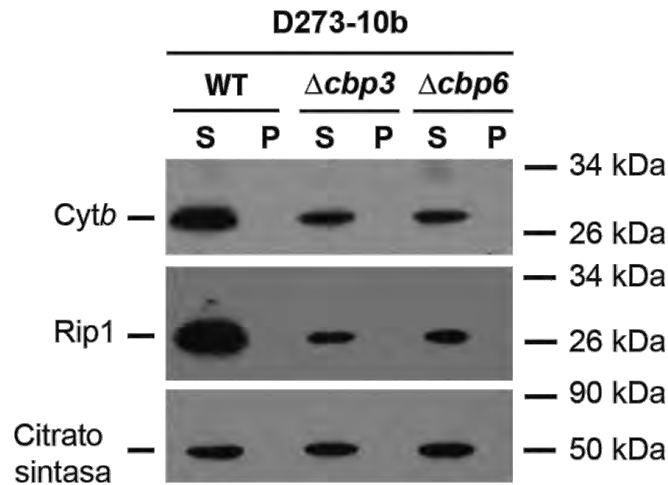


Figura 13. Cytb y Rip1 no forman agregados en la ausencia de Cbp3 y Cbp6. A partir de 100 μ g de proteína mitocondrial de las mutantes especificadas, se realizó un tratamiento secuencial, primero con 1% de digitonina y luego con 1 % de tritón X-100. Después de cada tratamiento se ultracentrifugó para separar botón (P) de sobrenadante (SN); los sobrenadantes se combinaron. Las dos fases se analizaron por SDS-PAGE y western blot con anticuerpos específicos contra citocromo *b* (Cytb), la subunidad Rip1 y citrato sintasa como control de proteína no agregada. En esta figura concluimos que la estabilidad de Cytb y Rip1 en la ausencia de Cbp3 y Cbp6 en la cepa D273-10b no se debe a que formen agregados resistentes a proteasas endógenas.

Cytb y Rip1 se asocian a supercomplejos en la ausencia de Cbp3 y Cbp6 en la cepa D273-10b

Debido a que Cytb y Rip1 son estables en la ausencia de Cbp3 y Cbp6 en la cepa D273-10b, y además estas no forman agregados en la cepa D273-10b, decidimos evaluar si estas subunidades se asocian a complejos de alto peso molecular. Por ello, solubilizamos con digitonina mitocondrias aisladas de las mutantes $\Delta cbp3$, $\Delta cbp6$, $\Delta cbs1$ y la doble mutante $\Delta cbp3/\Delta cbp6$ a partir de células D273-10b. Los solubilizados se resolvieron en un gel azul nativo (BN-PAGE). Por western blot descubrimos que en las mutantes $\Delta cbp3$, $\Delta cbp6$, así como en la doble mutante $\Delta cbp3/\Delta cbp6$ Cytb migró en

un complejo de alto peso molecular con peso similar al de los supercomplejos respiratorios (Figura 14A). También analizamos a la subunidad Cor1 y observamos que co-migraba con *Cytb*, aunque se detectó un aumento de señal a 140-600 kDa. Posiblemente esta banda corresponde al subcomplejo que forman Cor1 con Cor2 y *Cytc*₁ (2). Rip1 se asoció con *Cytb* y Cor1 en los mismos pesos moleculares.

Para corroborar que el tamaño observado del patrón de migración de *Cytb*, Cor1 y Rip1 corresponde a supercomplejos, realizamos un ensayo de actividad de la CcO "in gel" con las mismas muestras que en la Figura 14A. Incubamos el gel con 3,3-diaminobencidina y *Cytc* de caballo; la actividad de la CcO se observó como una tinción color marrón en el gel. Se detectaron bandas de actividad de la CcO en el peso de los supercomplejos en las mutantes $\Delta cbp3$, $\Delta cbp6$ y $\Delta cbp3/\Delta cbp6$ (Figura 14B). Esta banda no se detectó en la mutante $\Delta cbs1$ donde *Cytb* no se sintetiza. Como control negativo de actividad de la CcO se incluyó una mutante $\Delta cox1$, *carente* de la subunidad Cox1 de la CcO. Esto sugiere que *Cytb* se asocia en etapas tempranas de ensamblaje con la CcO, y que dicha asociación no depende de Cbp3 y Cbp6.

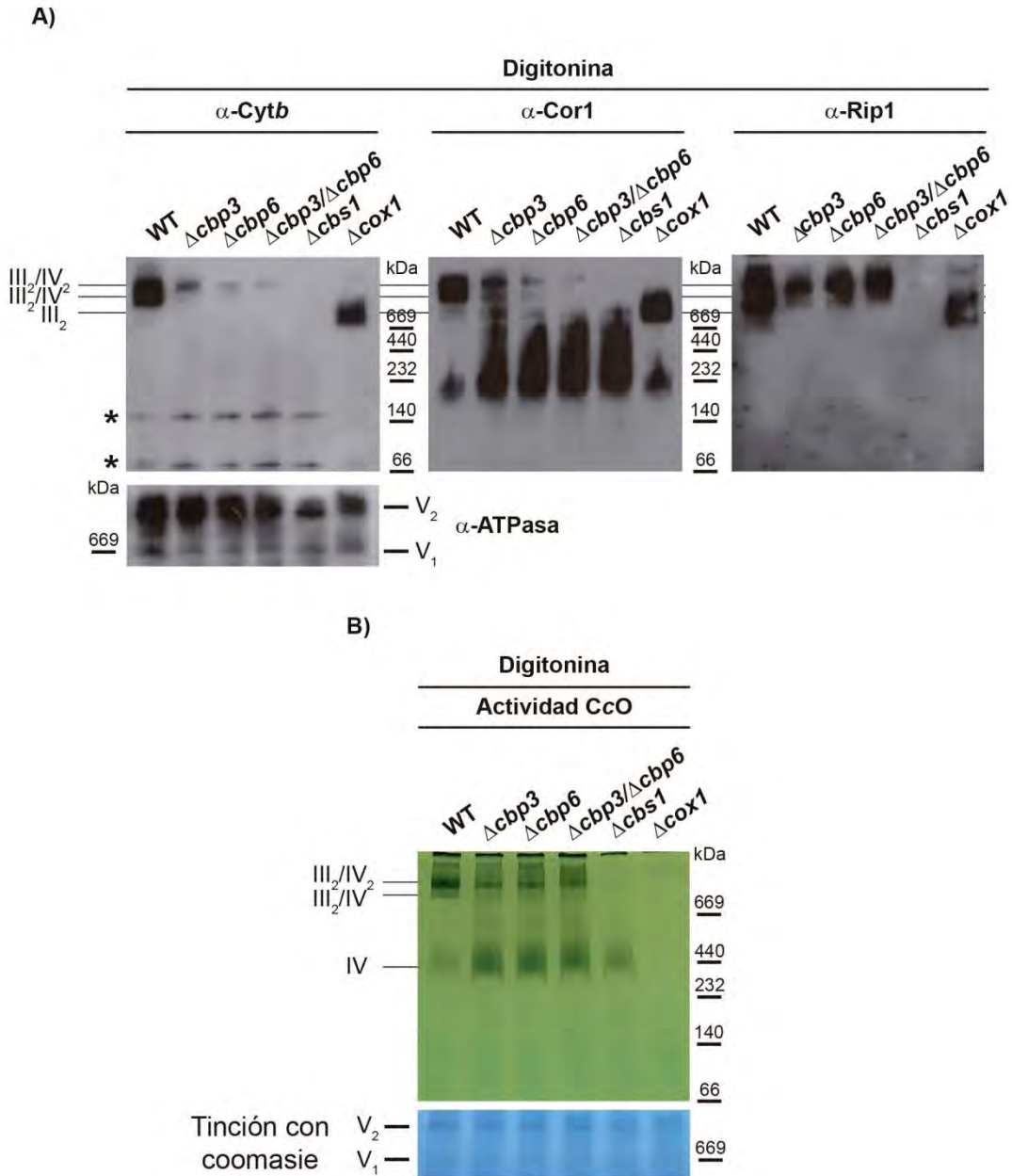


Figura 14. Cytb y Rip1 se asocian a supercomplejos intermedarios en la cepa D273-10b. Muestras de 100 μ g de proteína mitocondrial de las mutantes especificadas, se solubilizaron con 1% de digitonina. Los solubilizados se resolvieron por geles azules nativos (BN-PAGE) (12 – 5%). A) Western blot con anticuerpos específicos contra citocromo *b* (Cytb), Cor1, Rip1 y ATP sintasa como control de carga. B) Actividad “*in gel*” de la CcO en presencia de 3,3-diaminobenzidina y citocromo *c* de caballo. Como control de carga se fotografió previamente la tinción del gel con azul de coomasie. En esta figura concluimos que Cytb y Rip1 son capaces de asociarse a supercomplejos intermedarios en la ausencia de Cbp3 y Cbp6, y aunque el complejo *bc*₁ no sea funcional.

Después nos preguntamos si el complejo bc_1 que forma parte de estos supercomplejos intermediarios era tan estable como la enzima silvestre. Para ello, solubilizamos mitocondrias con el detergente dodecil-maltósido. Este detergente separa los supercomplejos en complejos respiratorios funcionales (43). Las mitocondrias se solubilizaron con este detergente, y se analizaron por BN-PAGE y western blot. Encontramos que en las mutantes $\Delta cbp3$ y $\Delta cbp6$, la señal por western blot de *Cytb* y *Cor1* era indetectable en comparación a la cepa silvestre (Figura 15). Estos datos sugieren que el complejo bc_1 intermediario que se forma en ausencia de Cbp3 y Cbp6 no es estable, lo cual podría explicar por qué dichas mutantes no respiran a pesar de que *Cytb* se sintetiza de manera normal.

En conjunto, estos datos nos demostraron que en la ausencia de Cbp3 y Cbp6 en la cepa D273-10b, *Cytb* y otras subunidades del complejo bc_1 se asocian con la CcO formando “supercomplejos intermediarios”. Estos supercomplejos no son funcionales debido a que las mutantes $\Delta cbp3 \Delta cbp6$ tienen un fenotipo no respiratorio (Figura 8B). Adicionalmente, el complejo bc_1 intermediario que se forma es inestable en ausencia de Cbp3 y Cbp6.

A pesar de que observamos que Rip1 migró en supercomplejos intermediarios en ausencia de Cbp3 y Cbp6, aún quedaba la duda si esta migración pudiera deberse a que Rip1 se asoció al hexámero de Bcs1, la chaperona encargada de translocar a Rip1 a la membrana interna mitocondrial (87). Para descartar esta posibilidad, evaluamos si Rip1 migraba en forma similar al de los supercomplejos pero en ausencia de la CcO, de Cbp3 y Cbp6. Para eliminar a la CcO, generamos la mutante nula de *Pet309*, proteína necesaria para la síntesis de la subunidad *Cox1* (27). Analizamos la formación de supercomplejos en las mutantes $\Delta cbp6$ y la doble mutante $\Delta cbp6/\Delta pet309$ solubilizando con digitonina, resolviendo por BN-PAGE y western blot. Observamos que a diferencia de lo que ocurre en la cepa $\Delta cbp6$, en la doble mutante $\Delta cbp6/\Delta pet309$, Rip1 no migró en forma similar a los supercomplejos sino que migró en forma similar a la del complejo bc_1 (III*) (Figura 16). De igual manera, la subunidad *Cor1* co-migró con Rip1 en

proporción similar al del complejo bc_1 (~750kDa) Con este dato corroboramos que Rip1 en la ausencia de Cbp3 y Cbp6 también fue capaz de asociarse a supercomplejos.

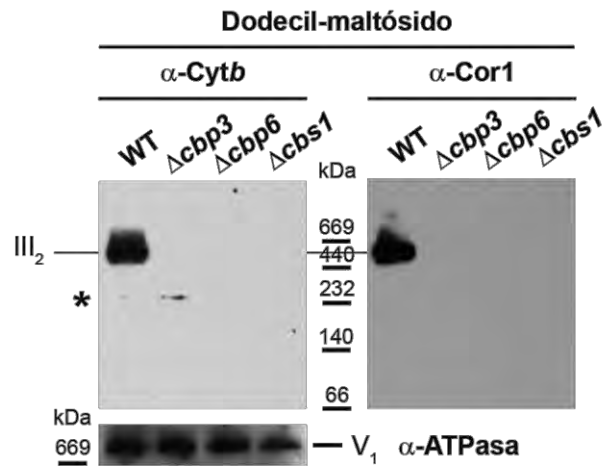


Figura 15. En la ausencia de Cbp3 y Cbp6 el complejo bc_1 es inestable. Muestras de 100 μ g de proteína mitocondrial de las mutantes indicadas se solubilizaron con 0.1% de dodecil-maltósido, y el solubilizado se analizó por gel nativo (BN-PAGE) (12 – 5%) y western blot. Se emplearon anticuerpos específicos contra citocromo *b* (Cytb), la subunidad Cor1 y la ATP sintasa como control de carga. En esta figura concluimos que el complejo bc_1 es inestable en la ausencia de Cbp3 y Cbp6 en la cepa D273-10b.

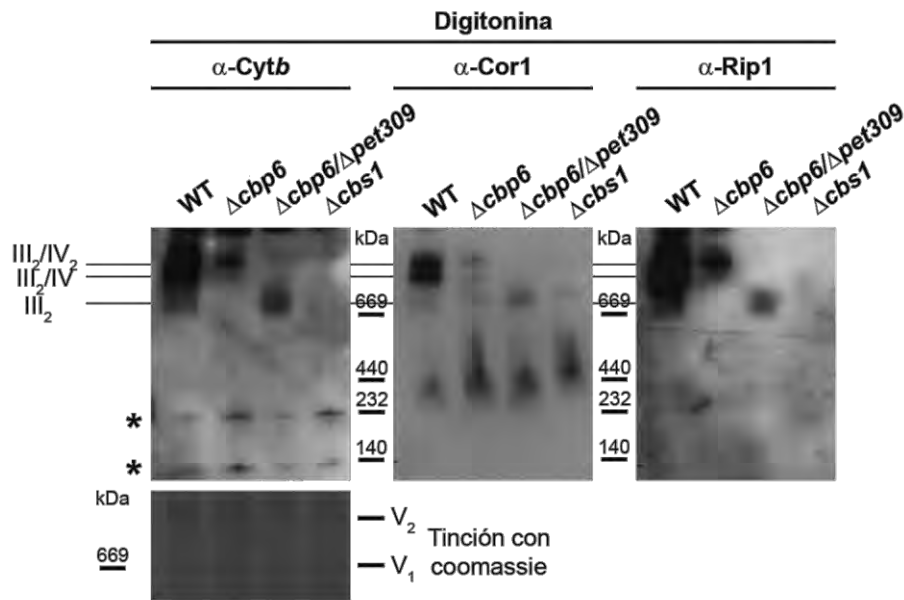


Figura 16. La asociación de Rip1 a supercomplejos depende de la presencia de la CcO. Muestras de 100 μ g de proteína mitocondrial se solubilizaron con 1% de digitonina, y los extractos obtenidos se analizaron por BN-PAGE (12 – 5%) y western blot. Se emplearon anticuerpos específicos contra citocromo *b* (Cytb), Cor1 y Rip1. El gel teñido con azul de coomassie se fotografió previamente como control de carga. En esta figura concluimos que la migración de Rip1 en complejos de alto peso molecular se debe a su asociación con la CcO.

Cbp3 y Cbp6 asisten la hemilación de Cytb

En un reporte previo se demostró que Cytb se hemila en la primera fase de su ensamblaje, por lo que cuando Cytb interactúa con Qcr7 y Qcr8, éste se encuentra completamente hemilado (8). Decidimos evaluar si la falta de hemilación de Cytb era la causa por la que las mutantes Δ cbp3 y Δ cbp6 en la cepa D273-10b presentan un fenotipo no respiratorio. Inicialmente, estudiamos la hemilación de Cytb mediante espectrofotometría UV-visible de mitocondrias en suspensión, y analizamos la diferencia del espectro de mitocondrias en estado reducido menos estado oxidado. Analizamos a las mutantes Δ cbp3, Δ cbp6 y empleamos mitocondrias de la mutante

$\Delta cbs1$ como control negativo. En las mutantes $\Delta cbp3$ y $\Delta cbp6$ no se detectó hemo *b* el cual se observa como un pico a 550 nm (Figura 17).

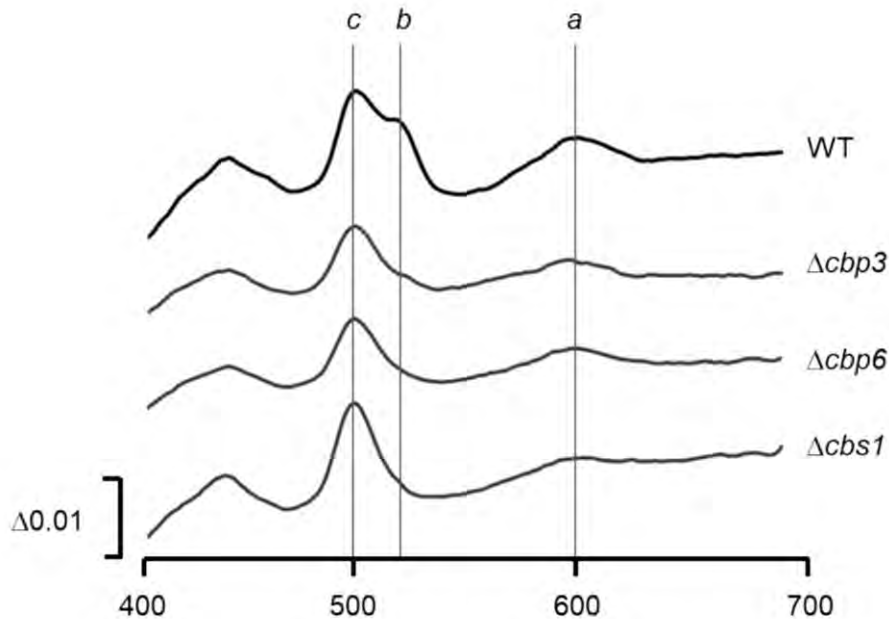


Figura 17. El hemocromo *b* es indetectable por espectrofotometría UV-visible en mutantes $\Delta cbp3$ y $\Delta cbp6$. Se analizaron 1.5 mg de proteína mitocondrial de las mutantes indicadas. Se graficaron los espectros diferenciales en estado oxidado reducido con ditionita menos oxidado con ferrocianuro.

Para corroborar que en la ausencia de Cbp3 y Cbp6 el Cyt*b* no se hemila en la cepa D273-10b, decidimos analizar la presencia de hemo *b* en las mismas mutantes por HPLC. Se purificaron mitocondrias de cada mutante, se extrajeron los hemos con acetona ácida y se analizaron por HPLC, utilizando como fase móvil un gradiente 0-100% de acetonitrilo con 1% de ácido trifluoroacético en una columna 4.6- by 250- μ m SunFire C18 5-mm (Waters). Para determinar el tiempo de retención del hemo *b*, se corrió una muestra de 10 μ g de hemina y se observó un pico alrededor de los 12 minutos (Figura 18A). Los picos correspondientes a hemo *b* en las mutantes $\Delta cbp3$, $\Delta cbp6$ y $\Delta cbs1$ disminuyeron con respecto a la cepa WT (Figura 18B). De 3 ensayos se

cuantificó el área bajo la curva, y se promedió el valor obtenido. Observamos que los niveles de hemo *b* disminuyeron 70% en las mutantes $\Delta cbp3$, $\Delta cbp6$ y $\Delta cbs1$ con respecto a la cepa WT ($p < 0.001$). Esto indica que *Cytb* no se hemiló en la ausencia de Cbp3 y Cbp6 (Figura 18C).

Cbp3 y Cbp6 se asocian al ribosoma mitocondrial y se unen físicamente al mRNA de *COB*

En un reporte previo se demostró que Cbp3 y Cbp6 se unen al túnel de salida del mitoribosoma en la cepa W303, en que ambas chaperonas regulan la síntesis de *Cytb* (6). Para entender por qué existe una diferencia de función de Cbp3 y Cbp6 sobre la síntesis de *Cytb* entre las cepas BY4742 y D273-10b, decidimos estudiar la asociación de Cbp3 y Cbp6 con el ribosoma mitocondrial. Esto debido a que Cbp3 y Cbp6 podrían dejar de asociarse con el mitoribosoma en cepas en que ya no regulan la síntesis de *Cytb*.

Decidimos analizar sólo a Cbp3, asumiendo que la función de Cbp3 y Cbp6 dependen de la presencia de ambas (6). Para detectar a Cbp3, decidimos etiquetarla con un epítipo de hemaglutinina (HA) fusionado en su extremo carboxilo terminal. La construcción *CBP3-HA* se expresó a partir de un vector centromérico (pRS416) de *S. cerevisiae*. El vector se expresó en la mutante $\Delta cbp3$ de las cepas D273-10b y BY4742. Por la capacidad de crecimiento en medio respiratorio, determinamos que la fusión del epítipo de HA no afectó la función de Cbp3 (Figura 19).

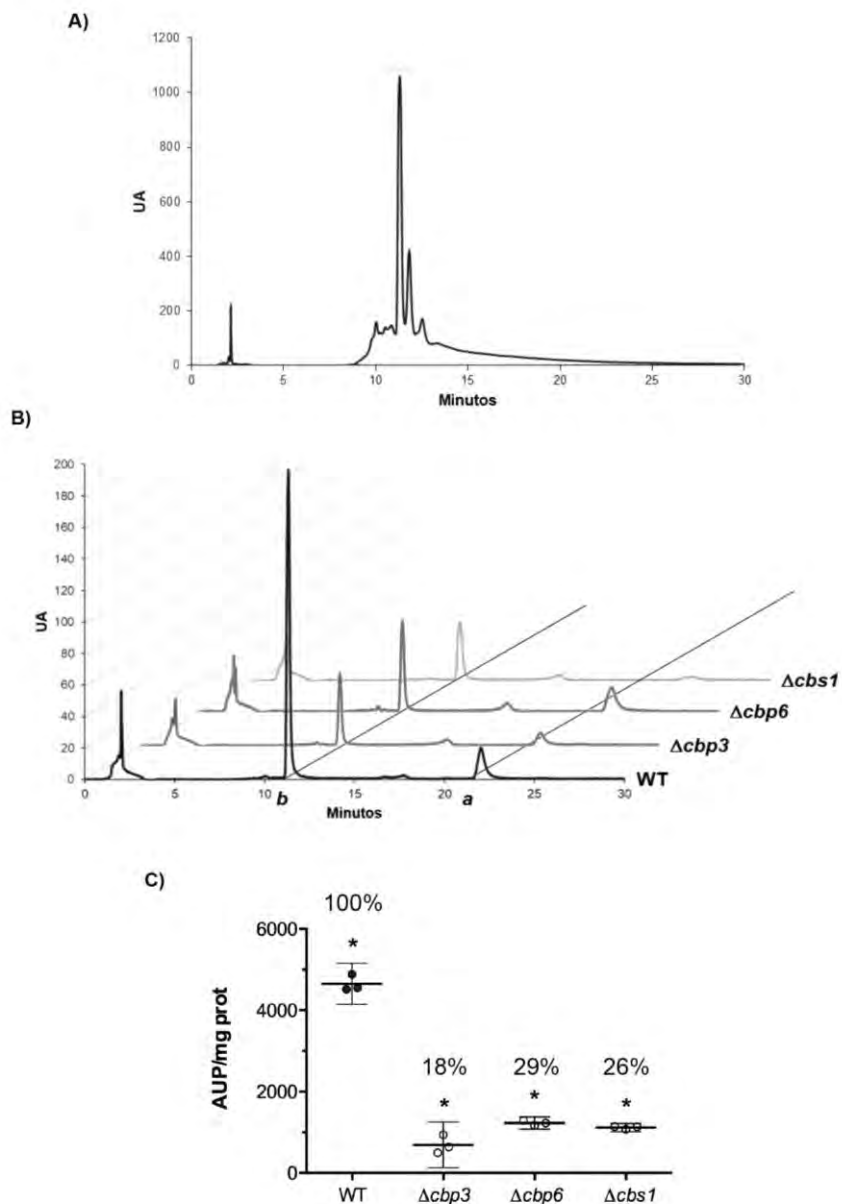


Figura 18. Cbp3 y Cbp6 se requieren para hemilar a Cytb en la cepa D273-10b. A) Una muestra de 10 μ g de hemina se analizó por HPLC para determinar el tiempo de retención del hemo *b*. B) 700 μ g de proteína mitocondrial de las mutantes indicadas en la cepa D273-10b se trataron con acetona ácida (3% HCl) para extraer grupos hemo. Las muestras se analizaron por HPLC y se observaron los picos correspondientes a hemo *b* y hemo *a* a los 12 y 22 minutos respectivamente. C) A partir de tres análisis independientes, se promedió el área bajo la curva del pico correspondiente a hemo *b*. Los errores estándar son representados por el intervalo de confianza (CI) del 95%. El análisis estadístico se realizó con la prueba de ANOVA de una vía con análisis post hoc Bonferroni (GraphPad Prism Software v.6.0). * $p < 0.001$ v/s WT. En esta figura concluimos que en la cepa D273-10b, Cytb no se hemila en la ausencia de Cbp3 y Cbp6.

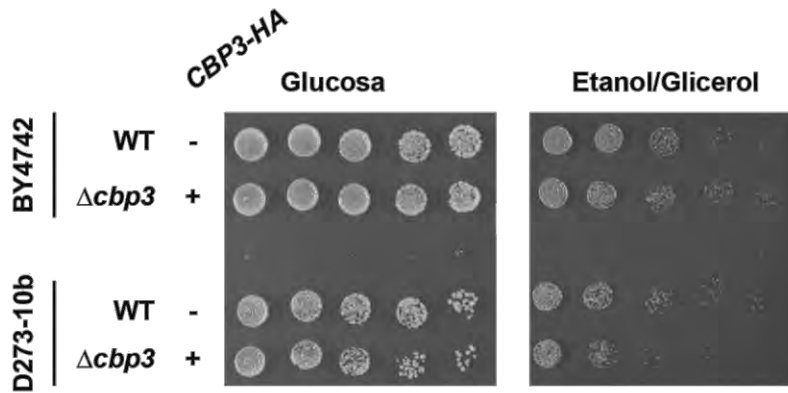


Figura 19. La construcción *CBP3-HA* no afectó la capacidad respiratoria de las cepas BY4742 y D273-10b. Análisis de crecimiento en medio fermentativo (Glucosa) y respiratorio (Etanol/Glicerol) de células WT y $\Delta cbp3$ complementadas con el plásmido que contiene a *CBP3-HA* en las cepas BY4742 y D273-10b. El crecimiento de las células se analizó mediante diluciones seriadas (10X) durante 3 días a 30°C.

Para estudiar si Cbp3-HA interactúa con el mitoribosoma, solubilizamos mitocondrias con 1% de digitonina. El solubilizado se cargó en un gradiente de sacarosa (20-40%) y ultracentrifugamos a 69 000 $\times g$ por 2 horas. Colectamos 7 fracciones desde la superficie hasta el fondo del tubo de centrifugación, y las analizamos por western blot. En la cepa BY4742 el mitoribosoma migró en fases intermedias del gradiente, ya que detectamos la presencia de las proteínas Mrp20 (proteína de la subunidad grande) y Mrp51 (proteína de la subunidad chica) (Figura 20A). También observamos que una población de Cbp3-HA co-migró en las mismas fases que el mitoribosoma. Como control negativo analizamos a la citrato sintasa, proteína que no migra con el mitoribosoma y observamos que ésta se mantiene en las fases superficiales por su bajo peso molecular comparado al del mitoribosoma. En mitocondrias de la cepa D273-10b encontramos que al igual que en la cepa BY4742, una parte de Cbp3-HA co-migró con el mitoribosoma (Figura 20B). Una mayor población de Cbp3-HA migró en fracciones superficiales en ambas cepas D273-10B y BY4742. Consideramos que esta población podría corresponder a Cbp3-HA traduccionalmente activo y/o Cbp3-HA asociado a *Cytb* como chaperona. Con estos experimentos concluimos que la asociación de Cbp3 con el

mitoribosoma está conservada entre las cepas BY4742 y D273-10b, y que por lo tanto es independiente del papel que tenga o no esta chaperona en la activación traduccional del mRNA de *COB*.

Como no observamos una diferencia en la unión de Cbp3 con el mitoribosoma, nos preguntamos si Cbp3 es capaz de unirse al mRNA de *COB* y si esta unión pudiera ser diferente entre las cepas BY4742 y D273-10b. Para esto aislamos mitocondrias, las solubilizamos con 0.7% de dodecil-maltósido e inmunoprecipitamos a Cbp3-HA con anticuerpos específicos contra HA. Aislamos el RNA de la fracción de inmunoprecipitación (IP) y por RT-PCR con oligonucleótidos específicos para el extremo *5'UTR* de *COB* evaluamos la presencia del RNA de *COB*. Por western blot, observamos que tanto en la cepa BY4742 como en la D273-10b la inmunoprecipitación de Cbp3-HA fue eficiente (Figura 21A). Se amplificó a *COB* por RT-PCR en la fase de IP tanto en la cepa BY4742 como en la D273-10B (Figura 21B), indicando que Cbp3-HA interactúa físicamente con el mRNA de *COB*. En el control negativo de interacción no se observó amplificación en la fase de IP del mRNA de *VAR1*. Este gen es codificado en el genoma mitocondrial pero que no forma parte del complejo *bc₁*, y por lo tanto no se espera que interaccione con Cbp3-HA. Con estos resultados concluimos que Cbp3 interactúa físicamente con el mRNA de *COB* y que esta interacción se mantiene aun cuando Cbp3 y Cbp6 no regulen la síntesis de *Cytb* en la cepa D273-10b.

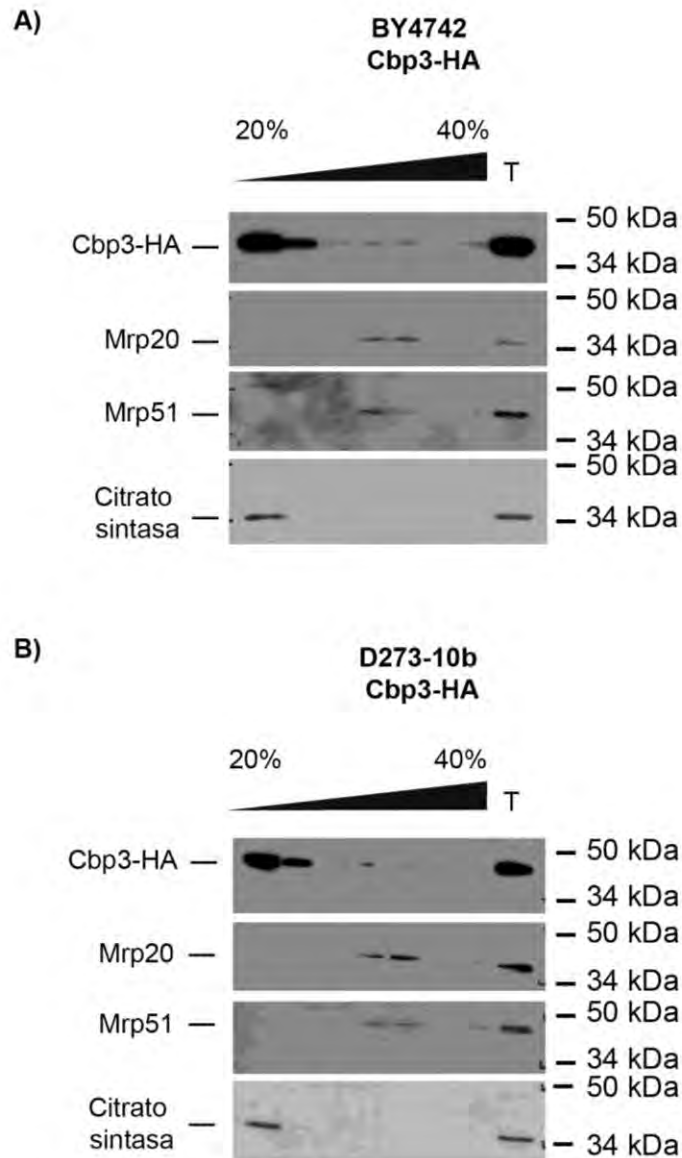


Figura 20. La interacción de Cbp3 con el mitorribosoma está conservada en las cepas BY4742 y D273-10b. Análisis por western blot de 500 μ g de proteína mitocondrial solubilizada con 1% de digitonina. El solubilizado se cargó en un gradiente discontinuo de sacarosa de 20-40% y se ultracentrifugó. Se tomaron 7 fracciones y se analizaron por western blot con anticuerpos específicos contra hemaglutinina (Cbp3-HA), la proteína de la subunidad grande del mitorribosoma (Mrp20), la proteína de la subunidad chica del mitorribosoma (Mrp51) y la citrato sintasa como control de proteína no ribosomal. (T) corresponde a la fracción total del solubilizado con detergente. En esta figura concluimos que la asociación de Cbp3 con el mitorribosoma está conservada en las cepas BY4742 y D273-10b.

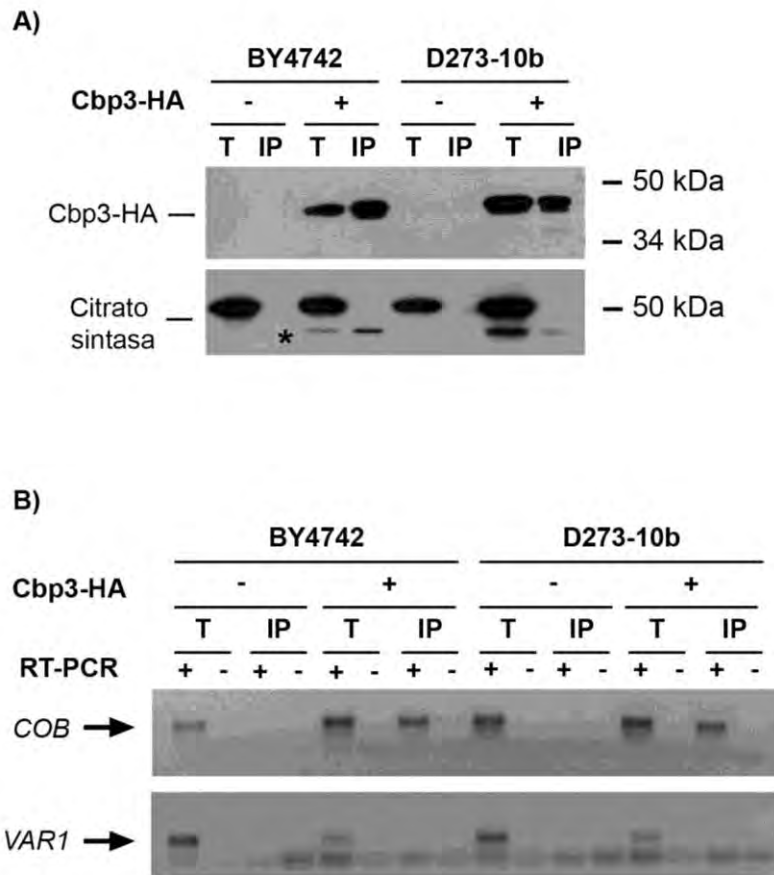


Figura 21. Cbp3 interactúa físicamente con el mRNA de *COB* y ésta interacción es independiente de la función de Cbp3 en la regulación de la síntesis de *Cytb*. 500 μ g de proteína mitocondrial de las cepas BY4742 y D273-10b con (+) y sin (-) epítipo HA en Cbp3 (Cbp3-HA) se solubilizaron con 0.7% de dodecil-maltósido. El solubilizado se incubó con perlas de proteína A-sefarosa acoplada a anticuerpos contra hemaglutinina (HA) y por centrifugación se separó al inmunoprecipitado (IP) del sobrenadante. A) Western blot con anticuerpos contra HA y citrato sintasa como control de inmunoprecipitación inespecífica. (*) Banda correspondiente a Cbp3-HA. B) Se extrajo RNA de 2/3 de la fracción de IP y se amplificó el extremo 5'UTR de *COB* y el de *VAR1* por RT-PCR. La síntesis de cDNA se llevó a cabo en presencia (+) y ausencia (-) de transcriptasa reversa. (T) corresponde a la fracción total del solubilizado con detergente. En esta figura concluimos que Cbp3 se asocia con el mRNA de *COB* en las cepas BY4742 y D273-10b.

La síntesis de *Cytb* en las cepas BY4742 y D273-10b es diferente debido a polimorfismos en el genoma nuclear

Encontramos que entre la cepa BY4742 y la cepa D273-10b existe una diferencia en la regulación de la síntesis de *Cytb*. Consideramos que esta diferencia podría deberse a la presencia de polimorfismos entre las dos cepas analizadas. Estos polimorfismos podrían existir en el genoma nuclear o en el mitocondrial y su presencia podría afectar factores que estén involucrados en la regulación de la síntesis de *Cytb*. Para estudiar en qué genoma se localizan los probables polimorfismos responsables de la regulación diferencial de la síntesis de *Cytb*, intercambiamos el DNA mitocondrial entre cepas D273-10b y BY4742. Generamos dos diferentes tipos de cepas híbridas, una con el fondo genético nuclear de la cepa D273-10b pero con DNA mitocondrial (mtDNA) de la BY4742 y otra con el fondo nuclear BY4742 con mtDNA de la cepa D273-10b. En ambos contextos evaluamos la síntesis de *Cytb* en las mutantes $\Delta qcr7$, $\Delta cbp3$, $\Delta cbp6$ y $\Delta cbp4$. Como control positivo utilizamos a la mutante $\Delta qcr10$ donde la síntesis de *Cytb* no se afecta (67). Mediante el ensayo de síntesis y marcaje radioactivo de proteínas de origen mitocondrial en presencia de cicloheximida y ^{35}S -metionina, observamos que en la cepa híbrida D273-10b con mtDNA BY4742, el efecto de las mutantes fue similar al de la cepa D273-10b, en donde la ausencia de Qcr7, Cbp3 y Cbp6 no afectan la síntesis de *Cytb* (>50% con respecto a la WT) (Figura 22A). Para corroborar este efecto observamos por western blot que los niveles basales de *Cytb* en todas las mutantes analizadas en estas cepas híbridas fueron similares a las mutantes en la cepa D273-10b (>50% con respecto a la WT) (Figura 22B). De igual manera, evaluamos por síntesis y marcaje radioactivo de proteínas de origen mitocondrial a la cepa híbrida BY4742 con mtDNA de D273-10b. Observamos que en las mutantes $\Delta qcr7$, $\Delta cbp3$, $\Delta cbp6$ y $\Delta cbp4$, la síntesis de *Cytb* disminuyó dramáticamente igual que en la cepa BY4742 (<25% con respecto a la WT) (Figura 22C). Corroboramos este dato por western blot y observamos que los niveles basales de *Cytb* disminuyeron dramáticamente (<25% con respecto a la WT) en las mutantes $\Delta qcr7$, $\Delta cbp3$, $\Delta cbp6$ y $\Delta cbp4$ en la cepa híbrida BY4742 mtDNA D273-10b, así como en la cepa BY4742

(Figura 22D). Estos datos demostraron que el o los polimorfismos asociados a la regulación diferencial de la síntesis de *Cytb* se localizan en el genoma nuclear.

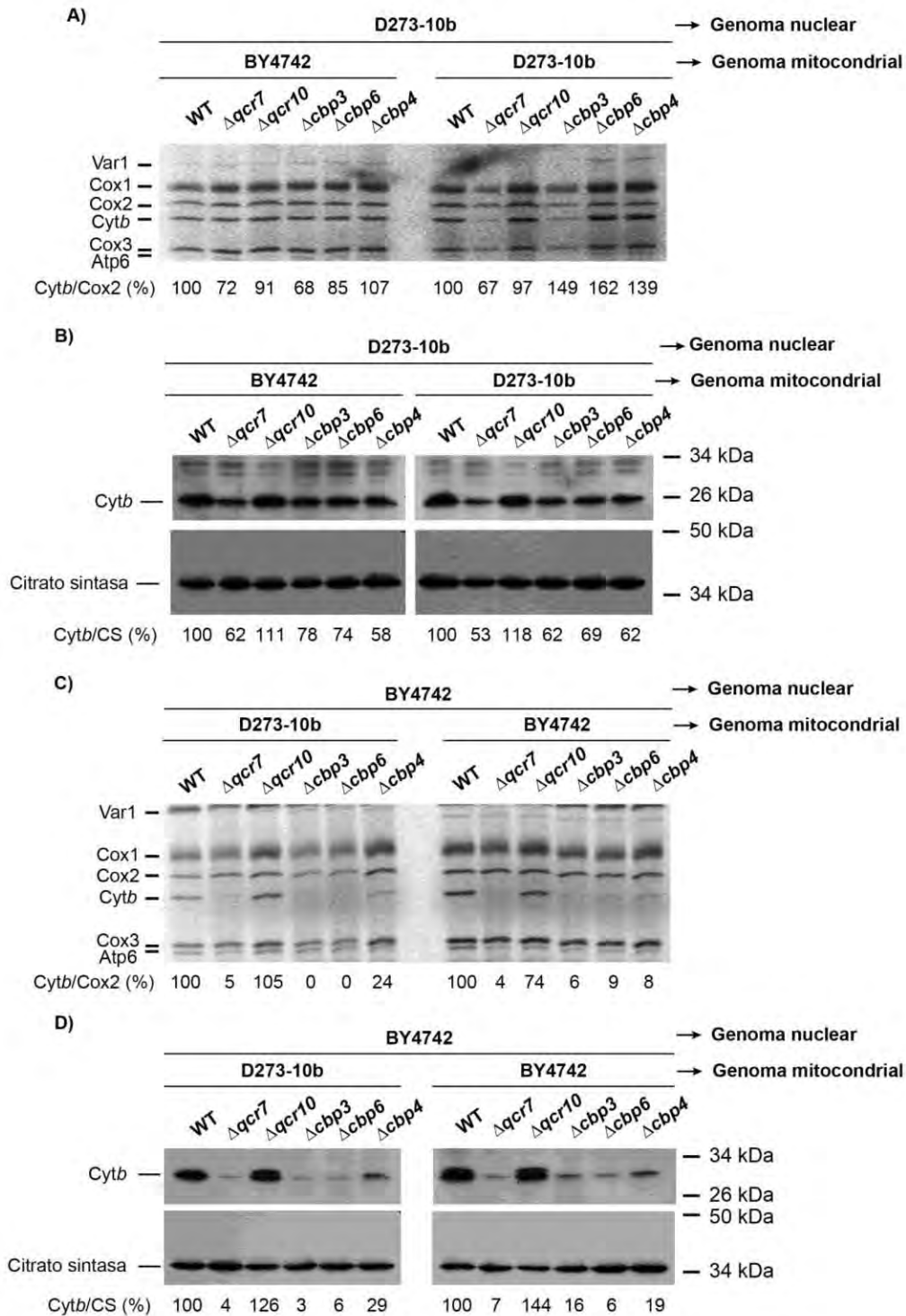


Figura 22. La diferencia sobre la regulación de la síntesis de *Cytb* se localiza en el genoma nuclear. A) y C) Análisis por autoradiografía del ensayo de traducción mitocondrial *in vivo*. Células completas de las cepas híbridas indicadas, se incubaron con ^{35}S -metionina en presencia de cicloheximida. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE (16%) y se analizaron por autoradiografía. El porcentaje de *Cytb* se analizó por densitometría de banda y se calculó con relación a la densitometría de la proteína Cox2. B) y D) 20 μg de proteína mitocondrial de las mismas mutantes híbridas se analizaron por western blot con anticuerpos específicos contra citocromo *b* (*Cytb*) y citrato sintasa como control de carga. El porcentaje de *Cytb* se analizó por densitometría de banda en relación a la densitometría de la citrato sintasa. (→) Indican el origen del genoma nuclear o mitocondrial. En esta figura concluimos que los polimorfismos asociados a la diferencia de función de Cbp3 y Cbp6 entre las cepas BY4742 y D273-10b se localiza en el genoma nuclear.

Para comprender cómo funciona este nuevo factor o factores nucleares, primero evaluamos qué fenotipo era dominante, el de regulación o el de no regulación sobre la síntesis de *Cytb*. Para ello generamos células diploides a partir de células D273-10b haploides apareadas con la cepa BY4741 haploide. Posteriormente monitoreamos la síntesis de *Cytb* en las cepas WT y en las mutantes $\Delta cbp3$, $\Delta cbp6$, $\Delta qcr7$ y $\Delta cbp4$. Las mutantes diploides se comportaron de manera similar a la cepa D273-10b, es decir, en las mutantes $\Delta cbp3$, $\Delta cbp6$ y $\Delta qcr7$ la síntesis de *Cytb* se mantuvo en niveles silvestres (>50% con respecto a la WT). Este resultado indicó que el fenotipo dominante en la síntesis de *Cytb* es el de no regulación (Figura 23A y B).

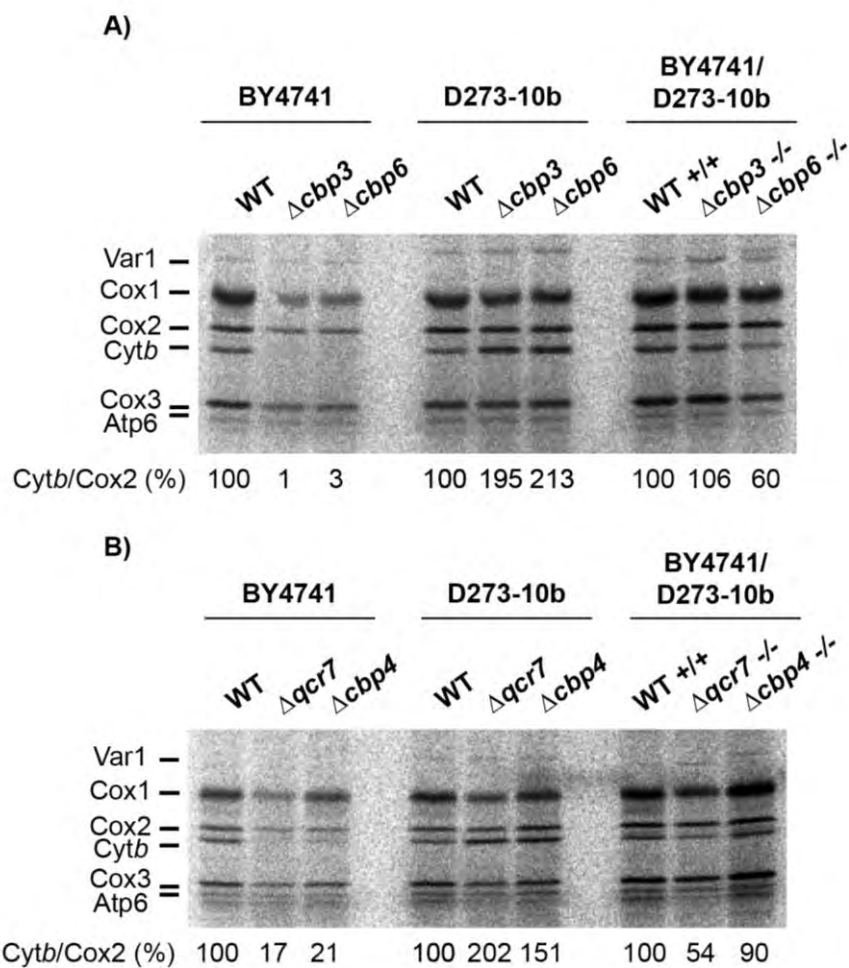


Figura 23. El fenotipo de la cepa D273-10b sobre la regulación de la síntesis de Cytb es dominante. Análisis por autoradiografía del ensayo de traducción mitocondrial *in vivo*. Células haploides de la cepa D273-10b o diploides BY4741/D273-10b, se incubaron con ³⁵S-metionina en presencia de cicloheximida. Las proteínas mitocondriales se analizaron por SDS-PAGE (16%) y autoradiografía. El símbolo en el nombre de la mutante (-/-) indica la ausencia del gen indicado en ambos cromosomas de la cepa diploide. Los porcentajes de Cytb se calcularon por densitometría en relación a la densitometría de Cox2. En esta figura se puede concluir que el efecto dominante sobre la regulación de la síntesis de Cytb radica en el fenotipo de la cepa D273-10b.

Dos genes están involucrados en la función diferencial de Cbp3 y Cbp6 sobre la síntesis de *Cytb*

Todos nuestros datos indican que existe(n) nuevo(s) factor(e)s con polimorfismos de origen nuclear e identidad desconocida que están involucrados en la regulación de la síntesis de *Cytb*. Para investigar el número posible de genes con polimorfismos que podrían ocasionar la diferencia, observada generamos una cepa diploide entre la cepa W303 sin genoma mitocondrial (ρ°) y la cepa mutante D273-10b $\Delta cbp3$. Utilizamos a la cepa W303 en vez de la BY4742 ya que esta última tiene una mutación que provoca un paro prematuro en el gen *HAP1* que codifica para un activador transcripcional que modula la expresión de genes mitocondriales, mientras que en W303, *HAP1* es silvestre (74). En estudios previos se identificó que en la cepa W303, al igual que en la cepa BY4742 la síntesis de *Cytb* depende de Cbp3 y Cbp6 (6). Para monitorear la síntesis de *Cytb*, utilizamos además cepas que codifican al reportero de la traducción Arg8 en la construcción mitocondrial *COB(1-385)::pARG8^m*. De esta manera podríamos evaluar exclusivamente la síntesis de *Cytb* por la capacidad de la célula de crecer en medio sin arginina y discriminar entre la función de Cbp3 en la hemilación y crecimiento respiratorio de las células. La cepa diploide generada se creció en condiciones que llevan a la esporulación y formación de tétradas (esporas). Las tétradas se incubaron con zimoliasa para degradar la pared celular. Por microdissección se separaron las esporas y se analizó la síntesis de *Cytb*-Arg8. Como control de que las esporas provenían de una sola tétrada se observó que el patrón de segregación de los sexos Mat a/α , y el crecimiento en medio sin lisina y sin triptófano fuera de 2:2.

