



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Estudio comparativo entre cepas de levadura que no regulan la síntesis de Cox1, cultivadas en diferentes fuentes de carbono.

TESIS

QUE PARA OBTENER TITULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

ITZEL ABIL GARCÍA CORDERO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. XOCHITL PÉREZ MARTÍNEZ

INV. TIT. B DE T. C. DEPARTAMENTO DE GENÉTICA MOLECULAR

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR UNAM



Ciudad de México, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Esta tesis fue hecha en el laboratorio 204 oriente del Departamento de genética molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Doctora Xochitl Pérez Martínez.

Se agradece el apoyo de la Biol. Ana Paulina Gutiérrez Alejandre y el Dr. Rafael Lazo.

Se agradece al Dr. Rodolfo García Villegas y al Dr. Miguel Shingú Vázquez por la creación de cepas.

Se agradece la ayuda técnica brindada por la Dra. Yolanda Camacho Villasana

Este trabajo fue financiado por CONACyT-284514 y por PAPIIT-UNAM-IN209217 y 202720

El jurado de examen de grado estuvo constituido por:

Presidente:	Luis Sánchez Sánchez
Vocal:	Xochitl Pérez Martínez
Secretario:	Hugo López Muñoz
Suplente:	Hortensia Rosas Acevedo
Suplente:	Octavio Daniel Reyes Hernández

Dedicatorias

A mi mamá Cecilia, gracias por tu gran fortaleza, dedicación y apoyo, aun en los momentos más difíciles, te quiero mucho.

A mi papá Luis, gracias por una gran infancia y lindos recuerdos.

A mi abuelito Efraín por ser como un padre para mí.

A mi abuelita Catalina que me enseñó a no rendirme y luchar hasta el final.

A mis hermanos Julio, Carolina, Cecilia gracias por hacer de mi vida más interesante.

A mis tíos Lucho, Margarita, Chalo, Rosa, Efraín, Zeferino, Raúl y Tita, gracias por todo el apoyo que me han brindado.

A mis amigos Paulina, Marisela, Armando y Juan.

Índice

Agradecimientos	2
Dedicatorias	3
Nomenclatura	6
Abreviaturas	6
Resumen	7
Introducción	9
La Mitocondria.....	9
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudio.....	9
El genoma mitocondrial de <i>S. cerevisiae</i>	10
La cadena respiratoria de <i>S. cerevisiae</i>	11
Metabolismo en <i>S. cerevisiae</i>	13
Mecanismo de represión por glucosa.....	14
Metabolismo de la Galactosa.....	15
Metabolismo de fuentes no fermentables en <i>S. cerevisiae</i> : Glicerol y Lactato	16
Síntesis de proteínas mitocondriales.....	18
Citocromo c oxidasa.....	19
Subunidad 1 de la citocromo c oxidasa: Cox1.....	20
Ensamblaje de la Citocromo c Oxidasa.....	20
Regulación de la síntesis de Cox1.....	21
Las mutantes Cox1-P521/P522 y Cox1 Δ C15 no regulan su síntesis.....	22
Justificación.....	24
Hipótesis	25
Objetivo	25

Objetivos particulares.....	25
Materiales y métodos	26
Lista de cepas utilizadas en este estudio.....	26
Medios.....	26
Curvas de crecimiento.....	27
Adaptación de glucosa a un medio respiratorio.....	27
Diluciones seriadas 1:10 en medios sólidos con antimicina A.....	28
Análisis estadístico.....	29
Resultados	29
Las mutantes Cox1 Δ C15 y Cox1- P521A/P522A crecen de manera similar a la cepa WT a 30° y 37° en medios fermentativos.....	29
La mutante Cox1 Δ C15 presenta un fenotipo sensible a temperatura en glicerol como fuente de carbono respiratoria.....	33
La mutante Cox1 Δ C15 Presenta un fenotipo de crecimiento diferente con respecto a la cepa Cox1WT tanto a 30°C como a 37°C en lactato.....	35
La mutante con Cox1 Δ C15 presenta un crecimiento retardado durante el cambio de glucosa a un medio respiratorio.....	38
Las mutantes Cox1 Δ C15 y Cox1- P521A/P522A presentan dificultad para adaptarse a un medio respiratorio con lactato.....	39
La cepa Cox1 Δ C15 no puede crecer en un medio con antimicina A y lactato	41
Discusión	42
Conclusiones	46
Perspectivas	48
Bibliografía	49
Anexo 1	56
Anexo 2	60

Nomenclatura

Los nombres de genes de levadura están escritos con tres letras y hasta tres números que sean relevantes en la función del gen, localización o fenotipo: *HSP12* (para heat shock protein 12)

Los genes WILD-Type están escritos con letras mayúsculas en itálico: *COX1*, *COX2*

El producto de un gen, una proteína, es escrito con una mayúscula al inicio: Cox1, Cox2, Cox3

Abreviaturas

Cox1, Subunidad 1 de la citocromo c oxidasa

mRNA, ARN mensajero

mtDNA, ADN mitocondrial

mtRNA, ARN mitocondrial

RNAs, plural de RNA

CcO, Citocromo c oxidasa

Cox1 Δ C15, Subunidad 1 de la citocromo c oxidasa que tiene deletados los últimos 15 aminoácidos del extremo carboxilo terminal

Cox1- P521A/P522A, Subunidad 1 de la citocromo c oxidasa que tiene dos mutaciones puntuales en los residuos aminoácidos 521 y 522 en donde se han intercambiado dos prolinas por alaninas.

MIM, membrana interna mitocondrial

MEM, membrana externa mitocondrial

NADHs, plural de NADH

UTRs, Regiones no traducidas de un gen.

Resumen

La citocromo *c* oxidasa (CcO) es el último aceptor de