Se analizaron 66 tétradas, en las cuales se observó que el patrón de segregación del fenotipo arg^{+} fue: 4:0, 3:1 y 2:2 ($arg^{+}:arg^{-}$) con una frecuencia de 34, 30 y 2 respectivamente (Tabla II). Si se tratara de un solo gen la frecuencia esperada sería de 3:1 en el 100% de las tétradas. Como el resultado experimental arrojó que sólo un 45% de las tétradas se segregó 3:1, consideramos que es más de un gen el involucrado en la regulación del mRNA de *COB*, pero posiblemente estos genes se localizan en el mismo cromosoma debido a la alta frecuencia de segregación 3:1 (Tabla II).

Para determinar el número de genes involucrados contamos el número total de esporas con fenotipo *arg*⁺ y con fenotipo *arg*⁻, y encontramos una relación 6.8:1, lo cual es cercano a la relación teórica 7:1 si se trataran de dos genes (Tabla II). Con estos datos sugerimos que son dos genes los responsables de la diferencia en la regulación de la síntesis de *Cytb* entre las cepas D273-10b y las cepas BY4742 y W303.

Tabla II. Resultado de segregación del fenotipo *arg*⁺ de la cepa diploide D273/W303 (*COB(1-385)::pARG8^m*)

Fenotipo analizado	Segregación	Frecuencia	Esporas <i>arg</i> ⁺	Esporas <i>arg</i> ⁻
<i>arg</i> ⁺	2:2	2	4	4
	3:1	30	90	30
	4:0	34	136	0
Total			230	34
Segregación			6.8	1

La proteína Smt1 no parece ser responsable de la regulación diferencial de la síntesis de *Cytb*

Para poder identificar a los factores que están involucrados en la diferencia observada en la regulación de la síntesis de *Cytb*, analizamos por alineamiento la secuencia de todos los factores conocidos que tienen una función en este proceso; *CBP1*, *CBS1*, *CBS2*, *CBP3*, *CBP6* y *CBP4*. Estas secuencias se obtuvieron de la base de datos *Saccharomyces* genome database: yeastgenome.org. La intención fue encontrar polimorfismos en estos genes en regiones codificantes y UTRs que fueran iguales en W303 y BY4742 (que regulan la síntesis de *Cytb*) pero diferentes en la D273-10b (que no regula síntesis de *Cytb*). Los alineamientos realizados no arrojaron diferencias en término de sustitución de aminoácidos entre la cepa D273-10b con respecto a las cepas W303 y BY4742. El único gen candidato en el que encontramos las diferencias esperadas fue *SMT1*. Recientemente se determinó que Smt1 es un represor traduccional del mRNA bicistrónico de *ATP6/ATP8* y curiosamente Smt1 también

interactúa físicamente con el mRNA de *COB* (34). Encontramos tres polimorfismos en la secuencia de la cepa D273-10b no presentes en la BY4742 y W303. Dichos polimorfismos fueron A>G, T>C y A> G en las posiciones 400, 644 y 668 dentro del *orf* respectivamente. Estos polimorfismos cambian los aminoácidos metionina 134 por valina, fenilalanina 206 por serina e histidina 223 por arginina. Decidimos estudiar si este gen estaba involucrado en las diferencias que observamos sobre la síntesis de *Cytb* entre las cepas D273-10b y la BY4742. Inicialmente, estudiamos si *Smt1* actuaba como represor traduccional del mRNA de *COB* como lo reportado para el mRNA de *ATP6/ATP8* (34). Para ello generamos las mutantes $\Delta cbp6$, $\Delta smt1$ y $\Delta cbp6/\Delta smt1$ en la cepa BY4742. Si fuera un represor traduccional esperaríamos que la doble mutante $\Delta cbp6/\Delta smt1$ recuperara la síntesis de *Cytb*. Mediante ensayos de traducción mitocondrial *in vivo*, observamos que la mutante $\Delta smt1$ no afectó la síntesis de *Cytb* (123% con respecto a la WT), y la doble mutante $\Delta cbp6/\Delta smt1$ no recuperó la síntesis de *Cytb* (6% con respecto a la WT) (Figura 24A). Este resultado apunta a que *Smt1* no reprime la síntesis de *Cytb* en la ausencia de *Cbp6* como lo hace con el mRNA de *ATP6/ATP8* (34). Para corroborar estos datos, realizamos las mismas mutantes pero con la construcción mitocondrial *COB(1-385)::pARG8^m*, y observamos que de igual forma la mutante $\Delta smt1$ no afectó el crecimiento en medio sin arginina y la doble mutante $\Delta cbp6/\Delta smt1$ no recuperó el crecimiento en medio sin arginina (Figura 24B).

Como no observamos ningún efecto sobre la síntesis de *Cytb* en la ausencia de *Smt1* en la cepa BY4742, decidimos evaluar el efecto del gen *SMT1* de la cepa D273-10b en la BY4742. Si el fenotipo de la cepa D273-10B es dominante, al expresar el gen *SMT1* de la cepa D273-10B en la cepa BY4742 la síntesis de *Cytb* no se regulará. Por ello, clonamos el gen *SMT1* con el promotor endógeno de la cepa D273-10b en el plásmido centromérico pRS416 y en el plásmido de alto número de copias YEp352 (2 μ). Los plásmidos se introdujeron a las cepas mutantes $\Delta smt1$, $\Delta cbp6$ y $\Delta cbp6/\Delta smt1$. Por ensayos de traducción mitocondrial observamos que la síntesis de *Cytb* no se recuperó en la mutante $\Delta cbp6/\Delta smt1$ complementada con *SMT1*^{D273-10B} ni en bajo o alto número de copias (<20% con respecto a la WT) (Figura 24C).

Por lo tanto, a pesar de que Smt1 interactúa físicamente con el mRNA de *COB*, ésta proteína no está involucrada en la regulación de la síntesis de *Cytb*.

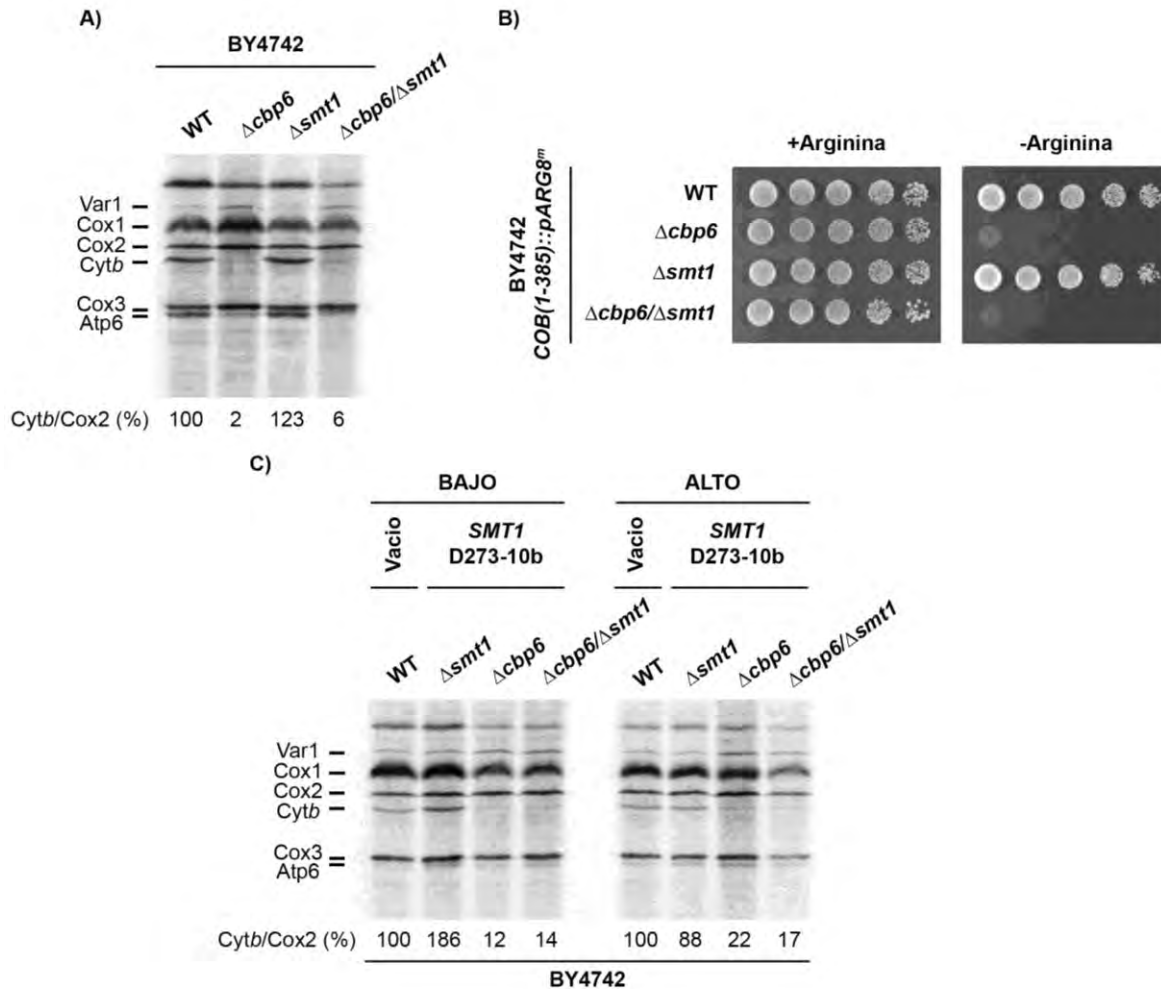


Figura 24. Smt1 no está involucrada en la regulación diferencial de la síntesis de *Cytb*. A) Análisis por autoradiografía del ensayo de traducción mitocondrial *in vivo*. Células completas de la cepa BY4742 con las mutaciones indicadas, se incubaron con ^{35}S -metionina en presencia de cicloheximida. Se resolvieron por SDS-PAGE (16%) y se revelaron por autoradiografía. B) Bajo el contexto $COB(1-385)::pARG8^m$ se analizó el fenotipo de crecimiento en medio sin arginina de las mutantes indicadas. Crecimiento en dilución seriada (10X) a 30°C por 3 días. C) Ensayo de traducción mitocondrial *in vivo*. Células completas de la cepa BY4742 transformadas con vectores de expresión de *SMT1* de la cepa D273-10b en ALTO y BAJO número de copias. Se resolvieron por SDS-PAGE (16%) y se revelaron por autoradiografía. En esta figura se puede concluir que la proteína Smt1 no está involucrada en la regulación de la síntesis de *Cytb* mediada por Cbp3 y Cbp6.

DISCUSIÓN

La biogénesis del complejo bc_1 es un proceso que ocurre en diferentes etapas y que involucra el ensamblaje de las distintas subunidades que lo conforman. Durante este proceso se coordinan la síntesis y ensamblaje de las 9 subunidades de origen nuclear y *Cytb*, la única subunidad de origen mitocondrial.

Las diferentes etapas de ensamblaje del complejo bc_1 se conocen, pero poco se sabe sobre las chaperonas que asisten cada paso y sus mecanismos de acción (1). Hasta el momento se ha determinado que las etapas críticas en el ensamblaje del complejo bc_1 son; la etapa temprana cuando *Cytb*, *Qcr7* y *Qcr8* forman el primer subcomplejo, y la etapa tardía cuando *Qcr9* y la proteína Rieske (*Rip1*) se ensamblan formando el complejo bc_1 completo y funcional. En la etapa temprana *Cytb* se sintetiza, adquiere dos hemo tipo *b* y se ensambla en la membrana interna mitocondrial. Durante este proceso los activadores traduccionales y las chaperonas son necesarias para acoplar la traducción del RNA mensajero de *COB* con el ensamblaje de *Cytb* (6,25,26). En estudios previos se postuló que *Cbp3* y *Cbp6* son las proteínas involucradas en activar la síntesis de *Cytb* y acoplar este proceso a su ensamblaje (7). Sin embargo, en el presente estudio encontramos que *Cbp3* y *Cbp6* tienen una función diferencial según la cepa de laboratorio que se utilice. En la cepa BY4742 *Cbp3* y *Cbp6* funcionan como activadores traduccionales del mRNA de *COB*, pero en la cepa D273-10b esta función no está conservada, por lo que solo actúan como chaperonas del ensamblaje de *Cytb*. Esta observación nos permitió estudiar más a fondo los mecanismos de regulación traduccional del mRNA de *COB* por parte de *Cbp3* y *Cbp6* en las cepas en que sí poseen esta función. Debido a que en la cepa D273-10b la síntesis de *Cytb* no se regula por *Cbp3* y *Cbp6*, y además se acumulan niveles importantes de la proteína *Cytb*, fue que pudimos realizar una mayor caracterización sobre las posibles funciones de *Cbp3* y *Cbp6* como chaperonas en la biogénesis del complejo bc_1 .

Sobre la función de Cbp3-Cbp6 en la activación traduccional del RNA mensajero de COB

Reportes previos demostraron que Cbp3 y Cbp6 cooperativamente activan la traducción del mRNA de *COB* actuando en el extremo *5'UTR*, pero además, regulan la traducción dependiendo del estado de ensamblaje de *Cytb*. Esto es, en ausencia de algunas subunidades de complejo III, la síntesis de *Cytb* disminuye, y la intensidad de este efecto depende de la subunidad que se elimine (6,7). En este estudio observamos que la función de activadores y reguladores de la síntesis de *Cytb* es diferencial entre distintas cepas de laboratorio. En la cepa BY4742, Cbp3 y Cbp6 regulan la síntesis de *Cytb* como se había reportado en la cepa W303 (6), mientras que en la D273-10b, no. No nos sorprendió que la cepa BY4742 se comportara de manera similar a la cepa W303 porque la cepa W303 comparte un 85.4% de identidad a nivel de genoma con la cepa S288C, y la cepa BY4742 se deriva de la cepa S288C (78). Contrariamente, la cepa D273-10b proviene de un linaje distinto a la BY4742 (79).

Aunque en la cepa D273-10b observamos que Cbp3 y Cbp6 no activan la síntesis de *Cytb*, esto no parece ser debido a una falta de regulación general del inicio de la traducción, ya que la mutación $\Delta cbs1$ en ambas cepas afectó en su totalidad la síntesis de *Cytb*. Cbs1 es una proteína integral de la membrana interna mitocondrial, y junto con la proteína periférica Cbs2 activan la traducción del mRNA de *COB* actuando en el extremo *5'UTR* (25). Ambas proteínas interactúan con el mitoribosoma, por lo que se propone que asisten al mitoribosoma para identificar el codón de inicio de la traducción del mRNA de *COB* (88,89). Debido a estas observaciones pensamos que la activación traduccional del mRNA de *COB* depende de al menos dos distintos mecanismos, uno en el que Cbs1 y Cbs2 activan la traducción, y otro en el que Cbp3 y Cbp6 acoplan la síntesis y el ensamblaje de *Cytb*. Es importante resaltar que hasta el momento no se conoce cómo se modula la traducción de *COB* con el ensamblaje de *Cytb* ya que no se ha encontrado una interacción física entre Cbp3 y Cbp6 con Cbs1 o Cbs2 (7).

En este trabajo demostramos que Cbp3 interacciona físicamente con el mRNA de *COB*. Llama la atención que dicha interacción está conservada entre las cepas BY4742 y D273-10b, indicando que la unión de Cbp3 con el mRNA *COB* es independiente a la función de regulación de la traducción. Aunque también es probable que Cbp3 y Cbp6 modifiquen al posible nuevo factor que activa la traducción. En este caso, la interacción con el mRNA de *COB* ocurre en la cepa D273-10b, pero el factor traduccional es insensible a la modulación por Cbp3 y Cbp6. Es importante señalar que aún desconocemos si la interacción de Cbp3 con el mRNA es directa o indirecta. Actualmente no existe una estructura tridimensional reportada para estas proteínas. Sin embargo, por modelamientos *in silico* de la estructura de Cbp3 y Cbp6 no hemos identificado dominios de unión a RNA (I-TASSER prediction software), por lo que es posible que otra proteína permita la asociación de Cbp3 y Cbp6 con el mRNA de *COB*. Existen dos sitios en los que Cbp3 y Cbp6 podrían actuar sobre el mRNA de *COB*. Uno es el extremo *5'UTR* y otro dentro del *orf* de *COB*. Para identificar la región de interacción de Cbp3 y Cbp6 utilizamos al gen reportero de la traducción *ARG8^m* en dos distintas construcciones: una en la que se reemplazó por completo el *orf* de *COB* con *ARG8^m* (*cobΔ::ARG8^m*) (Figura 9A) y otra en donde se fusionó *ARG8^m* al final del *orf* de *COB* (*COB(1-385)::pARG8^m*) (Figura 8A). Encontramos que Cbp3 y Cbp6 tienen un sitio de acción en los extremos *UTR* del mRNA de *COB*. Sin embargo, observamos que la región *orf* de *COB* contiene señales negativas sobre la traducción que dependen de la presencia Cbp3 y Cbp6. Posiblemente, Cbp3 y Cbp6 actúen en el extremo *5'UTR* del mRNA de *COB* y esto rompa estructuras secundarias en el *orf* de *COB* para permitir una activación traduccional eficiente.

Aunque Cbs1 y Cbs2 no interaccionan con Cbp3 y Cbp6, es posible que Cbs1/Cbs2 actúen primero en la activación traduccional y permitan que Cbp3 y Cbp6 ejerzan su función traduccional. Esto puede deberse a cambios en la estructura secundaria del mRNA de *COB* inducidos por Cbs1/Cbs2 que permiten que Cbp3 y Cbp6 se unan a su secuencia blanco en el RNA. Esto se observó para el RNA mensajero de *COX1*: el activador traduccional Pet309 se une al mRNA de *COX1* junto con la helicasa de RNA, Mss116. Esta asociación permite que el mRNA de *COX1* adopte una estructura

secundaria distinta, permitiendo que el activador traduccional Mss51 module la traducción de *COX1* con el ensamblaje de la subunidad Cox1 de la CcO (37,90). Pet309 se asocia al mitoribosoma, por lo que es probable que el mitoribosoma se una al mRNA de *COX1* antes que Mss51. Mss51 posiblemente asiste al mitoribosoma a que localice su codón AUG de inicio. Esta observación se respalda con la mutante $\Delta mss51$, en donde se descubrió que se sintetiza un péptido pequeño (Mp15) que es traducido del mRNA de *COX1* (91). Basados en lo que ocurre con *COX1*, es posible que Cbs1 y Cbs2 actúen en el mRNA de *COB* y permitan la asociación del mitoribosoma con el mensajero. Cbp3 y Cbp6 junto con los dos probables factores traduccionales asisten al mitoribosoma para localizar su AUG de inicio.

El análisis genético de diploides con genoma W303/D273-10B nos permitió proponer que existen dos genes nucleares que provocan la diferencia en la regulación de la síntesis de *Cytb* entre la cepa BY4742 y D273-10b. Se espera que estos genes tengan polimorfismos iguales entre las cepas BY4742 y W303 pero diferentes en la cepa D273-10b. Observamos también que el fenotipo de la cepa D273-10b domina sobre el fenotipo de la cepa BY4742. Esto sugiere que se trata de factores que activan la traducción y que en la cepa BY4742 dependen de Cbp3 y Cbp6, mientras que en la cepa D273-10b su actividad ya no depende de Cbp3 y Cbp6. Con la finalidad de identificar a los genes "X" y "Y" realizamos alineamientos de la secuencia de aminoácidos de proteínas que sabemos participan en la biogénesis de *Cytb* como Cbp1, Cbs1, Cbs2, Cbp3, Cbp4 y Cbp6. Sin embargo no encontramos ninguna diferencia en la secuencia de dichos genes entre la cepa D273-10b y las cepas BY4742 y W303 (datos obtenidos de la base de datos *Saccharomyces* genome database (SGD) (92), por lo que consideramos que el factor desconocido no es ninguna de las proteínas hasta ahora caracterizadas con función en la expresión de *COB*. Un gen candidato era *SMT1*, el cual contiene tres polimorfismos que cambiaron los siguientes aminoácidos: metionina 134 por valina, fenilalanina 206 por serina e histidina 223 por arginina en las cepas BY4742 y W303 respecto a la cepa D273-10b (datos obtenidos por la base de datos del SGD y confirmados por secuenciación). *Smt1* es un represor traduccional del mRNA de *ATP6-ATP8*, el cual inhibe la síntesis de Atp6 y Atp8 cuando existen defectos

en el ensamblaje de la ATP sintasa (34). Aunque Smt1 se une físicamente al mRNA de *COB*, en nuestro trabajo no encontramos que estuviera involucrado en la síntesis de *Cytb*. Aún no encontramos una función de Smt1 sobre el mRNA de *COB*, pero datos no publicados de nuestro laboratorio han revelado que cuando la síntesis de *Cytb* se abate, la síntesis de *Atp6* y *Atp8* disminuyen (Tesis de maestría Daniel Flores-Mireles), por lo que será interesante evaluar si Smt1 está involucrado en esta función. Otro candidato era el gen *HAP1*. Hap1 es un activador transcripcional de genes mitocondriales en el núcleo, y en la cepa BY4742 éste gen contiene una mutación que lo hace no funcional y que provoca que la actividad respiratoria de esta cepa sea menor (93). Sin embargo, descartamos que *HAP1* tenga una función relacionada a Cbp3 y Cbp6 debido a que en la cepa W303, donde la síntesis *Cytb* también se regula como en la BY4742, *HAP1* tiene una secuencia idéntica a la de la cepa D273-10b. Desafortunadamente, hasta el momento no conocemos la identidad de los dos nuevos genes que regulan la traducción de *COB*, por lo que será necesario abordar futuras estrategias experimentales para descubrir su naturaleza.

Otra diferencia que observamos es que la síntesis de *Cytb* no se regula en la ausencia de la subunidad Qcr7. Qcr7 junto con Qcr8 interactúan de manera temprana con *Cytb* (2), formando el primer subcomplejo de ensamblaje. Nuestros datos y reportes previos demuestran que en la mutante $\Delta qcr7$ la síntesis de *Cytb* disminuye dramáticamente (7,94). Este efecto se explica porque Cbp3 y Cbp6 se mantienen “secuestradas” interactuando con *Cytb*, por lo que el efecto es similar al de las mutantes $\Delta cbp3$ o $\Delta cbp6$ (7). Sin embargo el efecto sobre la síntesis de *Cytb* es diferencial según la subunidad del complejo *bc₁*, que se analice, ya que en la mutante $\Delta qcr8$ observamos una disminución de la síntesis de *Cytb*, pero no tan dramática como en la mutante $\Delta qcr7$ (Figura 8). En la cepa D273-10b observamos que en la mutante $\Delta qcr7$ de igual manera no reprime la síntesis de *Cytb*. Consideramos que esto se debe a que los factores “X” y “Y” activan la traducción del mRNA de *COB* sin necesitar de la asistencia de Cbp3 y Cbp6. Sin embargo será necesario evaluar que en la mutante $\Delta qcr7$ de la cepa D273-10b, Cbp3 y Cbp6 también se encuentren asociadas físicamente con *Cytb*.

Con los datos que hemos obtenido estudiando a la cepa BY4742 proponemos modificaciones en el modelo vigente de la síntesis y regulación de la síntesis de *Cytb* (8): 1) Cbs1 y Cbs2 activan la traducción del mRNA de *COB* actuando en el extremo *5'UTR* de *COB*. Posiblemente interactúan con estructuras secundarias en el mRNA de *COB* que permiten que el mitorribosoma interactúe en el sitio AUG de inicio de la traducción. Este mecanismo se ha propuesto para otros activadores traduccionales de la mitocondria (20, 37, 90). 2) Cbp3 (y posiblemente Cbp6) se une al mRNA de *COB*, probablemente en el extremo *5'UTR*, ya que es el sitio de regulación traduccional. Dado que Cbp3 y Cbp6 también se requieren para expresar eficientemente el *orf* de *COB*, proponemos que estas chaperonas permitirían que en el *orf* de *COB* ocurran cambios conformacionales que promuevan una interacción eficiente entre el AUG de inicio de la traducción y el mitorribosoma. Esta función se ha propuesto para Mss51, quien parece actuar sobre regiones codificantes de *COX1* (91); 3) Cbp3 y Cbp6 por sí solos no son capaces de modular la traducción ya que se necesitan activar a los factores “X” y “Y” que finalmente activan la traducción de *COB*. Es posible que la función sobre el mRNA de *COB* descrita en el punto 3) la lleven a cabo directamente “X” y “Y”, no Cbp3 y Cbp6, en cuyo caso estas chaperonas podrían inducir cambios conformacionales en “X” y “Y” que conduzcan a su activación. 4) En la cepa D273-10b estos factores “X” y “Y” contienen polimorfismos que los hacen constitutivamente activos sin necesitar de la presencia de Cbp3 y Cbp6. 5) Smt1 también se une al mRNA de *COB* con una función aún desconocida sobre el mRNA de *COB* (Figura 25). Una vez que *Cytb* es completamente sintetizado, Cbp3 y Cbp6 se asocian físicamente con *Cytb* y se mantienen “secuestradas” hasta que *Cytb* se hemila, y Qcr7 y Qcr8 se asocian a *Cytb* formando el primer subcomplejo de ensamblaje (7).

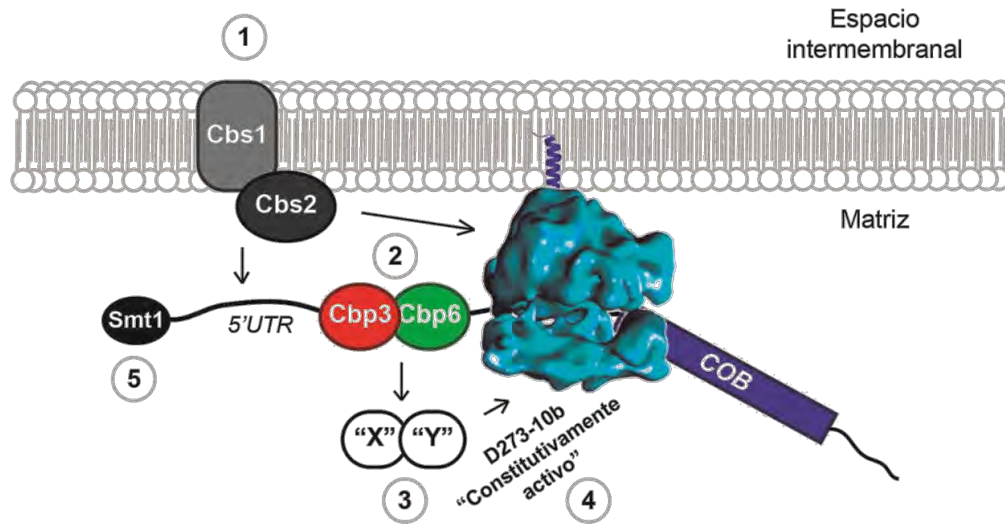


Figura 25. Modelo propuesto para la activación de la traducción del mRNA de *COB*. (1) Cbs1 y Cbs2 actúan en el extremo 5'UTR del mRNA de *COB* (AZUL OBSCURO) y con el mitorribosoma (AZUL CLARO). (2) Cbp3 y Cbp6 se unen al mRNA de *COB*. (3) Cbp3 y Cbp6 modulan la actividad de los activadores "X" y "Y" los cuales activan la síntesis de *Cytb*. (4) En la cepa D273-10b los factores "X" y "Y" se encuentran constitutivamente activos. (5) Smt1 se une al mRNA de *COB* con una función aún desconocida.

Sobre la función de Cbp3 y Cbp6 como chaperonas de Cytb

Cbp3 y Cbp6 no son necesarias en la regulación y activación de la síntesis de Cytb en la cepa D273-10b, pero su función como chaperonas aún es importante. Gracias a esta diferencia, pudimos caracterizar la función de chaperonas de Cbp3 y Cbp6 ya que en la cepa D273-10b detectamos cantidades importantes de la proteína Cytb aún en ausencia de estas chaperonas. La función de chaperonas parece estar conservada entre distintas especies. En *Schizosaccharomyces pombe* se demostró que los homólogos de Cbp3 y Cbp6 no están involucrados en la activación traduccional del mRNA de COB, pero funcionan como chaperonas en la biogénesis del complejo bc₁ (95). En humano existen UQCC1 y UQCC2, ortólogos de Cbp3 y Cbp6, respectivamente, que solo funcionan como factores de ensamblaje del complejo bc₁ (96). Pero, ¿en qué etapa del ensamblaje de Cytb participan Cbp3 y Cbp6? Basados en reportes anteriores consideramos que su función es en etapas tempranas del ensamblaje.

En un estudio previo, se determinó que Cbp3 y Cbp6 interactúan físicamente con la proteína ribosomal Mrpl4 (uL29), la cual se localiza en el túnel de salida del mitorribosoma. Por lo que es posible que Cbp3 y Cbp6 interactúen con Cytb mientras transita por el túnel de salida (7). Esta interacción parece estar conservada porque demostramos que en las cepas BY4742 y D273-10b, Cbp3 se asocia al mitorribosoma. Existen diversos ejemplos de chaperonas que interactúan con el péptido nascente en el túnel de salida y las funciones son: proteger de proteasas endógenas, modular la velocidad de síntesis del péptido y promover un correcto plegamiento de la proteína sintetizada. Estas funciones están conservadas en todos los dominios de la vida. En bacterias el factor "Trigger" se localiza en el túnel de salida, modula la velocidad de síntesis de la proteína e interactúa con la proteína recién sintetizada para evitar su degradación por proteasas (97). En eucariontes, como levadura, dos componentes están involucrados en estos procesos, el Ssb/Ssz/Zuotin y el componente NAC. Ssb/Ssz/Zuotin como el factor Trigger en bacterias, previene la degradación del péptido nascente y promueve un correcto plegamiento de la proteína (98). El componente NAC

está formado por las subunidades α y β , se asocia al túnel de salida del ribosoma citoplasmático, y su función radica en el transporte de proteínas hacia la mitocondria mediado por Sam37 (99,100). En mitocondrias de levadura la insertasa de membrana, Oxa1, dimeriza y su dominio carboxilo terminal interactúa con el túnel de salida del mitoribosoma (23,101,102). En este proceso las chaperonas Mba1 y Mdm38 también interactúan con Oxa1 y con el mitoribosoma, y todo este proceso es importante para que la inserción de las proteínas esté acoplada con la traducción del mRNA (22). Cbp3 y Cbp6 posiblemente tienen funciones similares a las proteínas que interactúan en el túnel de salida ribosomal, como modular la velocidad de síntesis de *Cytb*, así como promover un correcto plegamiento de *Cytb*. Descartamos que su función sea evitar la degradación de *Cytb* por proteasas, ya que en las mutantes $\Delta cbp3$ y $\Delta cbp6$ de la cepa D273-10b, *Cytb* se sintetiza normalmente y es estable. Cbp3 y Cbp6 podrían interactuar con el péptido nascente mientras sale por el túnel de salida, o hasta que *Cytb* se sintetice completamente. Consideramos que Cbp3 y Cbp6 interactúan con *Cytb* completa debido a que no se ha detectado interacción de Cbp3 y Cbp6 con péptidos pequeños (7) (Tesis de maestría Daniel Flores-Mireles).

Hildenbeutel y colaboradores en 2014 reportaron que Cbp3 y Cbp6 coordinan la hemilación del apocitocromo *b*. Se demostró que Cbp3 y Cbp6 interactúan con el intermediario *Cytb* libre de hemo *b* y esta interacción se mantiene hasta la adquisición del primer hemo *b* (b_L). Por lo tanto, se propuso que Cbp3 y Cbp6 modulan la traducción de *COB* con el ensamblaje de los grupos hemo *b* de *Cytb* (8). En nuestro estudio evaluamos si en la cepa D273-10b, donde no hay regulación de la síntesis de *Cytb*, Cbp3 y Cbp6 son necesarias para la hemilación de *Cytb*. Por HPLC y espectrofotometría observamos que en la ausencia de Cbp3 y Cbp6, *Cytb* es incapaz de adquirir sus grupos hemo *b*, por lo que es probable que la función principal de Cbp3 y Cbp6 es promover la hemilación de *Cytb*. Los mecanismos exactos de hemilación de *Cytb* aún son desconocidos, los grupos hemo *b* son sintetizados en la matriz mitocondrial por la ferroquelatasa que se localiza en la membrana interna mitocondrial. Cbp3 y Cbp6 están asociadas de manera periférica a la membrana interna, pero hasta el momento no se ha detectado una interacción física o genética con la ferroquelatasa

(SGD). Los grupos hemo *b* pueden ensamblarse desde la matriz o por la membrana interna mitocondrial (103). Basados en reportes previos y en nuestros datos postulamos 3 posibles mecanismos en los que *Cytb* adquiere sus grupos hemo *b* (Figura 26):

1. Los grupos hemo *b* pueden incorporarse paralelamente al ensamblaje de *Cytb*. Esto podría ser mediado por la interacción de Cbp3 y Cbp6 con el péptido naciente mientras sale por el túnel de salida. Sin embargo, si este mecanismo ocurriera existiría un intermediario de Cbp3 y Cbp6 con péptidos pequeños de *Cytb* y esto hasta el momento no se ha comprobado. Además de que se detectó un intermediario de la proteína completamente sintetizada de apocitocromo *b* con Cbp3 y Cbp6 (8).
2. Cbp3 y Cbp6 podrían adquirir los grupos hemo *b* y pasarlos a *Cytb*, aunque no se predicen dominios de unión a hemo *b* en Cbp3 y Cbp6 debido a que no contiene sitios de unión a grupos hemo como dominios CPX o histidinas en dos alfa-hélices (I-TASSER prediction software).
3. La interacción de Cbp3 y Cbp6 con *Cytb* recién sintetizada permite que *Cytb* se mantenga en una conformación “accesible” para la adquisición de los grupos hemo *b*. Además, cuando *Cytb* interactúa con los grupos hemo *b* posiblemente éste cambie de conformación y provoque la pérdida de afinidad en la unión con Cbp3 y Cbp6 (8). Este mecanismo es el que posiblemente ocurra, debido a que los grupos hemo *b* pueden ser ensamblados a *Cytb* directamente en la membrana interna mitocondrial.

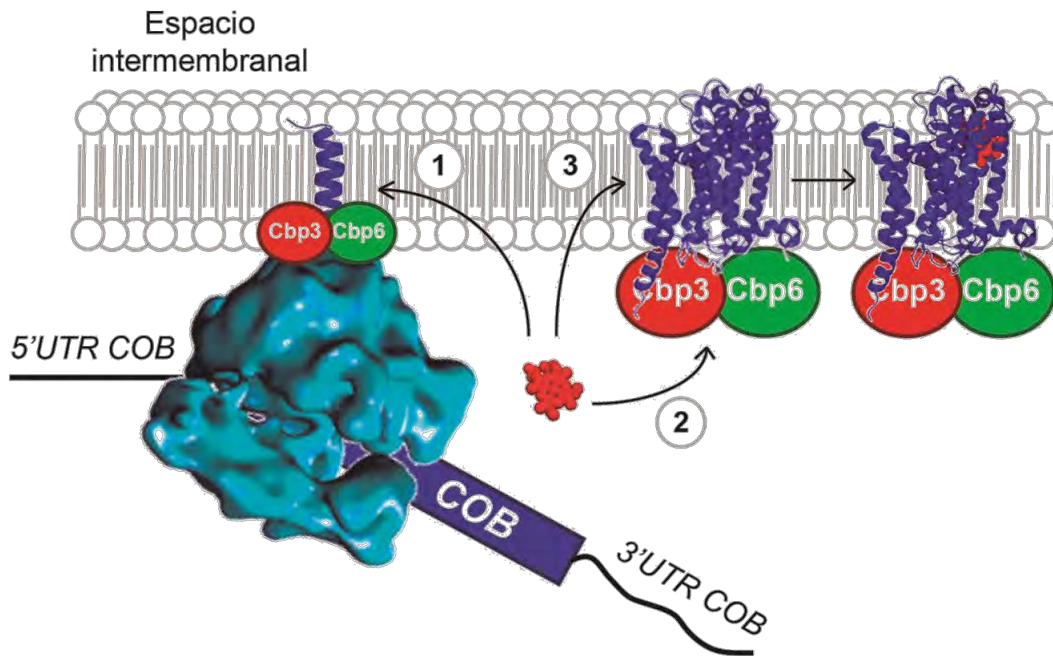


Figura 26. Posibles mecanismos de hemilación de *Cytb* por Cbp3 y Cbp6. Proponemos 3 diferentes mecanismos por los que *Cytb* adquiere sus grupos hemo *b* (ROJO). (1) La hemilación de *Cytb* ocurre paralelamente a su ensamblaje a la membrana interna. (2) El hemo *b* se ensambla a través de Cbp3 y Cbp6 a *Cytb*. (3) La interacción de *Cytb* con Cbp3 y Cbp6 permite que se encuentre en una conformación “accesible” para que pueda hemilarse.

Encontramos que *Cytb* es relativamente estable aunque no se hemile. Sin embargo, dicha hemilación parece ser un paso importante para la estabilidad del complejo bc_1 , ya que encontramos que Cbp3 y Cbp6 se necesitan para que el complejo bc_1 solubilizado con dodecil maltósido sea estable. (Figura 16). Esto indica que la función de Cbp3 y Cbp6 radica solo en la hemilación de *Cytb* y no en pasos posteriores del ensamblaje del complejo bc_1 , debido a que no se ha encontrado interacción de Cbp3 y Cbp6 con subcomplejos de la fase intermedia o tardía (7). Nuestros datos indicaron que *Cytb* no hemilado es estable y se asocia a la CcO en etapas tempranas, llegando hasta la formación de supercomplejos no funcionales (Figura 14). En las mitocondrias de levadura, dos diferentes supercomplejos respiratorios están presentes; un dímero del

complejo bc_1 con un dímero de la CcO (III₂/IV₂) (~1000kDa), y un dímero del complejo bc_1 con un monómero de la CcO (III₂/IV) (~750kDa) (43,44). La formación de supercomplejos parece ocurrir en etapas tempranas del ensamblaje de los dos complejos respiratorios (104,105). El ensamblaje de la CcO está mediado por tres distintos módulos. Cada uno posee una de las tres subunidades que se codifican dentro de la mitocondria (módulo de Cox1, módulo de Cox2 y módulo de Cox3) (104,106), y parece que el módulo de Cox3 es importante para el ensamblaje temprano de los supercomplejos (104). En el caso del complejo bc_1 , se identificó que la subunidad Cox2 está presente en el subcomplejo de Cytb-Qcr7-Qcr8 en etapas tempranas del ensamblaje del complejo bc_1 (64). Estos datos junto con nuestros resultados indican que la formación de supercomplejos ocurre en etapas tempranas del ensamblaje del complejo bc_1 . Por lo que el ensamblaje de los supercomplejos ocurre mientras se co-ensamblan el complejo bc_1 y la CcO. Será interesante poder identificar cómo se lleva a cabo este proceso y qué chaperonas están involucradas en mediar el ensamblaje de dos distintos complejos respiratorios para la formación de supercomplejos. Con datos obtenidos en nuestro laboratorio, pensamos que el ensamblaje del complejo bc_1 depende del ensamblaje de la CcO. En el trabajo doctoral de Rodolfo García Villegas se alteró la regulación de la síntesis de la subunidad Cox1, y cuando se eliminó la subunidad estructural Cox2 se observó la formación supercomplejos no funcionales. Pero de manera interesante, se descubrió que Rip1 era incapaz de ensamblarse, sugiriendo que el ensamblaje del complejo bc_1 depende de señales del ensamblaje de la CcO (105). Será de interés descubrir los mecanismos de modulación del ensamblaje del complejo bc_1 en etapas tardías con la CcO.

Proponemos un modelo en que la función primordial de Cbp3 y Cbp6 es en la hemilación de Cytb, mientras que sólo algunas cepas de levadura poseen la función en traducción. La adquisición de los grupos hemo *b* es necesaria para que se forme un complejo bc_1 estable además de funcional. En etapas tempranas de ensamblaje del complejo bc_1 , la CcO se co-ensambla para formar supercomplejos respiratorios. Nuestros datos demuestran que no es necesaria la hemilación de Cytb (o la presencia de Cbp3 y Cbp6) para que este proceso ocurra. El ensamblaje de Rip1 depende del

ensamblaje de la CcO ya que si la CcO no se ensambla correctamente, Rip1 no se asocia al complejo bc_1 (Figura 27).

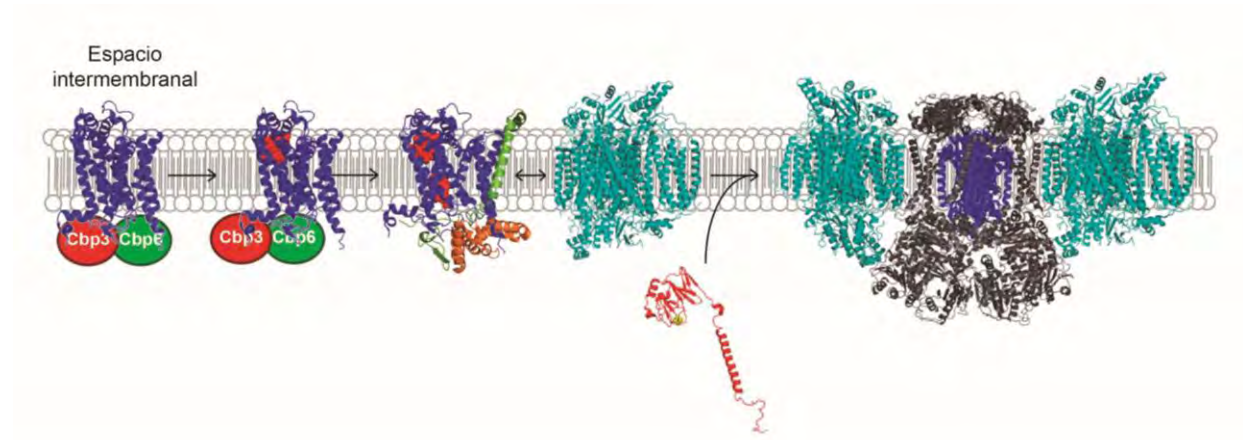


Figura 27. Modelo de formación de supercomplejos en etapas tempranas. Cbp3 y Cbp6 modulan la hemilación de Cytb (AZUL). La CcO (CIAN) se co-ensambla con el complejo bc_1 aunque Cytb no se hemile. La adición de Rip1 (ROJO) depende del ensamblaje de la CcO para la formación de supercomplejos funcionales.

Los resultados de nuestro trabajo demostraron que Cbp3 y Cbp6 tienen dos funciones sobre la biogénesis de Cytb: 1) Modular a los factores “X” y “Y” para que se active la traducción del mRNA de *COB*; y 2) Como chaperonas de la hemilación de Cytb. Por reportes existentes sobre los ortólogos de Cbp3 y Cbp6 en humano y en *S. pombe*, en donde solo funcionan como chaperonas del ensamblaje de Cytb, consideramos que la función de regular la traducción del mRNA de *COB* se adquirió en un evento temprano en *S. cerevisiae*. Será necesario evaluar cuál es el sentido fisiológico de regular la síntesis de Cytb con su estado de ensamblaje. Es decir, cuáles son las consecuencias fisiológicas en la cepa D273-10b donde no existe regulación de la síntesis de Cytb, con respecto a las cepas BY4742 o W303 donde si la hay.

CONCLUSIONES

- Existe una función diferencial de Cbp3 y Cbp6 como activadores de la síntesis de *Cytb*: Observamos que en la cepa D273-10b, Cbp3 y Cbp6 no son necesarias para que *Cytb* se sintetice, mientras que en la cepa BY4742 si son necesarias para sintetizar a *Cytb*.
- Cbp3 interacciona físicamente con el mRNA de *COB*: La unión de Cbp3 al mRNA de *COB* está conservada entre las cepas BY4742 y D273-10B. Ésta interacción puede ser directa o mediada por otras proteínas.
- Cbp3 y Cbp6 actúan en el extremo 5'UTR del mRNA de *COB*, y existen señales de regulación negativa en el *orf* del mensajero de *COB*.
- Existen otros dos probables factores ("X" y "Y") que activan la síntesis de *Cytb*: La función de estos factores es modulada por Cbp3 y Cbp6. Proponemos que en la cepa D273-10b estos factores contienen polimorfismos que los hacen constitutivamente activos.
- Cbp3 interactúa con el mitorribosoma y ésta interacción es independiente de su función en la regulación de la síntesis de *Cytb*.
- Cbp3 y Cbp6 son necesarias para que *Cytb* adquiriera sus grupos hemo *b*. Proponemos que esta es la función esencial y conservada de Cbp3 y Cbp6, mientras que la función en traducción está sólo presente en algunas cepas de levadura.
- *Cytb* puede formar supercomplejos con la citocromo *c* oxidasa aunque no se hemile. Tampoco requiere de Cbp3 y Cbp6 para la formación de supercomplejos. Sin embargo, estos supercomplejos no son funcionales y probablemente se encuentren incompletos ya que la subunidad Qcr10 no está presente.
- Cbp3 y Cbp6 son necesarias para dar estabilidad al complejo *bc₁*. En ausencia de Cbp3 y Cbp6 se forma un complejo *bc₁* que no posee actividad y que es inestable en presencia de dodecil-maltósido, por lo que la CcO solo le confiere algo de estabilidad.

PERSPECTIVAS

1. Descubrir la identidad de los factores “X” y “Y”. Esto se puede realizar por diversas estrategias experimentales:
 - Si asumimos que las proteínas “X” y “Y” interactúan con Cbp3 y Cbp6 y que esta interacción es distinta entre las cepas BY4742 y D273-10B, podríamos inmunoprecipitar a Cbp3 y por espectrometría de masas en las dos distintas cepas identificaríamos qué proteínas se une a Cbp3 y Cbp6 en la cepa BY4742 y no en la D273-10b.
 - Sabemos que el fenotipo sobre la regulación de *Cytb* de la cepa D273-10b domina sobre la BY4742. Adicionalmente, sabemos que al menos la presencia de un factor de la cepa D273-10b es necesario para romper la regulación de *Cytb* en la cepa BY4742. Por ello, se puede generar una biblioteca genómica de la cepa D273-10b y expresarla en BY4742 e identificar qué gen provoca que la síntesis de *Cytb* ya no se regule.
 - Buscar y caracterizar supresoras de la síntesis de *Cytb* en la cepa BY4742 $\Delta cbp3$ o $\Delta cbp6$. Esto nos permitiría identificar los factores responsables de regular la traducción de COB.
2. Estudiar la región de interacción de Cbp3 y Cbp6 con *Cytb*. *Cytb* es una proteína altamente hidrofóbica, por lo que pocas regiones solubles están expuestas hacia la matriz mitocondrial. Consideramos que el extremo carboxilo terminal de *Cytb*, que interactúa con la subunidad Qcr7, es una región importante para la regulación de la síntesis de *Cytb*. Adicionalmente será necesario buscar si otras regiones expuestas a la matriz mitocondrial son importantes para interacción de Cbp3 y Cbp6 con *Cytb*.
3. Estudiar el mecanismo de hemilación de *Cytb*.
 - Si identificamos la región de unión de Cbp3 y Cbp6 con *Cytb*, tal región se podría mutar y por lo tanto Cbp3 y Cbp6 no se asociarían con *Cytb* de

manera temprana en la membrana interna mitocondrial. Sin embargo, la interacción de Cbp3 y Cbp6 con el túnel de salida del mitoribosoma no se afectaría. Con esta mutante podríamos evaluar si *Cytb* se hemila, si es así esto significaría que la hemilación ocurre mientras *Cytb* se ensambla en la membrana interna mitocondrial; pero si no hay hemilación, entonces se necesita que *Cytb* esté completamente ensamblada en la membrana interna mitocondrial.

- Buscar supresoras respiratorias de las mutantes $\Delta cbp3$ y $\Delta cbp6$ en la cepa D273-10b. Sabemos que en esta cepa el defecto que provoca un fenotipo no respiratorio es la falta de hemilación de *Cytb*. Por lo que es probable que las supresoras respiratorias nos ayudaran a entender qué gen o genes mutan para que *Cytb* sea capaz de hemilarse.
4. Estudiar cómo se acopla el ensamblaje del complejo bc_1 con el de la CcO. Estudios en nuestro laboratorio (105), sugieren que el ensamblaje de Rip1 depende del ensamblaje de la CcO. Se podría evaluar la función de la translocasa de Rip1 y Bcs1 en mutantes que afecten el ensamblaje de la CcO.
 5. Buscar qué chaperonas modulan el ensamblaje de los supercomplejos. Éste análisis se podría realizar mutando diferentes subunidades de los complejos bc_1 y CcO, aislar intermediarios del ensamblaje y mediante espectrometría de masas buscar qué proteínas interactúan.

MATERIALES Y MÉTODOS

Generación de mutantes nucleares de *S. cerevisiae* (107)

Diseño de casetes para generar mutaciones nucleares

La generación de mutantes nulas de los genes de interés se realizó mediante la integración y sustitución del *orf* completo del casete de resistencia a G418 (*KanMX4*) o por marcadores de recuperación de auxotrofías como *LEU2*, *URA3* y *HIS3MX4*.

Para los casetes de resistencia a G418, las mutantes de interés se tomaron de la colección YKO Mat α Strain Collection – Glycerol Stock (Open Biosystems). De estas cepas se extrajo DNA para usar como templado de amplificación por PCR. Se diseñaron oligonucleótidos que se aparean ~300nt río arriba y ~300nt río abajo de cada gen (Ver apéndice) y mediante PCR se amplificaron los casetes para transformar a la levadura (Figura 28). Los productos de PCR se purificaron y utilizaron para transformar levadura.

Para el diseño de casetes con los marcadores *LEU2*, *URA3* y *HIS3MX4*, se diseñaron oligonucleótidos que contenían 50-100 nt del extremo 5' o 3'UTR del gen de interés, y 25 nt de la secuencia de cada casete (Ver apéndice). Se utilizaron los plásmidos YEp351 para *LEU2*, pRS416 para *URA3* y pRS423 para *HIS3MX6*. Mediante PCR se amplificaron los casetes y se purificaron de un gel de agarosa al 1% para transformar a las células de levadura (Figura 29).

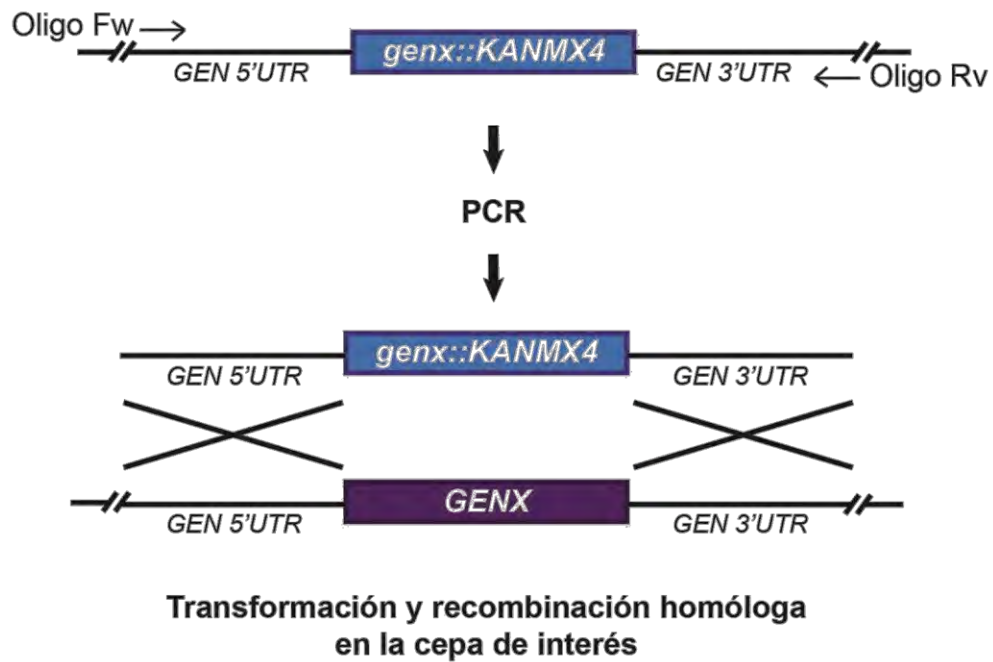


Figura 28. Generación de los cassettes de resistencia a G418 (*KANMX4*). A partir de la colección YKO Mat α Strain Collection y con oligonucleótidos específicos se amplificó el casete integrado en el gen de interés. El casete se transformó en la levadura y por recombinación homóloga el casete se integró en el locus del gen de interés.

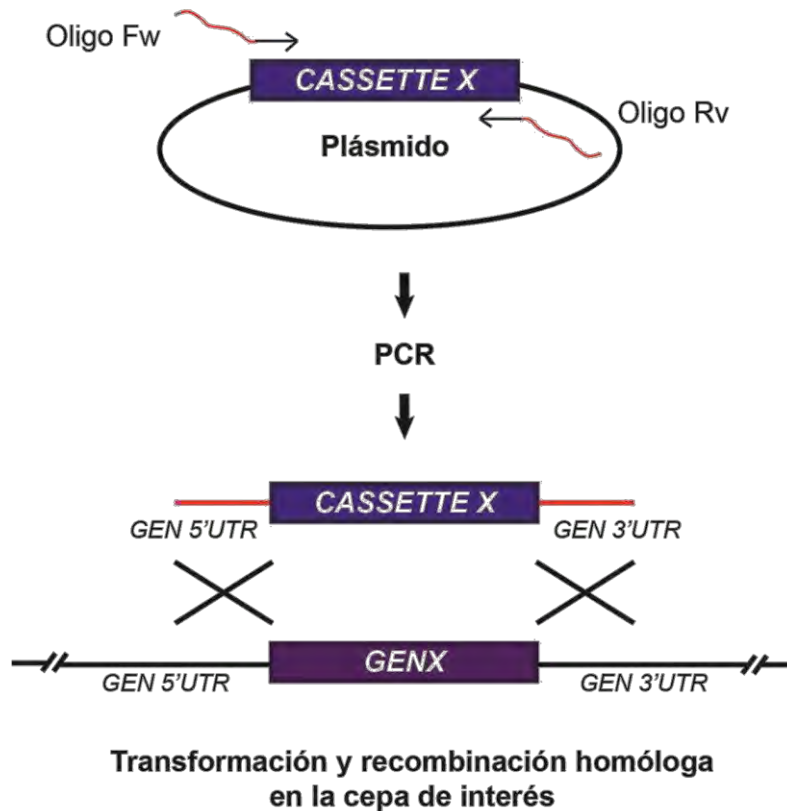


Figura 29. Generación de los casetes para sustituir genes por marcadores de auxotrofia. Se amplificó un producto de PCR a partir de DNA plasmídico que contiene un casete para auxotrofia (AZUL). A los oligonucleótidos se les adicionaron 50-100 nucleótidos con homología a los extremos 5' y 3'UTR del gen de interés (ROJO). El casete amplificado y purificado se transformó en la cepa de interés y por recombinación homóloga se reemplazó el casete por el locus del gen (MORADO).

Fusión de la etiqueta de hemaglutinina (HA) en el extremo carboxilo terminal de Cbp3 (107)

Para etiquetar a la proteína Cbp3 con un heptópe de hemaglutinina en su extremo carboxilo terminal se llevó a cabo una PCR de fusión. Por un lado se amplificaron 300 pb del extremo 5'UTR de *CBP3* con el *orf* completo de *CBP3* incluyendo una copia de la secuencia codificante para un epítipo HA. Por otro lado se amplificó un fragmento que incluyó el epítipo de HA y 325 nt del extremo 3'UTR de *CBP3*; los productos de PCR se utilizaron como plantados para realizar una PCR de fusión. Se purificó la banda correspondiente a *CBP3-HA* y se clonó en el vector pGEM T-easy (Promega) para

generar el plásmido pYCV68. Se corroboró la secuencia por secuenciación y se subclonó en el vector pRS416 con el sitio de restricción *EcoRI* para generar el plásmido pYCV70-C (Figura 30).

Clonación del gen *SMT1* de la cepa D273-10b (107)

Para clonar al gen *SMT1* de la cepa D273-10b, se utilizó el DNA genómico de la cepa NB40-36a (28). Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar 330 pb río arriba y 415 pb río abajo del *orf* de *SMT1*. El producto amplificado por PCR se purificó y se clonó en el vector pGEM T-easy (Promega) para generar el plásmido pAG17. Se verificó por secuenciación y se subclonó en los vectores centromérico pRS416 (pAG17) y con origen de replicación de 2 μ YEp352 (pAG18) con los sitios de restricción *XbaI* y *PstI*.

Generación de la construcción *COB(1-385)::pARG8^m* (107)

La construcción *COB(1-385)::pARG8^m* se generó amplificando por PCR 3 fragmentos: uno incluyó los últimos 351 pb del *orf* de *COB*; el otro cubrió los primeros 470 pb del *orf* de *ARG8^m* (86) incluyendo su pre-secuencia mitocondrial. Los dos fragmentos se utilizaron para realizar una PCR de fusión. El producto de fusión se purificó y se clonó en el vector pBluescript con los sitios de restricción *XhoI* y *EcoRI* para obtener el plásmido pYCV55. El tercer producto de PCR incluyó el *orf* completo de *ARG8^m* y 625 pb del extremo 3'UTR de *COB*. Esta última amplificación se realizó utilizando como templado DNA mitocondrial de la cepa YTE31, la cual tiene reemplazado el *orf* de *COB* con el de *ARG8^m* (108). Ésta amplificación se purificó y se subclonó en el vector pYCV55 empleando los sitios de restricción *NcoI* y *EcoRI* para generar el plásmido pYCV56 (Figura 31). La construcción se corroboró por secuenciación del plásmido pYCV56.

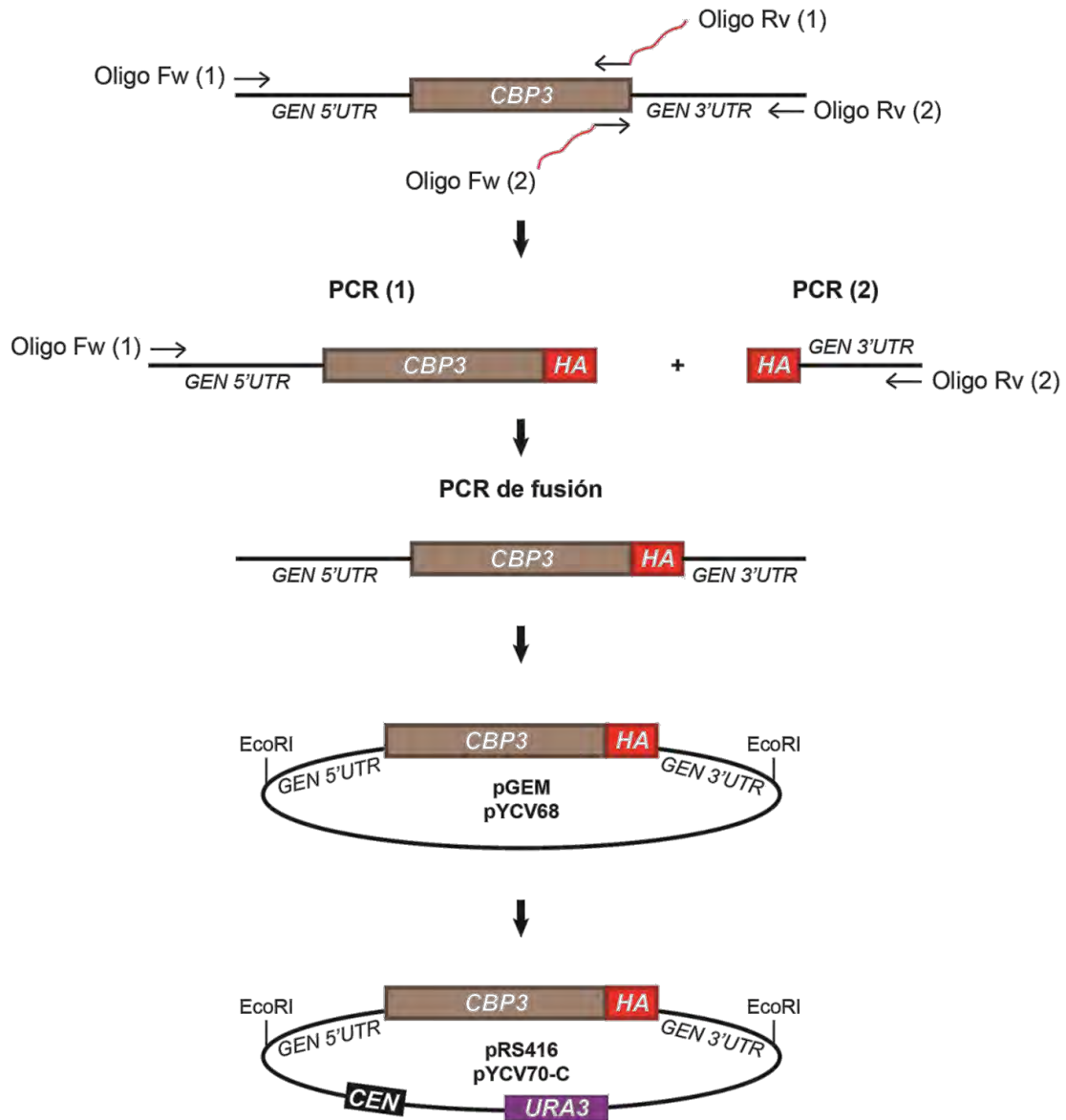


Figura 30. Fusión del epítipo de HA a Cbp3. Mediante dos reacciones de PCR se amplificó, un fragmento con oligonucleótidos específicos, Oligo Fw (1) y Oligo Rv (1), que incluye el extremo 5'UTR, el locus completo del gen y el epítipo de HA (PCR (1)). Con otros oligonucleótidos, Oligo Fw (2) y Oligo Rv (2) se amplificó otro fragmento que incluyó el epítipo de HA y la región 3'UTR del gen *CBP3* (PCR (2)). Los dos fragmentos se utilizaron como templado para realizar una PCR de fusión con los oligonucleótidos Oligo Fw (1) y Oligo Rv (2). El plásmido pYCV70-C deriva del pRS416 con el marcador de auxotrofia *URA3* (MORADO) y con una secuencia centromérica (*CEN*) (NEGRO).

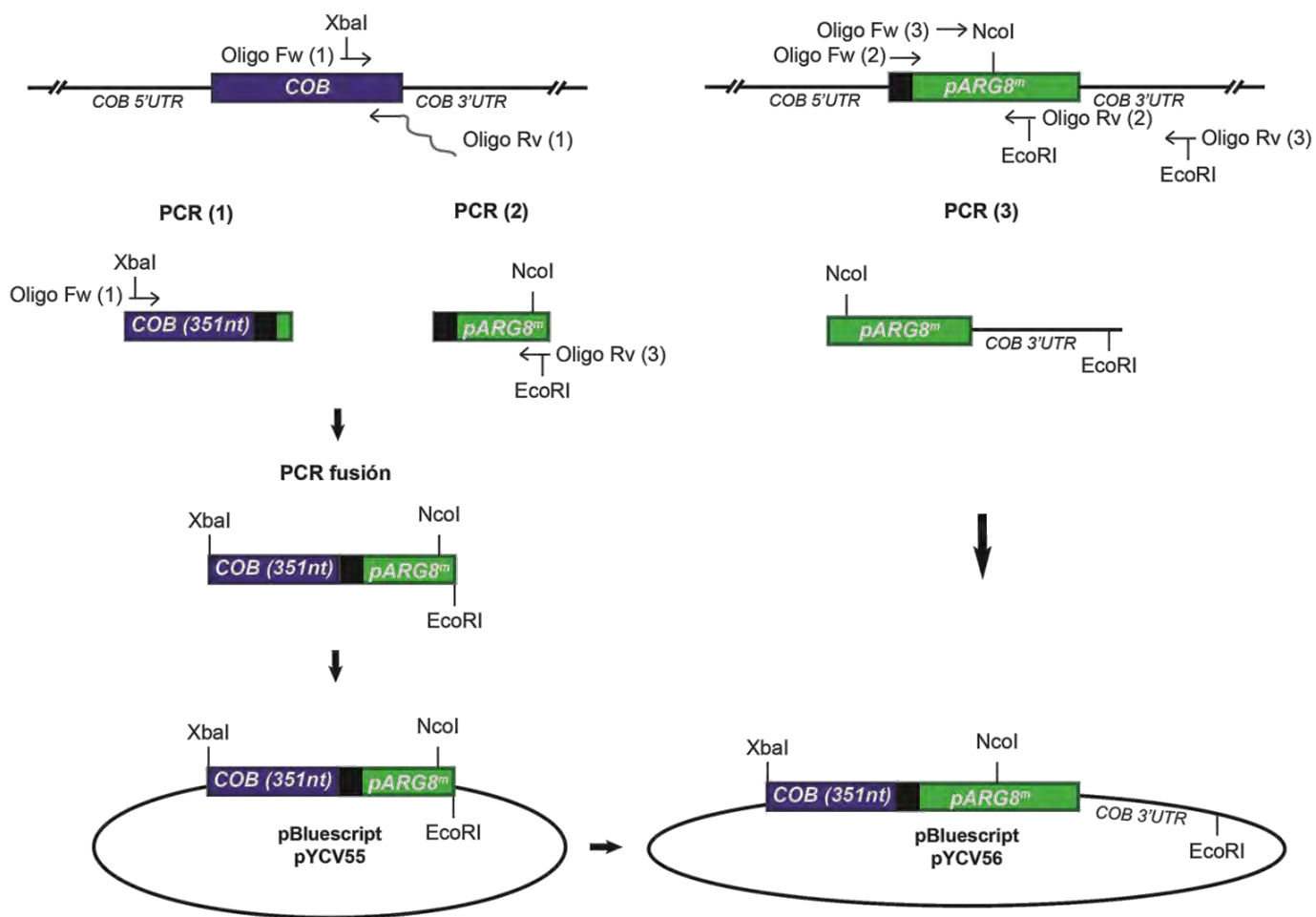


Figura 31. Generación de la construcción *COB(1-385)::pARG8^m* y clonación en pBluescript. Se realizaron 3 reacciones de PCR: (1) incluyó los últimos 351 pb del gen *COB* (AZUL) con 25 pb del gen *pARG8^m*; (2) incluyó 470 pb del gen *ARG8^m* (VERDE), incluyendo la región codificante de la pescecua; (3) incluyó al gen *ARG8^m* y 625 pb del 3'UTR de *COB*. Los PCR's (1) y (2) se utilizaron para hacer una PCR de fusión, y el producto se clonó en el vector pBluescript digerido con los sitios de restricción *XbaI* y *EcoRI*. Esta construcción dio lugar al plásmido pYCV55. El PCR (3) se subclonó en el vector pYCV55 digerido con *NcoI* y *EcoRI* obteniendo la construcción completa para transformar mitocondrias de levadura (pYCV56).

Generación de la construcción *cobΔ::ARG8^m* (107)

La construcción *cobΔ::pARG8^m* se generó amplificando por PCR con oligonucleótidos diseñados para alinear en el extremo 5'UTR de *COB* a 161 pb río arriba del codón *AUG* de inicio y en el extremo 3'UTR de *COB* a 371 bp río abajo del codón de paro. Como templado se empleó DNA mitocondrial de la cepa YTE31 (108) que contiene la construcción *cobΔ::pARG8^m*. El producto amplificado se clonó en el vector pGEM T-easy para generar el plásmido pYCV66 y se verificó por secuenciación (Figura 32).

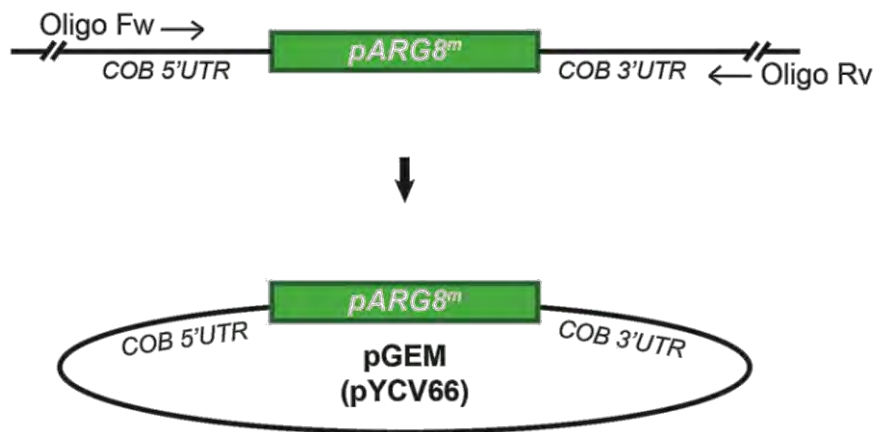


Figura 32. Clonación de la construcción *cobΔ::pARG8^m*. A partir de DNA mitocondrial de la cepa YTE31 se amplificó por PCR a *cobΔ::pARG8^m*. La amplificación incluyó 161 nt del extremo 5'UTR de *COB* y 371 nt del extremo 3'UTR de *COB*. El producto de PCR se clonó en el vector pGEM (pYCV66) y se corroboró por secuenciación.

Purificación de productos de PCR

Todos los productos de PCR fueron purificados por el kit de extracción de DNA de gel o por purificación por columna con los kits de QIAGEN, siguiendo las instrucciones del producto.

Extracción de DNA plasmídico por kit

Para secuenciar plásmidos y para transformar, todos los plásmidos se extrajeron utilizando el kit de extracción de DNA plasmídico de Qiagen, siguiendo las instrucciones del manual.

Medios de cultivo utilizados en este estudio (16)

YP (1 litro)

Extracto de levadura: 10 g

Peptona: 20 g

Fuente de carbono (YPD, YPGal, YPRaf, YPEG): 20 g

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

YPD: Dextrosa

YPGal: Galactosa

YPRaf: Rafinosa

YPEG: 30 ml de etanol y 30 ml de glicerol

Medio “Drop-out” (1 litro)

Base nitrogenada sin aminoácidos: 6.7 g

Glucosa/Galactosa: 20 g

Medio drop-out: Agregar según las indicaciones del producto

Para medio solido: 20 g de agar. Esterilizar en autoclave

Medio -met Gal (1 litro)

Base nitrogenada sin aminoácidos: 6.7 g

Galactosa: 20 g

Medio drop-out sin metionina: 750 mg

Para medio solido: 20 g de agar. Esterilizar en autoclave

LB (1 litro)

Extracto de levadura: 5 g

Triptona: 10 g

NaCl: 10 g

Para medio solido: 20 g de agar. Esterilizar en autoclave

SOC (1 litro)

Triptona: 20 g

Extracto de levadura: 5 g

NaCl: 0.5 g

Dextrosa: 3.6 g

Medio para transformación mitocondrial por biobalística (SD +sobitol +ade +arg) (1 litro) (109)

Base nitrogenada sin aminoácidos: 6.7 g

Dextrosa: 50 g

Sorbitol: 182.2 g

Adenina: 0.1 g

Arginina: 0.106 g

Agar: 20 g

Diluciones seriadas

- Cultivar las cepas de interés en 2 ml de YPD a 30°C O/N.
- Al día siguiente pesar los tubos para microcentrifuga tipo eppendorf a utilizar en balanza analítica.
- Centrifugar 1 ml de cada cultivo a 16100 x g por 1 min. Eliminar sobrenadante.
- Pesar nuevamente los tubos. Estimar el peso del botón celular.
- Diluir con dH₂O estéril para que queden las células a una concentración de 10 mg/mL.

Colocar en los pozos de una placa estéril de 96 pozos 135 µl de H₂O estéril con pipeta multicanal hasta la columna número 6 (A2, A3, A4... B2, B3, B4...etcétera).

- En el primer pozo de cada fila (A1, B1, C1...) agregar 150 μl de la solución celular.
- Con pipeta multicanal, tomar 15 μl del primer pozo y transferir al siguiente pozo de la siguiente columna (A2, B2, C2...) (subir y bajar para homogenizar 10 veces). Repetir éste paso hasta la columna 6 (A3, B3, C3...) (A4, B4, C4...) etc.
 - Se pueden replicar en cada caja con medio por goteo con la pipeta multicanal, tomando 10 μl de cada columna y agregándola en la caja de Petri.
 - También se puede replicar utilizando un replicador metálico. Se sumerge el replicador en cada pozo de la caja de ELISA, se toma muestra de cada pozo y se agrega a una caja de Petri.

Transformación de levadura (110)

- Cultivar dos o tres colonias de levadura en 2 ml de medio YPD toda la noche (O/N) a 30°C.
- Del cultivo O/N tomar 1 ml y agregar 4 ml de YPD fresco. Incubar a 30°C por 2 hrs.
- Tomar 750 μl y 1 ml del cultivo. Centrifugar 1 min a 16100 x g a temperatura ambiente. Eliminar completamente el sobrenadante.
- Resuspender el botón celular en 52.5 μl de amortiguador de transformación.
- Adicionar DNA (100 ng a 1 μg).
 - Transformación integrativa: Incubar a 30°C por 30 min (mezclar cada 10 min) y posteriormente incubar 30 min a 42°C.
 - Transformación de plásmido: Incubar a 42°C por 30 min.
- Adicionar 1 ml de YPD e incubar a 30°C durante 2 hrs (sólo para transformación integrativa).
- Centrifugar los tubos 1 min a 13200 x g a temperatura ambiente. Eliminar 900 μl del sobrenadante.
- Plaquear la mezcla en el medio de selección necesario.

Amortiguador de transformación:

PEG 3350: 3.8%

DTT: 100 mM

Acetato de Litio: 0.2 mM

DNA de esperma de salmón (Invitrogene): 0.5 mg/ml (antes de usar hervir 10 min)

Purificación de DNA total de levadura (110)

- Cultivar dos o tres colonias de levadura en 2 ml de medio YPD toda la noche a 30°C.
- Centrifugar los cultivos 1 min a 16100 x g a temperatura ambiente.
- Lavar las células con 500 µl de agua. Centrifugar como en el paso anterior.
- Resuspender el botón celular con 200 µl de amortiguador de lisis.
- Adicionar 200 µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1).
- Agitar en vórtex a velocidad máxima durante 3 min.
- Centrifugar 5 min a 16100 x g a temperatura ambiente.
- Separar la fase acuosa (fase superior) y poner en tubo nuevo. Precipitar DNA adicionando 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5.3 y 3 volúmenes de etanol al 100% previamente enfriado a -20°C. Incubar 20 min a -20°C.
- Centrifugar la mezcla anterior a 16100 x g a 4°C.
- Lavar el botón de DNA con 1 ml de etanol al 70% previamente enfriado a -20°C.
- Centrifugar 1min a 16100 x g a 4°C. Eliminar completamente el etanol. Dejar secar las muestras al aire.
- Resuspender en 50 µl de agua libre de nucleasas (Gibco)l.
- Guardar a -20°C.

Amortiguador de lisis

Tris-HCl pH 8.0: 10 mM

EDTA pH 8.0: 1 mM

SDS: 1%

Tritón X-100: 2%

Extracción de DNA plasmídico (111)

- Inocular un cultivo de 2 ml en medio LB con ampicilina (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).
- Centrifugar a 14000 $\times g$ por 1 min. Eliminar sobrenadante.
- Resuspender células con 100 μl de Solución I fría.
- Añadir 200 μl de Solución II. Mezclar invirtiendo por 6 veces.
- Inmediatamente añadir 150 μl de Solución III fría. Mezclar invirtiendo por 6 veces.
- Centrifugar a 14000 $\times g$ por 10 min. Recuperar sobrenadante.
- Agregar al sobrenadante 2 volúmenes de etanol 100% (-20°C).
- Centrifugar a 14000 $\times g$ por 10 min. Eliminar sobrenadante.
- Lavar con etanol al 70%.
- Centrifugar a 14000 $\times g$ por 5 min. Eliminar sobrenadante.
- Dejar secar al aire.
- Disolver el DNA con 30 μl de buffer TE + RNasa.

Solución I

Tris-HCl pH 8.0: 25 mM

EDTA pH 8.0: 10 mM

Glucosa: 50 mM

*Esterilizar y almacenar a 4°C

Solución II

NaOH: 0.2 N

SDS: 1%

*Preparar al momento a temperatura ambiente

Solución III

Acetato de potasio: 3 M

Ácido acético: 11.5%

*Esterilizar por filtración y almacenar a 4°C

Buffer TE

Tris-HCl pH 8.0: 10 mM

EDTA pH 8.0: 1 mM

Transformación de *Escherichia coli*

Preparación de células quimiocompetentes (112)

- Tomar algunas colonias de *E. coli* (DH5 α) y crecer en 10 ml de medio LB O/N a 37°C.
- Inocular los 10 ml del cultivo anterior en 1 l de LB. Incubar en agitación hasta que alcance el cultivo una D.O. de 0.5
- Poner el cultivo a enfriar en hielo por 10 min.
- Centrifugar a 15000 x g por 10 min a 4°C. Eliminar sobrenadante.
- Resuspender el pellet en 1/3 del volumen inicial con amortiguador RF1. Incubar las células en hielo por 15 min.
- Centrifugar a 15000 x g por 10 min a 4°C. Eliminar sobrenadante.
- Resuspender el pellet celular en 1/6.25 del volumen inicial con el amortiguador RF2. Incubar las células en hielo por 15 min.
- Alicuotar 200 μ l de células en tubos tipo eppendorf y congelar inmediatamente en N₂ líquido. Almacenar alícuotas a -70°C.

Amortiguador RF1

RbCl: 100 mM

MnCl₂: 50 mM

Acetato de potasio: 30 mM

CaCl₂: 10 mM

Glicerol: 15%

*Ajustar el pH a 5.8 con 0.2 M de ácido acético. Esterilizar por autoclave o filtración.

Amortiguador RF2

MOPS: 10 mM

RbCl: 10 mM

CaCl₂: 75 mM

Glicerol: 15%

*Ajustar el pH a 6.8 con NaOH y esterilizar por autoclave o filtración.

Transformación de células quimiocompetentes de *Escherichia coli* por choque térmico (111)

- Tomar una alícuota de 200 μ l y mezclar con el DNA a transformar (no exceder un volumen mayor a 20 μ l).
- Incubar en hielo por 30 min.
- Incubar a 42°C por 2 min.
- Incubar en hielo por 10 min
- Agregar 1 ml de medio LB o SOC e incubar en agitación a 37°C.
- Centrifugar a 14000 x g por 1 min. Retirar 900 μ l de sobrenadante y plaquear en LB ampicilina (o antibiótico de selección de plásmido), con IPTG 1 mM y 0.2 mg de X-Gal.

Transformación mitocondrial por biobalística (109)

Preparación de las levaduras

- Crecer un cultivo a 30°C O/N de la cepa NAB69 (ρ°) (109) en 2 ml de YPRaf.
- Tomar 300 μ l del cultivo O/N y agregarlos en 30 ml de YPRaf fresco. Incubar por 2 noches a 30°C.
- Centrifugar células a 3000 x g y resuspender en 600 μ l de YPD.

- Plaquear 6 cajas de transformación cada una con 100 μl de células y dejar reposando por 3 hrs antes de bombardear.

Preparación de las partículas de tungsteno

- Esterilizar 10-50 mg de partículas de tungsteno (0.5 μm BIORAD) en un tubo eppendorf con 1.5 ml de etanol 70%. Agitar con vortex e incubar por 10 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar por 15 min a 14000 $\times g$. Retirar sobrenadante.
- Lavar las partículas con H_2O estéril y agitar con vortex.
- Centrifugar por 15 min a 14000 $\times g$. Retirar sobrenadante.
- Adicionar glicerol al 50% (16.7 μl glicerol/mg partículas). Las partículas en glicerol pueden ser almacenadas a -20°C .

Precipitación de DNA en las partículas de tungsteno

Para selección de transformantes nucleares emplear plásmido de 2 μ , *URA3* (YEp352).

- Agregar en un tubo tipo eppendorf:
 - 5 μg de YEp352 + 15 μg del plásmido mitocondrial (volumen total: 51 μl máximo).
 - 100 μl de partículas de tungsteno preparadas (mezclar con vórtex previamente)
 - 4 μl de espermidina 1 M
 - 100 μl de CaCl_2 2.5 M
- Incubar la mezcla en hielo durante 10 min. Mezclar con vortex cada 3 min.
- Centrifugar a 14000 $\times g$ por 30 seg. Eliminar sobrenadante.
- Agregar 200 μl de etanol al 100% (-20°C). Resuspender suavemente.
- Centrifugar a 14000 $\times g$ por 30 seg. Eliminar sobrenadante.
- Agregar 200 μl de etanol al 100% (-20°C). Resuspender suavemente.
- Centrifugar a 14000 $\times g$. Eliminar sobrenadante.
- Resuspender suavemente las partículas en 60 μl de etanol al 100% (temperatura ambiente).

- Insertar 6 discos (“*flying discs*”) en los “*macrocarriers*”.
- Tomar 10 μ l de las partículas con DNA y distribuir en los “*flying discs*”. Dejar secar a temperatura ambiente.
- Esterilizar la cámara del bombardeador 30 min antes de bombardear con etanol al 70%. Posteriormente secar con papel absorbente para quitar el exceso de etanol.
- Para bombardear, seguir el manual del bombardeador.
- Dejar crecer las células a 30°C hasta por 7 días.
- Seleccionar las colonias que hayan crecido replicando en medio CSM –URA, y en medio YPD con un césped de la cepa de prueba (tester) para seleccionar transformantes mitocondriales. Este tester se crece O/N en 2 ml de YPD y se esparcen 150 μ l en una caja de YPD. Se empleó NB71 para este estudio, la cual contiene el alelo mutado no funcional *ARG8^m-1*. Sólo aquellos diploides que contengan en la mitocondria el plásmido transformado podrán crecer en un medio sin arginina ya que *ARG8^m-1* recombinará con el plásmido transformado.
- El césped se deja crecer por 2 días a 30°C. Replicar césped en medio de selección (CSM –ARG para estudio). Crecer réplica a 30°C máximo dos días.
- Las colonias que hayan crecido en CSM –ARG, seleccionarlas de la caja de CSM –URA y volver a estriar en CSM –URA.
- Repetir los pasos de réplicas para seleccionar y purificar colonias transformantes positivas.
- Aquellas colonias que crezcan en CSM –URA, y CSM –ARG después del césped con NB71 se consideran como colonias ρ^- sintéticas.

Condiciones de bombardeo:

Discos de ruptura: 1300 psi

Vacio: 19-27 pgHg (La presión del vacío puede variar dependiendo de la altitud).

Gas: Helio

Equipo: PDS-1000/He™ System (BIORAD)

Integración de la construcción transformada en el DNA mitocondrial:

El plásmido transformado presente en la cepa ρ^- sintética se integra en el genoma mitocondrial de la cepa que se utilizará en este estudio mediante citoinducción (16). La citoinducción es un proceso técnico de cruce entre dos cepas de levadura para transmitir el genoma mitocondrial (Figura 33). La cepa donadora, contiene el alelo *kar1-1*, el cual no permite que su núcleo se fusione con el de la cepa aceptora, y por lo tanto manteniendo la haploidia celular. La cepa aceptora es la que recibirá sólo el material genético mitocondrial.

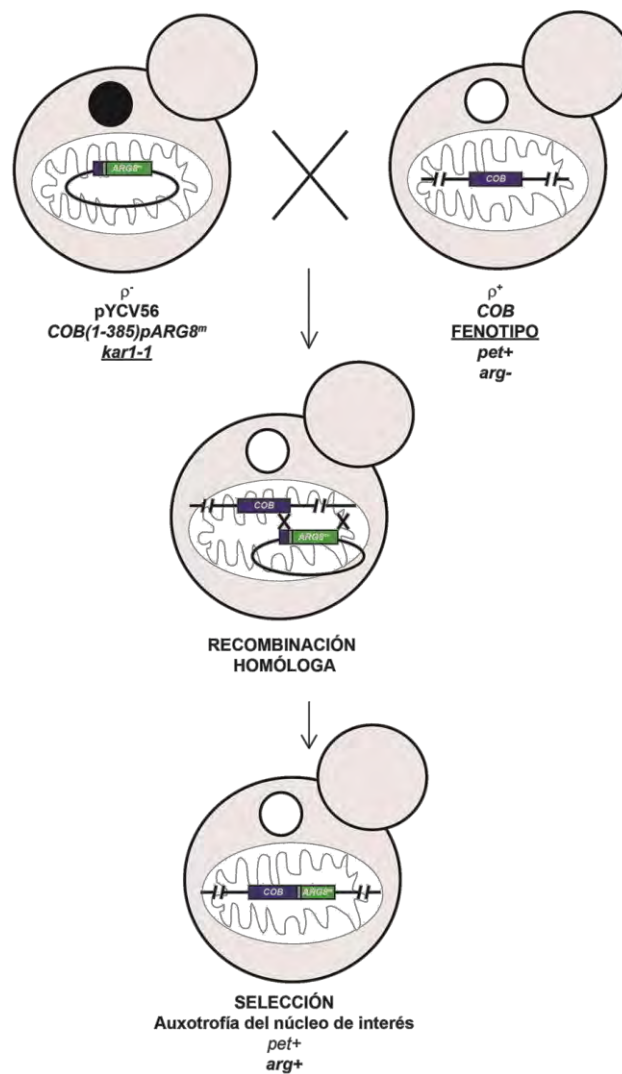


Figura 33. Integración de la construcción *COB(1-385)::pARG8^m* en el genoma mitocondrial. La cepa transformada por biobalística con el plásmido pYCV56 contienen el alelo *kar1-1* para evitar la fusión de núcleos. Se realiza una cruce con la cepa de interés, la cual tiene un fenotipo respiratorio (*pet+*) y es

auxótrofa a arginina (*arg*⁻). Durante la cruce ocurre la recombinación homóloga de la construcción con el genoma mitocondrial. Se selecciona el núcleo de interés por crecimiento en medios con auxotroffas, en medio respiratorio (*pet*⁺) y en medio sin arginina (*arg*⁺).

Citoinducción

- Inocular las cepas a citoinducir (Mata y Mat α) por separado en 5 ml de medio YPD e incubar a 30°C O/N.
- Mezclar las dos cepas a citoinducir en tubo tipo eppendorf:
 - Para pasar DNA mitocondrial a una cepa ρ° : 500 μ l de la cepa donadora y 500 μ l de la cepa receptora.
 - Para pasar DNA de una cepa ρ^{-} sintética: 750 μ l de la cepa donadora y 250 μ l de la cepa receptora.
- Centrifugar a 14000 x g por 2 min. Eliminar sobrenadante procurando dejar una pequeña cantidad para resuspender a las células mezcladas (<50 μ l).
- Resuspender el pellet celular, colocar la mezcla en una caja de YPD en forma de gota. Dejar secar en la mesa por 30 min.
- Incubar 2.5 hrs a 5 hrs a 30°C.
- Con un palillo tomar células y agregarlas en 2 ml de YPD. Incubar en agitación a 30°C por 3 hrs.
- Tomar 10 μ l de cultivo y agregarlo a 990 μ l de H₂O estéril. Plaquear 100 μ l en medio de selección de la cepa receptora. Incubar cajas a 30°C por 2 días.
- Hacer réplicas en medio de selección de la cepa receptora, medio de selección de la cepa donadora y medio de selección al fenotipo esperado; las colonias que crezcan en medio de selección de la receptora y la donadora se consideran como diploides, por lo que éstas no se seleccionan.

Obtención de la fracción mitocondrial cruda (113)

- Crecer una colonia de levadura en 2 ml de medio YPGal (en el caso de medios drop-out agregar como fuente de carbono galactosa) O/N a 30°C.

- Si es medio rico con 2 ml es suficiente para inocular el matraz de 1L.
- Si es medio mínimo seguir el siguiente paso.
- Resembrar los 2 ml en 25 ml del mismo medio e incubar a 30°C O/N.
- Del cultivo anterior resembrar en 1L del mismo medio e incubar O/N a 30°C hasta una D.O.₆₀₀ de 1.0 ± 0.1 (fase exponencial de crecimiento). **(Para este paso considerar la curva de crecimiento para la D.O. inicial y la cantidad de horas que el cultivo se incubará para que no se pase de una D.O. de 1.0)**
- Centrifugar a 2800 x g por 5 min a 4°C.
- Lavar el botón con dH₂O fría, juntar todo el botón en un tubo de centrifuga previamente pesado.
- Centrifugar a 2800 x g por 5 min a 4°C. Eliminar el sobrenadante y pesar.
- Resuspender el botón en amortiguador TD (2 ml/g de peso húmedo).
- Agitar 10 min a 30°C.
- Centrifugar 5 min a 2000 x g a 4°C.
- Lavar el botón con amortiguador MPZ (7 ml/g de peso húmedo).
- Centrifugar 5min a 2000 x g a 4°C.
- Resuspender el botón en amortiguador MPZ (7 mg/g peso húmedo), adicionar zimoliasa-20T (3 mg/g peso húmedo).
- Agitar de 30 a 60 min a 30°C, hasta que los esferoplastos se formen (revisar la formación de esferoplastos a los 30, 45 y 60 min). Para revisar la formación de esferoplastos:

Comparar 2 ml de dH₂O contra 2 ml de sorbitol 1.2 M adicionando a cada uno 50 µL de células, agitar en vórtex. Cuando se hayan formado los esferoplastos el tubo con agua se verá claro comparado con el tubo con sorbitol el cual se observará turbio, esto es debido a que la diferencia de osmolaridad romperá a los esferoplastos.

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

- Centrifugar a 1100 x g por 5 min a 4°C.
- Resuspender en $\frac{1}{4}$ del volumen requerido de amortiguador Dounce (70 ml por cepa).
- Homogenizar 10 veces usando un homogenizador y pistilo de vidrio (Estrecho).
- Centrifugar 5 min a 2000 x g a 4°C. Recuperar sobrenadante.

- Centrifugar 5 min a 2000 x g a 4°C. Recuperar sobrenadante.
- Centrifugar 12 min a 17400 x g a 4°C. Desechar sobrenadante (en el botón se encuentran las mitocondrias crudas).
- Resuspender suavemente el botón en 2 ml de amortiguador SEH (punta de la micropipeta cortada), después de resuspender el botón completamente agregar 8 ml de buffer SEH.
- Centrifugar 12 min a 17400 x g a 4°C. Desechar sobrenadante.
- Si solo se necesitan mitocondrias aisladas. Agregar 200-300 µl de SEH, alicuotar y congelar en N₂ líquido. Guardar a -70°C.
- Cuantificar por espectrofotometría la proteína (método de Lowry) de la siguiente manera: llevar 10 µl de mitocondrias crudas a 100 µl con SDS al 0.6%, agitar en vórtex.

Purificación de mitocondrias crudas en gradiente de Nicodenz.

- Preparar 10 ml de cada una de las siguientes soluciones de Nicodenz en amortiguador SEH 2X.

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

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

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

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

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

- Preparar dos gradientes por cultivo (1 l de medio de cultivo), depositando 2 ml de cada una de las soluciones de Nicodenz en el siguiente orden; 25, 20, 15, 10 y 5% (usar punta para micropipeta cortada en el extremo).
- Depositar 0.5 ml del extracto crudo de mitocondrias en cada gradiente (usar punta cortada).
- Centrifugar a 10000 x g por 39 min en un rotor SW40Ti (Beckman). Al finalizar la centrifugación se observarán cuatro bandas.
- Remover las bandas de mitocondrias y mitoplastos con una aguja y jeringa. Colocarlas en tubos diferentes.
- Diluir las mitocondrias y los mitoplastos en 25 ml de amortiguador SEH.

- Centrifugar 10 min a 17400 x *g* a 4°C.
- Para eliminar completamente el Nicodenz, resuspender el botón en 20 ml de SEH.
- Centrifugar 10 min a 17400 x *g* a 4°C.
- Resuspender el botón en 250 µl de amortiguador SEH, con la punta para micropipeta cortada en el extremo.
- Congelar en nitrógeno líquido y guardar a -70°C en alícuotas de 20 µl.
- Cuantificar por espectrofotometría la proteína (método de Lowry) de la siguiente manera: llevar 10 µl de mitocondrias puras a 100 µl con SDS al 0.6%, agitar en vórtex.

Amortiguadores para la purificación de mitocondrias

TD (Tris-DTT)

Tris-SO₄ pH 9.4: 0.1 M

DTT: 10 mM

MPZ

Sorbitol: 1.2 M

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

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

Homogenización (Dounce)

Tris pH7.4: 10 mM

EDTA pH 8.0: 1 mM

BSA: 0.2% p/v

TLCK: 50 µg/ml

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

PMSF (preparar al momento en etanol) : 1 mM

Sorbitol/EDTA/HEPES (SEH)

HEPES: 20 mM

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

EDTA pH 8.0: 1 mM (No usar EDTA si las mitocondrias se utilizaran para separación de ribosomas por gradiente de sacarosa y para IP-RTPCR)

Cuantificación de proteínas por método de Lowry (114)

Curva de calibración: Usar solución de albumina a 1 mg/ml

- Alicuotar en tubos de ensaye 0, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 μ l de la solución de albumina.
- En otros tubos agregar 10, 20 y 40 μ l de la muestra a analizar.
- Agregar a cada tubo H₂O hasta llevar a un volumen de 1 ml.
- Agregar 3 ml de Solución C, mezclar con vórtex. Incubar 10 min a temperatura ambiente.
- Agregar 300 μ l de Solución D, mezclar con vortex. Incubar 30 min a temperatura ambiente.
- Medir absorbancia a 740 nm

Solución A

Na₃CO₃: 2% (p/v)

NaOH: 0.4% (p/v)

Na₂tartrato: 0.16% (p/v)

SDS: 1% (p/v)

Solución B

Cu₂SO₄·5H₂O: 4% (p/v)

Solución C

Solución A / Solución B: 100/1

Solución D

Reactivo de Folin / H₂O: 1/1

Análisis de agregados proteicos (67)

- Centrifugar 100 μg de mitocondrias por 5 min a 14000 $\times g$ a 4°C. Retirar el sobrenadante.
- Resuspender en 250 μl de amortiguador de lavado.
- Centrifugar la mitocondrias a 14000 $\times g$ por 2 min. Eliminar sobrenadante.
- Centrifugar nuevamente a 14000 $\times g$ por 15 seg y eliminar el sobrenadante que haya quedado.
- Resuspender en 45 μl de amortiguador de lisis. Agregar 5 μl de digitonina al 10%. Incubar por 30 min en hielo.
- Ultracentrifugar a 100000 $\times g$ a 4°C por 30 min. Apartar sobrenadante (S1) en un tubo fresco.
- Resuspender botón en 45 μl de amortiguador de lisis. Agregar 5 μl de Tritón X-100 al 10%. Incubar por 5 min en hielo.
- Ultracentrifugar a 100000 $\times g$ a 4°C por 30 min. Apartar sobrenadante (S2) y combinarlo con S1
- Agregar al botón 15 μl de amortiguador de muestra (Laemmli) con 5% de β -mercaptoetanol.
- Al sobrenadante (S1+S2) agregar 9 μl de TCA al 100%. Incubar en hielo por 30 min.
- Centrifugar 10 min a 14000 $\times g$ a 4°C. Retirar sobrenadante.
- Lavar con 1 ml de acetona fría.
- Centrifugar 10 min a 14000 $\times g$ a 4°C. Retirar sobrenadante.
- Incubar 5 min a 65°C para evaporar la acetona.
- Resuspender en 10 μl de una solución de SDS 5%, NH_4OH 1%.
- Incubar 5 min a 65°C.
- Agregar amortiguador de Laemmli 1X.
- Incubar 5 min a 65°C.
- Cargar en un gel de acrilamida desnaturalizante, transferir y analizar por western blot con los anticuerpos deseados.

Amortiguador de lavado (50 ml)

- Sorbitol 250 mM
 - Bis-tris 50 mM
- Ajustar pH a 7.0 con HCl

Separación de ribosomas con gradiente de sacarosa (94)

- Centrifugar 0.5 mg de mitocondrias por 5 min a 14000 x g a 4°C. Retirar el sobrenadante.
- Resuspender en 300 µl de amortiguador de lisis.
- Incubar 30 min en hielo.
- Cargar en un gradiente discontinuo de 20, 30 y 40% de sacarosa.
- Centrifugar 2 horas a 144000 x g en rotor SW55Ti.
- Retirar fracciones de 600 µl y agregar 60 µl de TCA al 100%.
- Incubar 30 min en hielo.
- Centrifugar 10 min a 14000 x g a 4°C. Retirar sobrenadante.
- Lavar con 1 ml de acetona fría.
- Centrifugar 10 min a 14000 x g a 4°C. Retirar sobrenadante.
- Incubar 5 min a 65°C para evaporar la acetona.
- Resuspender en 10 µl de una solución de SDS 5%, NH₄OH 1%.
- Incubar 5 min a 65°C.
- Agregar amortiguador de Laemmli 1X.
- Incubar 5 min a 65°C.
- Cargar en un gel de acrilamida desnaturalizante, transferir y analizar por western blot con los anticuerpos deseados.

Amortiguador de lisis

Acetato de Mg	10 mM
NaCl	50 mM
Hepes-KOH pH 7.4	20 mM

PMSF	1 mM
Digitonina	1%

Amortiguador MT5X

Tris-HCl pH 7.4	50 mM
Acetato de Mg	50 mM

Amortiguador para gradiente de sacarosa

Amortiguador MT	1X
DTT	40 mM
PMSF	1 mM
Digitonina	0.1%
Sacarosa	20%, 30% o 40%

Inmunoprecipitación de complejos proteína-RNA (Modificado de (37))

Para este ensayo se utilizan guantes y material estéril. Utilizar H₂O libre de nucleasas para la preparación de amortiguadores.

- Centrifugar 0.5 mg de mitocondrias por 5 min a 14000 x g. Retirar sobrenadante.
- Resuspender las mitocondrias con 500 µl de amortiguador de lisis, pipetear varias veces para resuspender el botón.
- Incubar en aparato giratorio por 20 min a 4°C.
- Centrifugar por 10 min a 14000 x g a 4°C.
- Lavar 50 µl de perlas A-sefarosa no acopladas a anticuerpo (Amersham) con 200 µl de Tris-HCl pH 7.4 20mM. Centrifugar 1 min a 14000 x g a 4°C y retirar los 200 µl de sobrenadante.
- Agregar 10 µl de anticuerpo anti HA de rata (Roche).
- Retirar 40 µl de lisado mitocondrial. Utilizar 20 µl para analizar proteína y 20 µl para extracción de RNA (Fracción total, T).
- Añadir el lisado mitocondrial al tubo con las perlas de proteína A-sefarosa con anticuerpo anti HA.

- Incubar 2 h en aparato giratorio a 4°C.
- Centrifugar 1 min a 14000 x g a 4°C. Retirar sobrenadante.
- Lavar 2 veces el botón con 500 µl de amortiguador de lisis. Invertir y centrifugar 1min a 14000 x g a 4°C. Extraer con microjeringa.
- Lavar 2 veces el botón con 1 ml de HEPES 20 mM pH 7.4. Invertir y centrifugar 1 min a 14000 x g a 4°C. Extraer con microjeringa.
- Resuspender el botón en 150 µl de HEPES 20 mM pH 7.4.
- Tomar 50 µl de esta fracción con punta cortada (fracción de inmunoprecipitación, IP) y transferir a un tubo fresco de donde se extraen proteínas. La muestra restante se utilizar para extraer RNA.
- A las muestra del total (T) agregar 2 µl de TCA al 100%. Conservar en hielo por 30 minutos. Centrifugar muestras con TCA al 100% a 14000 x g por 10 min a 4°C. Retirar sobrenadante.
- Lavar con 1 ml de acetona al 100% fría (-20°C).
- Centrifugar a 14000 x g por 10 min a 4°C. Retirar sobrenadante.
- Resuspender botón con 10 µl de SDS 5% con NH₄OH 1%.
- Agregar 10 µl de amortiguador de Laemmli 2X complementado con β-mercaptoetanol.
- Incubar 5 min a 65°C.
- Por otro lado, a la muestra de IP se le extrae el sobrenadante con microjeringa después de centrifugar 1 min a 14000 x g y agregar amortiguador de Laemmli 1X complementado con β-mercaptoetanol al 2%.
- Incubar 5 min a 65°C.
- Cargar en el gel de acrilamida 12% SDS-PAGE.

Extracción de RNA

- A las 2 muestras destinadas para la extracción de RNA agregar 1 ml de Trizol (Thermo-Scientific). Pipetear varias veces con punta de 1000 µl. Incubar 5 min a temperatura ambiente.

- Añadir 200 μl de cloroformo. Agitar 15 s manualmente. Incubar por 3 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 13400 $\times g$ por 15 min a 4°C. Recuperar fase acuosa y pasar a tubo fresco.
- Agregar a la fase acuosa 500 μl de isopropanol. Incubar a temperatura ambiente por 10 min.
- Centrifugar a 13400 $\times g$ por 10 min a 4°C. Retirar sobrenadante.
- Lavar botón con 1 ml de etanol 75% frío (-20°C).
- Centrifugar por 5 min a 7500 $\times g$ a 4°C. Retirar sobrenadante.
- Dejar secar sobrenadante a 65°C por 2 min.
- Resuspender RNA con 25 μl de H₂O libre de nucleasas (Gibco).
- Cuantificar el RNA en Nano-drop 2000 (Thermo Scientific).

RT-PCR

Las secuencias de los oligonucleótidos se muestran en la Tabla X, en el Apéndice.

- Usar tubos de PCR de 0.2 ml estériles. Marcar los tubos como T+, T-, IP+, IP-. A los (-) no se les agregará transcriptasa reversa. Es un control de contaminación por DNA.
- Preparar la siguiente mezcla solo en los tubos (+):
 - 10-20 ng de RNA
 - 1.5 μl de amortiguador de DNasal (Thermo Scientific).
 - 1.5 μl de DNasal (Thermo Scientific)
 - 15 μl de volumen final con H₂O libre de nucleasas
- Incubar 15 min a 25°C en termociclador.
- Agregar 1.5 μl de EDTA 25mM (Thermo Scientific). Calentar 10 min a 65°C.
- Agregar a cada tubo:
 - 1.5 μl de oligo 10 μM COBR3
 - 1.5 μl de oligo 10 μM VAR1R3
 - 1.5 μl de dNTPs 10 μM

- Calentar a 65°C por 5 min y posteriormente 1 min a 4°C.
- Agregar:
 - 6 µl de amortiguador FS 5X (Thermo Scientific)
 - 1.5 µl de DTT 0.1 M
 - 1.5 µl de RNasaOUT (Thermo Scientific)
 - Separar 10 µl y transferir al tubo (-)
 - Agregar al tubo (+) 1 µl de SuperscriptIII (Thermo Scientific).
- Generar el cDNA en el termociclador bajo las siguientes condiciones:
 - 5 min a 25°C
 - 60 min a 50°C
 - 15 min a 70°C
- Para la PCR se utiliza 1 µl de cDNA
 - 2.5 µl de amortiguador 10X
 - 0.75 µl de MgCl₂ 100 µM (Thermo)
 - 0.5 µl de dNTPs 10 µM
 - 1.5 µl de Oligonucleótido Fw 10 µM (Para COB: COBF4, para VAR1: VAR1F2)
 - 1.5 µl de Oligonucleótido Rv 10 µM (Para COB: COBR4, para VAR1: VAR1R2)
 - 0.25 µl de TaqPol (Thermo)
 - 18 µl de H₂O libre de nucleasas
- Amplificar usando el siguiente programa:
 - 94°C por 5 min

 - 94°C por 45 s
 - 48°C por 1 min
 - 72°C por 1 min
 - Repetir por 5 ciclos

 - 94°C por 45 s
 - 50°C por 1 min
 - 72°C por 1 min
 - Repetir por 30 ciclos

 - 72°C por 5 min

4°C ∞

- Los productos de PCR se resuelven en gel de agarosa al 1% complementado con bromuro de etidio.

Amortiguador de lisis

Digitonina: 1%

NaCl: 150 mM

Tris-HCl pH 7.4: 20 mM

RNaseOUT (Thermo): 400 U/ml

Mini Complete (Roche): 1/5 pastilla (Disolver 1 pastilla en 1 ml de H₂O libre de nucleasas. Añadir 200 µl por cada ml de amortiguador)

Síntesis y marcaje radioactivo *in vivo* de proteínas mitocondriales (ivTL) (115)

- Crecer un cultivo de 2 ml de YPGal a 30°C por 2 ON.
- Tomar 1 ml de las cepas *pef* y 0.5 ml de las *pet*⁺ e inocular 10 ml de YPGal. Agitar a 30°C por 2.5 hrs.
- Leer y apuntar la D.O., la cual no debe de pasar de 1.0.
- Centrifugar células a 3000 x *g* por 5 min a temperatura ambiente en tubos Falcon.
- Pesar el botón y resuspender en 1 ml de agua estéril en tubos de 2 ml con tapa de rosca.
- Resuspender en 500 µl de medio Gal/-met. Incubar durante 30 min a 30°C con agitación constante.
- Adicionar 5 µl de cicloheximida (10 mg/ml, disuelto en etanol). Incubar 5 min a 30°C agitar invirtiendo en termoblock cada minuto.
- Adicionar 7 µCi de ³⁵S-Met (METRIX). Incubar durante 15 min a 30°C en agitación constante.
- Inmediatamente enfriar en hielo/agua durante 5min.
- Centrifugar a 3200 x *g* a 4°C por 1 min. Eliminar sobrenadante.

- Lavar el botón con 200 μ l de SHP frío con inhibidor de proteasas (Sigma, 3.3 μ l/10ml, preparar en el momento).
- Centrifugar a velocidad máxima a 4°C por 1 min. Eliminar sobrenadante.
- Resuspender el botón en 200 μ l de SHP frío.
- Adicionar 1 volumen de perlas de vidrio previamente enfriadas a -20°C.
- Agitar en vortex 30 seg a velocidad máxima e incubar 30 seg en hielo (realizar este paso 3 veces).
- Centrifugar a 600 \times g a 4°C por 5 min. Recuperar sobrenadante en tubo eppendorf etiquetado, previamente enfriado en hielo.
- Adicionar 200 μ l de SHP frío a las perlas. Repetir el ciclo vortex/hielo (realizar este paso 3 veces).
- Centrifugar los tubos con perlas de vidrio a 600 \times g a 4°C por 5 min. Recuperar y combinar los sobrenadantes.
- Centrifugar a velocidad máxima en microcentrífuga a 4°C durante 12 min. Eliminar sobrenadante.
- Adicionar a los botones mitocondriales 40 μ l de amortiguador de Laemmli 1X (5% β -mercaptoetanol).
- Tomar 5 μ l de cada muestra y calentar a 65°C durante 5 min. El resto se guarda inmediatamente a -70°C.
- Separar las muestras en gel de poliacrilamida desnaturalizante al 16%. Correr a 27 mA a 7 cm de la interfase de los geles.
- Secar gel en tal equipo por tanto tiempo a tal temperatura. Alternativamente transferir a membrana (PVDF o nitrocelulosa). Exponer a películas para rayos X (Kodak) hasta que se visualice la(s) banda(s).

Geles de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE)

Laemmli SDS-PAGE (116)

TABLA III. Preparación de geles SDS-PAGE (Laemmli) (Gel chico)

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

TABLA IV. Preparación de geles SDS-PAGE para ivTL (Laemmli) (Gel grande)

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

Amortiguador de corrida 5X

Tris-HCl pH 8.3: 0.125 M

Glicina: 1.25 M

SDS: 0.5%

Amortiguador de carga 2X (Amortiguador de Laemmli)

Tris-HCl pH 6.8: 100 mM

Glicerol: 20%

SDS: 4%

Azul de bromofenol: 0.2%

β -mercaptoetanol: 5%

* PMSF: 2 mM (*Solo si es necesario, agregar al momento con SB 1X)

- Para geles chicos correr a 100 V hasta que el frente llegue al final del gel.
- Para geles grandes correr a 28 mA hasta separador, posteriormente subir a 30 mA

Schägger and von Jagow SDS-PAGE (42)

TABLA V. Preparación de geles Schägger and von Jagow (Gel grande)

Componentes	Acrilamida 16%	Acrilamida 4%
Acrilamida 30% Bisacrilamida 0.98%	4.5 ml	1.6 ml
Amortiguador de gel	3 ml	3 ml
Glicerol 80%	950 μ l	-
H ₂ O	-	7.4 μ l
APS 10%	50 μ l	100 μ l
TEMED	5 μ l	10 μ l

Amortiguador de gel

Tris-HCl pH 9.0: 3 M

SDS: 0.3%

Amortiguador de Ánodo

Tris-HCl pH 8.9: 0.2 M

Amortiguador de Cátodo

Tris-HCl pH 8.25: 0.1 M

Tricina: 0.1 M

SDS: 0.1%

Amortiguador de Muestra

Tris-HCl pH 8.8

Glicerol: 30%

SDS: 10%

Azul de bromofenol: 0.3%

β -mercaptoetanol: 5%

Análisis de los complejos proteicos mitocondriales mediante electroforesis nativa azul (BN-PAGE) (117)

TABLA VI. Preparación de geles nativos

Componentes	Acrilamida 4%	Acrilamida 5%	Acrilamida al 13%
Acrilamida 48.5% Bisacrilamida 1.5%	125 μ l	510 μ l	1.34 ml
Amortiguador de gel 3X	500 μ l	1.69 ml	1.69 ml
Glicerol 80%	-	320 μ l	1.28 ml
H₂O	860 μ l	2.5 ml	720 μ l
APS 10%	8 μ l	13.5 μ l	13.5 μ l
TEMED	2.25 μ l	4.9 μ l	4.9 μ l
Volumen total	2.25 ml	9 ml	9 ml

Amortiguador del gel 3X

Bis-tris: 150 mM

Ácido aminocaproico: 1.5 mM

Ajustar pH a 7.0 con HCl

Solubilización de complejos proteicos

- Descongelar en hielo 250 μ g de proteína mitocondrial.
- Resuspender en 250 μ l de amortiguador de lavado.
- Centrifugar por 2 min a 14000 x g a 4°C. Eliminar sobrenadante.
- Centrifugar nuevamente y eliminar sobrenadante que haya quedado.
- Homogenizar las mitocondrias con 45 μ l de amortiguador de muestra con punta cortada.
- Agregar 5 μ l de digitonina al 10% ó dodecil-maltósido al 1%. Subir y bajar para mezclar con la micropipeta.
 - Incubar la digitonina por 30 min en hielo.

- Incubar el dodecil-maltósido por 15 min en hielo.
- Clarificar el lisado centrifugando por 12 min a 14000 x g en centrífuga eppendorf (4°C).
- Rescatar el sobrenadante en un tubo nuevo (~50 µl). Agregar 2.5 µl de la solución de coomassie (amortiguador de muestra + 5% Serva-G).
- Cargar 20 µl de la muestra en el gel (100 µg).
- Correr el gel a 15 mA con el amortiguador del cátodo (coomasie 0.02%) por 30 min (Aproximadamente 1/3 del gel) a 4°C.
- Se cambia el amortiguador de cátodo (coomasie 0.002%) y se corre a 6 mA hasta que se salga el frente del gel (~2hrs).
 - Si se quieren observar proteínas que no migran en complejos de alto peso molecular no hay que dejar que se salga el frente.
- Se transfiere el gel en membrana de PVDF por 2 horas a 1.5 mA/cm².
- Las membranas se lavan con metanol 100% hasta quitar coomasie.
- Se deja secar la membrana por 10 min.
- Lavar con amortiguador de lavado (Western blot) hasta que la membrana se moje.
- Incubar con amortiguador de bloqueo por 1 hr o O/N a 4°C.
- Incubar con anticuerpo primario.
- Realizar 3 lavados de 20 min c/u.
- Incubar con anticuerpo secundario.
- Realizar 3 lavados de 20 min c/u.
- Agregar sustrato a elegir. Revelar.
 - Es importante ser estricto con el bloqueo y lavados en cada incubación con anticuerpo para obtener una bonita figura.

Amortiguador de lavado (50 ml)

- Sorbitol 250 mM
 - Bis-tris 50 mM
- Ajustar pH a 7.0 con HCl

Amortiguador de muestra

- Ácido aminocaproico 750 mM
- Bis-tris 50 mM
- Ajustar el pH a 7.0 con HCl

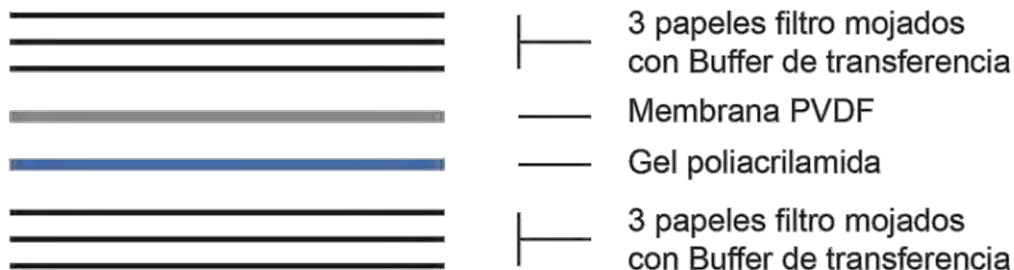
Actividad *in gel* de la CcO (118)

Para la actividad en gel, después de correr las muestras en gel para BN-PAGE, tomar foto del gel con solo coomasie, poner el gel en un recipiente y agregar 50 ml de amortiguador de fosfatos pH 7.4 50 mM.

- Agregar 5 mg de Citocromo c de caballo.
- Agregar 10 mg de 3'-5'-diaminobencidina.
- Incubar en agitación constante a temperatura ambiente por 2 hrs. Tomar foto.
- Si es necesario incubar por otra hora. Tomar foto
- Poner el gel en solución desteñidora. Poner en agitación constante hasta que se destiña, o dejar por O/N en la mesa a temperatura ambiente.
- El gel generalmente se encoje por deshidratación. Se puede agregar H₂O estéril hasta que recupere su tamaño original. Tomar foto.

Western blot

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



- Electrotransferir durante 1.5 – 2 horas a 1.5 mA/cm², cuidando que no exceda los 10 V.
- La membrana se seca mojándola con metanol 100% por 10 seg y dejarla en papel por 10 min.
- Agregar la membrana en solución de lavado en agitación constante hasta que se moje.
 - Si se desea teñir con Ponceau, lavar la membrana con H₂O dos veces por 10 min en agitación constante.
 - Agregar solución de Ponceau por 30 min.
 - Quitar exceso de Ponceau con H₂O.
- Si es necesario, la membrana se bloquea con solución de bloqueo por 1 hr o toda la noche a 4°C.
- Incubar la membrana con la solución de blot, la cual contiene al anticuerpo primario (acoplado o no acoplado a peroxidasa). Incubar 1 hora a temperatura ambiente (Anticuerpos utilizados en este estudio en Apéndice).
- Lavar la membrana en solución de lavado por 10 min, repetir el lavado 2 veces más.
- Incubar si es necesario durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa.
- Lavar la membrana en solución de lavado por 10 min, repetir el lavado 2 veces más.
- Revelar la presencia del anticuerpo unido a la proteína deseado siguiendo las indicaciones kit con el sustrato para revelado: Este estudio se utilizó ECL (Pierce) y Millipore.
- Poner la membrana entre dos acetatos y exponer (Biomax, Kodak) con el tiempo necesario según sea el caso para cada anticuerpo.
- Eliminar el anticuerpo unido a las proteínas de la membrana incubando con la solución de eliminación de anticuerpo por 30 min a 50°C. Lavar 3 veces con buffer de lavado hasta quitar olor a β-mercaptoetanol. Lavar con amortiguador de lavado por 10 min a temperatura ambiente, repetir por tres veces.

- Si es necesario, bloquear nuevamente durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C.
- Repetir los pasos de incubación con anticuerpo si se desea revelar la presencia de una proteína distinta.

Amortiguador de transferencia

Buffer de electroforesis 1X: 80%

Metanol: 20%

Solución de bloqueo

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

Tris-HCl pH 7.6: 50 mM

NaCl: 150 mM

Solución de blot

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

Tris-HCl pH 7.6: 10 mM

NaCl: 100 mM

EDTA pH 8.0: 1 mM

Tween-20: 0.1% ó 1% (v/v)

Anticuerpo: Adicionar según el título de anticuerpo apropiado

Solución de lavado

Tris-HCl pH 7.6: 10 mM

NaCl: 100 mM

EDTA pH 8.0: 1 mM

Tween-20: 0.1% (v/v)

Solución de eliminación

β -mercaptoetanol: 0.7% (v/v)

Tris-HCl pH 6.8: 62.5 mM

SDS: 2%

Generación de anticuerpos contra *Cytb*

Preparación de membranas de mitocondrias de levadura (119)

- Utilizar las levaduras previamente molidas de -70°C
 - Se utilizan 1.4 kg de levadura (Azteca) y se licúa en presencia de N_2 líquido para romper las células y mantenerlas congeladas.
- En vaso de precipitados descongelar las levaduras con agitación constante en baño maría.
- Agregar a las células PMSF 1 mM y cocktail de inhibidores de proteasas (Complete Roche).
- Cuando se disuelvan inmediatamente poner en hielo.
- Pasar a botellas y equilibrar.
- Centrifugar a $2800 \times g$ por 10 min. Recuperar sobrenadante.
- Resuspender el botón en 50 ml de amortiguador DisB frío y adicionar inhibidores de proteasas para levadura (Sigma).
- Centrifugar a $2800 \times g$ por 10 min. Recuperar sobrenadantes (en el botón hay células sin romper).
- Juntar los sobrenadantes recuperados y agregar inhibidores de proteasas.
- Centrifugar a $12000 \times g$ por 30 min. Descartar sobrenadante.
- Resuspender el botón en amortiguador B1 frío.
- Centrifugar a $12000 \times g$ por 30 min. Descartar sobrenadante.
- Resuspender el botón en amortiguador B1 frío.
- Centrifugar a $17500 \times g$ por 30 min. Descartar sobrenadante.
- Resuspender botón en buffer B2 frío.
- Centrifugar a $17500 \times g$ por 30 min. Descartar sobrenadante.
- Resuspender el botón en mínimo volumen de amortiguador B2.
- Agregar glicerol 1:1.
- Agregar inhibidores de proteasa (Sigma) más AEBSF 0.1 mM.

- Homogenizar.
- Guardar a -70°C y cuantificar proteína por método de Lowry.

Amortiguador DisB:

Tris-HCl pH 8.0: 100 mM
Acetato de potasio: 150 mM
MgCl₂: 5 mM
Sorbitol: 250 mM
DTT: 1 mM

Amortiguador B1:

Tris-OAc pH 8.0: 50 mM
Manitol: 400 mM
EDTA pH 8.0: 2 mM

Amortiguador B2:

Tris-OAc pH 8.0: 50 mM
Acetato de potasio: 150 mM
EDTA: 2 mM

Purificación del complejo *bc*₁ de *S. cerevisiae* (119)

- Descongelar las membranas mitocondriales y diluir con amortiguador B3 (30 mg/ml).
- Equilibrar la columna DEAE-Biogel A con amortiguador B4 (10 volúmenes)
- Resuspender en amortiguador B3 las membranas (10 mg/ml) agregando inhibidores de proteasas.
- Añadir dodecil-maltósido con una relación 0.8:1 (detergente/proteína). Incubar en agitación suave por 45 min a 4°C con barra magnética.
- Centrifugar a $100000 \times g$ por 90 min. Quitar de la superficie del sobrenadante los lípidos que queden con una servitoalla. Recuperar el sobrenadante con punta limpia.

- Agitar suavemente el sobrenadante a 4°C por 1 hr con barra magnética.
- Agregar la mezcla en la columna DEAE-Biogel ya equilibrada. Checar que el pH saliente sea el mismo que el anterior.
- Lavar con 4 volúmenes de amortiguador B4.
- Programar un gradiente de amortiguador B4/B5 (6 volúmenes). Recuperar fracciones de 1 ml.
- Lavar con 4 volúmenes de B5.
- Determinar la densidad óptica de los tubos a 280 y 415 nm por espectrofotometría, y concentrar las fracciones.
- Checar por espectrometría qué fracción contiene el pico de absorción de 550nm y 560nm correspondientes a citocromo *b* y *c* respectivamente. Concentrar las fracciones con Amicon. Agregar glicerol en relación 1:1 y conservar a -20°C

Amortiguador B3:

Tris-HCl pH 8.0: 50 mM

MgSO₄: 1 mM

Amortiguador B4:

Tris-HCl pH 8.0: 50 mM

NaCl: 100 mM

Sorbitol: 1 mM

Dodecil-maltósido: 0.1 mg/ml (Agregar cuando se vaya a usar el buffer)

Amortiguador B5:

Tris-HCl pH 8.0: 50 mM

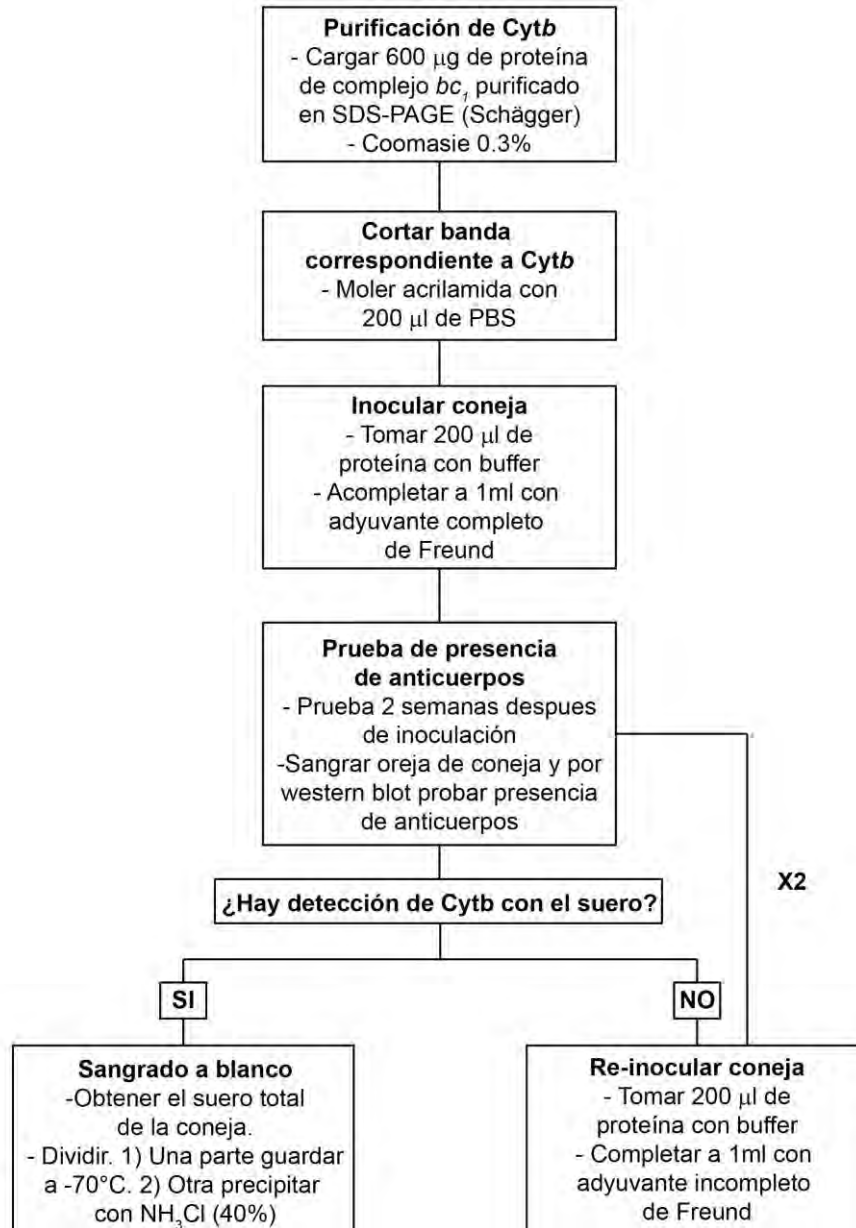
NaCl: 300 mM

MgSO₄: 1 mM

Dodecil-maltósido: 0.1 mg/ml (Agregar cuando se vaya a usar el buffer)

Generación de anticuerpos α -Cytb

Para la generación de anticuerpo se realizaron los pasos esquematizados en el diagrama de flujo. En este trabajo se obtuvieron anticuerpos contra Cytb después de la primera inoculación al conejo.



Espectros de hemocromos mitocondriales (120)

- Tomar 1.5 mg de proteína total de mitocondrias aisladas (tratar de que las mitocondrias tengan la menor cantidad de grasa posible, esto se evita aumentando al doble la albumina durante la extracción y haciendo un lavado suave a las mitocondrias con amortiguador SEH).
- Completar el volúmen de las mitocondrias con amortiguador de fosfatos pH 6.6 a 1 ml de volumen total.
- Leer con el espectrofotómetro un intervalo de 450-700 nm (este espectro corresponde al estado oxidado).
- Agregar a las mitocondrias 1 mg de ditionita (estado reducido), repetir lectura en el espectrofotómetro.
- Hacer la resta de absorbancias del estado reducido menos el oxidado.

Cuantificación de hemo *b* por HPLC (121,122)

Extracción de hemos totales

- A partir de mitocondrias purificadas por gradiente de Nycodenz, tomar 750 μ g de proteína total.
- Centrifugar a 16100 $\times g$ por 5 min. Descartar sobrenadante.
- Agregar 300 μ l de solución de extracción.
- Incubar a temperatura ambiente por 5 min.
- Centrifugar a 16100 $\times g$ por 5 min. Recuperar sobrenadante.
- Agregar 300 μ l de Solución A/B 1:1
- Centrifugar a 16100 $\times g$ por 5 min. Recuperar sobrenadante.
- Inyectar la muestra al HPLC.

Condiciones HPLC

Columna a utilizar: 250- μ m SunFire C₁₈ 5-mm

- Calibrar columna con solución A/B (50%/50%) por 5 min con una velocidad de flujo de 1 ml/min.
- Inyectar la muestra.

- Condición de corrida: Gradiente del 0-100% de solución A→B.
- Calcular el área bajo la curva del pico correspondiente a *b*.

Solución A:

Ácido trifluoroacético (SIGMA): 1%

Solución B:

Acetonitrilo (JT Baker): 100%

Ácido trifluoroacético: 1%

APÉNDICE

Oligonucleótidos utilizados en este estudio

Tabla III. Oligonucleótidos utilizados en este estudio.

Oligonucleótidos para generar cassettes	
Cbp3Fw1	AAGAACGCAACTAGAAACAAA
Cbp3Rv1	GTGGGTTAGATTCCACTGGAAAAC
Cbp6Fw2	ACGTATTGCAAGATATGATTATGTACTG
Cbp6Rv2	AGTGTCCAATACAATGGAAAATCCACCG
Cbp4Fw1	CCGAAGTGTTTTATACTTTTTGTTC
Cbp4Rv1	CGTTTTGACAACCTGGTACTTCCC
Qcr7Fw2	AATGCGGTTTCCCAACACAGCAGG
Qcr7Rv2	TAAGATATATAGACCACTCGATACC
Qcr8Fw1	ACGTGACTAGTCCAAGGATTTTTTTTA
Qcr8Rv1	AATAGGTTGAGGAAAATTGCA
Qcr10Fw1	AACGCTGTGCACTTTGAATA
Qcr10Rv1	GCTCAAAAGATACATAAAAAGAGGA
Cbs1Fw1	CAAGAGTTTGTAGGGAAGGAAAACAG
Cbs1Rv1	ACTAAGTGGCAACTACTCGACTGCG
Smt1Fw1	GCTCTAGAAAGTTGAGAACCCGTAGTGTCATAGC
Smt1Rv1	TTCTGCAGAGAAGCGTTCACATCACGACGATGAAG
Oligonucleótidos para generar la construcción <i>CBP3-HA</i>	
Cbp3Fw2	ACGCGTCGACCGAGAGGATGAAGAACGCAACTAG
Cbp3Rv2	CCCAAGCTTTCCTTATCGGTGGGTTAGATTCCAC
Cbp3HAFw1	GGCTACCCATACGATGTTCTGACTATGCGTAAACGAGCTAGTTTGTAACCTC AAAAC
Cbp3HARv1	TTACGCATAGTCAGGAACATCGTATGGGTAGCCGTTTGTATATGACAGCCTA CTTCTC
Oligonucleótidos para generar la construcción <i>COB(1-385)::pARG8^m</i>	
CobFw8	GTACCTGAATGATACTTATTA
CobRv8	ATGATAAATATCTTTTGAACATTTTATTAACCTCTACCGATA
Arg8EHW4	ATGTTCAAAGATATTTATC
Arg8EcoRIRv	CCGGAATTCAGCACCCATTGTTCTACCATGGGA
SHArg8-3	CAGCTGGTATTGCTGT
Cob3UTREcoRIRv2	CCGGAATTCATATTTATATTAATGAGTA
Oligonucleótidos para generar la construcción <i>cobΔ::pARG8^m</i>	
CobFw19	CCGCTCGAGATATAATAAAATATGTATATATAATAAAAAAATAG
CobRv4-2	CTAGATATCCCTTGCGGGTTCCGGCTTCCGTG

*Oligos anotados en dirección 5'→3'

Anticuerpos utilizados en este estudio

Tabla IV. Anticuerpos utilizados en este estudio.

Anticuerpo	Fuente	Dilución
anti-Cy t b	Este estudio	1:10000
anti-Qcr7	Vicenzo Zara	1:10000
anti-Qcr8	Vicenzo Zara	1:10000
anti-Cor1	Vicenzo Zara	1:10000
anti-Cor2	Vicenzo Zara	1:10000
anti-Cytc1	Vicenzo Zara	1:10000
anti-Rip1	Vicenzo Zara	1:10000
anti-Qcr10	Vicenzo Zara	1:10000
anti-Por1	Dennis R. Winge	1:10000
anti-Rip1	Rosemary Stuart	1:10000
anti-Cytc1	Rosemary Stuart	1:10000
anti-MrpL54	Rosemary Stuart	1:10000
anti-Mrp120	Rosemary Stuart	1:20000
anti-Citrato sintasa	Thomas D. Fox	1:1000

Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este estudio

Tabla V. Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este estudio.

Cepa	Genotipo nuclear (mitochondrial)	Referencia/Fuente
NB40-36a	<i>Mata</i> , <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>Mata</i> α , D273-10B (ρ^+)	(28)
BY4742	<i>Mata</i> α , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , BY4742 (ρ^+)	YKO Matx Strain Collection – Glycerol Stocks (Open Biosystems)
BY4741	<i>Mata</i> , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>met15-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , BY4741 (ρ^+)	YKO Matx Strain Collection – Glycerol Stocks (Open Biosystems)
DAU1	<i>Mata</i> α , <i>ade2</i> , <i>ura3Δ</i> , D273-10b (ρ^+)	(123)
$\Delta qcr7$	<i>Mata</i> α , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>qcr7::KANMX4</i> , BY4742 (ρ^+)	YKO Matx Strain Collection – Glycerol Stocks (Open Biosystems)
$\Delta qcr10$	<i>Mata</i> α , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>qcr10::KANMX4</i> , BY4742 (ρ^+)	YKO Matx Strain Collection – Glycerol Stocks (Open Biosystems)
$\Delta cbp4$	<i>Mata</i> α , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>cbp4::KANMX4</i> , BY4742 (ρ^+)	YKO Matx Strain Collection – Glycerol Stocks (Open Biosystems)
$\Delta smt1$	<i>Mata</i> α , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>smt1::KANMX4</i> , BY4742 (ρ^+)	YKO Matx Strain Collection – Glycerol Stocks (Open Biosystems)
$\Delta cbp3$	<i>Mata</i> , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>met15-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>cbp3::KANMX4</i> , BY4741 (ρ^+)	YKO Matx Strain Collection – Glycerol Stocks (Open Biosystems)
AGG24	<i>Mata</i> α , <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3,112</i> , D273-10B (ρ^+ , BY4742 mtDNA ^a)	Este estudio
AGG25	<i>Mata</i> α , <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>cbp3::KANMX4</i> , D273-10B (ρ^+ , BY4742 mtDNA)	Este estudio
AGG28	<i>Mata</i> α , <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>cbp4::KANMX4</i> , D273-10B (ρ^+ , BY4742 mtDNA)	Este estudio
AGG29	<i>Mata</i> α , <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>qcr7::KANMX4</i> , D273-10B (ρ^+ , BY4742 mtDNA)	Este estudio
AGG30	<i>Mata</i> α , <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>qcr10::KANMX4</i> , D273-10B (ρ^+ , BY4742 mtDNA)	Este estudio
AGG33	<i>Mata</i> α , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>arg8::URA3</i> , BY4742 (ρ^+ , $\Delta\Sigma ai^b$, COB(1-352)::pARG8 ^m)	Este estudio
AGG34	<i>Mata</i> α , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>arg8::URA3</i> , <i>qcr7::KANMX4</i> , BY4742 (ρ^+ , $\Delta\Sigma ai$, COB(1-352)::pARG8 ^m)	Este estudio
AGG35	<i>Mata</i> α , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>arg8::URA3</i> , <i>qcr8::KANMX4</i> , BY4742 (ρ^+ , $\Delta\Sigma ai$, COB(1-352)::pARG8 ^m)	Este estudio
AGG36	<i>Mata</i> α , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>arg8::URA3</i> , <i>cbp3::KANMX4</i> , BY4742 (ρ^+ , $\Delta\Sigma ai$, COB(1-	Este estudio

	352)::pARG8 ^m)	
AGG37	<i>Mata</i> , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>arg8::URA3</i> , <i>cbp4::KANMX4</i> , BY4742 (ρ^+ , $\Delta\Sigma ai$, COB(1-352)::pARG8 ^m)	Este estudio
AGG38	<i>Mata</i> , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>arg8::URA3</i> , BY4742 (ρ^+ , NB40-36a mtDNA)	Este estudio
AGG39	<i>Mata</i> , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>arg8::URA3</i> , <i>qcr7::KANMX4</i> , BY4742 (ρ^+ , NB40-36 mtDNA)	Este estudio
AGG40	<i>Mata</i> , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>arg8::URA3</i> , <i>qcr10::KANMX4</i> , BY4742 (ρ^+ , NB40-36 mtDNA)	Este estudio
AGG41	<i>Mata</i> , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>arg8::URA3</i> , <i>cbp3::KANX4</i> , BY4742 (ρ^+ , NB40-36 mtDNA)	Este estudio
AGG42	<i>Mata</i> , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>arg8::URA3</i> , <i>cbp6::LEU2</i> , BY4742 (ρ^+ , NB40-36 mtDNA)	Este estudio
AGG43	<i>Mata</i> , <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>qcr7::KANMX4</i> , D273-10B (ρ^+)	Este estudio
AGG46	<i>Mata</i> , <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>cbp3::KANMX4</i> , D273-10B (ρ^+)	Este estudio
AGG47	<i>Mata</i> , <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>cbp4::KANMX4</i> , D273-10B (ρ^+)	Este estudio
AGG48	<i>Mata</i> , <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3,112</i> , D273-10B (ρ^+ , $\Delta\Sigma ai$, COB(1-352)::pARG8 ^m)	Este estudio
AGG56	<i>Mata</i> , <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>cbp6::LEU2</i> , D273-10B (ρ^+)	Este estudio
AGG57	<i>Mata</i> , <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>cbp6::LEU2</i> , D273-10B (ρ^+ , BY4742 mtDNA)	Este estudio
AGG58	<i>Mata</i> , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>cbp3::KANMX4</i> , BY4742 (ρ^+)	Este estudio
AGG59	<i>Mata</i> , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>cbp6::LEU2</i> , BY4742 (ρ^+)	Este estudio
AGG60	<i>Mata</i> , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>arg8::URA3</i> , <i>cbp4::KANMX4</i> , BY4742 (ρ^+ , NB40-36a mtDNA)	Este estudio
AGG61	<i>Mata</i> <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>cbp3::KANMX4</i> , <i>cbp6::LEU2</i> , D273-10B (ρ^+)	Este estudio
AGG62	<i>Mata</i> , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>lys2-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> , <i>arg8::URA3</i> , <i>cbp6::LEU2</i> , BY4742 (ρ^+ , $\Delta\Sigma ai$, COB(1-352)::pARG8 ^m)	Este estudio
AGG63	<i>Mata</i> , <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>qcr7::KANMX4</i> , D273-10B (ρ^+ , $\Delta\Sigma ai$, COB(1-352)::pARG8 ^m)	Este estudio
AGG65	<i>Mata</i> , <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>cbp3::KANMX4</i> , D273-10B (ρ^+ , $\Delta\Sigma ai$, COB(1-352)::pARG8 ^m)	Este estudio
AGG66	<i>Mata</i> , <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>cbp6::LEU2</i> , D273-10B (ρ^+ , $\Delta\Sigma ai$, COB(1-352)::pARG8 ^m)	Este estudio
AGG67	<i>Mata</i> , <i>lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>cbp4::KANMX4</i> , D273-10B (ρ^+ , $\Delta\Sigma ai$, COB(1-352)::pARG8 ^m)	Este estudio
AGG68	<i>Mata</i> , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>met15-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> <i>qcr7::KANMX4</i> , BY4741 (ρ^+)	Este estudio
AGG69	<i>Mata</i> , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>met15-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> <i>cbp6::LEU2</i> , BY4741 (ρ^+)	Este estudio
AGG70	<i>Mata</i> , <i>his3-delta1</i> , <i>leu2-delta0</i> , <i>met15-delta0</i> , <i>ura3-delta0</i> <i>cbp4::KANMX4</i> , BY4741 (ρ^+)	Este estudio
AGG71	<i>Mata</i> / <i>a</i> ^f , <i>lys2</i> ^{+/-c} , <i>arg8::hisG</i> ^{+/-} , <i>ura3-52/ura3-delta0</i> , <i>leu2-3,112/leu2-delta0</i> , <i>met15-delta0</i> ^{+/-} , <i>his-delta1</i> ^{+/-} , D273-	Este estudio

	10b/BY4741 (ρ^+)	
AGG72	<i>Mata/a^f, lys2^{+/-}, arg8::hisG^{+/-}, ura3-52/ura3-delta0, leu2-3,112/leu2-delta0, met15-delta0^{+/-}, his-delta1^{+/-}, qcr7::KANMX4^{+/-}, D273-10b/BY4741 (ρ^+)</i>	Este estudio
AGG73	<i>Mata/a^f, lys2^{+/-}, arg8::hisG^{+/-}, ura3-52/ura3-delta0, leu2-3,112/leu2-delta0, met15-delta0^{+/-}, his-delta1^{+/-}, cbp6::LEU2^{+/-}, D273-10b/BY4741 (ρ^+)</i>	Este estudio
AGG74	<i>Mata/a^f, lys2^{+/-}, arg8::hisG^{+/-}, ura3-52/ura3-delta0, leu2-3,112/leu2-delta0, met15-delta0^{+/-}, his-delta1^{+/-}, cbp4::KANMX4^{+/-}, D273-10b/BY4741 (ρ^+)</i>	Este estudio
AGG75	<i>Mataα, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3,112, cbs1::URA3, D273-10B (ρ^+, $\Delta\Sigma$ai, COB(1-352)::pARG8^m)</i>	Este estudio
AGG76	<i>Mataα, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, arg8::URA3, cbs1::HIS3MX6, BY4742 (ρ^+, $\Delta\Sigma$ai, COB(1-352)::pARG8^m)</i>	Este estudio
AGG77	<i>Mataα, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, cbs1::URA3, BY4742 (ρ^+)</i>	Este estudio
AGG78	<i>Mataα, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3,112, cbs1::URA3, D273-10B (ρ^+)</i>	Este estudio
AGG87	<i>Mata/a^f, lys2^{+/-}, arg8::hisG^{+/-}, ura3-52/ura3-delta0, leu2-3,112/leu2-delta0, met15-delta0^{+/-}, his-delta1^{+/-}, cbp3::KANMX4^{+/-}, D273-10b/BY4741 (ρ^+)</i>	Este estudio
AGG89	<i>Mataα, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, smt1::KANMX4, cbp6::LEU2, BY4742 (ρ^+)</i>	Este estudio
AGG91	<i>Mataα, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, arg8::URA3, smt1::KANMX4, BY4742 (ρ^+, $\Delta\Sigma$ai, COB(1-352)::pARG8^m)</i>	Este estudio
AGG92	<i>Mataα, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, arg8::URA3, smt1::KANMX4, cbp6::LEU2, BY4742 (ρ^+, $\Delta\Sigma$ai, COB(1-352)::pARG8^m)</i>	Este estudio
AGG93	<i>Mataα, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, arg8::URA3, qcr7::KANMX4, BY4742 (ρ^+, $\Delta\Sigma$ai, cobΔ::ARG8^m)</i>	Este estudio
AGG95	<i>Mataα, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, arg8::URA3, cbp4::KANMX4, BY4742 (ρ^+, $\Delta\Sigma$ai, cobΔ::ARG8^m)</i>	Este estudio
AGG96	<i>Mataα, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, arg8::URA3, cbp3::KANMX4, BY4742 (ρ^+, $\Delta\Sigma$ai, cobΔ::ARG8^m)</i>	Este estudio
AGG97	<i>Mataα, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3,112, qcr7::KANMX4, D273-10B (ρ^+, $\Delta\Sigma$ai, cobΔ::ARG8^m)</i>	Este estudio
AGG99	<i>Mataα, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3,112, cbp4::KANMX4, D273-10B (ρ^+, $\Delta\Sigma$ai, cobΔ::ARG8^m)</i>	Este estudio
AGG100	<i>Mataα, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3,112, cbp3::KANMX4, D273-10B (ρ^+, $\Delta\Sigma$ai, cobΔ::ARG8^m)</i>	Este estudio
AGG101	<i>Mataα, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3,112, pet309::URA3, cpb6::LEU2, D273-10B^a (ρ^+)</i>	Este estudio
AGG102	<i>Mataα/Mata, lys2^{+/-}, arg8::hisG^{+/-}, ura3-52^{+/-}, leu2-3,112^{+/-}, ade2^{+/-}, his3-11,15^{+/-}, trp1-1^{+/-}, ura3-1^{+/-}, cbp3::KANMX4^{+/-}, D273-10B/W303 (ρ^+, $\Delta\Sigma$ai, COB(1-352)::pARG8^m)</i>	Este estudio
DFM2	<i>Mataα, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, arg8::URA3, BY4742 (ρ^+, $\Delta\Sigma$ai^d, cobΔ::ARG8^m)</i>	Tesis maestría Daniel Flores-Mireles
DFM5	<i>Mataα, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3,112, D273-10B (ρ^+, $\Delta\Sigma$ai, cobΔ::ARG8^m)</i>	Tesis maestría Daniel Flores-Mireles

YC140	<i>Matα, ade2, ura3-delta, MSS51-3XHA, pet309::URA3, D273-10b (ρ^+, cox1-delta)</i>	Este estudio
YC166	<i>Matα, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3,112, cbs1::URA3, D273-10B (ρ^+, $\Delta\Sigma$ai, cobΔ::ARG8^m)</i>	Este estudio
YC173	<i>Matα, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, arg8::URA3, cbp6::LEU2, BY4742 (ρ^+, $\Delta\Sigma$ai, cobΔ::ARG8^m)</i>	Este estudio
YC174	<i>Matα, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3,112, cbp6::LEU2, D273-10B (ρ^+, $\Delta\Sigma$ai, cobΔ::ARG8^m)</i>	Este estudio
YC175	<i>Matα, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, arg8::URA3, cbs1::HIS3MX6, BY4742 (ρ^+, $\Delta\Sigma$ai, cobΔ::ARG8^m)</i>	Este estudio

BIBLIOGRAFÍA

1. Zara, V., Conte, L., and Trumpower, B. L. (2009) Biogenesis of the yeast cytochrome bc1 complex. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 89-96
2. Zara, V., Palmisano, I., Conte, L., and Trumpower, B. L. (2004) Further insights into the assembly of the yeast cytochrome bc1 complex based on analysis of single and double deletion mutants lacking supernumerary subunits and cytochrome b. *Eur J Biochem* **271**, 1209-1218
3. Wu, M., and Tzagoloff, A. (1989) Identification and characterization of a new gene (CBP3) required for the expression of yeast coenzyme QH₂-cytochrome c reductase. *J Biol Chem* **264**, 11122-11130
4. Dieckmann, C. L., and Tzagoloff, A. (1985) Assembly of the mitochondrial membrane system. CBP6, a yeast nuclear gene necessary for synthesis of cytochrome b. *J Biol Chem* **260**, 1513-1520
5. Crivellone, M. D. (1994) Characterization of CBP4, a new gene essential for the expression of ubiquinol-cytochrome c reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **269**, 21284-21292
6. Gruschke, S., Kehrein, K., Rompler, K., Grone, K., Israel, L., Imhof, A., Herrmann, J. M., and Ott, M. (2011) Cbp3-Cbp6 interacts with the yeast mitochondrial ribosomal tunnel exit and promotes cytochrome b synthesis and assembly. *J Cell Biol* **193**, 1101-1114
7. Gruschke, S., Rompler, K., Hildenbeutel, M., Kehrein, K., Kuhl, I., Bonnefoy, N., and Ott, M. (2012) The Cbp3-Cbp6 complex coordinates cytochrome b synthesis with bc(1) complex assembly in yeast mitochondria. *J Cell Biol* **199**, 137-150
8. Hildenbeutel, M., Hegg, E. L., Stephan, K., Gruschke, S., Meunier, B., and Ott, M. (2014) Assembly factors monitor sequential hemylation of cytochrome b to regulate mitochondrial translation. *J Cell Biol* **205**, 511-524
9. Nelson, D. (2005) *Lehninger: Principles of Biochemistry*, Fourth ed., W.H. Freeman and Company
10. Reichert, A. S., and Neupert, W. (2002) Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria-role in protein transport. *Biochim Biophys Acta* **1592**, 41-49
11. Cogliati, S., Frezza, C., Soriano, M. E., Varanita, T., Quintana-Cabrera, R., Corrado, M., Cipolat, S., Costa, V., Casarin, A., Gomes, L. C., Perales-Clemente, E., Salviati, L., Fernandez-Silva, P., Enriquez, J. A., and Scorrano, L. (2013) Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell* **155**, 160-171
12. Nunnari, J., and Suomalainen, A. (2012) Mitochondria: in sickness and in health. *Cell* **148**, 1145-1159
13. van Vliet, A. R., Verfaillie, T., and Agostinis, P. (2014) New functions of mitochondria associated membranes in cellular signaling. *Biochim Biophys Acta* **1843**, 2253-2262
14. West, A. P., Shadel, G. S., and Ghosh, S. (2011) Mitochondria in innate immune responses. *Nat Rev Immunol* **11**, 389-402
15. Pernas, L., and Scorrano, L. (2016) Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function. *Annu Rev Physiol* **78**, 505-531
16. Burke, D., Dawson, D., and Stearns, T. (2000) Methods in yeast genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*
17. Foury, F., and Kucej, M. (2002) Yeast mitochondrial biogenesis: a model system for humans? *Curr Opin Chem Biol* **6**, 106-111
18. Noda, N. N., and Inagaki, F. Mechanisms of Autophagy. *Annu Rev Biophys* **44**, 101-122
19. Merz, S., and Westermann, B. (2009) Genome-wide deletion mutant analysis reveals genes required for respiratory growth, mitochondrial genome maintenance and mitochondrial protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biol* **10**, R95

20. 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**, 286-294
21. Kitakawa, M., and Isono, K. (1991) The mitochondrial ribosomes. *Biochimie* **73**, 813-825
22. Bauerschmitt, H., Mick, D. U., Deckers, M., Vollmer, C., Funes, S., Kehrein, K., Ott, M., Rehling, P., and Herrmann, J. M. (2010) Ribosome-binding proteins Mdm38 and Mba1 display overlapping functions for regulation of mitochondrial translation. *Mol Biol Cell* **21**, 1937-1944
23. Jia, L., Dienhart, M., Schramp, M., McCauley, M., Hell, K., and Stuart, R. A. (2003) Yeast Oxa1 interacts with mitochondrial ribosomes: the importance of the C-terminal region of Oxa1. *EMBO J* **22**, 6438-6447
24. Fox, T. D. (1996) Translational control of endogenous and recoded nuclear genes in yeast mitochondria: regulation and membrane targeting. *Experientia* **52**, 1130-1135
25. Rodel, G. (1986) Two yeast nuclear genes, CBS1 and CBS2, are required for translation of mitochondrial transcripts bearing the 5'-untranslated COB leader. *Curr Genet* **11**, 41-45
26. Islas-Osuna, M. A., Ellis, T. P., Marnell, L. L., Mittelmeier, T. M., and Dieckmann, C. L. (2002) Cbp1 is required for translation of the mitochondrial cytochrome b mRNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**, 37987-37990
27. 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
28. 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
29. Mayorga, J. P., Camacho-Villasana, Y., Shingu-Vazquez, M., Garcia-Villegas, R., Zamudio-Ochoa, A., Garcia-Guerrero, A. E., Hernandez, G., and Perez-Martinez, X. (2016) A Novel Function of Pet54 in Regulation of Cox1 Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondria. *J Biol Chem* **291**, 9343-9355
30. 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
31. 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
32. Haffter, P., and Fox, T. D. (1992) Suppression of carboxy-terminal truncations of the yeast mitochondrial mRNA-specific translational activator PET122 by mutations in two new genes, MRP17 and PET127. *Mol Gen Genet* **235**, 64-73
33. Helfenbein, K. G., Ellis, T. P., Dieckmann, C. L., and Tzagoloff, A. (2003) ATP22, a nuclear gene required for expression of the F0 sector of mitochondrial ATPase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **278**, 19751-19756
34. Rak, M., Su, C. H., Xu, J. T., Azpiroz, R., Singh, A. M., and Tzagoloff, A. (2016) Regulation of mitochondrial translation of the ATP8/ATP6 mRNA by Smt1p. *Mol Biol Cell* **27**, 919-929
35. Ackerman, S. H., Gatti, D. L., Gellefors, P., Douglas, M. G., and Tzagoloff, A. (1991) ATP13, a nuclear gene of *Saccharomyces cerevisiae* essential for the expression of subunit 9 of the mitochondrial ATPase. *FEBS Lett* **278**, 234-238
36. Payne, M. J., Schweizer, E., and Lukins, H. B. (1991) Properties of two nuclear pet mutants affecting expression of the mitochondrial oli1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **19**, 343-351
37. Zamudio-Ochoa, A., Camacho-Villasana, Y., Garcia-Guerrero, A. E., and Perez-Martinez, X. (2014) The Pet309 pentatricopeptide repeat motifs mediate efficient binding to the mitochondrial COX1 transcript in yeast. *RNA Biol* **11**, 953-967

38. Maleszka, R., Skelly, P. J., and Clark-Walker, G. D. (1991) Rolling circle replication of DNA in yeast mitochondria. *EMBO J* **10**, 3923-3929
39. Williamson, D. (2002) The curious history of yeast mitochondrial DNA. *Nat Rev Genet* **3**, 475-481
40. Costanzo, M. C., and Fox, T. D. (1990) Control of mitochondrial gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* **24**, 91-113
41. Jacobs, H. T. (2001) Making mitochondrial mutants. *Trends Genet* **17**, 653-660
42. Schagger, H., Aquila, H., and Von Jagow, G. (1988) Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis. *Anal Biochem* **173**, 201-205
43. Schagger, H., and Pfeiffer, K. (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J* **19**, 1777-1783
44. Mileykovskaya, E., Penczek, P. A., Fang, J., Mallampalli, V. K., Sparagna, G. C., and Dowhan, W. (2012) Arrangement of the respiratory chain complexes in *Saccharomyces cerevisiae* supercomplex III₂IV₂ revealed by single particle cryo-electron microscopy. *J Biol Chem* **287**, 23095-23103
45. Acin-Perez, R., Fernandez-Silva, P., Peleato, M. L., Perez-Martos, A., and Enriquez, J. A. (2008) Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell* **32**, 529-539
46. Boumans, H., Grivell, L. A., and Berden, J. A. (1998) The respiratory chain in yeast behaves as a single functional unit. *J Biol Chem* **273**, 4872-4877
47. Eubel, H., Heinemeyer, J., Sunderhaus, S., and Braun, H. P. (2004) Respiratory chain supercomplexes in plant mitochondria. *Plant Physiol Biochem* **42**, 937-942
48. Stroh, A., Anderka, O., Pfeiffer, K., Yagi, T., Finel, M., Ludwig, B., and Schagger, H. (2004) Assembly of respiratory complexes I, III, and IV into NADH oxidase supercomplex stabilizes complex I in *Paracoccus denitrificans*. *J Biol Chem* **279**, 5000-5007
49. Cruciat, C. M., Brunner, S., Baumann, F., Neupert, W., and Stuart, R. A. (2000) The cytochrome bc₁ and cytochrome c oxidase complexes associate to form a single supracomplex in yeast mitochondria. *J Biol Chem* **275**, 18093-18098
50. Chen, Y. C., Taylor, E. B., Dephoure, N., Heo, J. M., Tonhato, A., Papandreou, I., Nath, N., Denko, N. C., Gygi, S. P., and Rutter, J. (2012) Identification of a protein mediating respiratory supercomplex stability. *Cell Metab* **15**, 348-360
51. Strogolova, V., Furness, A., Robb-McGrath, M., Garlich, J., and Stuart, R. A. (2012) Rcf1 and Rcf2, members of the hypoxia-induced gene 1 protein family, are critical components of the mitochondrial cytochrome bc₁-cytochrome c oxidase supercomplex. *Mol Cell Biol* **32**, 1363-1373
52. Rydstrom Lundin, C., von Ballmoos, C., Ott, M., Adelroth, P., and Brzezinski, P. (2016) Regulatory role of the respiratory supercomplex factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E4476-4485
53. Vukotic, M., Oeljeklaus, S., Wiese, S., Vogtle, F. N., Meisinger, C., Meyer, H. E., Zieseniss, A., Katschinski, D. M., Jans, D. C., Jakobs, S., Warscheid, B., Rehling, P., and Deckers, M. (2012) Rcf1 mediates cytochrome oxidase assembly and respirasome formation, revealing heterogeneity of the enzyme complex. *Cell Metab* **15**, 336-347
54. Rompler, K., Muller, T., Juris, L., Wissel, M., Vukotic, M., Hofmann, K., and Deckers, M. (2016) Overlapping Role of Respiratory Supercomplex Factor Rcf2 and Its N-terminal Homolog Rcf3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **291**, 23769-23778
55. Singhal, R. K., Kruse, C., Heidler, J., Strecker, V., Zwicker, K., Dusterwald, L., Westermann, B., Herrmann, J. M., Wittig, I., and Rapaport, D. (2017) Coi1 is a novel assembly factor of the yeast complex III-complex IV supercomplex. *Mol Biol Cell*

56. Strecker, V., Kadeer, Z., Heidler, J., Cruciat, C. M., Angerer, H., Giese, H., Pfeiffer, K., Stuart, R. A., and Wittig, I. (2016) Supercomplex-associated Cox26 protein binds to cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta* **1863**, 1643-1652
57. Bohovych, I., Fernandez, M. R., Rahn, J. J., Stackley, K. D., Bestman, J. E., Anandhan, A., Franco, R., Claypool, S. M., Lewis, R. E., Chan, S. S., and Khalimonchuk, O. (2015) Metalloprotease OMA1 Fine-tunes Mitochondrial Bioenergetic Function and Respiratory Supercomplex Stability. *Sci Rep* **5**, 13989
58. Mileykovskaya, E., and Dowhan, W. (2014) Cardiolipin-dependent formation of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Chem Phys Lipids* **179**, 42-48
59. Schlame, M., and Ren, M. (2006) Barth syndrome, a human disorder of cardiolipin metabolism. *FEBS Lett* **580**, 5450-5455
60. Bultema, J. B., Braun, H. P., Boekema, E. J., and Kouril, R. (2009) Megacomplex organization of the oxidative phosphorylation system by structural analysis of respiratory supercomplexes from potato. *Biochim Biophys Acta* **1787**, 60-67
61. Bottinger, L., Horvath, S. E., Kleinschroth, T., Hunte, C., Daum, G., Pfanner, N., and Becker, T. (2012) Phosphatidylethanolamine and cardiolipin differentially affect the stability of mitochondrial respiratory chain supercomplexes. *J Mol Biol* **423**, 677-686
62. Ott, M., Amunts, A., and Brown, A. (2016) Organization and Regulation of Mitochondrial Protein Synthesis. *Annu Rev Biochem* **85**, 77-101
63. Crivellone, M. D., Wu, M. A., and Tzagoloff, A. (1988) Assembly of the mitochondrial membrane system. Analysis of structural mutants of the yeast coenzyme QH₂-cytochrome c reductase complex. *J Biol Chem* **263**, 14323-14333
64. Conte, A., Papa, B., Ferramosca, A., and Zara, V. (2015) The dimerization of the yeast cytochrome bc₁ complex is an early event and is independent of Rip1. *Biochim Biophys Acta* **1853**, 987-995
65. Atkinson, A., Smith, P., Fox, J. L., Cui, T. Z., Khalimonchuk, O., and Winge, D. R. (2011) The LYR protein Mzm1 functions in the insertion of the Rieske Fe/S protein in yeast mitochondria. *Mol Cell Biol* **31**, 3988-3996
66. Nobrega, F. G., Nobrega, M. P., and Tzagoloff, A. (1992) BCS1, a novel gene required for the expression of functional Rieske iron-sulfur protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **11**, 3821-3829
67. Cui, T. Z., Smith, P. M., Fox, J. L., Khalimonchuk, O., and Winge, D. R. (2012) Late-stage maturation of the Rieske Fe/S protein: Mzm1 stabilizes Rip1 but does not facilitate its translocation by the AAA ATPase Bcs1. *Mol Cell Biol* **32**, 4400-4409
68. Fekete, Z., Ellis, T. P., Schonauer, M. S., and Dieckmann, C. L. (2008) Pet127 governs a 5' → 3'-exonuclease important in maturation of apocytochrome b mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **283**, 3767-3772
69. Dieckmann, C. L., Koerner, T. J., and Tzagoloff, A. (1984) Assembly of the mitochondrial membrane system. CBP1, a yeast nuclear gene involved in 5' end processing of cytochrome b pre-mRNA. *J Biol Chem* **259**, 4722-4731
70. Henke, R. M., Butow, R. A., and Perlman, P. S. (1995) Maturase and endonuclease functions depend on separate conserved domains of the bifunctional protein encoded by the group I intron at4 alpha of yeast mitochondrial DNA. *EMBO J* **14**, 5094-5099
71. Dieckmann, C. L., and Staples, R. R. (1994) Regulation of mitochondrial gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int Rev Cytol* **152**, 145-181
72. Sherman, F. (2002) Getting started with yeast. *Methods Enzymol* **350**, 3-41
73. Schacherer, J., Ruderfer, D. M., Gresham, D., Dolinski, K., Botstein, D., and Kruglyak, L. (2007) Genome-wide analysis of nucleotide-level variation in commonly used *Saccharomyces cerevisiae* strains. *PLoS One* **2**, e322

74. Young, M. J., and Court, D. A. (2008) Effects of the S288c genetic background and common auxotrophic markers on mitochondrial DNA function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **25**, 903-912
75. Landry, C. R., Townsend, J. P., Hartl, D. L., and Cavalieri, D. (2006) Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Ecol* **15**, 575-591
76. Mortimer, R. K., and Johnston, J. R. (1986) Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics* **113**, 35-43
77. Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., and Boeke, J. D. (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* **14**, 115-132
78. Ralser, M., Kuhl, H., Werber, M., Lehrach, H., Breitenbach, M., and Timmermann, B. (2012) The *Saccharomyces cerevisiae* W303-K6001 cross-platform genome sequence: insights into ancestry and physiology of a laboratory mutt. *Open Biol* **2**, 120093
79. Sherman, F. (1963) Respiration-deficient mutants of yeast. I. Genetics. *Genetics* **48**, 375-385
80. Lacroute, F. (1968) Regulation of pyrimidine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **95**, 824-832
81. Robinson, J. S., Klionsky, D. J., Banta, L. M., and Emr, S. D. (1988) Protein sorting in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of mutants defective in the delivery and processing of multiple vacuolar hydrolases. *Mol Cell Biol* **8**, 4936-4948
82. Tawfik, O. W., Papasian, C. J., Dixon, A. Y., and Potter, L. M. (1989) *Saccharomyces cerevisiae* pneumonia in a patient with acquired immune deficiency syndrome. *J Clin Microbiol* **27**, 1689-1691
83. Soto, I. C., Fontanesi, F., Liu, J., and Barrientos, A. (2012) Biogenesis and assembly of eukaryotic cytochrome c oxidase catalytic core. *Biochim Biophys Acta* **1817**, 883-897
84. Rak, M., and Tzagoloff, A. (2009) F1-dependent translation of mitochondrially encoded Atp6p and Atp8p subunits of yeast ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 18509-18514
85. Brandt, U., Uribe, S., Schagger, H., and Trumppower, B. L. (1994) Isolation and characterization of QCR10, the nuclear gene encoding the 8.5-kDa subunit 10 of the *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome bc1 complex. *J Biol Chem* **269**, 12947-12953
86. 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
87. Wagener, N., Ackermann, M., Funes, S., and Neupert, W. (2011) A pathway of protein translocation in mitochondria mediated by the AAA-ATPase Bcs1. *Mol Cell* **44**, 191-202
88. Krause-Buchholz, U., Barth, K., Dombrowski, C., and Rodel, G. (2004) *Saccharomyces cerevisiae* translational activator Cbs2p is associated with mitochondrial ribosomes. *Curr Genet* **46**, 20-28
89. Krause-Buchholz, U., Schobel, K., Lauffer, S., and Rodel, G. (2005) *Saccharomyces cerevisiae* translational activator Cbs1p is associated with translationally active mitochondrial ribosomes. *Biol Chem* **386**, 407-415
90. De Silva, D., Poliquin, S., Zeng, R., Zamudio-Ochoa, A., Marrero, N., Perez-Martinez, X., Fontanesi, F., and Barrientos, A. (2017) The DEAD-box helicase Mss116 plays distinct roles in mitochondrial ribogenesis and mRNA-specific translation. *Nucleic Acids Res* **45**, 6628-6643
91. 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
92. Cherry, J. M., Adler, C., Ball, C., Chervitz, S. A., Dwight, S. S., Hester, E. T., Jia, Y., Juvik, G., Roe, T., Schroeder, M., Weng, S., and Botstein, D. (1998) SGD: *Saccharomyces Genome Database*. *Nucleic Acids Res* **26**, 73-79

93. Gaisne, M., Becam, A. M., Verdiere, J., and Herbert, C. J. (1999) A 'natural' mutation in *Saccharomyces cerevisiae* strains derived from S288c affects the complex regulatory gene HAP1 (CYP1). *Curr Genet* **36**, 195-200
94. Garcia-Guerrero, A. E., Camacho-Villasana, Y., Zamudio-Ochoa, A., Winge, D. R., and Perez-Martinez, X. (2018) Cbp3 and Cbp6 are dispensable for synthesis regulation of Cytochrome b in yeast mitochondria. *J Biol Chem*
95. Kuhl, I., Fox, T. D., and Bonnefoy, N. (2012) Schizosaccharomyces pombe homologs of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial proteins Cbp6 and Mss51 function at a post-translational step of respiratory complex biogenesis. *Mitochondrion* **12**, 381-390
96. Tucker, E. J., Wanschers, B. F., Szklarczyk, R., Mountford, H. S., Wijeyeratne, X. W., van den Brand, M. A., Leenders, A. M., Rodenburg, R. J., Reljic, B., Compton, A. G., Frazier, A. E., Bruno, D. L., Christodoulou, J., Endo, H., Ryan, M. T., Nijtmans, L. G., Huynen, M. A., and Thorburn, D. R. (2013) Mutations in the UQCC1-interacting protein, UQCC2, cause human complex III deficiency associated with perturbed cytochrome b protein expression. *PLoS Genet* **9**, e1004034
97. Hoffmann, A., Merz, F., Rutkowska, A., Zachmann-Brand, B., Deuerling, E., and Bukau, B. (2006) Trigger factor forms a protective shield for nascent polypeptides at the ribosome. *J Biol Chem* **281**, 6539-6545
98. Gautschi, M., Mun, A., Ross, S., and Rospert, S. (2002) A functional chaperone triad on the yeast ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 4209-4214
99. Wegrzyn, R. D., Hofmann, D., Merz, F., Nikolay, R., Rauch, T., Graf, C., and Deuerling, E. (2006) A conserved motif is prerequisite for the interaction of NAC with ribosomal protein L23 and nascent chains. *J Biol Chem* **281**, 2847-2857
100. Ponce-Rojas, J. C., Avendano-Monsalve, M. C., Yanez-Falcon, A. R., Jaimes-Miranda, F., Garay, E., Torres-Quiroz, F., DeLuna, A., and Funes, S. (2017) alpha-beta'-NAC cooperates with Sam37 to mediate early stages of mitochondrial protein import. *FEBS J* **284**, 814-830
101. Kohler, R., Boehringer, D., Greber, B., Bingel-Erlenmeyer, R., Collinson, I., Schaffitzel, C., and Ban, N. (2009) YidC and Oxa1 form dimeric insertion pores on the translating ribosome. *Mol Cell* **34**, 344-353
102. Szyrach, G., Ott, M., Bonnefoy, N., Neupert, W., and Herrmann, J. M. (2003) Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria. *EMBO J* **22**, 6448-6457
103. Kim, H. J., Khalimonchuk, O., Smith, P. M., and Winge, D. R. (2012) Structure, function, and assembly of heme centers in mitochondrial respiratory complexes. *Biochim Biophys Acta* **1823**, 1604-1616
104. Su, C. H., McStay, G. P., and Tzagoloff, A. (2014) The Cox3p assembly module of yeast cytochrome oxidase. *Mol Biol Cell* **25**, 965-976
105. Garcia-Villegas, R., Camacho-Villasana, Y., Shingu-Vazquez, M. A., Cabrera-Orefice, A., Uribe-Carvajal, S., Fox, T. D., and Perez-Martinez, X. (2017) The Cox1 C-terminal domain is a central regulator of cytochrome c oxidase biogenesis in yeast mitochondria. *J Biol Chem* **292**, 10912-10925
106. McStay, G. P., Su, C. H., and Tzagoloff, A. (2012) Modular assembly of yeast cytochrome oxidase. *Mol Biol Cell* **24**, 440-452
107. Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Pease, L. R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51-59
108. Ding, M. G., Butler, C. A., Saracco, S. A., Fox, T. D., Godard, F., di Rago, J. P., and Trumpower, B. L. (2008) Introduction of cytochrome b mutations in *Saccharomyces cerevisiae* by a method that allows selection for both functional and non-functional cytochrome b proteins. *Biochim Biophys Acta* **1777**, 1147-1156

109. Bonnefoy, N., and Fox, T. D. (2001) Genetic transformation of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Methods Cell Biol* **65**, 381-396
110. Guthrie, C., and Fink, G. R. (eds). (2002) Guide to yeast genetics and molecular and cell biology. *Academic Press, San Diego* **350**
111. Sambrook, J., and Russel, D. W. (2001) Molecular Cloning A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor*
112. Dohrmann, P. R. (1992) DNA cloning. *IRL press book*, 121-124
113. Diekert, K., de Kroon, A. I., Kispal, G., and Lill, R. (2001) Isolation and subfractionation of mitochondria from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Cell Biol* **65**, 37-51
114. 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
115. Colby, G., Wu, M., and Tzagoloff, A. (1998) MTO1 codes for a mitochondrial protein required for respiration in paromomycin-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**, 27945-27952
116. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
117. Wittig, I., Braun, H. P., and Schagger, H. (2006) Blue native PAGE. *Nat Protoc* **1**, 418-428
118. Wittig, I., Karas, M., and Schagger, H. (2007) High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Mol Cell Proteomics* **6**, 1215-1225
119. Ljungdahl, P. O., Pennoyer, J. D., and Trumpower, B. L. (1986) Purification of cytochrome bc₁ complexes from phylogenically diverse species by a single method. *Methods Enzymol* **126**, 181-191
120. Yonetani, T. (1960) Studies on cytochrome oxidase. I. Absolute and difference absorption spectra. *J Biol Chem* **235**, 845-852
121. Barros, M. H., and Tzagoloff, A. (2002) Regulation of the heme A biosynthetic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **516**, 119-123
122. Bestwick, M., Khalimonchuk, O., Pierrel, F., and Winge, D. R. (2009) The role of Coa2 in hemylation of yeast Cox1 revealed by its genetic interaction with Cox10. *Mol Cell Biol* **30**, 172-185
123. 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



Cbp3 and Cbp6 are dispensable for synthesis regulation of cytochrome *b* in yeast mitochondria

Received for publication, October 24, 2017, and in revised form, February 8, 2018. Published, Papers in Press, February 23, 2018, DOI 10.1074/jbc.RA117.000547

Aldo E. García-Guerrero^{†1}, Yolanda Camacho-Villasana[‡], Angélica Zamudio-Ochoa^{‡2}, Dennis R. Winge[§], and Xochitl Pérez-Martínez^{‡3}

From the [‡]Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 Mexico City, Mexico and the [§]Department of Medicine and Biochemistry, University of Utah Health Sciences Center, Salt Lake, Utah 84132

Edited by Ronald C. Wek

Cytochrome *b* (*Cytb*) is the only mitochondrial encoded subunit from the *bc*₁ complex. Cbp3 and Cbp6 are chaperones necessary for translation of the *COB* mRNA and *Cytb* hemylation. Here we demonstrate that their role in translation is dispensable in some laboratory strains, whereas their role in *Cytb* hemylation seems to be universally conserved. BY4742 yeast requires Cbp3 and Cbp6 for efficient *COB* mRNA translation, whereas the D273-10b strain synthesizes *Cytb* at wildtype levels in the absence of Cbp3 and Cbp6. Steady-state levels of *Cytb* are close to wildtype in mutant D273-10b cells, and *Cytb* forms non-functional, supercomplex-like species with cytochrome *c* oxidase, in which at least core 1, cytochrome *c*₁, and Rieske iron-sulfur subunits are present. We demonstrated that Cbp3 interacts with the mitochondrial ribosome and with the *COB* mRNA in both BY4742 and D273-10b strains. The polymorphism(s) causing the differential function of Cbp3, Cbp6, and the assembly feedback regulation of *Cytb* synthesis is of nuclear origin rather than mitochondrial, and Smt1, a *COB* mRNA-binding protein, does not seem to be involved in the observed differential phenotype. Our results indicate that the essential role of Cbp3 and Cbp6 is to assist *Cytb* hemylation and demonstrate that in the absence of heme *b*, *Cytb* can form non-functional supercomplexes with cytochrome *c* oxidase. Our observations support that an additional protein or proteins are involved in *Cytb* synthesis in some yeast strains.

Mitochondrial respiratory complex *bc*₁ is a dimeric enzyme composed of 10 subunits. Cytochrome *b* (*Cytb*)⁴ is the only

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Grant 47514 (to X. P.-M.) and Fellowship 255917 (to A. E. G.-G.) and Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Universidad Nacional Autónoma de México Grants IN204414 and IN209217 (to X. P.-M.). The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

This article contains Figs. S1–S4.

¹ Submitted in partial fulfillment of the requirements for a Ph.D. degree at the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

² Present address: Dept. of Cell Biology, School of Osteopathic Medicine, Rowan University, 2 Medical Center Dr., Stratford, NJ 08084.

³ To whom correspondence should be addressed: Dept. de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, 04510 Mexico City, Mexico. E-mail: xperez@ifc.unam.mx.

⁴ The abbreviations used are: *Cytb*, cytochrome *b*; CcO, cytochrome *c* oxidase; *Cytc*₁, cytochrome *c*₁; BN, blue native; HA, hemagglutinin; PVDF, polyvinylidene fluoride.

subunit encoded in the mitochondrial genome by the *COB* gene. Assembly of the *bc*₁ complex involves formation of different subcomplexes (1, 2): 1) early stage: subunits *Cytb*, *Qcr7*, and *Qcr8* interact, forming the first subcomplex (*Cytb*–*Qcr7*–*Qcr8*); 2) intermediate stage: subunits *Cytb*, *Qcr7*, *Qcr8*, *Qcr6*, cytochrome *c*₁ (*Cytc*₁), *Cor1*, and *Cor2* form a 500-kDa subcomplex; dimerization and interaction with the cytochrome *c* oxidase (*CcO*) occurs at this stage (2); and 3) late stage: *Rip1*, *Qcr9*, and *Qcr10* assemble to form the complete *bc*₁ complex. Although little is known about regulatory mechanisms in each step of the *bc*₁ complex assembly, some studies show two important points of regulation, the formation of the subcomplex *Cytb*–*Qcr7*–*Qcr8* and the assembly of the Rieske iron-sulfur protein *Rip1* (3–5). Stability of each subunit in the subcomplex *Cytb*–*Qcr7*–*Qcr8* depends on the presence of the other two subunits (6), and recently it was demonstrated that synthesis of *Cytb* is regulated at this early stage of assembly (7).

COB mRNA translation depends on a set of translational activators: *Cbs1* and *Cbs2*, which act on the *COB* mRNA 5'-UTR (8, 9). *Cbp1* is involved in maturation, stability (10), and translation of the *COB* mRNA by an unknown mechanism (11). These proteins interact with mitochondrial ribosomes (12, 13). *Cbp3* and *Cbp6* are chaperones of *Cytb* that in addition activate *COB* mRNA translation in a cooperative form. These proteins also interact with the tunnel exit of the mitochondrial ribosome, specifically with the ribosomal subunit *MrpL4* (14). *Cbp3* and *Cbp6* interact with newly synthesized *Cytb*, probably immediately as the peptide exits the mitochondrial ribosome. This interaction is important for addition of heme *b*_L to *Cytb*, and it is preserved until *Qcr7*, *Qcr8*, the chaperone *Cbp4*, and the heme *b*_H assemble with *Cytb* (15). The model suggests that once *Cbp3*–*Cbp6* dissociate from the newly synthesized *Cytb*, these chaperones are able to activate additional rounds of *COB* mRNA translation. This idea is supported by the observation that *Cytb* synthesis is reduced in mutants lacking some of the *bc*₁ complex subunits, like *Qcr7* and *Qcr8*. In this case, *Cbp3* and *Cbp6* remain sequestered in a complex with *Cytb* and are therefore proposed to be impaired for *COB* mRNA translational activation (7).

Feedback assembly regulation of mitochondrial mRNAs translation is a very well-known mechanism in mitochondria. In *CcO*, synthesis of the subunit *Cox1* is highly repressed by assembly defects of the complex, and this process is mostly

Cbp3 and Cbp6 are dispensable for Cytb synthesis

mediated by the Cox1 translational activator Mss51 (16–18). Synthesis of the mitochondrial-encoded ATP synthase subunits Atp6 and Atp8 decrease by assembly defects on the F1 portion (19). The negative effect on Atp6 and Atp8 synthesis is mediated by Smt1, an integral protein localized in the mitochondrial inner membrane facing the matrix. Smt1 physically interacts with the *ATP8-ATP6* mRNA acting as a translational repressor. Surprisingly, it was shown that Smt1 also interacts with the *COB* mRNA. However, no effect on *Cytb* synthesis was observed in a Δ *smt1*-null mutant (20).

In this study, we report that Cbp3 and Cbp6 are dispensable for translational activation of *Cytb* synthesis in the D273-10b yeast strain, whereas in BY4742 cells these chaperones are necessary for *Cytb* synthesis as previously reported for W303 strain (7, 14). We characterized the role of Cbp3 and Cbp6 in *Cytb* biogenesis in both strains and studied whether Smt1 was involved in the differential regulation of *Cytb* synthesis by Cbp3/Cbp6 in the D273-10b and BY4742 strains. Our study demonstrated that the essential role of Cbp3 and Cbp6 is to regulate *Cytb* hemylation and that a regulatory function in *COB* mRNA translation prevails in some yeast strains. Moreover, non-hemylated *Cytb* can form non-functional supercomplexes with cytochrome *c* oxidase. Our results provide relevant information about the process of *Cytb* biogenesis and translational control of the *COB* mRNA.

Results

Cbp3 and Cbp6 are dispensable for Cytb synthesis, but not for bc₁ complex activity in D273-10b lab strains

We were interested in the study of the mechanisms of *Cytb* synthesis. To see whether assembly defects in *bc₁* complex affect *Cytb* synthesis, we created Δ *qcr7*, Δ *cbp4*, Δ *cbp3*, and Δ *cbp6* mutants in the D273-10b yeast strain. These proteins form the first intermediates at early stages of *Cytb* assembly and maturation (7, 15). To follow mitochondrial translation, the cells were incubated with [³⁵S]methionine in the presence of cycloheximide, and mitochondrial products were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. Surprisingly, contrary to previous reports (7, 14), depletion of Cbp3 or Cbp6 did not negate *Cytb* labeling (Fig. 1A). Deletion of *CBP4* also showed normal levels of *Cytb* labeling in agreement with previous reports supporting that this chaperone is not necessary for efficient *Cytb* synthesis (14). Likewise, the absence of subunit Qcr7 also permitted wildtype levels of *Cytb* labeling. As expected, cells lacking Cbs1, one of the translational activators of the *COB* mRNA (8), were completely impaired in *Cytb* synthesis. The majority of experiments regarding Cbp3 and Cbp6 function are based on the W303 strain, so we hypothesized that the difference in the observed phenotype could be due to the strain used. To test this, *Cytb* synthesis of the same mutants was analyzed in a third yeast strain, BY4742. In these BY4742 mutants, *Cytb* labeling dramatically decreased in the absence of Cbp3 and Cbp6, as previously reported for W303 nuclear background (7, 14, 15) (Fig. 1B). Interestingly, in BY4742 cells Δ *qcr7* and Δ *cbp4* mutations also decreased *Cytb* labeling, whereas absence of Cbs1 abolished labeling. In the Δ *cbs1* mutant, Cox1 labeling also decreased dramatically, probably because of the presence of

introns in the *COX1* gene and the dependence of a *COB* maturase for *COX1* mRNA maturation (21). Even though *Cytb* [³⁵S]methionine labeling was normal in Δ *cbp3* and Δ *cbp6* mutants in the D273-10b strain, respiratory growth was still compromised (Fig. 1C), indicating that in D273-10b cells, Cbp3 and Cbp6 are still necessary for a post-translational step of complex III biogenesis.

Variations in the *Cytb* [³⁵S]methionine labeling in D273-10b and BY4742 strains might be due to differences in the effect of Cbp3, Cbp6, Qcr7, and Cbp4 on *COB* mRNA translation. Alternatively, it could be due to differences in *Cytb* instability in the absence of these proteins. To differentiate between these two possibilities, we used the translation reporter gene *ARG8^m*, which has been widely used to study mitochondrial translation. Arg8 is an acetylornithine aminotransferase involved in arginine biosynthesis. It is normally encoded by a nuclear gene and imported into mitochondria using a mitochondrial targeting signal. The mitochondrial encoded Arg8 protein activity is not linked to the respiratory chain function and therefore can be used to assess mitochondrial translation by monitoring growth on media lacking arginine (14, 16, 19, 22). In a strain with the endogenous *ARG8* deleted, we inserted *ARG8^m* in the *COB* locus, maintaining the *COB* untranslated regions and *COB* codons. The precursor *pARG8^m* reporter was fused in frame to the last codon of the *COB* gene to create the construct *COB(1–385)::pARG8^m* (Fig. 1D) and followed *ARG8^m* expression by monitoring growth in media lacking arginine. After Western blotting analysis with antibodies against Arg8, we detected the presence of a *Cytb*-pArg8 fusion protein of the expected size, 90 kDa, as well as a faint band for processed Arg8 (Fig. 1E). *Cytb* was also observed albeit at lower levels as compared with mitochondria carrying wildtype mtDNA in both BY4742 and D273-10b strains. Mitochondrial translation products analysis indicated that processed *Cytb* is only observed after 40 min of [³⁵S]methionine pulse labeling (Fig. 1F). Both strains carrying the *COB(1–385)::pARG8^m* mitochondrial construct supported growth on media lacking arginine (Fig. 1H and Fig. S1A), as well as respiratory growth, albeit with less efficiency as compared with cells carrying wildtype mitochondrial DNA (Fig. 1G). We created Δ *cbp3*, Δ *cbp6*, Δ *qcr7*, Δ *cbp4*, and Δ *cbs1* mutants carrying the *COB(1–385)::pARG8^m* construct in D273-10b and BY4742 strains. With the exception of Δ *cbs1* mutation, the rest of D273-10b mutants showed a robust growth on media lacking arginine (Fig. 1H). In contrast, Δ *cbp3* and Δ *cbp6* mutants completely lacked growth capacity in –Arg media in BY4742 cells. This is consistent with previous observations where absence of Cbp3 and Cbp6 reduced –Arg growth of cells carrying a complete *COB* codon replacement with the *ARG8^m* reporter, *cobΔ::pARG8^m* (14) (Fig. S1C).

Δ *qcr7* BY4742 mutants showed a very weak growth on media lacking arginine, whereas Δ *cbp4* showed a more robust growth on –Arg media (Fig. 1G). Growth of the Δ *qcr7* mutant in the absence of supplemental arginine was particularly impaired as compared with Δ *cbp4* and Δ *qcr8* mutants (Fig. S1B). However, growth in media lacking arginine was recovered after complete replacement of *COB* codons by *ARG8^m* (Fig. S1C), indicating that translation of *COB* mRNA is regulated by the presence of *Cytb*. These phenotypes are consistent with previous observa-

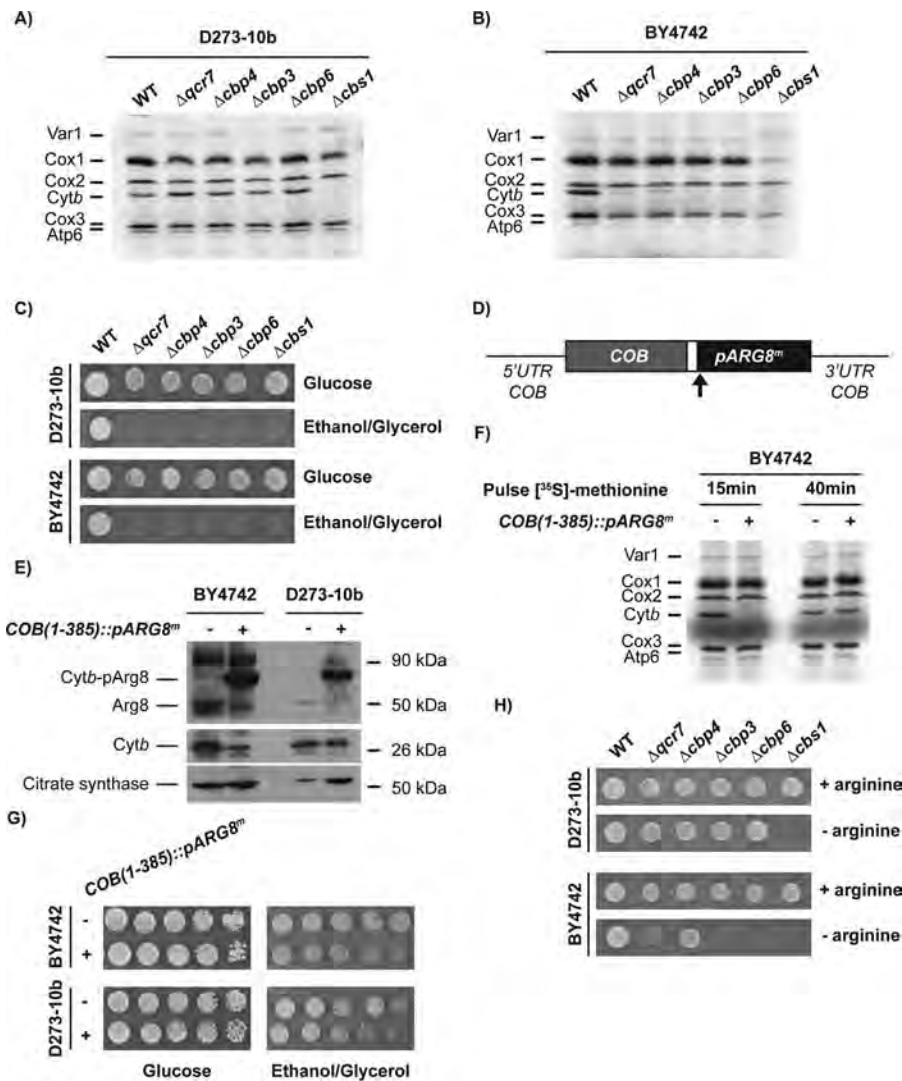


Figure 1. Cbp3 and Cbp6 are dispensable for Cytb synthesis in D273-10b lab strains. *A* and *B*, whole-cell mitochondrial translation products from WT and the indicated mutant strains in the D273-10b (*A*) and BY4742 (*B*) strains were labeled with [³⁵S]methionine in the presence of cycloheximide. The proteins were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. *Cox1*, cytochrome *c* oxidase subunit 1; *Cox2*, cytochrome *c* oxidase subunit 2; *Cox3*, cytochrome *c* oxidase subunit 3; *Atp6*, ATP synthase subunit 6; *Atp8*, subunit 8; *Atp9*, subunit 9; *Var1*, ribosomal subunit *Var1*. *C*, WT and the indicated mutants from the BY4742 and D273-10b strains were spotted as serial dilutions in rich fermentative (glucose) and respiratory (ethanol/glycerol) media for 3 days at 30 °C. *D*, the *pARG8^m* gene was fused in frame with the complete *COB* codons. The reporter gene contains the Arg8 mitochondrial targeting signal, and the processing site is indicated by an arrow. *E*, mitochondria from D273-10b and BY4742 lab strains carrying the *COB(1-352)::pARG8^m* construct were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting using antibodies against Arg8, Cytb, and citrate synthase (as loading control). *F*, cells from the BY4742 lab strain carrying either the WT mitochondrial genome or the *COB(1-352)::pARG8^m* construct were pulse-labeled with [³⁵S]methionine for 15 min or 40 min as in *A*. *G*, respiratory growth of cells carrying the *COB(1-352)::pARG8^m* construct were assessed by 10-fold serial dilutions spotted on YPD or YPEG media and were grown for 3 days at 30 °C. *H*, the indicated mutants from D273-10b and BY4742 lab strains bearing the *COB(1-352)::pARG8^m* construct were spotted on synthetic media in the presence or absence of arginine. 10-fold serial dilutions were grown for 3 days at 30 °C.

tions where different feedback regulation levels of *Cytb* synthesis occurs in the absence of *bc₁* complex subunits and chaperones (7). These results strongly suggest that Cbp3 and Cbp6 are necessary for *Cytb* synthesis in BY4742 but not in D273-10b. In addition, the assembly feedback regulation of *Cytb* synthesis by complex III subunits is preserved in BY4742 cells but not in D273-10b cells.

This comparative analysis showed that Cbp3 and Cbp6 are dispensable as translational activators in the D273-10b strain but are still necessary for respiration, probably as chaperones, whereas in the BY4742 lab strain both proteins are necessary to achieve efficient *Cytb* synthesis. Moreover, our results indicate that assembly feedback regulation of *COB* mRNA translation is

present in BY4742 strains, where some subunits and chaperones like Qcr7, Qcr8, and Cbp4 have an important participation in this process.

In D273-10b strain Cytb and Rip1 are stable in the absence of Cbp3 and Cbp6

Previous reports indicate that cells lacking Cbp3, Cbp6, and Qcr7 exhibit high *Cytb* degradation (6, 23, 24). Because Cbp3, Cbp6, and Qcr7 were dispensable for *COB* mRNA translation in D273-10b strains, we analyzed steady-state levels of *Cytb* by Western blotting in mutants lacking these proteins. *Cytb* levels were slightly reduced in $\Delta cbp3$ and $\Delta cbp6$ as compared with wildtype in D273-10b cells; however, cells lacking Qcr7 showed

Cbp3 and Cbp6 are dispensable for Cytb synthesis

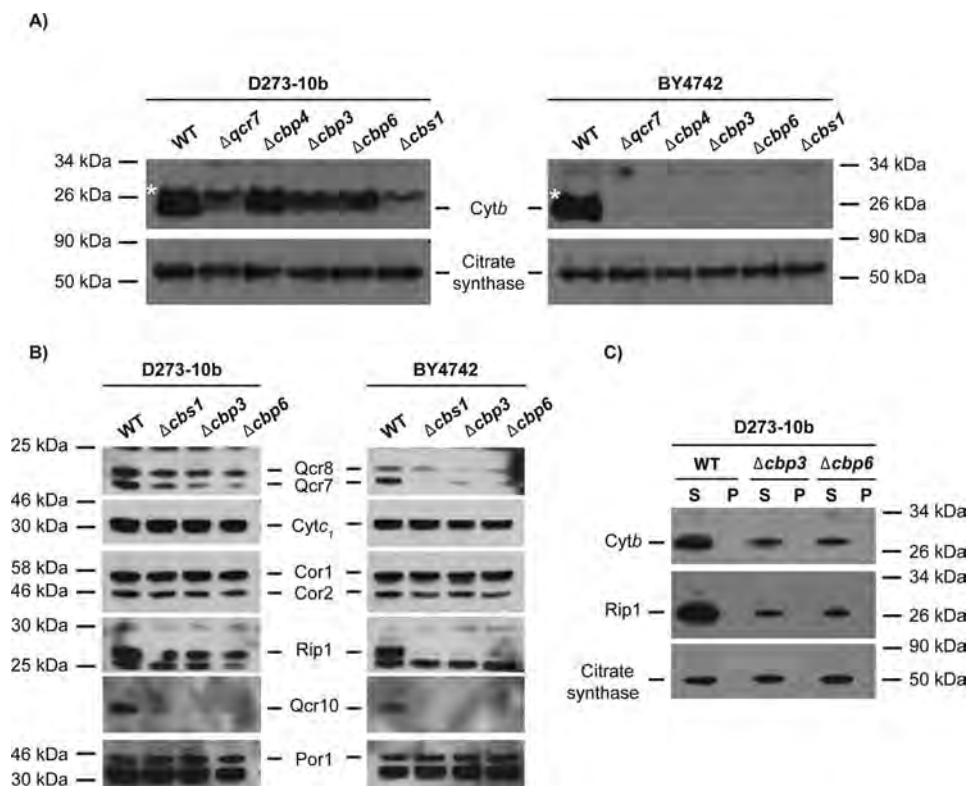


Figure 2. Cytb and Rip1 accumulate in Δcbp3 and Δcbp6-null mutants from the D273-10b lab strain. A, mitochondrial proteins (20 μg) of the indicated mutants were resolved on a 16% SDS-PAGE in the presence of urea 6 M and transferred to PVDF membrane. Western blotting was carried out with anti-Cytb or anti-citrate synthase (as loading control). The asterisk shows an unspecific band. B, mitochondrial proteins (20 μg) of D273-10b and BY4742 mutants were analyzed by SDS-PAGE 12% and Western blotting with the indicated antibodies. C, isolated mitochondria from WT, Δcbp3, and Δcbp6 mutants were first treated with digitonin and sequentially with Triton X-100. After ultracentrifugation, supernatants from both solubilizations were combined. Supernatants (S) and pellet (P) were loaded on a 12% SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using antibodies against Cytb, Rip1, and citrate synthase.

strongly decreased Cytb levels. In contrast, in BY4742 cells, none of the mutants analyzed showed detectable levels of Cytb (Fig. 2A).

Because Cytb was stable in mutants lacking Cbp3 or Cbp6 in D273-10b cells, we next evaluated the steady-state levels of other *bc*₁ complex subunits in these mutants and compared them to protein levels in the BY4742 strain. Subunits like Cyt_{c1}, Cor1, and Cor2 were stable in all mutants from both strains, probably because these three subunits form a stable subcomplex (25) (Fig. 2B). Whereas Qcr7, Qcr8, and Rip1 were practically undetectable in BY4742 mutants, these subunits were detected in D273-10b cells lacking Cbp3, Cbp6, and even Cbs1. Interestingly, the Qcr10 subunit was almost absent in all the mutants analyzed in both strains (Fig. 2B). This observation suggests that Rip1 is not correctly assembled into the *bc*₁ complex in the mutants, and therefore Qcr10 stability is compromised, as previously reported (26).

The observed stability of Cytb, which is an early assembly subunit, and of Rip1, a late assembly subunit (25) in the absence of Cbp3 and Cbp6 in the D273-10b strain surprised us, because both mutants are non-respiratory. We asked whether Cytb and Rip1 aberrantly aggregated and became insensitive to mitochondrial protease activity. To test aggregation, we first solubilized mitochondria from Δcbp3 and Δcbp6 mutants in the D273-10b strain with digitonin and separated pellet from supernatant by ultracentrifugation. The pellet was next solubilized with Triton X-100, and pellet and supernatant fractions

were again separated by ultracentrifugation. Aggregates are expected to migrate in the pellet portion of the digitonin–Triton X-100 sequential treatment (5). Western blotting analysis of both fractions showed that Cytb and Rip1 were present in the supernatant fractions, regardless of the presence of Cbp3 and Cbp6 (Fig. 2C). This result indicates that at least Cytb and Rip1 subunits are not forming protease-resistant aggregates in the absence of Cbp3 and Cbp6.

Cytb, Rip1, and Cor1 associate into supercomplexes in the absence of Cbp3 and Cbp6 in the D273-10b strain

Because Cytb and Rip1 are stable in D273-10b strains in the absence of Cbp3 and Cbp6, we asked whether these subunits could form high molecular weight complexes related to supercomplexes III₂/IV₂ and III₂/IV. Digitonin-solubilized mitochondria from D273-10b containing the mutations Δcbp3, Δcbp6, Δcbp3/Δcbp6, and Δcbs1 were separated by blue native (BN)-PAGE. Western blotting analysis indicated that Cytb, Cor1, and Rip1 co-migrated into III₂/IV₂ and III₂/IV supercomplexes in the wildtype strain (Fig. 3A). The Cytb, Cor1, and Rip1 high molecular weight bands were not present after deletion of the cytochrome *c* oxidase subunit COX1, where the main species was the dimeric III₂ complex. Cor1 and Rip1 were unable to form the high molecular weight complex after deletion of Cbs1, where Cytb synthesis was abolished. Surprisingly, in the Δcbp3 and Δcbp6 mutants, and even in the Δcbp3/Δcbp6 double mutant, a fraction of Cytb, Cor1, and Rip1 co-migrated in high

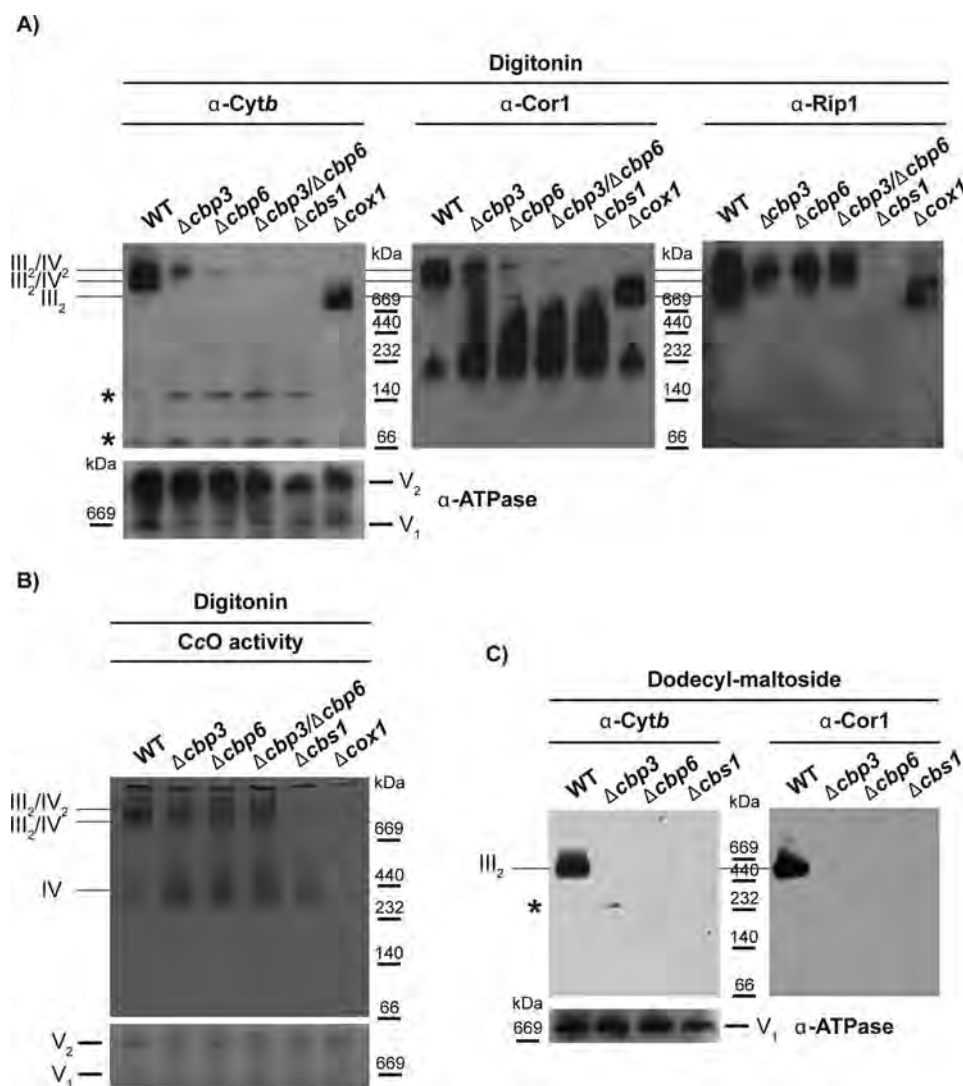


Figure 3. Cytb forms supercomplex-like species in the absence of Cbp3 and Cbp6 in D273-10b lab strains. 200 μg of mitochondrial protein from the indicated mutants were solubilized with digitonin, divided, and then loaded in two different BN-PAGE systems. *A*, one BN-PAGE was analyzed by Western blotting using antibodies against Cytb, Cor1, Rip1, and ATP synthase (as loading control). Asterisks indicate unspecific bands not related to Cytb. *B*, the second BN-PAGE was treated with 3,3'-diaminobenzidine and horse Cytc to observe the CcO in-gel activity. Coomassie stain is shown as a loading control. *C*, 100 μg of mitochondrial protein were solubilized with dodecyl-maltoside and analyzed by BN-PAGE and Western blotting using antibodies against Cytb, Cor1, and ATP synthase (the monomeric complex, V₁, was used as loading control).

molecular weight complexes with sizes corresponding to supercomplexes III₂/IV₂ and III₂/IV and enriched in III₂/IV₂ complex-like size. In the Δcbp3, Δcbp6, Δcbp3/Δcbp6, and Δcbs1-null mutants, Cor1 migrates in complexes of 232–669 kDa that are absent in the wildtype strain and in the Δcox1 strain. These bands probably correspond to the assembly intermediate subcomplex Cor1–Cor2–Cyt_{c1} (25) (Fig. 3A). It calls our attention that most of Rip1 is observed in high mass complexes, suggesting association with supercomplexes, but very little Cor1 fractionates in these high mass bands. To explore the possibility that Rip1 might form another high mass complex perhaps associated with the Bcs1 hexamer (27), we combined a Δcbp6 mutation with a deletion of Cox1 (by elimination of Pet309, translational activator of the COX1 mRNA (28)). In the double mutant, association of Rieske protein, Cor1, and also Cytb with supercomplex-like bands was lost, and only co-migration with a III₂ dimer-like size band was detected (Fig. S2A). These observations support that the high-molecular-weight complexes

observed in the absence of Cbp3/Cbp6 are related to complex IV and to III/IV supercomplexes. The supercomplex-like band contained active cytochrome *c* oxidase, as revealed by an in-gel activity assay (Fig. 3B and Fig. S2B). Mitochondria from the Δcbs1 mutant presented a ~450-kDa band corresponding to the monomeric CcO enzyme, not present in a Δcox1-null mutant. Taken together, these data support the idea that the observed complex in Δcbp3, Δcbp6, and Δcbp3/Δcbp6 mutants is related to respiratory supercomplexes, even if the bc₁ complex lacks activity.

Solubilization of mitochondria with dodecyl-maltoside usually separates the III–IV associations and maintains individual IV and III₂ complexes (29). Thus, mitochondria from D273-10b strains carrying the Δcbp3, Δcbp6, Δcbp3/Δcbp6, or Δcbs1 mutations were solubilized with dodecyl-maltoside and analyzed by BN-PAGE. Only wildtype mitochondria maintained Cytb and Cor1 in the ~670-kDa band corresponding to dimeric complex III (Fig. 3C), whereas Δcbp3, Δcbp6, Δcbp3/Δcbp6, or

Cbp3 and Cbp6 are dispensable for Cytb synthesis

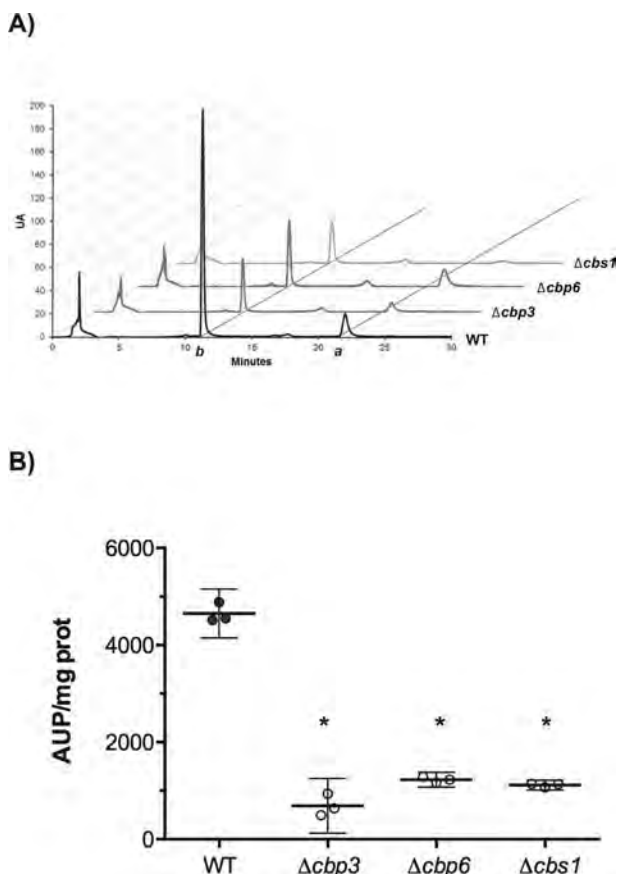


Figure 4. Cbp3 and Cbp6 are still necessary for Cytb hemylation in the D273-10b lab strain. Mitochondrial proteins (700 μ g) from the indicated mutants were treated with acidic acetone (1% HCl), clarified, and then separated by reverse-phase HPLC. A, retention time peaks of heme b (peak b) and heme a (peak a) are represented by arbitrary units (UA). B, the area under the peak (AUP)/mg protein was calculated by the mean of two biological and one technical replicate ($n = 3$). Confidence interval (95%) is represented by error bars. *, $p < 0.0001$ versus WT.

$\Delta cbs1$ mitochondria showed undetectable levels of this band. These data indicate that in the absence of Cbp3 and Cbp6, the bc_1 complex subunits Cytb and Cor1 are not forming a stable complex III. Moreover, these data suggest that association with the CcO is necessary to maintain the interaction of bc_1 complex subunits.

Cbp3 and Cbp6 are still necessary for Cytb hemylation in the D273-10b strain

Even though Cytb synthesis proceeds and aberrant super-complexes form in the absence of Cbp3 and Cbp6, these chaperones are still necessary for respiration. In W303 lab strain, it was observed that Cbp3 and Cbp6 are necessary for heme b assembly into the Cytb subunit (15). We asked whether Cbp3 and Cbp6 were still necessary for Cytb hemylation in the D273-10b lab strain. Hemes were extracted from purified mitochondria by incubation with acidic acetone (1% HCl), and the extract was analyzed by reverse phase HPLC. We used hemin as a control to identify heme b, with a retention time of 12 min (data not shown). HPLC analysis showed a dramatic decrease of the total heme b present in $\Delta cbp3$ and $\Delta cbp6$ mutants (Fig. 4). This level was similar to the one observed in the absence of Cbs1, used as negative control because Cytb is completely absent in this strain

(8). Our results indicate that even when Cbp3 and Cbp6 are not necessary for COB mRNA translation in D273-10b strains, they are still necessary for Cytb hemylation.

Cbp3 interacts with the COB mRNA and with the mitochondrial ribosome in both D273-10b and BY4742 strains

Cbp3 and Cbp6 interact with the mitochondrial ribosome tunnel exit in W303 lab strains (14). Thus, we investigated whether Cbp3 associates with the mitoribosome in BY4742 strains, in which this protein is necessary for Cytb synthesis, and in D273-10b strains, in which Cbp3 is dispensable for Cytb synthesis. To detect Cbp3, we fused a hemagglutinin (HA) epitope to the C-terminal end of Cbp3. The construction expressing this protein was expressed from a centromeric plasmid and transformed into $\Delta cbp3$ cells from either BY4742 or D273-10b strains. The presence of the HA epitope on Cbp3 did not disrupt respiratory growth of otherwise wildtype cells (Fig. S3). Mitochondria was digitonin-solubilized in the presence of 10 mM Mg^{2+} , a condition in which both ribosomal subunits are associated. The extracts were loaded on a discontinuous sucrose gradient (20–40%) and ultracentrifuged. Six fractions were collected and analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. In both strains, BY4742 and D273-10b, Cbp3–HA co-migrated with Mrp20 (protein from the large ribosomal subunit) and with Mrp51 (protein from the small ribosomal subunit) (Fig. 5, A and B), indicating that in both strains Cbp3–HA interacts with the mitoribosome.

Considering that Cbp3 is necessary for efficient Cytb synthesis in W303 (14) and BY4742 lab strains (this study), we asked whether this protein physically interacts with the COB mRNA. Mitochondria from BY4742 and D273-10b strains expressing the CBP3-HA or CBP3 gene were solubilized with dodecyl-maltoside. The mitochondrial extract was immunoprecipitated using antibodies against the HA epitope, and RNA was isolated and analyzed by reverse transcription-PCR (30). For cDNA synthesis and PCR amplification, we used primers specific for COB and also for VARI (used as a negative control because translation of this mRNA is independent of Cbp3). After HA immunoprecipitation, Western blotting analysis showed that Cbp3 was efficiently immunoprecipitated in both BY4742 and D273-10b mitochondria (Fig. 5C). First strand cDNA and PCR amplification indicated that in both strains Cbp3 physically interacts with the COB mRNA (Fig. 5D).

The polymorphism(s) between D273-10b and BY4742 producing differential function of Cbp3, Cbp6, and Qcr7 in Cytb synthesis has a nuclear origin and is not present on Smt1

The observed difference on the role of Cbp3, Cbp6, Qcr7, and Cbp4 in Cytb synthesis regulation between the two lab strains suggests the existence of polymorphism(s) producing these distinct phenotypes. This polymorphism(s) could locate either on nuclear or in mitochondrial genes. To investigate this, we exchanged the mitochondrial genomes between the two lab strains, creating two different cybrid strains: D273-10b with the BY4742 mtDNA and BY4742 with the D273-10b mtDNA. Next, by whole-cell [35 S]methionine labeling in the presence of cycloheximide, we analyzed the effect of $\Delta qcr7$, $\Delta cbp3$, $\Delta cbp6$, and $\Delta cbp4$ mutations on Cytb synthesis. We included a $\Delta qcr10$

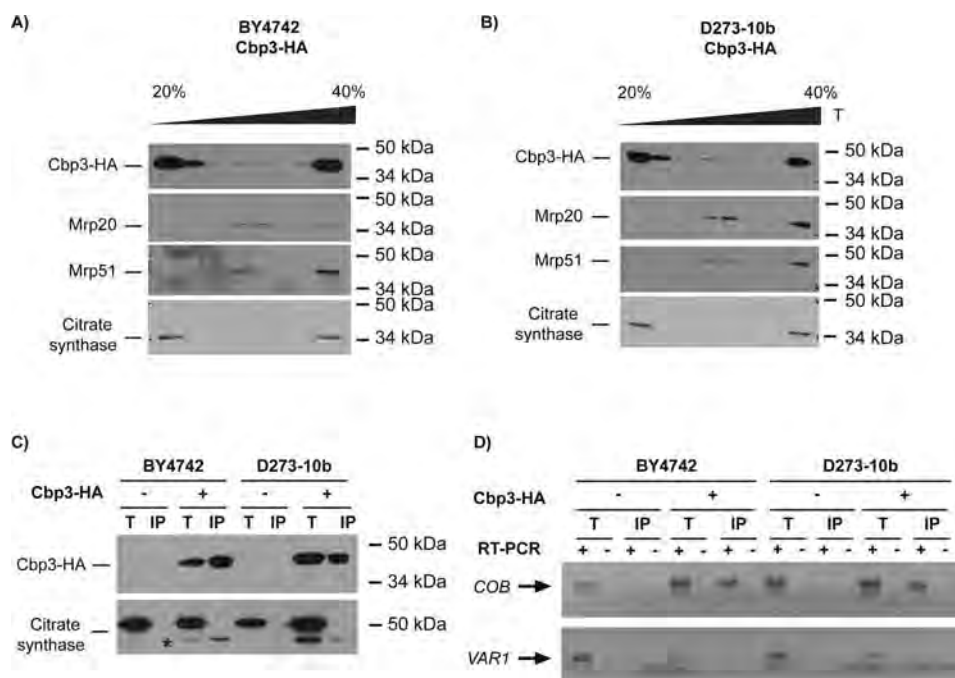


Figure 5. Cbp3 and Cbp6 interact with the mitochondrial ribosome and with the *COB* mRNA in both D273-10b and BY4742 lab strains. *A* and *B*, 500 μ g of isolated mitochondria from BY4742 (*A*) and D273-10b (*B*) cells expressing *CBP3-HA* from a low-copy plasmid were solubilized with digitonin, clarified, and loaded into a discontinuous sucrose gradient (20–40%) for ultracentrifugation. 1/10 of the clarified portion was taken as a total control (*T*). Proteins from seven fractions were TCA-precipitated and analyzed by SDS-PAGE (12%) and Western blotting. Cbp3-HA was detected with an antibody against the HA epitope. Antibodies against Mrp20 and Mrp51 were used as markers for large and small ribosomal subunits, respectively. Citrate synthase was used as a control for a non-ribosomal mitochondrial protein. *C*, 500 μ g from isolated mitochondria were solubilized with dodecyl maltoside, and Cbp3-HA or untagged Cbp3 were subjected to immunoprecipitation with an antibody against HA. Immunoprecipitate (*IP*, one-third) and total (*T*, 5% of the mitochondrial extract used for immunoprecipitation) fractions were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting with antibodies against HA and citrate synthase (as a negative control for interaction). The asterisk corresponds to the previous HA immunoblot analysis of Cbp3-HA. *D*, RNA was extracted from the total (*T*) and immunoprecipitate (*IP*) fractions. Each fraction was divided in two, and cDNA was prepared in the presence (+) or absence (–) of reverse transcriptase (*RT*) using primers for the *COB* and *VAR1* 5'-UTRs. The (–) *RT* lanes represent a negative control for DNA contamination. The PCR products were run on agarose gel, and the gel pictures were color-inverted.

mutant as control of a subunit whose absence has no effect on *Cytb* synthesis (7, 31). D273-10b mutants with BY4742 mtDNA showed *Cytb* labeling pattern as a D273-10b strain, where $\Delta qcr7$, $\Delta cbp3$, and $\Delta cbp6$ mutants exhibited wildtype *Cytb* labeling (Fig. 6A). $\Delta cbp4$ and $\Delta qcr10$ cells also labeled *Cytb* as wildtype. In concordance, steady-state levels of *Cytb* in the mutants are close to wildtype levels (Fig. 6B). BY4742 mutants with D273-10b mtDNA behaved as BY4742 cells: the absence of Cbp3, Cbp6, and Qcr7 dramatically reduced *Cytb* labeling, whereas the absence of Cbp4 reduced only mildly *Cytb* labeling (Fig. 6C). In agreement, steady-state levels of *Cytb* in these mutants were also reduced (Fig. 6D). These results suggest that the polymorphism(s) between D273-10b and BY4742 is located in a nuclear gene or genes.

Unfortunately, many attempts to identify the polymorphism(s) associated with the differential phenotype have failed. One candidate was the nuclear gene *SMT1*. This gene has three polymorphisms: A \rightarrow G, T \rightarrow C, and A \rightarrow G at positions 400, 644, and 668 of the *orf*, respectively. These polymorphisms change three amino acids in D273-10b with respect to BY4742 and W303: methionine 134 to valine, phenylalanine 206 to serine, and histidine 223 to arginine (data obtained from the *Saccharomyces* genome database). Smt1 was found to interact with the *COB* mRNA and to act as a translational repressor of the *ATP8-ATP6* mRNA (20). To study whether Smt1 was involved in the differential regulation of *Cytb* synthesis by Cbp3 and

Cbp6, we first tested whether in the BY4742 strain Smt1 was acting as a translational repressor of the *COB* mRNA as was demonstrated for the *ATP8-ATP6* mRNA (20). In this case, we expected that double mutants $\Delta cbp3$ or $\Delta cbp6$ combined with $\Delta smt1$ resulted in wildtype levels of *Cytb* synthesis. Whole cell [35 S]methionine labeling in the presence of cycloheximide showed that *Cytb* synthesis had normal levels in the $\Delta smt1$ mutant. However, in the $\Delta cbp6/\Delta smt1$ double mutant, *Cytb* synthesis was not recovered in comparison to labeling of a $\Delta cbp6$ mutant (Fig. 7A). These data were confirmed by analyzing growth on media lacking arginine of the same strains in Fig. 7A but carrying the *COB(1–385)::ARG8^m* construct in the mitochondrial genome. Neither the single mutant $\Delta cbp6$ nor the double mutant $\Delta cbp6/\Delta smt1$ was able to grow on media lacking arginine (Fig. 7B). Because these experiments tested the effect of the absence of Smt1, we next asked whether the presence of Smt1 expressing the D273-10b gene would compensate *Cytb* synthesis in the BY4742 $\Delta cbp6$ mutant. Thus, we cloned *SMT1* from D273-10b lab strain in low-copy and high-copy yeast expression plasmids and transformed them into BY4742 cells carrying the $\Delta cbp6$ mutation. *In vivo* translation assays indicated that *Cytb* synthesis was not recovered after overexpression of *SMT1* carrying the D273-10b lab strain polymorphisms (Fig. 7C). Together, these results suggest that Smt1 is not related to the role of Cbp3 and Cbp6 in *Cytb* synthesis. Because Smt1 physically interacts, directly or indirectly, with

Cbp3 and Cbp6 are dispensable for Cytb synthesis

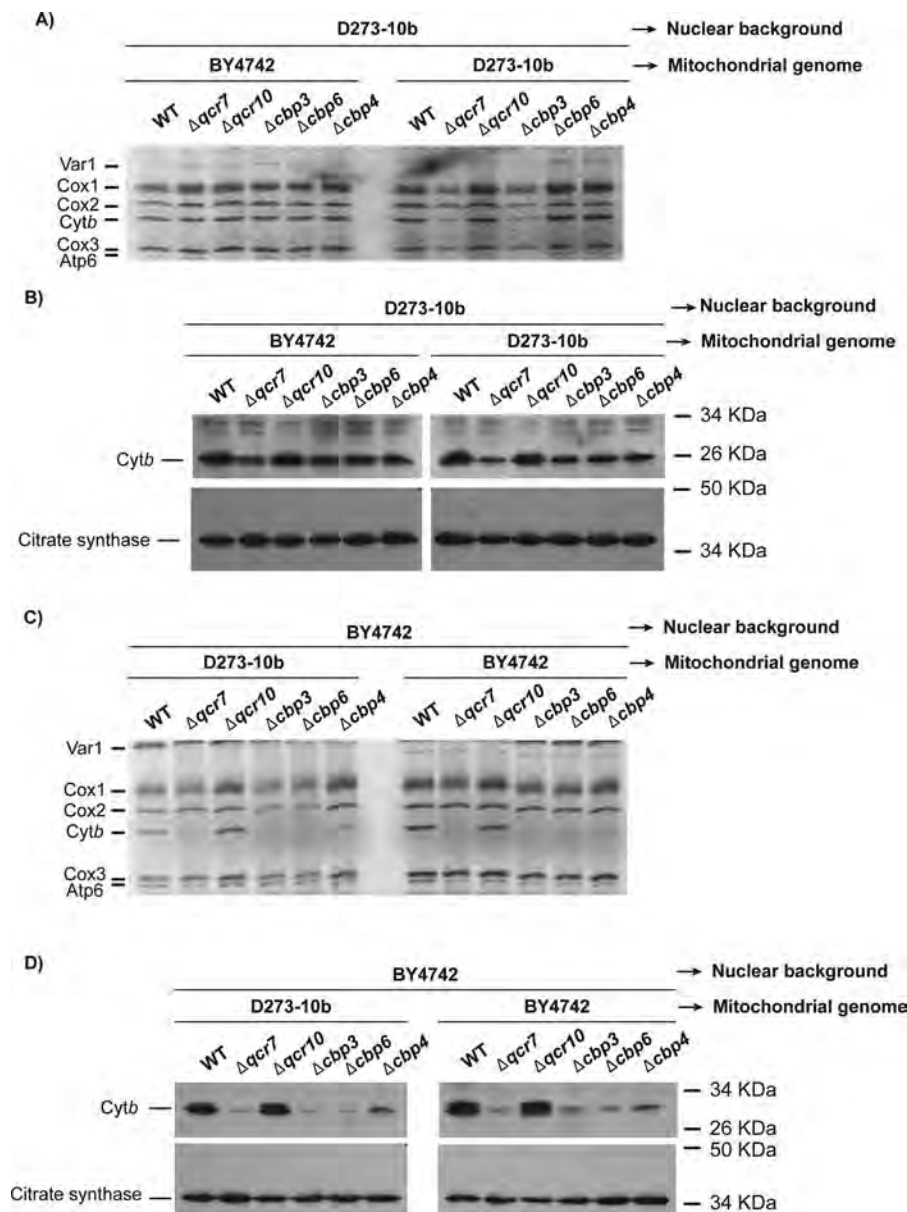


Figure 6. The polymorphism(s) associated with the differential phenotype of $\Delta cbp3$ and $\Delta cbp6$ mutants between D273-10b and BY4742 lab strains is located in the nuclear genome. A, mitochondrial DNA from BY4742 was introduced in rho0, D273-10b cells by cytoduction. These cells were labeled with [³⁵S]methionine in the presence of cycloheximide, and the proteins were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. B, mitochondria (20 μ g) from the same strains as in A were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting with the indicated antibodies. C, mitochondrial DNA from D273-10b was introduced in rho0, BY4742 cells by cytoduction. The cells were [³⁵S]methionine-labeled in the presence of cycloheximide, and proteins were analyzed as in A. D, mitochondria (20 μ g) from the same strains in C were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting with antibodies against Cytb and citrate synthase.

the COB mRNA, it must have a different role in Cytb biogenesis.

Discussion

An essential step on *bc*₁ complex biogenesis is assembly of the only mitochondrial encoded subunit, Cytb, where chaperones and translational activators of the COB mRNA coordinate to form the first Cytb assembly intermediaries (7). Cbp3 and Cbp6 were described as specific translational activators of the COB mRNA (14). Moreover, Cbp3 and Cbp6 act as chaperones necessary for respiratory growth (14, 23, 32), and it is proposed that they sense the assembly state of Cytb on early stages and coordinate synthesis and assembly (7, 14). In the course of our

studies to understand the function of Cbp3 and Cbp6, we observed that these proteins have a different role in Cytb biogenesis depending on the yeast lab strain we used. Cbp3 and Cbp6 are necessary for Cytb synthesis in the BY4742 strain, whereas in D273-10b lab strain, these proteins are dispensable for translational regulation. However, in both strains Cbp3 and Cbp6 are necessary for respiratory growth and Cytb hemylation.

The dual function of Cbp3 and Cbp6 in Cytb synthesis/assembly was first observed in W303 yeast lab strains (14). It was not surprising that BY4742 lab strains displayed a similar phenotype as W303 cells, because both strains share a more recent common ancestor than with the D273-10b strain (33, 34),

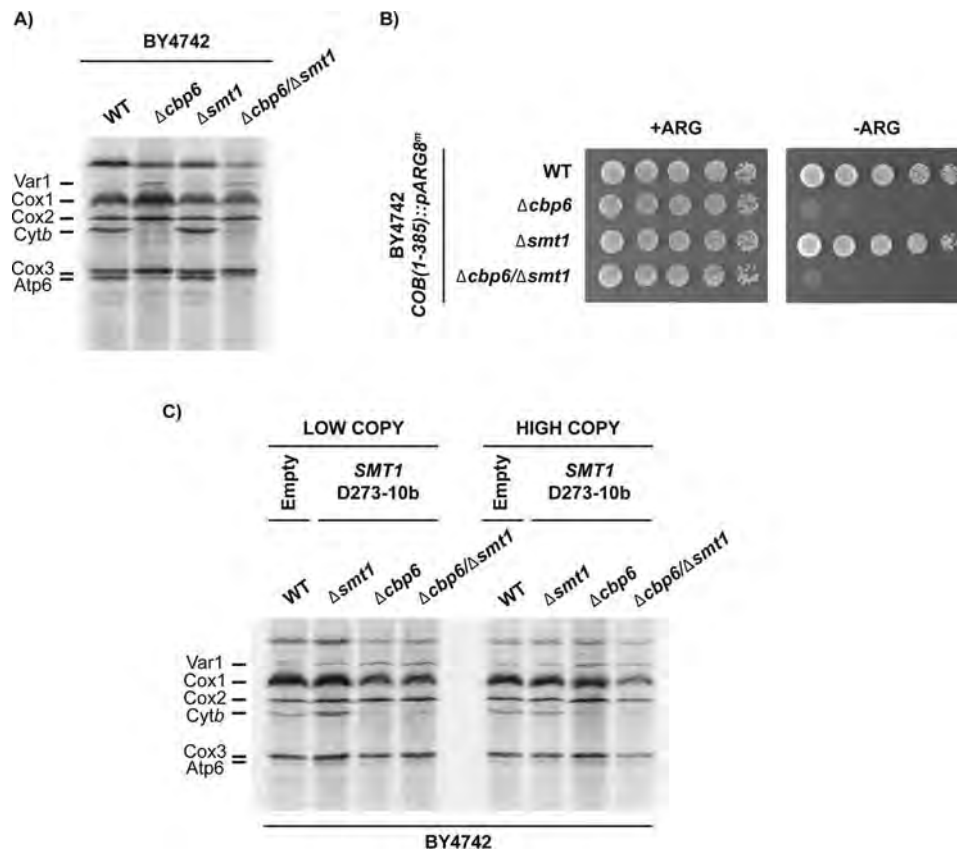


Figure 7. SMT1 is not involved in the differential regulation of Cytb synthesis between BY4742 and D273-10b lab strains. A, mitochondrial translation products from the WT, $\Delta cbp6$, $\Delta smt1$, and $\Delta cbp6/\Delta smt1$ -null mutants were labeled with [35 S]methionine in the presence of cycloheximide. Proteins were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. B, D273-10b cells carrying the $COB(1-385)::pARG8^m$ mitochondrial construct were grown on 10-fold serial dilutions on complete media (+ARG) or media lacking arginine (-ARG) for 3 days at 30 °C. C, BY4742 cells carrying the D273-10b $SMT1$ gene expressed from low-copy or high-copy plasmids were [35 S]methionine pulse-labeled, and mitochondrial translation products were analyzed as in A. Wildtype cells were transformed with empty plasmid as indicated.

which arose from a different lineage (35). Previous reports also observed that in D273-10b lab strains Cbp3 and Cbp6 were only involved in bc_1 complex assembly rather than in Cytb synthesis regulation (23, 32). Moreover, the homologs of Cbp3 and Cbp6 in *Schizosaccharomyces pombe* are only involved in the bc_1 complex assembly, but not in Cytb synthesis (24). These observations suggest that the role of Cbp3 and Cbp6 in COB mRNA translational regulation was acquired at a very recent event, after the divergence of *Saccharomyces cerevisiae* D273-10b strain from W303 and BY4742 strains.

Even though COB mRNA translation occurs normally in D273-10b strain in the absence of Cbp3 and Cbp6, cells are incapable of supporting respiratory growth. This could be explained because these chaperones are still required for Cytb hemylation in the D273-10b lab strain. Accordingly, Hildenbeutel *et al.* (15) reported that Cbp3–Cbp6 coordinate apocytochrome *b* hemylation. These chaperones interact with a heme-free Cytb intermediate, as well as with a Cytb protein carrying heme b_L . This result shows that the function of Cbp3 and Cbp6 as chaperones for Cytb hemylation is well-conserved in different *S. cerevisiae* laboratory strains. The exact mechanism by which heme *b* assembles into Cytb is still unknown, the heme *b* could be assembled from the mitochondrial matrix or from the inner membrane (36), and interaction of Cbp3 and Cbp6 with newly synthesized Cytb may keep it in an “accessi-

ble” conformation to be hemylated. Moreover, association of Cbp3 and Cbp6 with the ribosomal tunnel exit might be important for this process (15). Accordingly, we observed that even when Cbp3 is dispensable for translation in D273-10b cells, this chaperone interacts with the mitochondrial ribosome in both the BY4742 and in the D273-10b strains, as previously reported for W303 cells (14). This interaction could be important for early interaction with Cytb or for efficient communication between the translational machinery and assembly of Cytb. In this translation/assembly coordination process, Rrf1 and Mif3 might also be involved as previously proposed (37).

We also observed that in D273-10b cells, Cytb interacts with cytochrome *c* oxidase to form non-functional supercomplexes in the absence of Cbp3 and Cbp6. These supercomplexes contain at least Cytb, Core 1, and the Rieske iron–sulfur subunits. Several reports show that supercomplexes formation can occur at early steps of CcO and bc_1 complex assembly (2, 38, 39). Moreover, CcO subunit Cox2 can form a 230-kDa subcomplex with the early assembly intermediate composed of Cytb, Qcr7, and Qcr8 (2). These data support a model in which bc_1 complex interacts with CcO at early assembly stages and suggest that this interaction is independent from Cytb hemylation and Cbp3/Cbp6. Alternatively, Cbp3/Cbp6 might participate on regulation of Cytb incorporation into supercomplexes, explaining

Cbp3 and Cbp6 are dispensable for Cytb synthesis

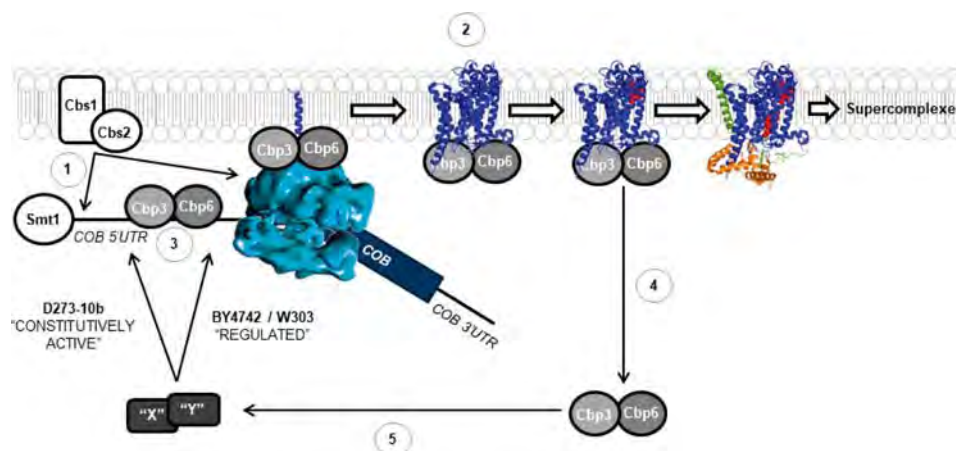


Figure 8. Model showing a mechanism for the differential regulation of *Cytb* synthesis by Cbp3 and Cbp6 in distinct laboratory yeast strains. Translational activation of the *COB* mRNA depends on Cbs1 and Cbs2 (8, 9) (1). Cbp3 and Cbp6 interact with the ribosomal tunnel exit (14) and with newly synthesized *Cytb* to promote hemylation/assembly (hemes in red) (7, 15) (2). Cbp3 interacts with the *COB* 5'-UTR mRNA (this work), probably to promote efficient translation (3). These interactions are present in both D273-10b and BY4742 lab strains. *Cytb* assembly proceeds to form the first intermediary, containing Qcr7 (orange) and Qcr8 (green) subunits, and then Cbp3/6 release from the *Cytb* complex (7). We propose the existence of additional factors X and Y, which in turn become active in BY4742 and W303 lab strains, allowing an efficient *COB* mRNA translation (5). Absence of Cbp3/6 prevents factors X and Y from becoming active, and thereby *Cytb* synthesis is reduced. In contrast, in D273-10b strain factors X and Y are constitutively active, even in the absence of Cbp3 and Cbp6. In addition, Smt1 physically interacts with the *COB* mRNA to carry over an unknown function that does not seem to be related to Cbp3/Cbp6 (20). Tertiary and quaternary structures were taken from the Protein Data Bank (code 1EZV).

why in the absence of these chaperones, non-functional super-complexes form.

How is *Cytb* synthesis differentially regulated by Cbp3/Cbp6 in D273-10b versus BY4742/W303 strains? We hypothesize that there are additional proteins participating in the Cbp3/Cbp6-dependent translational regulation observed in BY4742 and W303 lab strains. This function may arise from polymorphism(s) affecting the protein(s) sequence and therefore activity. Here we showed that the differential role of Cbp3/Cbp6 comes from polymorphisms in the nuclear genome rather than in the mitochondrial DNA. This polymorphism(s) confers a dominant phenotype to D273-10b cells over BY4742 cells, meaning that diploids resulting from the cross of D273-10b and BY4741 have normal levels of *Cytb* synthesis in the absence of Cbp3 and Cbp6 (Fig. S4). Moreover, tetrad analysis of diploid, *CBP3* heterozygous cells carrying the *COB(1-385)::ARG8^m* suggested that there are two nuclear genes involved in the observed differential phenotype of $\Delta cbp3$ mutants (data not shown).

We propose some modifications to the current model for *Cytb* synthesis and assembly (40). Translational activation of the *COB* mRNA depends on Cbs1 and Cbs2, which act on the *COB* mRNA 5'-UTR and also interact with the mitochondrial ribosome (8, 12) (Fig. 8, part 1). Cbp3 and Cbp6 interact with the ribosomal tunnel exit (7) and with the *Cytb* peptide probably to facilitate *Cytb* hemylation (15) and/or assembly (Fig. 8, part 2). We also demonstrated that Cbp3 physically interacts with the *COB* mRNA. This interaction could be direct or mediated by another protein or by the ribosome (Fig. 8, part 3). Interestingly, the Cbp3-*COB* mRNA association was observed in both lab strains, suggesting that this interaction alone is not sufficient for *COB* mRNA translational regulation. Once *Cytb* assembly proceeds to form the first intermediaries containing Qcr7 and Qcr8 subunits (and Cbp4; not shown), then Cbp3/Cbp6 release from the *Cytb* complex (7) (Fig. 8, part 4). Protein "X" (or perhaps proteins X and Y) becomes active only upon

release of Cbp3/Cbp6 from the *Cytb* complex in BY4742 and W303 lab strains to allow efficient *COB* mRNA translation (Fig. 8, part 5). In these lab strains, absence of Cbp3/Cbp6 prevents the factors X and Y from becoming active, and therefore *Cytb* synthesis is reduced. In contrast, in D273-10b lab strain factors X and Y are constitutively active, even in the absence of Cbp3 and Cbp6, possibly because of a loss of communication with these chaperones. Thus, *Cytb* synthesis is normal even in the absence of Cbp3/Cbp6.

The identity of proteins X and Y remains to be elucidated. Laboratory *S. cerevisiae* strains contain polymorphisms, introduced mutations, and genetic markers that confer differential phenotypes on mitochondrial function (41, 42). Chaperones that are currently known to be involved in *Cytb* biogenesis were discarded (Cbs1, Cbs2, Cbp1, and Cbp4), because sequence comparisons did not show any changes between D273-10b and BY4742/W303 strains. A candidate was Smt1, which physically interacts with the *COB* mRNA (20) and has three amino acid changes in the D273-10b protein as compared with BY4742 and W303. However, our results did not support that Smt1 has a regulatory role of *Cytb* synthesis that is related to Cbp3 and Cbp6. Other previously identified alleles affecting mitochondrial function that might be candidates are *HAPI* and *MRMI* (42). However, none of these genes are likely to be involved in the differential function of Cbp3/Cbp6 that we observe. Hap1, a heme-responsive transcriptional factor of genes involved in electron transfer reactions (43) has a C-terminal end mutation in some S288c-derived strains that modifies respiratory and oxygen metabolism (44). However, although BY4742 has the *hap1* mutation, W303 and D273-10b have wildtype *HAPI*, ruling out the possibility that *HAPI* could be involved in the Cbp3/Cbp6 differential function we observed between D273-10b and BY4742/W303 strains. Mutations on the promoter of *MRMI*, encoding a mitochondrial methyltransferase, are associated with respiratory defects in some lab

strains (42, 45). However, this gene is wildtype in W303, D273-10b, and BY4742 strains.

Experimental procedures

Yeast strains and genetic methods

S. cerevisiae D273-10b (ATCC24657), BY4742 (ATCC4040004), and BY4741 (ATCC4040002) strains used in this study are listed on Table 1. Genetic methods and media were as previously described (46, 47). Strains were cultured in complete fermentable media containing 1% yeast extract, 2% Bacto-peptone, and 2% glucose (YPD) or 2% galactose (YPGal), or in synthetic complete media containing 0.67% yeast nitrogen base and 2% glucose and lacking uracil or the indicated amino acids. Nuclear deletion constructs with *LEU2*, *URA3*, *HIS3MX6*, or *KanMX4* cassettes were made by PCR. Correct integration of the different constructs into the nuclear genome was confirmed by PCR. The *CBP3-HA* construct, including 320 and 352 bp of the *CBP3* 5'- and 3'-UTR, respectively, was amplified by fusion PCR (48). This product was ligated into NotI sites of the yeast expression plasmid pRS416.

Mitochondrial transformation

The construct *COB(1–385)::pARG8^m* was made by PCR amplification of three fragments: one included the last 351 bp of the *COB* *orf* and another covered the first 470 bp of the *ARG8^m* *orf* encoding the Arg8 mitochondrial targeting signal (22). These two products were used as templates for fusion PCR (48). The fusion product was cut with XhoI and EcoRI and cloned into equally digested pBluescript SK(+) vector to obtain plasmid pYCV55. The third PCR product included the complete *ARG8^m* *orf* and 625bp of *COB* 3'-UTR; this product was cloned in pYCV55 digested with NcoI and EcoRI. The resulting plasmid, pYCV56, was transformed by high-velocity microprojectile bombardment into the rho0 strain NAB69 (49). Transformants were selected by their ability to rescue growth in media lacking arginine when mated with the strain NB71 (49). Transformants with the *COB(1–385)::ARG8^m* plasmid were mated with XPM201 (derived from D273-10b lab strain) (50) and AGG26 (derived from BY4742 lab strain), and haploid cytoductants were selected for their ability to grow in media lacking arginine. Correct integration of the *COB(1–385)::ARG8^m* constructs into mtDNA was confirmed by PCR and DNA sequencing.

Analysis of mitochondrial proteins

Mitochondria were isolated from cells grown in YPGal media until late log phase. The cells were disrupted with glass beads or by zymolyase 20T treatment as described (51). The proteins were resolved by SDS-PAGE on 12% gels (52) or 16% in the presence of 6 M urea (53), transferred to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane and detected by immunoblotting with horseradish peroxidase-conjugated antibodies to HA (Roche) or the indicated rabbit polyclonal antibodies: anti-Qcr7, anti-Qcr8, anti-Cor1, anti-Cor2, anti-Rip1, and anti-Qcr10 (Vicenzo Zara); anti-Rip1, anti-Cor1, and anti-Mrp20 (Rosemary Stuart); anti-citrate synthase and anti-Mrp51 (Thomas D. Fox); and anti-Cytb. Secondary goat IgG anti-mouse or anti-

rabbit (Santa Cruz Biotechnology) conjugated to horseradish peroxidase was detected with the Pierce ECL (Thermo Scientific) or ImmobilonTM Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore). All loaded proteins were normalized by protein quantification using the Lowry method (54).

Protein aggregation analysis

Protein aggregation analysis was performed as described previously (5). Samples (100 μ g) of mitochondrial protein were washed with 250 mM sorbitol, 50 mM Bis-Tris and lysed with 1% digitonin, 30 mM Tris, pH 7.4, 200 mM KCl, 5 mM EDTA, and 0.5 mM PMSF for 30 min on ice. After ultracentrifugation at 4 °C for 30 min at 100,000 \times g in a TLA 120.2 rotor, supernatant was recovered into a new tube (S1). The resultant pellet was lysed with 1% Triton, 30 mM Tris, pH 7.4, 200 mM KCl, 5 mM EDTA, and 0.5 mM PMSF for 5 min on ice. Pellet (P) and supernatant (S2) were separated by ultracentrifugation at 4 °C for 30 min at 100,000 \times g in a TLA 120.2 rotor. Supernatants S1 and S2 were mixed (S) and treated with TCA for protein precipitation.

Heme b analysis

Total heme extraction was performed as previously described (55). Samples (700 μ g) of Histodenz (Sigma) purified mitochondrial protein were treated with 300 μ l acidic acetone (3% HCl) and incubated for 5 min at room temperature. Supernatant was recovered after centrifugation for 5 min at 16,200 \times g. Supernatant was mixed with 1% trifluoroacetic acid in a proportion 1:1. HPLC analysis was performed as described (56) in a Beckman HPLC unit with System Gold. Supernatant was injected onto a 4.6- by 250- μ m SunFire C₁₈ 5-mm column (Waters). Hemes were eluted from the column at a flow rate of 1 ml/min using a 0–100% gradient of acetonitrile containing 1% of trifluoroacetic acid. Elution of heme compounds was monitored at 400 nm. Purified heme *b* (Sigma) was used as standard to determine elution time. For heme *b* analysis, two different mitochondria purifications were used as biological replicates with one technical replicate. For each biological replicate, heme *b* extractions and HPLC analysis were made with one technical replicate ($n = 3$). Statistical analysis was made by one-way analysis of variance followed by Bonferroni post hoc (GraphPad Prism software, version 6.0). Two-sided adjusted *p* values for multiple comparisons are presented.

Synthesis of mitochondrial proteins

In vivo labeling of cells in the presence of [³⁵S]methionine and cycloheximide was performed as previously described (16). After 15 or 40 min of pulse labeling, the 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 PVDF membrane, and analyzed with a Typhoon 8600 phosphorimaging device (GE Healthcare).

Blue native electrophoresis

BN-PAGE was performed as described previously (29). Samples (100 μ g) of mitochondrial protein were washed with 250 mM sorbitol, 50 mM Bis-Tris and lysed with 750 mM aminocaproic acid, 50 mM Bis-Tris, and either digitonin or *n*-dodecyl

Table 1
Yeast strains used in this study

The mitochondrial genome is indicated in parentheses.

Strain	Nuclear (mitochondrial) genotype	Reference/source
NB40-36a	<i>Matx, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3.1.12, D273-10B</i> (p ⁺)	Ref. 16
DAU1	<i>Matx, ade2, ura3Δ, D273-10B</i> (p ⁺)	Ref. 58
XPM201	<i>Matx, arg8::hisG, leu2-3.1.12, lys2, ura3-52, D273-10b</i> (p ⁺ , Δ <i>Δ</i> ai) ^b	Ref. 50
NAB69	<i>Mata, ade2-101, arg8::delta::hisG, ura3-52, kar1-1</i> (p ⁺)	Ref. 49
NB71	<i>Matx, ade2-101, ura3-52, leu2-delta, arg8::delta::URA3, kar1-1</i> (p ⁺ , cox3Δ::ARG8 sm -1)	Ref. 49
BY4742	<i>Matx, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, BY4742</i> (p ⁺)	YKO Matx Strain Collection—Glycerol Stocks (Open Biosystems)
BY4741	<i>Mata, his3-delta1, leu2-delta0, met15-delta0, ura3-delta0, BY4741</i> (p ⁺)	YKO Matx Strain Collection—Glycerol Stocks (Open Biosystems)
Δ <i>qcr7</i>	<i>Matx, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, qcr7::KANMX4, BY4742</i> (p ⁺)	YKO Matx Strain Collection—Glycerol Stocks (Open Biosystems)
Δ <i>qcr10</i>	<i>Matx, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, qcr10::KANMX4, BY4742</i> (p ⁺)	YKO Matx Strain Collection—Glycerol Stocks (Open Biosystems)
Δ <i>cbp4</i>	<i>Matx, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, cbp4::KANMX4, BY4742</i> (p ⁺)	YKO Matx Strain Collection—Glycerol Stocks (Open Biosystems)
Δ <i>smt1</i>	<i>Matx, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, smt1::KANMX4, BY4742</i> (p ⁺)	YKO Matx Strain Collection—Glycerol Stocks (Open Biosystems)
Δ <i>cbp3</i>	<i>Mata, his3-delta1, leu2-delta0, met15-delta0, ura3-delta0, cbp3::KANMX4, BY4741</i> (p ⁺)	YKO Matx Strain Collection—Glycerol Stocks (Open Biosystems)
AGG24	<i>Matx, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3.1.12, D273-10B</i> (p ⁺ , BY4742 mtDNA) ^a	This study
AGG25	<i>Matx, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3.1.12, cbp3::KANMX4, D273-10B</i> (p ⁺ , BY4742 mtDNA)	This study
AGG28	<i>Matx, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3.1.12, cbp4::KANMX4, D273-10B</i> (p ⁺ , BY4742 mtDNA)	This study
AGG29	<i>Matx, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3.1.12, qcr7::KANMX4, D273-10B</i> (p ⁺ , BY4742 mtDNA)	This study
AGG30	<i>Matx, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3.1.12, qcr10::KANMX4, D273-10B</i> (p ⁺ , BY4742 mtDNA)	This study
AGG33	<i>Matx, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, arg8::URA3, BY4742</i> (p ⁺ , Δ <i>Δ</i> ai ^b , COB(1-352)::pARG8 sm)	This study
AGG34	<i>Matx, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, arg8::URA3, qcr7::KANMX4, BY4742</i> (p ⁺ , Δ <i>Δ</i> ai ^b , COB(1-352)::pARG8 sm)	This study
AGG35	<i>Matx, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, arg8::URA3, qcr8::KANMX4, BY4742</i> (p ⁺ , Δ <i>Δ</i> ai, COB(1-352)::pARG8 sm)	This study
AGG36	<i>Matx, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, arg8::URA3, cbp3::KANMX4, BY4742</i> (p ⁺ , Δ <i>Δ</i> ai, COB(1-352)::pARG8 sm)	This study
AGG37	<i>Matx, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, arg8::URA3, cbp4::KANMX4, BY4742</i> (p ⁺ , Δ <i>Δ</i> ai, COB(1-352)::pARG8 sm)	This study
AGG38	<i>Matx, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, arg8::URA3, BY4742</i> (p ⁺ , NB40-36a mtDNA)	This study
AGG39	<i>Matx, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, arg8::URA3, qcr7::KANMX4, BY4742</i> (p ⁺ , NB40-36 mtDNA)	This study
AGG40	<i>Matx, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, arg8::URA3, qcr10::KANMX4, BY4742</i> (p ⁺ , NB40-36 mtDNA)	This study
AGG41	<i>Matx, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, arg8::URA3, cbp3::KANMX4, BY4742</i> (p ⁺ , NB40-36 mtDNA)	This study
AGG42	<i>Matx, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, arg8::URA3, cbp6::LEU2, BY4742</i> (p ⁺ , NB40-36a mtDNA)	This study
AGG43	<i>Matx, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3.1.12, qcr7::KANMX4, D273-10B</i> (p ⁺)	This study
AGG44	<i>Matx, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3.1.12, cbp4::KANMX4, D273-10B</i> (p ⁺)	This study
AGG45	<i>Matx, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3.1.12, cbp3::KANMX4, D273-10B</i> (p ⁺)	This study
AGG46	<i>Matx, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3.1.12, cbp4::KANMX4, D273-10B</i> (p ⁺)	This study
AGG47	<i>Matx, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3.1.12, cbp4::KANMX4, D273-10B</i> (p ⁺)	This study
AGG48	<i>Matx, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3.1.12, D273-10B</i> (p ⁺ , Δ <i>Δ</i> ai, COB(-352)::pARG8 sm)	This study
AGG56	<i>Matx, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3.1.12, cbp6::LEU2, D273-10B</i> (p ⁺)	This study
AGG57	<i>Matx, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3.1.12, cbp6::LEU2, D273-10B</i> (p ⁺ , BY4742 mtDNA)	This study
AGG58	<i>Matx, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, cbp3::KANMX4, BY4742</i> (p ⁺)	This study
AGG59	<i>Matx, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, cbp6::LEU2, BY4742</i> (p ⁺)	This study
AGG60	<i>Matx, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, arg8::URA3, cbp4::KANMX4, BY4742</i> (p ⁺ , Δ <i>Δ</i> ai, COB(1-352)::pARG8 sm)	This study
AGG61	<i>Matx, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3.1.12, cbp3::KANMX4, cbp6::LEU2, D273-10B</i> (p ⁺)	This study
AGG62	<i>Matx, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, arg8::URA3, cbp6::LEU2, BY4742</i> (p ⁺ , Δ <i>Δ</i> ai, COB(1-352)::pARG8 sm)	This study
AGG63	<i>Matx, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3.1.12, qcr7::KANMX4, D273-10B</i> (p ⁺ , Δ <i>Δ</i> ai, COB(1-352)::pARG8 sm)	This study
AGG65	<i>Matx, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3.1.12, cbp3::KANMX4, D273-10B</i> (p ⁺ , Δ <i>Δ</i> ai, COB(1-352)::pARG8 sm)	This study
AGG66	<i>Matx, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3.1.12, cbp6::LEU2, D273-10B</i> (p ⁺ , Δ <i>Δ</i> ai, COB(1-352)::pARG8 sm)	This study
AGG67	<i>Matx, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3.1.12, cbp6::LEU2, D273-10B</i> (p ⁺ , Δ <i>Δ</i> ai, COB(1-352)::pARG8 sm)	This study
AGG68	<i>Mata, his3-delta1, leu2-delta0, met15-delta0, ura3-delta0, qcr7::KANMX4, BY4741</i> (p ⁺)	This study
AGG69	<i>Mata, his3-delta1, leu2-delta0, met15-delta0, ura3-delta0, cbp6::LEU2, BY4741</i> (p ⁺)	This study
AGG70	<i>Matx, his3-delta1, leu2-delta0, met15-delta0, ura3-delta0, cbp4::KANMX4, BY4741</i> (p ⁺)	This study
AGG71	<i>Matx(a, lys2^{+/+}, arg8::hisG^{+/+}, ura3-52/ura3-delta0, leu2-3.1.12/leu2-delta0, met15-delta0^{+/+}, his-delta1^{-/+}, D273-10b/BY4741</i> (p ⁺)	This study
AGG72	<i>Matx(a, lys2^{+/+}, arg8::hisG^{+/+}, ura3-52/ura3-delta0, leu2-3.1.12/leu2-delta0, met15-delta0^{+/+}, his-delta1^{-/+}, qcr7::KANMX4^{+/+}, D273-10b/BY4741</i> (p ⁺)	This study
AGG73	<i>Matx(a, lys2^{+/+}, arg8::hisG^{+/+}, ura3-52/ura3-delta0, leu2-3.1.12/leu2-delta0, met15-delta0^{+/+}, his-delta1^{-/+}, cbp6::LEU2^{+/+}, D273-10b/BY4741</i> (p ⁺)	This study
AGG74	<i>Matx(a, lys2^{+/+}, arg8::hisG^{+/+}, ura3-52/ura3-delta0, leu2-3.1.12/leu2-delta0, met15-delta0^{+/+}, his-delta1^{-/+}, cbp4::KANMX4^{+/+}, D273-10b/BY4741</i> (p ⁺)	This study
AGG75	<i>Matx, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3.1.12, cbs1::URA3, D273-10B</i> (p ⁺ , Δ <i>Δ</i> ai, COB(1-352)::pARG8 sm)	This study
AGG76	<i>Matx, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, arg8::URA3, cbs1::HIS3MX6, BY4742</i> (p ⁺ , Δ <i>Δ</i> ai, COB(1-352)::pARG8 sm)	This study
AGG77	<i>Matx, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, cbs1::URA3, BY4742</i> (p ⁺)	This study

Table 1—continued

Strain	Nuclear (mitochondrial) genotype	Reference/source
AGG78	<i>Matx, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3.112, cbs1::URA3, D273-10B</i> (p ⁺)	This study
AGG87	<i>Matx/a, lys2^{+/+}, arg8::hisG^{+/+}, ura3-52/ura3-delta0, leu2-3.112/leu2-delta0, met15-delta0^{-/-}, his-delta1^{-/-}, cbp3::KANMX4^{+/+}, D273-10b/BY4741</i> (p ⁺)	This study
AGG89	<i>Matx, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, snt1::KANMX4, cbp6::LEU2, BY4742</i> (p ⁺)	This study
AGG91	<i>Matx, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, arg8::URA3, snt1::KANMX4, cbp6::LEU2, BY4742</i> (p ⁺ , Δ <i>Σ</i> <i>ai</i> , COB(1-352)::pARG8 ^m)	This study
AGG93	<i>Matx, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, arg8::URA3, qcr7::KANMX4, BY4742</i> (p ⁺ , Δ <i>Σ</i> <i>ai</i> , <i>cobΔ::ARG8^m</i>)	This study
AGG95	<i>Matx, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, arg8::URA3, cbp4::KANMX4, BY4742</i> (p ⁺ , Δ <i>Σ</i> <i>ai</i> , <i>cobΔ::ARG8^m</i>)	This study
AGG96	<i>Matx, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, arg8::URA3, cbp3::KANMX4, BY4742</i> (p ⁺ , Δ <i>Σ</i> <i>ai</i> , <i>cobΔ::ARG8^m</i>)	This study
AGG97	<i>Matx, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3.112, qcr7::KANMX4, D273-10B</i> (p ⁺ , Δ <i>Σ</i> <i>ai</i> , <i>cobΔ::ARG8^m</i>)	This study
AGG99	<i>Matx, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3.112, cbp4::KANMX4, D273-10B</i> (p ⁺ , Δ <i>Σ</i> <i>ai</i> , <i>cobΔ::ARG8^m</i>)	This study
AGG100	<i>Matx, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3.112, cbp3::KANMX4, D273-10B</i> (p ⁺ , Δ <i>Σ</i> <i>ai</i> , <i>cobΔ::ARG8^m</i>)	This study
AGG101	<i>Matx, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3.112, pet309::URA3, cbp6::LEU2, D273-10B³</i> (p ⁺)	This study
AGG102	<i>Matx/Matx, lys2^{+/+}, arg8::hisG^{+/+}, ura3-52^{+/+}, ade2^{-/-}, his3-11.15^{-/-}, trp1-1^{-/-}, ura3-1^{-/-}, cbp3::KANMX4^{+/+}, D273-10B/W303</i> (p ⁺ , Δ <i>Σ</i> <i>ai</i> , COB(1-352)::pARG8 ^m)	This study
DFM2	<i>Matx, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, arg8::URA3, BY4742</i> (p ⁺ , Δ <i>Σ</i> <i>ai</i> , <i>cobΔ::ARG8^m</i>)	Daniel Flores-Mireles
DFM5	<i>Matx, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3.112, D273-10B</i> (p ⁺ , Δ <i>Σ</i> <i>ai</i> , <i>cobΔ::ARG8^m</i>)	Daniel Flores-Mireles
YC140	<i>Matx, ade2, ura3-delta, MSS51-3XHA, pet309::URA3, D273-10b</i> (p ⁺ , <i>cox1-delta</i>)	This study
YC166	<i>Matx, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3.112, cbs1::URA3, D273-10B</i> (p ⁺ , Δ <i>Σ</i> <i>ai</i> , <i>cobΔ::ARG8^m</i>)	This study
YC173	<i>Matx, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, arg8::URA3, cbp6::LEU2, BY4742</i> (p ⁺ , Δ <i>Σ</i> <i>ai</i> , <i>cobΔ::ARG8^m</i>)	This study
YC174	<i>Matx, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3.112, cbp6::LEU2, D273-10B</i> (p ⁺ , Δ <i>Σ</i> <i>ai</i> , <i>cobΔ::ARG8^m</i>)	This study
YC175	<i>Matx, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, arg8::URA3, cbs1::HIS3MX6, BY4742</i> (p ⁺ , Δ <i>Σ</i> <i>ai</i> , <i>cobΔ::ARG8^m</i>)	This study

^a mtDNA refers to mitochondrial genome.

^b Δ*Σ**ai* refers to the intronless COX1 gene.

^c +/− corresponds presence (+) or absence (−) of the allele in both chromosomes in the diploid strain.

Cbp3 and Cbp6 are dispensable for Cytb synthesis

β-D-maltoside on a protein detergent relation of 2:1 and 1:2, respectively, for 15 min (*n*-dodecyl β-D-maltoside) or 30 min (digitonin) on ice. Mitochondrial extracts were cleared at 16,200 × *g* for 12 min, and the supernatants were mixed with 2.5 μl of 5% Coomassie solution (750 mM aminocaproic acid, 50 mM Bis-Tris). Extracts were loaded on a 5% to 12% polyacrylamide gel and transferred to a PVDF membrane. The proteins were detected by immunoblotting with the indicated antibodies. In-gel CcO activity was performed after BN-PAGE using 0.04% diaminobenzidine (Sigma–Aldrich) and 0.02% of horse heart cytochrome *c* (Sigma–Aldrich) in phosphate buffer, pH 7.4 (57).

RNA immunoprecipitation assay

This technique was performed as previously described (30). Mitochondria (500 μg) were lysed with 0.7% *n*-dodecyl β-D-maltoside, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, RNaseOUT (Invitrogen), and Minicomplete protease inhibitors (Roche). The solubilized fractions were incubated with an anti-HA antibody coupled to protein A-Sepharose (GE Healthcare). 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-third of the precipitate fractions were saved for Western blotting analysis, and the remainder was 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 *COB* or *VARI* in the presence of SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen). The resulting cDNAs were used as PCR templates to amplify *COB* or *VARI* 5′-UTRs. Note that under these conditions, RT-PCRs are not quantitative.

Sucrose fractionation of mitochondrial lysates

Samples (500 μg) of mitochondrial protein were lysed with 1% digitonin, 10 mM MgOAc, 50 mM NaCl, 20 mM HEPES-KOH, pH 7.4, and 1 mM PMSF for 30 min on ice and clarified by centrifugation at 16,200 × *g* for 10 min. Supernatants were loaded into a discontinuous sucrose gradient of 40, 30, and 20% containing 0.1% digitonin, 10 mM MgOAc, 20 mM DTT, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, and 0.5 mM PMSF. Sucrose gradients were ultracentrifuged at 145,000 × *g* in a SW-55Ti rotor for 2 h at 4 °C. Fractions of 600 μl were taken and TCA-treated for protein precipitation. Proteins were resolved by SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes, and detected by immunoblotting with the indicated antibodies.

Imaging and figure edition

For better visualization, all figures from pictures, scanning, or phosphorimaging were adjusted in contrast and brightness using the Adobe Photoshop software. Pictures of serial dilutions, agarose gels, *in gel* activity, and Coomassie Blue gels from Figs. 1 (*G* and *H*), 3*B*, 6*D*, and 7*B* and Figs. S1 (*A–C*), S2 (*A* and *B*), and S3 were taken by a camera. *In vivo* labeling from Figs. 1 (*A*, *B*, and *F*), 6 (*A* and *C*), and 7 (*A* and *C*) and Fig. S4 (*A* and *B*) was visualized by exposure to a storage phosphor screen and then scanned in a Typhoon FLA700 or Typhoon 9400 (GE

Cbp3 and Cbp6 are dispensable for Cytb synthesis

Healthcare). Western blotting images from Figs. 1E, 2 (A and B), 2C, 3 (A and C), 5 (A–C), and 6 (B and D) and Fig. S2A were visualized by exposure to a film and then scanned in a scanner Color LaserJet Pro MFP M477fmw (HP).

Author contributions—A. E. G.-G. data curation; A. E. G.-G. and A. Z.-O. formal analysis; A. E. G.-G., Y. C.-V., A. Z.-O., D. R. W., and X. P.-M. investigation; A. E. G.-G. and X. P.-M. writing-original draft; Y. C.-V. project administration; Y. C.-V., A. Z.-O., and D. R. W. writing-review and editing; D. R. W. and X. P.-M. supervision; X. P.-M. conceptualization; X. P.-M. funding acquisition.

Acknowledgments—We thank Thomas D. Fox, Rosemary Stuart, Martin Ott, and Vincenzo Zara for the gift of antisera; Daniel Flores-Mireles, Gabriel del Río-Guerra, and Teresa Lara-Ortiz for the gift of yeast deletion strains; Thomas D. Fox for helpful insights of tetrad segregation analysis; Emma Bertha Gutiérrez-Cirlos, Tecillo Cabellos-Avelar, Ana Paula García-García, Mi-Young Jeong, Hyoung J. Kim, Miriam Vázquez-Acevedo, Guadalupe Códiz-Huerta, Minerva Mora-Cabrera, and Laura Ongay-Larios for technical assistance; and Claudia Rivera-Cerecedo and Héctor Malagón-Rivero for technical assistance obtaining antisera.

References

- Zara, V., Conte, L., and Trumpower, B. L. (2009) Biogenesis of the yeast cytochrome *bc*₁ complex. *Biochim. Biophys. Acta* **1793**, 89–96 [CrossRef Medline](#)
- Conte, A., Papa, B., Ferramosca, A., and Zara, V. (2015) The dimerization of the yeast cytochrome *bc*₁ complex is an early event and is independent of Rip1. *Biochim. Biophys. Acta* **1853**, 987–995 [CrossRef Medline](#)
- Atkinson, A., Khalimonchuk, O., Smith, P., Sabic, H., Eide, D., and Winge, D. R. (2010) Mzm1 influences a labile pool of mitochondrial zinc important for respiratory function. *J. Biol. Chem.* **285**, 19450–19459 [CrossRef Medline](#)
- Atkinson, A., Smith, P., Fox, J. L., Cui, T. Z., Khalimonchuk, O., and Winge, D. R. (2011) The LYR protein Mzm1 functions in the insertion of the Rieske Fe/S protein in yeast mitochondria. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 3988–3996 [CrossRef Medline](#)
- Cui, T. Z., Smith, P. M., Fox, J. L., Khalimonchuk, O., and Winge, D. R. (2012) Late-stage maturation of the Rieske Fe/S protein: Mzm1 stabilizes Rip1 but does not facilitate its translocation by the AAA ATPase Bcs1. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 4400–4409 [CrossRef Medline](#)
- Crivellone, M. D., Wu, M. A., and Tzagoloff, A. (1988) Assembly of the mitochondrial membrane system. Analysis of structural mutants of the yeast coenzyme QH₂-cytochrome *c* reductase complex. *J. Biol. Chem.* **263**, 14323–14333 [Medline](#)
- Gruschke, S., Römler, K., Hildenbeutel, M., Kehrein, K., Kühl, I., Bonnefoy, N., and Ott, M. (2012) The Cbp3–Cbp6 complex coordinates cytochrome *b* synthesis with *bc*₁ complex assembly in yeast mitochondria. *J. Cell Biol.* **199**, 137–150 [CrossRef Medline](#)
- Rödel, G. (1986) Two yeast nuclear genes, CBS1 and CBS2, are required for translation of mitochondrial transcripts bearing the 5′-untranslated COB leader. *Curr. Genet.* **11**, 41–45 [CrossRef Medline](#)
- Rödel, G., Michaelis, U., Forsbach, V., Kreike, J., and Kaudewitz, F. (1986) Molecular cloning of the yeast nuclear genes CBS1 and CBS2. *Curr. Genet.* **11**, 47–53 [CrossRef Medline](#)
- Dieckmann, C. L., Koerner, T. J., and Tzagoloff, A. (1984) Assembly of the mitochondrial membrane system. CBP1, a yeast nuclear gene involved in 5′ end processing of cytochrome *b* pre-mRNA. *J. Biol. Chem.* **259**, 4722–4731 [Medline](#)
- Islas-Osuna, M. A., Ellis, T. P., Marnell, L. L., Mittelmeier, T. M., and Dieckmann, C. L. (2002) Cbp1 is required for translation of the mitochondrial cytochrome *b* mRNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **277**, 37987–37990 [CrossRef Medline](#)
- Krause-Buchholz, U., Barth, K., Dombrowski, C., and Rödel, G. (2004) *Saccharomyces cerevisiae* translational activator Cbs2p is associated with mitochondrial ribosomes. *Curr. Genet.* **46**, 20–28 [Medline](#)
- Kehrein, K., Möller-Hergt, B. V., and Ott, M. (2015) The MIOREX complex: lean management of mitochondrial gene expression. *Oncotarget* **6**, 16806–16807 [Medline](#)
- Gruschke, S., Kehrein, K., Römler, K., Gröne, K., Israel, L., Imhof, A., Herrmann, J. M., and Ott, M. (2011) Cbp3–Cbp6 interacts with the yeast mitochondrial ribosomal tunnel exit and promotes cytochrome *b* synthesis and assembly. *J. Cell Biol.* **193**, 1101–1114 [CrossRef Medline](#)
- Hildenbeutel, M., Hegg, E. L., Stephan, K., Gruschke, S., Meunier, B., and Ott, M. (2014) Assembly factors monitor sequential hemylation of cytochrome *b* to regulate mitochondrial translation. *J. Cell Biol.* **205**, 511–524 [CrossRef Medline](#)
- 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 [CrossRef Medline](#)
- Perez-Martinez, X., Butler, C. A., Shingu-Vazquez, M., and Fox, T. D. (2009) Dual functions of Mss51 couple synthesis of Cox1 to assembly of cytochrome *c* oxidase in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Mol. Biol. Cell* **20**, 4371–4380 [CrossRef Medline](#)
- Barrientos, A., Zambrano, A., and Tzagoloff, A. (2004) Mss51p and Cox14p jointly regulate mitochondrial Cox1p expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **23**, 3472–3482 [CrossRef Medline](#)
- Rak, M., and Tzagoloff, A. (2009) F1-dependent translation of mitochondrially encoded Atp6p and Atp8p subunits of yeast ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 18509–18514 [CrossRef Medline](#)
- Rak, M., Su, C. H., Xu, J. T., Azpiroz, R., Singh, A. M., and Tzagoloff, A. (2016) Regulation of mitochondrial translation of the ATP8/ATP6 mRNA by Smt1p. *Mol. Biol. Cell* **27**, 919–929 [CrossRef Medline](#)
- Labouesse, M., Netter, P., and Schroeder, R. (1984) Molecular basis of the “box effect,” A maturase deficiency leading to the absence of splicing of two introns located in two split genes of yeast mitochondrial DNA. *Eur. J. Biochem.* **144**, 85–93 [CrossRef Medline](#)
- 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 [CrossRef Medline](#)
- Wu, M., and Tzagoloff, A. (1989) Identification and characterization of a new gene (CBP3) required for the expression of yeast coenzyme QH₂-cytochrome *c* reductase. *J. Biol. Chem.* **264**, 11122–11130 [Medline](#)
- Kühl, I., Fox, T. D., and Bonnefoy, N. (2012) *Schizosaccharomyces pombe* homologs of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial proteins Cbp6 and Mss51 function at a post-translational step of respiratory complex biogenesis. *Mitochondrion* **12**, 381–390 [CrossRef Medline](#)
- Zara, V., Palmisano, I., Conte, L., and Trumpower, B. L. (2004) Further insights into the assembly of the yeast cytochrome *bc*₁ complex based on analysis of single and double deletion mutants lacking supernumerary subunits and cytochrome *b*. *Eur. J. Biochem.* **271**, 1209–1218 [CrossRef Medline](#)
- Cui, T. Z., Conte, A., Fox, J. L., Zara, V., and Winge, D. R. (2014) Modulation of the respiratory supercomplexes in yeast: enhanced formation of cytochrome oxidase increases the stability and abundance of respiratory supercomplexes. *J. Biol. Chem.* **289**, 6133–6141 [CrossRef Medline](#)
- Wagener, N., Ackermann, M., Funes, S., and Neupert, W. (2011) A pathway of protein translocation in mitochondria mediated by the AAA-ATPase Bcs1. *Mol. Cell* **44**, 191–202 [CrossRef Medline](#)
- 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 [Medline](#)
- Wittig, I., Braun, H. P., and Schägger, H. (2006) Blue native PAGE. *Nat. Protoc.* **1**, 418–428 [CrossRef Medline](#)
- Zamudio-Ochoa, A., Camacho-Villasana, Y., García-Guerrero, A. E., and Pérez-Martínez, X. (2014) The Pet309 pentatricopeptide repeat motifs mediate efficient binding to the mitochondrial COX1 transcript in yeast. *RNA Biol.* **11**, 953–967 [CrossRef Medline](#)

31. Brandt, U., Uribe, S., Schägger, H., and Trumppower, B. L. (1994) Isolation and characterization of QCR10, the nuclear gene encoding the 8.5-kDa subunit 10 of the *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome *bc*₁ complex. *J. Biol. Chem.* **269**, 12947–12953 [Medline](#)
32. Dieckmann, C. L., and Tzagoloff, A. (1985) Assembly of the mitochondrial membrane system. CBP6, a yeast nuclear gene necessary for synthesis of cytochrome *b*. *J. Biol. Chem.* **260**, 1513–1520 [Medline](#)
33. Ralser, M., Kuhl, H., Werber, M., Lehrach, H., Breitenbach, M., and Timmermann, B. (2012) The *Saccharomyces cerevisiae* W303-K6001 cross-platform genome sequence: insights into ancestry and physiology of a laboratory mutt. *Open Biol.* **2**, 120093 [CrossRef Medline](#)
34. Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., and Boeke, J. D. (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* **14**, 115–132 [CrossRef Medline](#)
35. Sherman, F. (1963) Respiration-deficient mutants of yeast: I. Genetics. *Genetics* **48**, 375–385 [Medline](#)
36. Kim, H. J., Khalimonchuk, O., Smith, P. M., and Winge, D. R. (2012) Structure, function, and assembly of heme centers in mitochondrial respiratory complexes. *Biochim. Biophys. Acta* **1823**, 1604–1616 [CrossRef Medline](#)
37. Ostojić, J., Panozzo, C., Bourand-Plantefol, A., Herbert, C. J., Dujardin, G., and Bonnefoy, N. (2016) Ribosome recycling defects modify the balance between the synthesis and assembly of specific subunits of the oxidative phosphorylation complexes in yeast mitochondria. *Nucleic Acids Res.* **44**, 5785–5797 [CrossRef Medline](#)
38. Su, C. H., McStay, G. P., and Tzagoloff, A. (2014) The Cox3p assembly module of yeast cytochrome oxidase. *Mol. Biol. Cell* **25**, 965–976 [CrossRef Medline](#)
39. García-Villegas, R., Camacho-Villasana, Y., Shingú-Vázquez, M. A., Cabrera-Orefice, A., Uribe-Carvajal, S., Fox, T. D., and Pérez-Martínez, X. (2017) The Cox1 C-terminal domain is a central regulator of cytochrome *c* oxidase biogenesis in yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* **292**, 10912–10925 [CrossRef Medline](#)
40. Ott, M., Amunts, A., and Brown, A. (2016) Organization and regulation of mitochondrial protein synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **85**, 77–101 [CrossRef Medline](#)
41. Sherman, F. (2002) Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* **350**, 3–41 [CrossRef Medline](#)
42. Young, M. J., and Court, D. A. (2008) Effects of the S288c genetic background and common auxotrophic markers on mitochondrial DNA function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **25**, 903–912 [CrossRef Medline](#)
43. Zitomer, R. S., and Lowry, C. V. (1992) Regulation of gene expression by oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **56**, 1–11 [Medline](#)
44. Gaisne, M., Bécam, A. M., Verdière, J., and Herbert, C. J. (1999) A “natural” mutation in *Saccharomyces cerevisiae* strains derived from S288c affects the complex regulatory gene HAP1 (CYP1). *Curr. Genet.* **36**, 195–200 [CrossRef Medline](#)
45. Struhl, K. (1985) Naturally occurring poly(dA-dT) sequences are upstream promoter elements for constitutive transcription in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 8419–8423 [CrossRef Medline](#)
46. Burke, D., Dawson, D., and Stearns, T. (2000) *Methods in Yeast Genetics*, pp. 39–72, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
47. Guthrie, C., and Fink, G. R. (eds). (2002) *Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology*, p. 23, Academic Press, San Diego
48. Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Pease, L. R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51–59 [CrossRef Medline](#)
49. Bonnefoy, N., and Fox, T. D. (2001) Genetic transformation of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Methods Cell Biol.* **65**, 381–396 [CrossRef Medline](#)
50. 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 [CrossRef Medline](#)
51. Diekert, K., de Kroon, A. I., Kispal, G., and Lill, R. (2001) Isolation and subfractionation of mitochondria from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Cell Biol.* **65**, 37–51 [CrossRef Medline](#)
52. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 [CrossRef Medline](#)
53. Schägger, H., Aquila, H., and Von Jagow, G. (1988) Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis. *Anal. Biochem.* **173**, 201–205 [CrossRef Medline](#)
54. 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 [CrossRef Medline](#)
55. Barros, M. H., and Tzagoloff, A. (2002) Regulation of the heme A biosynthetic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **516**, 119–123 [CrossRef Medline](#)
56. Bestwick, M., Khalimonchuk, O., Pierrel, F., and Winge, D. R. (2010) The role of Coa2 in hemylation of yeast Cox1 revealed by its genetic interaction with Cox10. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 172–185 [Medline](#)
57. Wittig, I., Karas, M., and Schägger, H. (2007) High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Mol. Cell. Proteomics* **6**, 1215–1225 [CrossRef Medline](#)
58. 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 [CrossRef Medline](#)

Evolution of Translation in Mitochondria

Aldo E. García-Guerrero, Angélica Zamudio-Ochoa,
Yolanda Camacho-Villasana, Rodolfo García-Villegas,
Adrián Reyes-Prieto and Xochitl Pérez-Martínez

1 Introduction

Around 1.5 billion years ago a bacterial cell related to modern α -proteobacteria established a symbiosis with a eukaryote that originated mitochondria [1]. It is well-established that mitochondrial origin is monophyletic (i.e., it happened only once in evolution) and that the organelle arose from an α -proteobacterium with identity yet to be established [2, 3]. The symbiotic event was followed by extensive reduction of the organelle's genetic material, either by gene loss or gene transfer to the nuclear genome. In addition, mitochondrial DNA (mtDNA) from different lineages diverged extensively in shape, size, content, mutation rate, and gene expression mechanisms. What mitochondria from different lineages have in common is that more than 1000 proteins are present in the organelle [4–7]. However, only a very limited number of proteins are encoded in mtDNA. For example, mtDNAs from the *Phylum* Apicomplexa have only three protein-coding genes [8], animal mitochondria code (in general) for 13 proteins [9], land plants code for more than 30–40 proteins [10], and members of the jakobid protists, which are considered to be relics of the endosymbiont bacterial ancestor, code around 65 proteins [11]. Thus, the majority of proteins necessary for function are

Aldo E. García-Guerrero and Angélica Zamudio-Ochoa have contributed equally to this work.

A.E. García-Guerrero · A. Zamudio-Ochoa · Y. Camacho-Villasana · R. García-Villegas ·
X. Pérez-Martínez (✉)

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional
Autónoma de México, 04510 Mexico City, Mexico
e-mail: xperez@ifc.unam.mx

A.E. García-Guerrero
e-mail: aldog.2602@gmail.com

A. Reyes-Prieto
Department of Biology, University of New Brunswick, Fredericton, New Brunswick, Canada

© Springer International Publishing Switzerland 2016
G. Hernández and R. Jagus (eds.), *Evolution of the Protein Synthesis
Machinery and Its Regulation*, DOI 10.1007/978-3-319-39468-8_6

109

imported into mitochondria from the cytosol (for a review, see [12]). The organization of mtDNA among lineages has also diverged. Some organisms have extended non-coding regions, including type I and type II introns, as is the case for land plants, while others, like metazoan, have very compact mitochondrial genomes with only a few hundreds non-coding regions [9]. While fungal and apicomplexan mtDNAs are linear molecules, animals and some protists have circular mtDNA, trypanosome mtDNA is composed of minicircles and maxicircles, which are topologically intertwined [13], and some *Amoebidium* have several hundred linear DNA molecules with different gene contents in each molecule [14]. In land plants, mtDNA is arranged in circular molecules of DNA whose composition varies constantly as a high frequency of recombination events occurs in this clade [10].

Independent of the shape, coding capacity and size of mtDNA, these organelles contain a complete gene expression system that comprises DNA replication and maintenance, transcription, post-transcriptional processing, translation and post-translation functions, such as protein assembly and prosthetic group additions. Much of the mitochondrial expression machinery is nucleus-encoded, while only a limited set of mtDNA genes is coded in the organelle. The *Phylum* Apicomplexa has only two ribosomal RNAs coded by the mtDNA. Metazoans have around 22 tRNAs and the small and large subunits rRNAs, while land plant mtDNA in addition to tRNAs and rRNAs codes for a varied number of ribosomal proteins. Protists from the jakobid lineage code in addition a translation factor (TufA), 5S rRNA, RNA polymerase and a sigma factor, and three chaperones for protein processing [11]. In general, mitochondrial genomes code for subunits of respiratory complexes and ATP synthase. Apicomplexan mtDNAs code for only subunits 1 and 3 of cytochrome *c* oxidase and cytochrome *b* from complex *bc1* [8]. In contrast, the jakobid *Phylum* codes for 12 subunits from complex I (NADH dehydrogenase), 3 for complex II (succinate dehydrogenase), 1 for *bc1* complex, 3 for cytochrome *c* oxidase and 6 for ATP synthase [11].

Since mitochondria evolved from an α -proteobacterial ancestor, one might expect that the mtDNA expression mechanisms have conserved bacterial features. Even when this is the case, many novel mechanisms to control mtDNA expression have emerged and diverged among the eukaryotic groups. Some are conserved among certain lineages, but others appeared later during eukaryote divergence. In the present chapter, we describe the most prominent features of the mitochondrial translation machinery across different eukaryotic lineages. This knowledge allows us to better understand the evolution of the translation process in mitochondria.

2 The Mitochondrial Genetic Code

Translation in jakobid and land plant mitochondria uses the universal genetic code in mitochondria [11, 15]. However, at least 27 genetic code alterations (i.e., codon reassignments) are detected in mitochondrial systems of diverse eukaryote lineages (reviewed in [16, 17]). One of the most common changes in mitochondrial genetic code is the reassignment of termination codons to sense codons, such as the use of

Table 1 Mitochondrial genetic code in different organisms

	Group/organism	Genetic code	Comments
Protists	Jakobida	Standard	
	Euglenozoa Alveolata Rhizaria Amoebozoa Malawimonads	<i>UGA</i> Stop → Trp	Alternative initiation codons <i>Trypanosoma spp</i> : <i>UUA</i> , <i>UUG</i> , <i>CUG</i> <i>Leishmania spp</i> : <i>AUU</i> , <i>AUA</i> <i>Tetrahymena spp</i> : <i>AUU</i> , <i>AUA</i> , <i>AUG</i> <i>Paramecium sp</i> : <i>AUA</i> , <i>AUU</i> , <i>AUC</i> , <i>GUG</i> , <i>GUA</i>
Fungi	All fungi	<i>UGA</i> Stop → Trp	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Hansenula saturnus</i> , <i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	<i>AUA</i> Ile → Met <i>CUU</i> Leu → Thr <i>CUC</i> Leu → Thr <i>CUA</i> Leu → Thr <i>CUG</i> Leu → Thr <i>UGA</i> Stop → Trp <i>CGA</i> Arg → Absent <i>CGC</i> Arg → Absent	<i>AUA</i> is frequently used in <i>VARI</i> gene
Metazoa	Invertebrates	<i>AGA</i> Arg → Ser <i>AGG</i> Arg → Ser <i>AUA</i> Ile → Met <i>UGA</i> Stop → Trp <i>UAA</i> Stop → Tyr	In some flat and round worms: <i>AAA</i> Lys → Asn In ascidians: <i>AGA</i> , <i>AGG</i> Arg → Gly
	Vertebrates	<i>AUA</i> Ile → Met <i>UGA</i> Stop → Trp	Alternative initiation codons: <i>Bos taurus</i> : <i>AUA</i> <i>Homo sapiens</i> : <i>AUA</i> , <i>AUU</i> <i>Mus musculus</i> : <i>AUA</i> , <i>AUU</i> , <i>AUC</i> <i>Gallus gallus</i> : <i>GUG</i>
Non-chloropycean algae	Rodophyta Haptophyta	<i>UGA</i> Stop → Trp	
Viridiplantae	Chlorophyta	<i>UAG</i> Stop → Leu	Also found in <i>Scenedesmus obliquus</i> : <i>UCA</i> Ser → Stp
	Embryophyta	Standard	Alternative initiation codons: Gymnosperms and angiosperms: <i>ACG</i> <i>Cycas taitungensis</i> : <i>GCG</i> Alternative termination codons: Gymnosperms and angiosperms: <i>CGA</i>

Based in <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Utils/wprintgc.cgi>

the canonical *UGA* stop codon to decode tryptophan in numerous biological groups [18] (Table 1). Other cases include the use of the typical *UAG* triplet as a leucine codon in chlorophycean algae [19] and the codon *UAA*, which decodes tyrosine in the nematode *Radopholus similis* [20]. Non-standard stop codons are used in mitochondria from some lineages. For example, the chlorophycean algae *Scenedesmus obliquus* uses the *TCA* codon as a translation stop signal [21]. In bryophytes and vascular plants, the codons *CAA*, *CGA* and *GGU* are reassigned stop codons, while *AAA* and *AAU* are recognized as stop codons in *Oryza sativa* [22]. In vertebrate mitochondria, the *AGA* and *AGG* codons, which are universally assigned to arginine, were thought to become stop codons [23]. However, recent studies indicate that these codons are unassigned [24]. Other prevalent reassignment is the use of *AUA* in *Saccharomyces cerevisiae*, vertebrates and some invertebrates to decode methionine instead of the canonical isoleucine [25, 26]. The standard arginine codons *AGA/AGG* were reassigned to serine in certain invertebrate groups (Nematoda, Arthropoda) and decode glycine in Ascidians [27]. In *S. cerevisiae*, the typical arginine codons *CGA/CGC* are unassigned, and the triplets *CUU/CUC/CUA/CUG* are used for threonine instead of leucine [28]. In some invertebrates (flat and round worms), *AAA* was reassigned, from lysine to asparagine (for an example, see [29]). Atypical start codons are also present in mitochondrial systems. For example, humans use *AUA* and *AUU* as start alternatives [24]; other cases of alternative start codons occur in trypanosomatids, which use *UUA*, *UUG*, *CUG* and the ciliate *Tetrahymena* with *AUU*, *AUA* or *AUG* [30] and certain nematodes that use the *UUG* triplet to initiate protein translation [31].

Why did mitochondria acquire modified codon assignments during evolution? One explanation is that codon reassignments might be a consequence of the organelle genome reduction, which encodes for a small set of proteins, and in most cases for a small number of tRNAs [8–10]. The diversity of mitochondrial genetic codes across eukaryotic groups might also reflect differential mutational rates in mtDNAs, a general increase in AT content and a diversification of genome expression mechanisms [17]. Interestingly, *in silico* studies suggest that genome size is not correlated to incident mutations that could lead to codon reassignments (i.e., the size of mitochondrial genomes does not correlate with mutation rates) [16]. The tRNAs' structure, the mitochondrial-targeted aminoacyl tRNA synthetases and in general the translation machinery are adjusted to the mitochondrial genetic code of each eukaryotic group. For example, reassignment of *UGA* for tryptophan (instead of the stop codon) is mediated by a tRNA where the wobble position carries a modified uridine. Modifications include 5-taurinomethyluridine ($\tau\text{m}^5\text{U}$), 5-carboxymethylaminomethyl-2-thio-uridine ($\text{cmnm}^5\text{s}^2\text{U}$) or 5-carboxymethylaminomethyluridine (cmnm^5U). These modifications expand the decoding capacity to R-ending codons, enabling the decoding of *UGG* and *UGA* as tryptophan [32]. Decoding of mammalian *AUG* and *AUA* as methionine is possible because the met-tRNA^{Met(CAU)} has a 5-formylcytidine (f^5C) in the wobble position [33, 34]. Some theories try to explain how reassignments in the mitochondrial genetic code might have occurred during evolution. Two of the most established theories are the *Codon Capture* and *Ambiguous Intermediate* models.

The *Codon Capture*, also termed the *Codon Disappearance* theory, proposed by Osawa and Jukes in 1989, postulates that genetic code alterations are the result of neutral changes associated with the GC/AT content balance [35–38]. The theory posits that the disappearances of both the codon and the decoding tRNA are fundamental steps for further codon reassignment. Later, the “lost codon” can be reintroduced into the system by new mutations, but now is decoded at a relatively low efficiency by a different, noncognate tRNA, but with a similar anticodon sequence that allows the “capture” of the recently reestablished codon. Some reassignments are consistent with this *Codon Capture* model, such as the case of the frequent reuse of the *UGA* triplet to decode tryptophan [16]. A prediction derived from this model is that in mitochondrial genomes, which are high in AT content, GC-rich codons disappear at higher frequencies than AT-rich codons [36, 38, 39]. However, some codon reassignments in mtDNA do not follow the predictions of the GC/AT content balance. Thus, the *Codon Capture* theory does not explain satisfactorily the use of GC-rich codons in genomes with high AT content or the fact that some codons seem to be unassigned in some mtDNA genetic systems.

The *Ambiguous Intermediate* theory, proposed by Schultz and Yarus [40, 41], suggests that codon reassignment is the result of selective mechanisms that favor ambiguity in codon recognition during protein translation. The model postulates that codon recognition ambiguity, associated with structural changes in the tRNA molecules, is fundamental for the codon reassignment. The idea is that the codon in the spotlight is suddenly decoded by two different tRNAs, namely the “original” and the new “mutant,” which is now able to form a cognate pair with the codon. Later the “mutant” tRNA takes over the codon in a selection-driven process. Thus, the triplet is reassigned to a new amino acid. During mitochondrial evolution, many repeated tRNAs for each amino acid were lost, and in general mitochondria contain only one tRNA for each amino acid [42]. In contrast to the *Codon Capture theory*, in this model the initial loss of the codon before the reassignment is not necessary [37]. Some examples consistent with the *Ambiguous Intermediate* theory are the reassignments of leucine to threonine in yeast mitochondria [17] and from serine to lysine in Arthropoda [43].

Overall, both models are not mutually exclusive, as reassignments might have arisen from combinatory events during evolution [17, 44]. Some changes in the mitochondrial genetic code are explained by the *Codon Capture* theory, while others by the *Ambiguous Intermediate* theory.

3 Mitochondrial tRNAs

Translation of mitochondrial mRNAs requires around 20 tRNAs, but the exact number varies depending on the wobble rules and the genetic code in each species. Mitochondrial tRNAs have nuclear and mitochondrial origins. Depending on the organism, the proportion of nuclear and mitochondrial tRNAs varies. While human and the jakobid *Andalucia godoyi* [9, 11] encode a complete set of mitochondrial

encoded tRNAs for reading all codons in mtDNA, protist-like *Trypanosoma brucei* and *Plasmodium falciparum* have no mtDNA-coded tRNAs [8, 45] and therefore have to import all tRNAs necessary for translation. Interestingly, the number of mtDNA-derived tRNAs among closely related organisms is variable. For example, in chlorophycean algae, *Chlamydomonas reinhardtii* codes for only 3 tRNAs in mitochondria, while *Nephroselmis olivacea* codes for a full set of 26 tRNAs [46]. It is expected that mitochondria would import only the necessary number of tRNAs to complete the ~22 tRNAs necessary for translation. However, in some cases, import of redundant tRNAs can take place. For example, in the yeast *S. cerevisiae* a tRNA^{Lys(CUU)} is imported from cytosol even when mtDNA codes for the full set of tRNAs necessary to decode all codons [28, 47]. This tRNA is particularly important to decode codons under stress conditions [48]. Mammalian mitochondria can also import redundant cytosolic tRNAs [49]. The unicellular algae *C. reinhardtii* imports 31 tRNAs instead of the expected 22 tRNAs necessary to decode all codons [50]. The mechanisms to import cytosolic tRNAs are particular to each eukaryotic group, indicating that import of tRNAs into mitochondria is a process that emerged independently several times during evolution (for a review, see [51]). Delivery of tRNAs to mitochondria is mediated by proteins, usually with a previously described function. *S. cerevisiae* Eno2 (involved in glycolysis) delivers the charged tRNA^{Lys(CUU)} to the mitochondrial surface, where the mitochondrial lysyl-tRNA synthetase binds it and co-transport it via the general import machinery. In land plants, aminoacyl-tRNA synthetases might be involved in the delivery of tRNAs to mitochondria, and the Voltage Dependent Anion Channel (VDAC), together with the outer membrane receptors Tom20 and Tom40, functions in tRNA import. In *Trypanosoma*, the cytosolic EF1a, together with the import component Tim17 and Hsp70, Hsp60 and Hsp20 might participate in the delivery and import of cytosolic tRNAs.

The structure, sequence and post-transcriptional modifications of mitochondrial tRNAs have conserved features with cytosolic RNAs. However, many of these features have amazingly diverged in different eukaryotic groups and among specific tRNAs from the same organism. According to the structural characteristics, mitochondrial tRNAs are classified into five groups, named 1–5 [51]. Group 1 shares the most conserved features with cytosolic tRNAs. They carry canonical T and D arms, anticodon and acceptor arms, and L1/2 connectors (involved in joining the acceptor and anticodon helices) [52]. This class of tRNAs is present in mitochondria from amoebozoans, alveolates, plants and fungi. Group 2 carries conserved anticodon and acceptor arms. However, T/D arms may be smaller in size and may have less conservation on bases involved in D/T-loop interactions (mainly bases G18, G19, U55 and C56). These tRNAs are present in amoebozoans, alveolates, plants, fungi and some metazoans (including mammals). Group 3 consists of tRNAs where the acceptor arm may be 1–3 nucleotides shorter; they are T-armless and carry a shorter D-loop. The L2 connector is also shorter (6–7 nt instead of 21–30 nt). This class of tRNAs is present in some nematodes, bryozoan and arachnid species. Group 4 is represented by some insect and bryozoan species and by mammals. They are D-armless and carry shorter T arms. The L1 connector is also shorter (5–12 nt instead of 19–20 nt). Group 5 carries both shorter anticodon and

acceptor arms; they are T- and D-armless and have shorter L1 and L2 connectors. These minimalist tRNAs are found in acaria and some nematodes. In this group, the only conserved features with cytosolic tRNAs are the presence of an acceptor arm with the 3'-single-stranded CCA terminus and an anticodon arm with the canonical anticodon loop of seven nucleotides. The shortest mitochondrial tRNA so far is 54-nt long (tRNA^{Ser(UCU)}) from the nematode *Ascaris suum* [53, 54].

As a universal feature, mitochondrial tRNAs are also post-transcriptionally modified to define the structure and decoding capabilities. The best understood model is *Bos taurus*, where all mitochondrial tRNAs were isolated and analyzed. There are 15 types of modifications at 118 positions (representing 7.5 % abundance in mitochondrial tRNA bases) [55]. However, the occurrence of modified nucleotides can be as low as one residue in mitochondrial tRNA^{Ser} of the rodent *Mesocricetus auratus* (representing 1.7 % abundance) [56]. To date, 15 out of 18 conserved modifications (present throughout kingdoms of life) are observed in mitochondrial tRNAs, with the exception of ac⁴C, m³U and m⁶⁶A, which are not yet detected (reviewed in [51]). Comparative analyses of tRNA sequences indicate that mitochondria have the highest number of modified positions that are not universally conserved. The acceptor stem is particularly rich in Ψ residues, and the number of modifications located in positions 46–50, 5' to the T arm, is also relatively low in mitochondrial tRNAs [55, 56]. There are mitochondria-specific base modifications, like τm⁵U and τm⁵s²U, discovered in ascidian mitochondria [32], f⁵C, f⁵Cm, present at the wobble position 34 in bovine and the nematode *A. suum* [33, 54], and k²C in potato [57].

4 Mitochondrial mRNAs

Mitochondrial mRNAs have conserved some prokaryotic features, but some other characteristics have diverged. Mitochondrial mRNAs from some lineages, such as jakobid protists, have a putative Shine-Dalgarno-like sequence to locate the ribosome at the correct AUG start codon [11]. Other lineages lack a Shine-Dalgarno-like sequence and therefore must have different, unknown mechanisms to initiate translation. This is the case for flowering plants [58] and mammal mitochondria [59]. Similar to what is observed in prokaryotes, mitochondrial mRNAs do not have a 7-methylguanylate cap (5'-cap), as is found in cytosol mRNAs. Moreover, mitochondrial mRNAs undergo post-transcriptional modifications before they are ready for translation. The major post-transcriptional RNA processing events in mitochondria include 3'-end polyadenylation, intron/exon splicing and editing. Polyadenylation of RNA is present in all kingdoms of life and is a near-universal feature of RNA metabolism, although it can trigger different signals among cells and organelles. Today, the function of polyadenylation in mitochondrial gene expression is not fully understood. An additional interesting feature of mitochondrial mRNAs from some lineages is the requirement of RNA editing before translation. RNA editing might be important to correct transcript sequences that otherwise would affect the translation product's function [59, 60].

An example is editing in land plants, where the amino acid encoded by an edited mRNA is frequently more conserved than the one predicted from the gene sequence.

4.1 Polyadenylation of Mitochondrial mRNAs

Polyadenylation is the non-template addition of adenosine residues to the 3' end of RNAs. In the eukaryotic cytoplasm, the majority of nuclear-encoded mRNAs require a poly(A) tail for stability, nuclear export and translatability (for reviews, see [61, 62]). In contrast, in prokaryotes, RNA polyadenylation functions to tag the mRNA for exonucleolytic degradation [63, 64]. Although mitochondria have a monophyletic origin, many features of polyadenylation have extensively diverged within eukaryotes.

In mammalian mitochondria, 12 out of 13 mRNAs have stable poly(A) tails of 45 nt on average. However, there are slight variations between cell types and between transcripts within the same cell type [65]. For example, only the *ND6* transcript lacks a poly(A) tail [66]. The precise function of polyadenylation is not entirely understood. However, one function of polyadenylation is to complete the UAA codon, since several mammalian RNAs contain incomplete translational stop codons. The same feature is observed in general in metazoans, where some coding regions lack a complete UAA stop codon, suggesting that polyadenylation also plays an important role in translation [67, 68]. Although polyadenylation produces stable transcripts [66, 69], truncated, adenylated transcripts may coexist, suggesting that human mitochondria use transient poly(A) tails to degrade RNA [70]. The mechanism of a possible differential polyadenylation on stabilizing and destabilizing RNAs remains to be elucidated. In plants, similarly to the bacterial system, addition of a poly(A) tail targets exonucleolytic degradation of RNA [71]. In trypanosomatid mitochondria, most protein-coding transcripts suffer a massive edition (insertion or deletion of uridines) necessary to render translatable mRNAs [59]. The addition of a poly(A) tail in these organisms seems to render both stable and unstable transcripts. Polyadenylation in these organisms has an intricate relation to edition and translation. Poly(A) tails are 20–200 nt long, and the length of the tail seems to correlate with the state of edition. Short tails (~20 nt) stabilize edited or non-edited mRNAs. Long (100–200 nt) poly(A/U) tails are added to fully edited RNAs, and this extension might render the transcript translationally competent [72, 73].

Yeast mitochondria are so far the only organelles that do not polyadenylate their mRNAs. This was found to be the case in *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Candida albicans* [74–77], suggesting that it might be a general phenomenon of fungal mitochondria. Instead, the 3' ends of some, but not all fungal mitochondrial mRNAs possess a conserved dodecamer sequence that is encoded in the mitochondrial genome and seems to be vital for mRNA stability and translatability [75, 76, 78, 79].

4.2 *Edition of Mitochondrial mRNAs*

Some organisms require mitochondrial (and plastid) transcript edition before they can be translated. RNA editing consists of nucleotide substitutions, post-transcriptional or co-transcriptional insertion/deletions. These three processes occur in very different taxonomic groups, suggesting that they arose as several independent acquisitions [80]. This process is present in dinoflagellates (variable one-nucleotide substitutions), excavates (U insertions/deletions), unikonts (co-transcriptional insertion of 1 or 2 nucleotides), metazoa (U to C substitution) and archaeplastida (U to C and C to U substitutions) [80]. Editions throughout a transcript can be limited in number, as is the case for land plants [60, 81]. In other cases, extensive edition of a transcript is required to transform an unrecognizable sequence into a conserved protein sequence, as is the case of trypanosomatids [59, 82] and calcareous sponges [83].

In land plants, C to U (and less frequently U to C) editing often results in changes of the amino acid sequence from what the genomic sequence predicts. This process evolved in land plants [84] and was most likely subsequently lost in some marchantiid liverworts [85]. The number of edited nucleotides among plant lineages is: *Physcomitrella patens* edits 11 sites [86], *Arabidopsis thaliana* edits 600 cytidines [87], while the lycophytes *Isoetes engelmannii* and *Selaginella moellendorffii* edit more than 1,700 and 2,100 nucleotides, respectively [88, 89]. The composition of the RNA editosome is not yet fully understood, although *cis*- and *trans*-factors are essential for the editing process. The *cis* elements that specify the editing of the C target are present in close proximity to the edition site. *Trans*-factors include members of the pentatricopeptide repeat (PPR) motif-containing family, which are site-specific recognition factors. While the cytidine deaminase catalyzing C-to-U conversion has not been identified, considerable evidence points to the C-terminal DYW domain found on some PPR proteins, which exhibits sequence similarity to known cytidine deaminase motifs (for reviews, see [60, 80, 81]).

In trypanosomatids, edition is a post-transcriptional process, where uridines are inserted or deleted from mRNA precursors [90]. Edition introduces start and stop codons, restores frame shifts and often completes the coding sequence of mRNAs. Mitochondrial editing can occur at different extensions: transcripts that are never edited, transcripts where edition is restricted to a small region, with minimal edition, and transcripts that are extensively edited or pan-edited, where a single mRNA is altered by 553 insertions and 89 deletions [80]. The process in trypanosomatids includes mRNA cleavage, U deletion or insertion, and mRNA ligation [91]. The maxicircle molecules of mtDNA code for guide RNAs (gRNAs), which are derived from scattered intergenic regions. A partial hybrid is formed between the 5' portion of the gRNA and the complementary sequence on the pre-edited mRNA. Cleavage of the mRNA at the 3' end of the first base that is not paired with the gRNA leaves a free 3'OH. The uridine addition or deletion is followed by immediate relegation of the two molecules. Many proteins have been implicated in the edition process (reviewed in [59, 82]). However, these proteins are not related to the proteins involved on plant edition.

5 The Mitoribosome

Mitochondrial ribosomes (mitoribosomes) are located in the matrix, and are closely associated with the inner membrane [92, 93]. This location facilitates the insertion of newly synthesized products, which are mainly hydrophobic proteins. All mitochondrial genomes currently sequenced encode ribosomal RNAs (rRNAs). In contrast, almost all mitochondrial ribosomal proteins (MRPs) are nuclear encoded. Thus, assembly of functional ribosomes requires a coordinated expression of both genomes and a proper import of the necessary components into the organelle [94, 95]. The mechanism of this process is almost unknown, but evidence supports that several MRPs assemble with rRNAs in a co-transcriptional fashion [96, 97].

In contrast to the cytosolic ribosomes, mitoribosome composition is highly variable between different eukaryotic lineages. Their sedimentation coefficient ranges from 80S in ciliates, to 70–74S in fungi, to 77–78S in vascular plants and 55S in animals. These variable sedimentation values are the result of the difference in the protein:RNA ratio, while bacterial ribosomes contain a protein:RNA proportion of 1:2, in mitoribosomes this proportion varies from 1:1 in yeast to 2:1 in bovine [98].

The α -proteobacterial ribosome is composed of 54 proteins [99], which were also likely to be present in the ancestor of mitochondria. It is proposed that, in the earliest stage of eukaryotic evolution, several novel proteins were recruited for ribosomal function, and only one, Rps20, was lost, resulting in an ancestral mitoribosome of 72 proteins (Fig. 1) [100]. An interesting feature of several mitoribosomal proteins of bacterial origin is that they increased in length sequence. Accordingly, this stage in mitoribosome evolution is known as the “constructive phase”, as the total size of the ribosome was increased considerably [101].

The cause of the constructive phase of the mitoribosome is proposed to be the accumulation of slightly deleterious mutations on the mitochondrial genome, as this genome, with the exception of land plants, presents a higher mutation rate than the nuclear one [103, 104]. Slightly deleterious mutations could trigger the recruitment of new proteins because a mutation in an original component of the complex is compensated by the interaction with a new component [105]. This process is called Constructive Neutral Evolution (CNE), a universal evolutionary ratchet that leads to complexity [106]. Accordingly, genes coding for MRPs show higher levels of amino acid replacements than cytoplasmic ribosomal proteins, which suggests a compensatory modification [107, 108]. Gain of complexity throughout the evolution of mitochondria is not exclusive to the mitoribosome. The respiratory chain complexes have also acquired new proteins that are usually important for regulation, assembly and stability [101]. These eukaryotic subunits are in general localized in the peripheral regions of the enzymes. This feature is also observed for the mitoribosomes [109, 110]. The extensive gain of protein mass observed for mitoribosomes does not reflect the fate of all endosymbiotic organelles, as the plastid ribosomes only gained approximately 170 kDa [111, 112]. Several evolutionary mechanisms have led to the increase of protein mass in the mitoribosome.

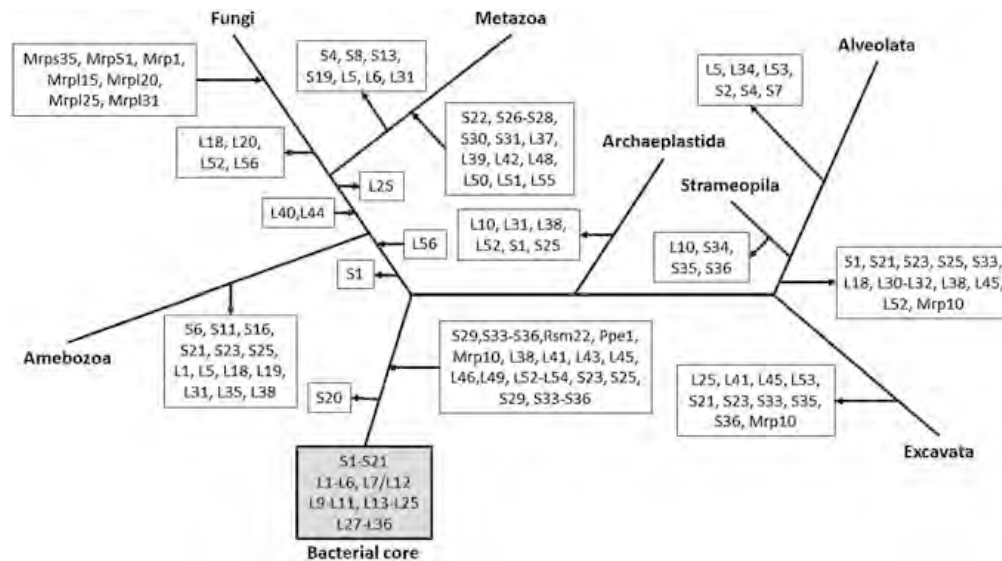


Fig. 1 Reconstruction of the evolutionary history of the mitochondrial ribosome proteome. Incoming and outgoing arrows indicate the gains and losses of the ribosomal proteins that are showed in the box. This figure is based on the data given by [102] and [100]. The models considered for the construction of this figure were: for fungi *Neurospora crassa*, *Aspergillus fumigatus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Cryptococcus neoformans*, *Ustilago maydis* and *Encephalitozoon cuniculi*; for metazoa *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Danio rerio*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* and *Monosiga brevicolis*; for amoebzoa *Dictyostelium discoideum* and *Entamoeba histolytica*; for Archaeplastida *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Ostreococcus tauri* and *Cyanidioschyzon merolae*; for Strameopila *Thalassiosira pseudonana* and *Phytophthora ramorum*; for Alveolata *Tetrahymena thermophila*, *Paramecium tetraurelia*, *Theileria annulata*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium yoelii* and *Cryptosporidium parvum* and for Excavata *Leishmania brasiliensis*, *Leishmania infantum*, *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Naegleria gruberi*, *Trichomonas vaginalis*, *Giardia lamblia* and *Reclinomonas americana*

One of them was the recruitment of existent proteins, such as the case of Mrpl45, a homolog of Tim44 (a subunit of the mitochondrial protein translocase machinery), which is present in several bacteria but is not part of the prokaryote ribosome [102]. Mrpl39, a metazoan protein, was recruited later in evolution and is homologous to threonyl-tRNA synthetases [113]. It is proposed that addition of Mrpl39 to the mitoribosome compensated for the loss of bacterial proteins involved in tRNA binding [102]. Numerous new ribosomal proteins emerged through gene duplication. For instance, Mrps10 gave rise to Mrpl48 through this process in metazoans. Interestingly, the duplicated gene product became part of the other ribosomal subunit [102]. Another case is Mrps18, which in *Caenorhabditis elegans* has three variants originated by gene duplication. It is believed that each ribosome contains only one copy of the protein, suggesting that mitoribosomes exist in heterogeneous populations [102].

The increment in protein mass in mitoribosomes is not only due to the addition of new subunits, but also to the gain of new domains in the prokaryotic proteins.

MRPs are sometimes almost twice the size of their bacterial counterparts [102]. In *P. falciparum*, Mrpl4 has an AAA domain, which is not present in the bacterial counterpart. This domain is known to participate in chaperone-like functions [114]. Another case is the presence of an RRM (RNA recognition motif) domain in Mrps19 of *A. thaliana*, which could be involved in the association of the protein with rRNAs [115]. In the yeast *S. cerevisiae*, the carboxyl-terminal end of Mrp20, which is mitochondria-specific, plays a role in ribosome assembly [116].

The evolution of mitochondria involved numerous independent losses of ribosomal proteins in different lineages (Fig. 1). Bacterial-exclusive S20 protein seems to have been lost early during mitoribosome evolution. This protein is not essential for bacterial growth. However, its absence causes a decrease in the association of the ribosomal subunits [117, 118]. In contrast, S1 protein, which was lost early in the evolution of unikonts, is an essential protein in bacteria [119]. Moreover, there is no apparent pattern favoring protein loss from either bacterial or eukaryotic origin, suggesting that there is no tendency in protein dispensability [100].

Whereas protein gain in mitoribosomes is a general phenomenon in all lineages, the rRNA content varies greatly. While bacteria have an rRNA content of 1.4 MDa, in mitochondria this number varies from 0.5 MDa in *C. elegans* to 1.6 MDa in *Neurospora crassa*. Since animals show an important reduction of rRNA, it was previously thought that the proteins acquired during mitoribosome evolution replaced the lost helices of rRNA [120]. However, now it is clear that the high content of proteins in mitoribosomes is not a consequence of the lower concentration of rRNA, as the increase in MRPs occurred previously to the reductive phase of rRNA [101]. This is consistent with the structural data in which the extra proteins of the ribosome do not substitute the lost portions of rRNA [121–123]. Furthermore, it is proposed that rRNA reduction might be driven by the reduction of the mitochondrial genome size and not necessarily by adaptive changes of the translational machinery [124].

Reduction of rRNA had triggered an important mitoribosome remodeling. For example, the bacterial ribosomal protein L24 contacts the helices H7 and H19 of the 23S rRNA, stabilizing its binding to the 39S subunit. The mammalian mitochondrial counterpart, Mrpl24, lacks both helices. However, mitochondria-specific protein elements maintain Mrpl24 in the same place and orientation as the prokaryotic counterpart [125].

An almost general phenomenon in mitochondria is the loss of 5S rRNA, which is present only in plants and some algae. An extension of the 23S rRNA replaces the resulting gap in *N. crassa*. On the contrary, in the mammalian mitoribosome this space is occupied by protein [121–123].

An interesting aspect of the evolution of mitoribosomes is their assembly mechanisms. This process has probably evolved differently in each lineage, as the components of the ribosome are partially different among eukaryote groups. In some lineages mitochondrial-encoded rRNAs are fragmented, need edition or lack 5S rRNA [8, 9, 126]. As stated above, the composition of proteins also diverged among eukaryote lineages. The understanding of ribosome assembly, the order of

rRNA processing and protein addition, the chaperones involved in such events and the role of mitochondrial RNA granules in ribosome biogenesis are just starting to emerge, especially in mammals and yeast models [97, 127].

6 Mitochondrial Translation Initiation

Translation initiation in bacteria is carried out by three conserved factors: IF1, IF2 and IF3 [128]. There are important differences between prokaryote and mitochondrial initiation factors. While mitochondrial IF2_{mt} is universally present, IF3_{mt} is semi-universal and IF1_{mt} was completely lost from the mitochondrial machinery [129]. In addition, there are important structural variations in the mitochondrial initiation factors. In agreement with the prokaryotic origin, mitochondria seem to initiate translation with formylated methionine, at least for the studied cases. Initially, by in vitro experiments, it was demonstrated that the initiation machinery in mammals does not need a formylated Met-tRNA. However, recent experiments demonstrate that a failure in formylation is a cause of disease in humans [130, 131]. In the yeast *S. cerevisiae* it was previously shown that a mutant *Δfnt1* (coding for a methionyl-tRNA formyltransferase) does not affect translation initiation [132]. However, an accessory factor, Aep3, was compensating the lack of *Δfnt1*. Double mutant *Δfnt1* and *Δaep3* affect respiratory growth [133]. The mechanisms of translation initiation regulation have extensively diverged from the bacterial counterpart. Despite the differences between bacterial and mitochondrial translation initiation factors, the general steps for initiation are conserved.

6.1 Structural and Functional Conservation of IF2_{mt}

In bacteria, IF2 interacts with initiator fMet-tRNA and promotes binding with the small ribosomal subunit and with mRNA. It also contains a GTPase activity to release all initiation factors from the completely assembled ribosome into the mRNA. IF2 triggers the binding of tRNA to the incomplete P site on the 30S subunit. After binding of the 50S subunit to the initiation complex, IF2 GTP hydrolysis assists the release of all initiation factors from the completely assembled ribosome [128]. Bacterial IF2 contains six domains (I–VI). To date, the function of domain I is not completely understood. Domain II stabilizes the interaction of IF2 with the ribosomal 30S subunit; this region is not conserved among bacterial species. Domain III is a linker between domains II and IV. Domain IV contains the GTPase activity. Domain V interacts with the ribosomal 30S subunit, and domain VI recognizes the fMet-tRNA [134]. In mitochondria, IF2_{mt} consists only of domains III–VI (Fig. 2). This short version of IF2_{mt} is not particular for mitochondrial systems, as shorter versions of IF2 factors are also present in some bacterial groups, like extremophiles [135]. Instead, in mammals IF2_{mt} interaction

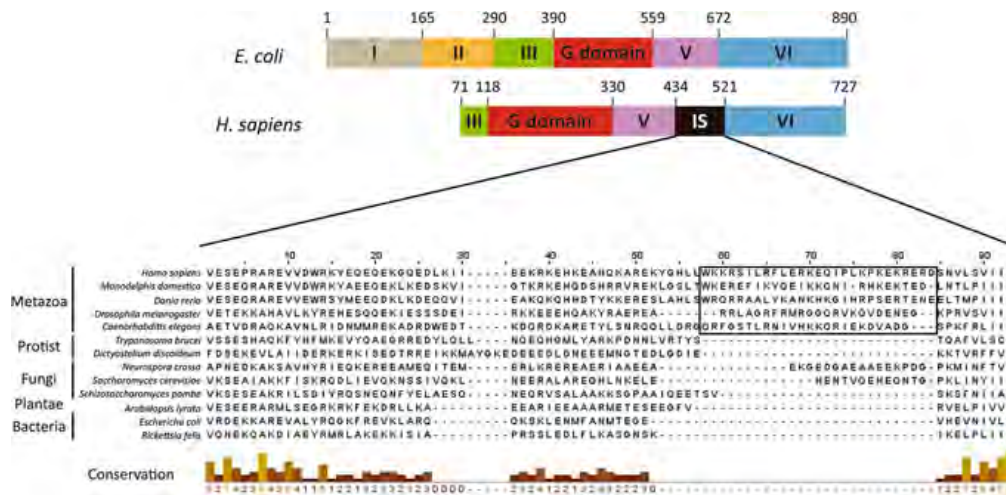


Fig. 2 Alignment of the insertion sequence on mIF2 among species from different phyla. Variations in domain composition between *E. coli* IF2 and *Homo sapiens* mIF2 are presented in the upper panel. Numbers indicate amino acid positions. The insertion sequence (IS) is amplified, and an alignment among different species is shown. Alignments of the insertion sequences were made with the MAFFT software, with the Blosum70 matrix as in [129]

with the 28S is performed by domain III, and this interaction is even stronger when GTP is bound to domain V [136]. Domain III of IF2_{mt} is not conserved in all eukaryote lineages, but its function might be compensated by the differences in the small ribosomal subunit protein and RNA content among eukaryotes [137]. Domain IV is the most conserved region of IF2_{mt} in structure and sequence similarity, sharing 99 % (metazoans) to 50 % (fungi) identity with bacterial counterparts [138–140]. Domain V in IF2_{mt} is modestly conserved with the bacterial IF2, sharing identity of 35–50 %. However, the function of this region is not completely understood [140]. It might be important for interaction with the small ribosomal subunit because structural modeling of IF2_{mt} suggests that this region is similar to domain II of EF-Tu and EF-G. This region is important for contact with small ribosomal subunits [141]. Interestingly, domain V in metazoa IF2_{mt} contains an insertion of variable length and sequence (Fig. 2). This region might perform the same function as IF1 [142] (discussed below). Domain VI in bacteria and mitochondria is divided into subdomains C1 and C2. Subdomain C2 is important for binding of IF2 to the fMet-tRNA [143]. Mutagenic analysis in *Bacillus stearothermophilus* shows that there are two critical cysteines at the 668 and 714 positions necessary for this interaction [144, 145]. These amino acids are usually present in IF2_{mt}, suggesting that IF2_{mt} subdomain C2 conserved the same function as in bacteria. IF2_{mt} contains the C1 subdomain. However, as in bacteria, the function of this domain is still unknown. By NMR studies it was suggested that this subdomain from *Bacillus stearothermophilus* has a similar structure as domain III from eukaryotic eIF5B. This region is implicated in transmitting and amplifying structural changes to the G-domain after GTP binding [144, 146].

6.2 *The Mystery of the Lost IF1 in Mitochondria*

In bacteria, IF1 plays an important role in the recognition of the correct *AUG* initiation codon. IF1 interacts with the A site of the 30S ribosomal subunit and prevents binding of the initiator aminoacyl-tRNA to the A site. In addition, bacterial IF1 increases the affinity of IF2 for 30S, has a role in small subunit dissociation and assists the release of IF2 from the 70S complex [128, 147]. So far, biochemical and bioinformatic approaches have failed to identify mitochondrial IF1. This suggests that IF1 was lost at the earliest stage of eukaryotic evolution [129, 148]. Mitochondria may be able to bypass the need for IF1: Experimental evidence indicates that, in the presence of mammalian IF2_{mt} and IF3_{mt}, the bacterial ribosome does not need IF1 for the formation of the 70S particle or translation in general [149]. As discussed above, metazoan IF2_{mt} contains an insertion between domains V and VI [129] (Fig. 2). Even though there is no conservation of the insertion sequence among eukaryotic IF2_{mts}, it is possible that this insertion substitutes the function of IF1, at least in metazoa. Through cryo-electron microscopy and nuclease digestion experiments, it was observed that bacterial IF2 associates with the interphase of the 30S subunit [134, 148]. Modeling of mammalian IF2_{mt} suggests that the extension is close to the small subunit A site, similar to bacterial IF1 [140]. How the need for IF1 is bypassed in other eukaryotic lineages remains an open question.

6.3 *Mitochondrial IF3_{mt}*

Bacterial IF3 plays a critical role in translation initiation. It binds the 30S ribosomal subunit in order to prevent association with the 50S subunit. This interaction is necessary for the initiation complex to recognize the Shine-Dalgarno sequence in the mRNA and enhances the interaction and activity of IF2 [140, 150]. Simple BLAST-P analysis failed to detect orthologs of IF3 in mitochondria. However, the existence of IF3_{mt} was hypothesized because orthologs of the bacterial ribosomal proteins S7, S11 and S18, which are in proximity to IF3, are present in mitochondria [129]. More sensitive searching algorithms, like PSI-BLAST, identified IF3_{mt} in fungi, animal, plant and excavates mitochondria [129, 140]. Structural data show that the IF3 C-terminal end is necessary for interaction with the 30S subunit through residues in two helical segments, designated H3 and H4. In most IF3_{mt} orthologs the C-terminal domain is the least conserved region of the protein. However, some residues from the H3 segments are conserved in IF3_{mt} [140, 151, 152]. Biochemical and structural approaches will clarify the mechanism of action of IF3_{mt}.

6.4 How Is the AUG Start Codon Recognized in Mitochondria?

As discussed above, most mitochondrial mRNAs seem to lack Shine-Dalgarno-like sequences to direct the ribosome to the AUG start codon. This is the case for metazoans, flowering plants and fungi [57, 58, 153]. In the case of metazoans it is even more puzzling because the start codon locates at or very near the 5' end of the mRNA. This implicates that cells developed different mechanisms to localize the ribosome to the correct start codon.

Mammalian mitochondria have developed an initiation codon selection that relies on leaderless mRNAs. Addition of three nucleotides prior to the *COX2* 5' AUG decreased translation by 40 %, and addition of 12 nucleotides reduced translation by 80 % [154]. It is proposed that the movement of the ribosome is

Table 2 Orthologs of known translational activators in mitochondria. Taken from [134, 157, 165, 168, 169, 225]

Mitochondrial target gene	Translational activator(s)	Reported species	Orthologs	Conserved function?
<i>COB</i>	Cbs1	<i>S. cerevisiae</i>	No	
	Cbs2	<i>S. cerevisiae</i>	No	
	Cbp3	<i>S. cerevisiae</i>	No	
	Cbp6	<i>S. cerevisiae</i> , <i>S. pombe</i>	Yes (only in fungi)	No, in <i>S. pombe</i> is only a chaperone
	Cbp1	<i>S. cerevisiae</i>	Yes (only in fungi)	Not known
<i>COX1</i>	Pet309	<i>S. cerevisiae</i> , <i>S. pombe</i>	Yes (only in fungi)	No, in <i>S. pombe</i> Ppr5 is activator and Ppr4 is repressor
	TACO1	<i>S. cerevisiae</i> , <i>H. sapiens</i>	Yes	Not known in <i>S. cerevisiae</i>
	C12orf62	<i>H. sapiens</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Yes	No, in <i>S. cerevisiae</i> is a chaperone (Cox14)
	Mss51	<i>S. cerevisiae</i> , <i>S. pombe</i> , <i>M. musculus</i>	Yes	No, in <i>S. pombe</i> is only a chaperone and in mammals is a metabolic regulator
<i>COX2</i>	Pet111	<i>S. cerevisiae</i> , <i>H. sapiens</i>	Yes	No, in <i>H. sapiens</i> is a nuclear protein
<i>COX3</i>	Pet54	<i>S. cerevisiae</i>	No	
	Pet122	<i>S. cerevisiae</i>	No	
	Pet494	<i>S. cerevisiae</i>	No	
<i>ATP6/8</i>	Atp22	<i>S. cerevisiae</i>	No	
<i>ATP9</i>	Aep1	<i>S. cerevisiae</i>	No	
	Aep2	<i>S. cerevisiae</i>	No	
Accessory factors in translation initiation				
Aep3		<i>S. cerevisiae</i>	No	
Rsm28		<i>S. cerevisiae</i>	No	
Rmd9		<i>S. cerevisiae</i>	No	

paused after the first 17 nucleotides of the mRNA enter the ribosome. The small subunit then inspects the mRNA 5' end. If there is a start codon at the P site, then a stable initiation complex is formed [58, 154].

Study of the mechanisms for initiation codon selection in the yeast *S. cerevisiae* has made important progress. A group of proteins, named translational activators, plays a role in the localization of the mitoribosome in the correct AUG start codon. Each one of these proteins interacts with specific mitochondrial mRNAs and with the ribosome to pose it on the start codon [155–157]. In addition, translational activators interact with each other and with the mitochondrial inner membrane, probably to tether translation initiation to the site where nascent peptides will be inserted [158–160] (Table 2). Many of these proteins are members of the pentatricopeptide repeat (PPR) family or RNA recognition motif (RRM). Other translational activators have no detectable RNA-binding motifs whatsoever. Many efforts have been made to find orthologs of these proteins in other organisms. Some translational activators may be present in other fungi [161–163] and probably also in humans [164]: However, in mammalian mitochondria, the mechanisms of action of the putative activators remains to be elucidated, as human mRNAs have either very short or no 5'-UTRs. Translational activation is also observed in plastids [165–167], suggesting that this mechanism arose several times during eukaryotic evolution.

7 Translation Elongation

Translation elongation in mitochondria is highly conserved with bacteria. During this process three elongation factors (EF) assist the mitoribosome for addition of new residues to the nascent polypeptide chain. EF-Tu_{mt} forms a ternary complex with the aminoacylated tRNA and GTP and enters the mitoribosome A site. Cognate codon-anticodon pairing triggers GTP hydrolysis by EF-Tu_{mt} and release of EF-Tu_{mt}-GDP. The mitoribosome catalyzes the peptide bond formation at the PTC. Thus, deacylated tRNA is left in the P site and the elongated peptidyl-tRNA in the A site of the ribosome. This process is assisted by EF-G1_{mt}, which catalyzes the translocation of peptidyl-tRNA from the A to the P site, and removing the deacylated tRNA from the ribosome. EF-Ts_{mt} exchanges GDP to GTP from EF-Tu_{mt} to allow a new round of elongation [58, 140]. Mitochondrial elongation, at least for mammalian and yeast models, seems to be a more conserved process than initiation and ribosome recycling. However, many components of the translation machinery have extensively diverged in different phyla, leading to adaptations of the elongation machinery. For example, as previously discussed, the structure of tRNAs and of mitoribosomes has diverged from the bacterial ancestor. In the next section, we discuss the main changes observed in the elongation factors.

7.1 Mitochondrial EF-Tu_{mt}

EF-Tu_{mt} must be able to bind tRNA with canonical conformations (e.g., fungi, plants and some protist lineages) and shorter tRNAs versions (metazoans) [51]. In some cases the tRNAs reduction is so extensive that EF-Tu_{mt} should use alternative binding modes. The divergence of EF-Tu is evident inside the nematode group: nematodes have 2 EF-Tu_{mt} homologs [53]. While EF-Tu1_{mt} is unable to bind cloverleaf type tRNAs, it is the only factor that binds T-armless tRNAs [170, 171]. *C. elegans* EF-Tu1_{mt} has a C-terminal extension of around 60 amino acids that likely interacts with the D arm of T-armless tRNAs [172]. In the *Trichinella* lineage EF-Tu1_{mt} binds T-armless tRNAs, D-armless tRNA and cloverleaf type tRNAs [170, 171]. Nematode EF-Tu2_{mt} has a short C-terminal extension of 7–15 amino acids that is necessary for interaction with the D-armless tRNA^{Ser} [170]. *C. elegans* mt EF-Tu2_{mt} is unique because it interacts with phosphates on the T arm on the opposite side from where canonical EF-Tu binds [173].

In trypanosomatids, EF-Tu_{mt} has a highly charged insertion of approximately 30 amino acids near the C terminus. This trypanosomatid-specific motif is dispensable for the union of EF-Ts_{mt}, but critical for EF-Tu_{mt} function [174]. This extension might be necessary for interaction with tRNAs or with the mitoribosome, which has less RNA content than mammalian ribosomes [175]. Since trypanosomatid mitochondrial tRNAs are imported, EF-Tu_{mt} has evolved to interact with eukaryotic-type tRNAs, suggesting that the appearance of this motif is an adaptation of the mitochondrial machinery to recognize imported tRNAs [174]. Interestingly, complete loss of tRNA genes from mtDNA is also observed in api-complexans [176, 177], and therefore their EF-Tu_{mt}s have to bind imported tRNAs. However, in this case EF-Tu_{mt} is closer to the bacterial factor, indicating that each group has their own mechanisms for imported tRNA-EF-Tu_{mt} binding [174]. Another distinctive feature of EF-Tu_{mt} is found in hemi-ascomycete yeasts, where EF-Ts_{mt} seems to be lost [178]. *S. cerevisiae* EF-Tu_{mt} displays greater affinity for GTP, like the self-recycling GTPases EF-G or IF2 [179]. It is functionally equivalent to the *S. pombe* EF-Tu_{mt}/EF-Ts_{mt} [180].

7.2 Mitochondrial EF-G1_{mt} and EF-G2_{mt}

Bacterial EF-G participates in translation elongation and ribosome recycling. However, in some bacterial groups these functions are separated in two specialized paralogs. This is the case of the majority of Spirochaetes, Planctomycetes, Lentisphaera and some species of δ -proteobacteria. Mitochondria of most organisms have specialized EF-G_{mt}s paralogs as well, and these are phylogenetically related to the specialized bacterial EF-Gs. EF-G_{mt}s probably were acquired before the eukaryotic last common ancestor, since at least one EF-G_{mt} paralog is present in all mitochondriate eukaryotes [181].

So far, aerobic eukaryotes that possess a unique EF-G_{mt} (which is an EF-G1_{mt} paralog) are the plastid/apicoplast-carrying eukaryotes: Archaeplastida, stramenopile algae and Apicomplexa [181]. Interestingly, instead of a second EF-G_{mt}, these species have a plastid/apicoplast-targeted EF-G (termed EF-G_{cp} or EF-G_{api}). Outside of these groups, some *Cryptococcus* species have only one EF-G1_{mt}. Curiously, they do not have plastids. Until now, it is estimated that all mitochondriate eukaryotes have either two specialized EF-Gs or one EF-G1_{mt} and an EF-G_{cp}/EF-G_{api} [181, 182]. Until now, it is estimated that all mitochondriate eukaryotes have either two specialized EF-G_{mt}s or one EF-G_{mt} and an EF-G_{cp}/EF-G_{api} [181, 182].

There are limited studies about the function of each mitochondrial paralog. Mammalian EF-G1_{mt} is specialized in translation elongation, while EF-G2_{mt} participates in ribosome recycling [183]. In contrast, *A. thaliana* EF-G1_{mt} carries both functions, translocation and ribosome recycling [182]. *P. falciparum* EF-G1_{mt} participates in ribosome recycling, although its translocation activity was not investigated [184, 185].

8 Termination and Ribosomal Recycling

Translation ends when the ribosome reaches one of three stop codons, *UGA*, *UAA*, or *UAG*. These codons are recognized by release factors (RF) that enter the ribosomal A site and induce release of the nascent peptide (class-I RFs). Bacterial RF1 recognizes *UAA* and *UAG*, while RF2 recognizes *UAA* and *UGA* [186]. These factors assist the hydrolysis of ester bonds on the peptidyl-tRNA, which is located in the ribosomal P site, releasing the newly synthesized protein. Bacterial class-II RFs are GTPases that trigger dissociation of the class-I RF from the ribosome after peptide release. RFs have a conserved GGQ motif that is involved in ester bond hydrolysis (peptidyl-hydrolase domain, PTH), whereas RF1 has a PAT or PVT motif and RF2 SPF motif important for stop codon recognition (codon-recognition domain, CR) (reviewed in [187]). As mentioned in a previous section, mitochondria recognize non-conventional codons as stop codons (Table 1). Thus, understanding the mechanisms of termination and stop codon recognition is a fertile ground for research. Despite recent advances (mostly in mammalian mitochondria), it is still unclear how translation terminates in mitochondria. The most challenging subject is to understand how non-standard stop codons are decodified in mitochondria.

Mitochondrial release factors divide in five distinct subfamilies: mtRF1a, mtRF2a and ICT1, derived from bacterial ancestors, C12orf65 and mtRF1, so far found only in vertebrates. While mtRF1a, mtRF1 and mtRF2a conserved both the PTH and CR domains, ICT1 and C12orf65 have lost the CR domain [188]. Because the release factor family seems particularly prone to genetic expansion and functional divergence [188], there are high probabilities that the mechanism of translation termination varies among different phyla.

- mtRF1a is present in every eukaryotic organism and evolved from an α -prokaryotic ancestor [188]. This protein recognizes *UAA/UAG* stop codons, both in vitro and in vivo [189, 190].
- mtRF1 is a vertebrate-specific mitochondrial protein [190], and it may originate from duplication of the mtRF1a gene at the root of this clade [191]. The function of mtRF1 is controversial. It may recognize the non-standard stop codons AGA and AGG [191]. However, posterior structural predictions and experimental data could not find evidence that mtRF1 recognizes any of the stop codons used in mitochondria [190, 192, 193]. In human mitochondria, the AGG and AGA codons may not function as stop codons. Instead, they promote a -1 frameshift that creates a standard TGA stop codon that can be decoded by mtRF1a [24]. Nonetheless, an analysis from all the vertebrate genomes showed that a -1 frameshift (or even a -2 frameshift) could not originate a canonical TGA stop in every ORF ending in AGG or AGA [188].
- ICT1 (immature colon carcinoma transcript-1) is widely distributed in mitochondria from all eukaryotic phyla [188]. ICT1 is a codon-independent release factor that lost the CR domain. In addition, it is an integral component of the mitoribosome and a crucial component for its assembly [194]. ICT1 is the eukaryotic ortholog of bacterial ArfB. This protein is a rescue factor of stalled ribosomes in prematurely truncated mRNAs and is also part of the bacterial ribosome [195, 196]. ICT1's role in mitochondrial translation is still not completely understood. The position of ICT1 in the mitoribosome is incompatible with the mechanism used by ArfB [193, 195]. In fact, the ICT1 integrated to the mitoribosome has no release factor activity [192]. This protein can rescue ribosomal complexes not only at the ends of mRNAs, but also in the middle of mRNAs, and even can rescue ribosomes depleted of mRNAs [192, 194]. ICT1 might terminate translation of ORFs ending in AGG and AGA since these codons are unassigned in mammalian mitochondria, and mitoribosomes stalled at AGG/AGA codons might be recognized by ICT1 [192, 193].
- C12orf65 is a release factor that probably derived from ICT1. It has a wide phylogenetic distribution and is only absent in viridiplantae [188]. Contrary to ICT1, C12orf65 is a mitochondrial soluble matrix protein that does not exhibit ribosomal-dependent peptidyl hydrolase activity. However, ICT1 overexpression partially complements C12orf65's absence, indicating that both proteins must have some overlapping functions [197].
- mtRF2s lack experimental data about their function or mitochondrial localization. mtRF2 has a narrow phylogenetic distribution, consistently found in land plants, red algae, dictyosteliida and some stramenopiles (brown algae, oomycetes and Blastocystis). It has been lost at least five times during eukaryotic evolution, in concordance with the reassignment of the UGA codon to Trp [188].

The final step of mitochondrial translation consists of recycling of the mitoribosomes. Once the nascent chain is released, the ribosome recycling factor 1 (RRF1_{mt}) and the specialized EF-G2_{mt} (see above) separate ribosome subunits to

allow new cycles of translation [181, 198]. In addition, IF3_{mt} may attach to the ribosomal SSU to prevent futile association of the mitoribosome until an initiation complex is formed [199].

9 Mitochondrial Translation Is Coupled to Protein Assembly

The majority of proteins encoded by mitochondrial DNA are subunits of the respiratory chain complexes and the ATP synthase. These proteins are usually hydrophobic, with two or more transmembrane stretches. Thus, it is expected that mitochondrial translation machinery is physically coupled to the mitochondrial inner membrane. Mitochondrial and cytoplasmic subunits have to assemble and acquire the necessary prosthetic groups in coordination to make active enzymes. Indeed, major progress in the field has come from baker's yeast *S. cerevisiae*. Defects in the coordination of mitochondrial-encoded subunit synthesis and assembly are proposed to affect the cell physiology. When cytochrome *c* oxidase is not assembled, then Cox1 synthesis in mitochondria is downregulated [200, 201]. Cox1 is part of the central core of the enzyme and has 12 transmembrane stretches. Downregulation of Cox1 synthesis may prevent generation of pro-oxidant species, because the poorly assembled heme *a* present in Cox1 has peroxidase activity [202]. When the ATPase F1 sector is not assembled, then translation of the *ATP8/ATP6* transcript is downregulated [203, 204]. This prevents accumulation on the membrane of Atp6–Atp9 rings that could interfere with the membrane potential [205, 206]. Translation of the mitochondrial *COB* mRNA, coding for the cytochrome *b* subunit from the *bc1* complex is also tightly linked to enzyme assembly [207]. Coordination of mitochondrial translation and assembly is an intricate process that requires many factors, many of them specific for each mitochondrial-coded protein [159, 203, 208, 209] (Fig. 3). In general, initiation of mitochondrial mRNA translation is achieved by translational activators (discussed above), which assist in the positioning of the ribosome on the initiator *AUG*. Translational activators are themselves associated with the inner membrane and with other translational activators to tether translation initiation to the localization of assembly of nascent peptides [155, 156]. Some of these mRNA-specific activators act exclusively on the 5'-UTR of the target mRNA and are no longer required in downstream events after translation initiation. Some other translational activators have dual functions. Together with specific chaperones, they physically interact with the newly synthesized peptide and are key players in the coordination of translation and assembly. In general, it is proposed that once the respiratory complex proceeds to assembly, these chaperones/translational activators are released from the assembly intermediary and recycled for new rounds of translation [159, 208]. Equivalent processes were described for *C. reinhardtii* photosynthetic complexes in chloroplasts [165].

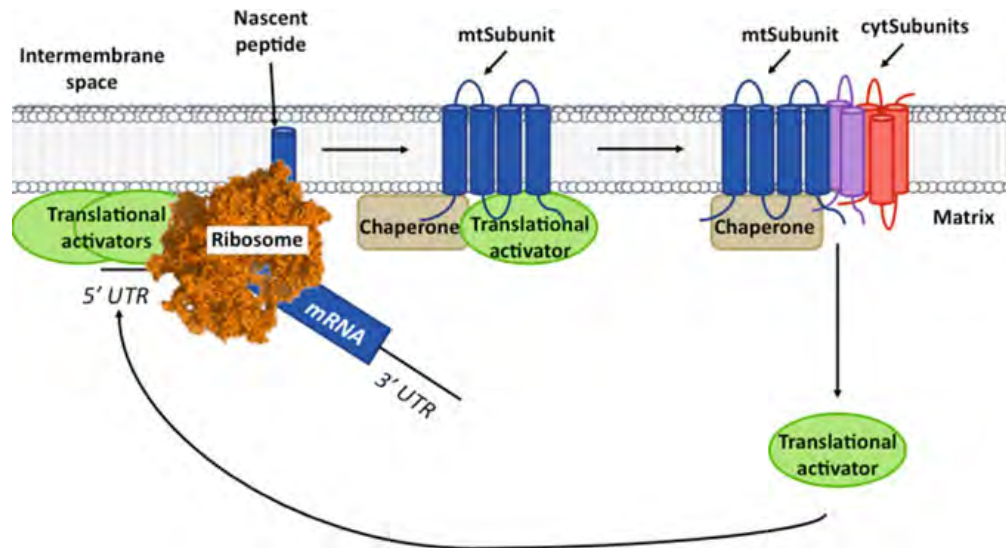


Fig. 3 General model for the coupling of protein synthesis and membrane assembly in yeast mitochondria. Translational activators assist the ribosome in localization of the AUG start codon through recognition of specific sequences within the 5'-UTR of each mRNA Cbs1/Cbs2/Cbp3/Cbp6 (cytochrome *b* synthesis) [207, 210]; Pet309/Mss51 (Cox1 synthesis) [157, 200, 201, 211]; Pet111 (Cox2 synthesis) [212]; Pet494/Pet122/Pet54 (Cox3 synthesis) [213–215], Atp22 (Atp6 and Atp8 synthesis) [204]; Aep1, Aep2 (Atp9 synthesis) [216, 217]. Some of these activators play a second role in coordination of translation/assembly. They physically interact with newly made peptides (mtSubunits) and with additional chaperones to form assembly intermediaries. This is the case for Cbp3/Cbp6 [207] and Mss51 [201]. Once the respiratory complexes assemble with cytosolic, imported subunits (CytSubunits), then the chaperones/translational activators are released and recycled. Translational activators are now ready for new rounds of translation

In human mitochondria, the scenario is not as clear as with yeast. However, some orthologs of the yeast translational activators and chaperones are present in humans, and some of them may have similar roles [164, 209, 218, 219].

10 Concluding Remarks

Mitochondrial translation evolution is an exciting field in biology. Many efforts have been made to understand mitochondrial translation by studying yeast, mammals, plant and trypanosomatid species, and to a lesser degree apicomplexans, nematodes and *Drosophila*. Since the mitochondrial translation machinery has extensively diverged among eukaryotes, it is necessary to study it in many disparate groups of eukaryotes in order to understand its evolution. To date, many questions remain open in this field. For instance: (1) What are the role and mechanism of action in the translation of mitochondrial-encoded small and large non-coding RNAs discovered a few years ago [220–222]? (2) How do mRNA polyadenylation and edition regulate stability, editing and translation in different species? (3) Are

there specialized ribosomes devoted to translating a specific mRNA in mitochondria? If this is the case, how are populations of each type of ribosome regulated in different conditions or cell types? (4) What are the mechanism and regulation of the recently discovered “programmed translational bypass”? This process was first discovered in the yeast *Magnusiomyces capitatus* [223, 224]. In this organism, almost all protein-coding genes in mtDNA have insertions of 27–55 nucleotides, called byps. Translation of these insertions would lead to frameshifts and premature termination of translation, so a precise mechanism to bypass these elements is necessary. Is translation bypass present in different eukaryotic groups? (5) What is the role of the recently discovered mitochondrial RNA granules in translation [127]? Are they present exclusively on mammalian mitochondria, or do they have a broader prevalence in eukaryotes? (6) Since Shine-Dalgarno sequences are absent in many eukaryotic lineages, how is the start codon *AUG* recognized by the initiation complex among different phyla? (7) Are the translation and assembly of nascent peptides prevalent processes in eukaryotes? The field of mitochondrial evolution awaits answers to these exiting questions.

Acknowledgments This work was supported by a research grant from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (47514 to XP-M) and fellowships 255917 (to AE. G-G), 298954 (to AZ-O) and 250726 (to RG-V); Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), UNAM (IN204414 to XP-M). AE.G-G and RG-V are students of the Programade Doctoradoen Ciencias Biomédicas, UNAM.

References

1. Hori H, Osawa S. Origin and evolution of organisms as deduced from 5S ribosomal RNA sequences. *Mol Biol Evol.* 1987;4:445–72.
2. Gray MW, Burger G, Lang BF. Mitochondrial evolution. *Science.* 1999;283:1476–81.
3. Degli Esposti M. Bioenergetic evolution in proteobacteria and mitochondria. *Genome Biol Evol.* 2014;6:3238–3251. doi:10.1093/gbe/evu257.
4. Millar AH, Heazlewood JL, Kristensen BK, Braun HP, Moller IM. The plant mitochondrial proteome. *Trends Plant Sci.* 2005; 10:36–43. doi:10.1016/j.tplants.2004.12.002.
5. Premisler T, Zahedi RP, Lewandrowski U, Sickmann A. Recent advances in yeast organelle and membrane proteomics. *Proteomics.* 2009;9:4731–43. doi:10.1002/pmic.200900201.
6. Szklarczyk R, Huynen MA. Mosaic origin of the mitochondrial proteome. *Proteomics.* 2010;10:4012–24. doi:10.1002/pmic.201000329.
7. Gawryluk RM, Chisholm KA, Pinto DM, Gray MW. Compositional complexity of the mitochondrial proteome of a unicellular eukaryote (*Acanthamoeba castellanii*, supergroup Amoebozoa) rivals that of animals, fungi, and plants. *J Proteomics.* 2014;109:400–16. doi:10.1016/j.jprot.2014.07.005.
8. Hikosaka K, Kita K, Tanabe K. Diversity of mitochondrial genome structure in the Phylum Apicomplexa. *Mol Biochem Parasitol.* 2013;188:26–33. doi:10.1016/j.molbiopara.2013.02.006.
9. Boore JL. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.* 1999;27:1767–80. doi:10.1093/nar/27.8.1767.
10. Gualberto JM, Mileshina D, Wallet C, Niazi AK, Weber-Lotfi F, Dietrich A. The plant mitochondrial genome: dynamics and maintenance. *Biochimie.* 2014;100:107–20. doi:10.1016/j.biochi.2013.09.016.

The Pet309 pentatricopeptide repeat motifs mediate efficient binding to the mitochondrial *COX1* transcript in yeast

Angélica Zamudio-Ochoa[†], Yolanda Camacho-Villasana[†], Aldo E García-Guerrero, Xochitl Pérez-Martínez*.

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México;

[†]These authors contributed equally to this work.

Keywords: *COX1* mRNA, cytochrome *c* oxidase, mitochondria, pentatricopeptide repeat, translation, yeast.

Mitochondrial synthesis of Cox1, the largest subunit of the cytochrome *c* oxidase complex, is controlled by Mss51 and Pet309, two mRNA-specific translational activators that act via the *COX1* mRNA 5'-UTR through an unknown mechanism. Pet309 belongs to the pentatricopeptide repeat (PPR) protein family, which is involved in RNA metabolism in mitochondria and chloroplasts, and its sequence predicts at least 12 PPR motifs in the central portion of the protein. Deletion of these motifs selectively disrupted translation but not accumulation of the *COX1* mRNA. We used RNA coimmunoprecipitation assays to show that Pet309 interacts with the *COX1* mRNA in vivo and that this association is present before processing of the *COX1* mRNA from the *ATP8/6* polycistronic mRNA. This association was not affected by deletion of 8 of the PPR motifs but was undetectable after deletion of the entire 12-PPR region. However, interaction of the Pet309 protein lacking 12 PPR motifs with the *COX1* mRNA was detected after overexpression of the mutated form of the protein, suggesting that deletion of this region decreased the binding affinity for the *COX1* mRNA without abolishing it entirely. Moreover, binding of Pet309 to the *COX1* mRNA was affected by deletion of Mss51. This work demonstrates an in vivo physical interaction between a yeast mitochondrial translational activator and its target mRNA and shows the cooperativity of the PPR domains of Pet309 in interaction with the *COX1* mRNA.

Introduction

The biogenesis of mitochondria and chloroplasts is controlled by protein factors encoded in the nucleus, many of which interact with organellar RNAs. Among these protein factors are the pentatricopeptide repeat proteins (PPR), a major sequence-specific RNA binding family. PPR proteins contain degenerate 35-amino acid units that are usually present in tandem arrays of 2 to 26 repeats throughout the protein. The crystal structures of the mitochondrial RNA polymerase¹ and ribonuclease P,² and more recently the chloroplast THA8L³, THA8⁴ and PPR10,⁵ show that each PPR folds into a pair of antiparallel α -helices. The structure of PPR10 demonstrate that the stacking of 19 repeats form a right-handed superhelical structure. THA8 and PPR10 were crystallized in the presence of their cognate RNA.^{4,5} PPR proteins are mainly localized to mitochondria and chloroplasts and have been found in all eukaryotes,⁶ although the family is particularly expanded in land plants, with more than 450 members in *Arabidopsis thaliana*.⁷ The PPR proteins described to date have roles in transcription, RNA processing, intron splicing, RNA stability and editing, tRNA biogenesis, translation, and

mRNA polyadenylation.^{8,9} Recent work has begun to shed light on the mechanisms of action of PPR proteins as well as the molecular basis of PPR-RNA interaction and recognition. Physical interactions of some PPR proteins with RNA have been demonstrated in vitro (for example, see¹⁰⁻¹⁶) and in vivo¹⁷⁻¹⁹. What is known is that some members of this family have no recognizable domains apart from the PPR motifs and are usually involved in mRNA stability.^{18,20,21} Others have motifs that are unrelated to PPRs, usually located at the C-terminal end, and in some cases have been implicated in the recruitment of catalytic factors for RNA processing.^{8,22}

The genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* predicts the presence of 15 PPR protein members.^{8,23} Some of these proteins are involved in general mitochondrial RNA maturation and translation (e.g., Cbp1, Rpm2, Rmd9, Dmr1, Aep3),²⁴⁻²⁸ whereas others (e.g., Msc6, Rmd9L, Yer077c, Sov1) have unknown functions. An important group of PPR proteins found in yeast are the mRNA-specific translational activators (Pet111, Pet309, Atp22, Aep1, Aep2) that function in translational regulation of mitochondrially-encoded mRNAs (reviewed in^{29,30}). Pet309 is a translational activator specific for the mitochondrial *COX1* mRNA, which encodes subunit 1 of the cytochrome *c* oxidase

*Correspondence to: Xochitl Pérez-Martínez; Email: xperez@ifc.unam.mx.

Submitted: 04/04/2014; Revised: 06/16/2014; Accepted: 06/30/2014; Published Online: 07/24/2014
<http://dx.doi.org/10.4161/rna.29780>

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

Received for publication, February 17, 2016. Published, JBC Papers in Press, February 29, 2016, DOI 10.1074/jbc.M116.721985

Juan Pablo Mayorga^{†1}, Yolanda Camacho-Villasana^{†1}, Miguel Shingú-Vázquez[§], Rodolfo García-Villegas[‡], Angélica Zamudio-Ochoa[‡], Aldo E. García-Guerrero[‡], Greco Hernández[¶], and Xochitl Pérez-Martínez^{‡2}

From the [†]Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico, the [§]Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Biomedical Sciences Monash University, Clayton, Victoria 3800, Australia, and the [¶]Division of Basic Research, National Institute of Cancer (INCan), Mexico City 14080, Mexico

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 *al5β* 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.

Cytochrome *c* oxidase (CcO)³ 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 CcO is a complex process regulated by more than 25 factors and chaperones (for reviews, see Ref. 1). The first steps of CcO 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 CcO 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 CcO, carries the heme *aa*₃-Cu_B center to reduce oxygen. Synthesis of Cox1 inside mitochondria is highly regulated. If CcO 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 intermediaries (COA complexes) that include the chaperones Cox14 and Coa3 (15, 18–20). The current model (reviewed in Refs. 1 and 21) states that if CcO assembly is defective, then Mss51 is sequestered on COA intermediaries 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 CcO 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 CcO 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.), 298954 (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.

¹ Both authors contributed equally to this work.

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

³ The abbreviations used are: CcO, cytochrome *c* oxidase; ARG8[™], mitochondria-encoded acetylornithine aminotransferase; RRM, RNA recognition motif; Mss51^{TE}, translation-effective Mss51; Mss51^{TI}, translational inactive Mss51; BN-PAGE, blue native PAGE; BisTris, 2-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol; COA, cytochrome oxidase assembly.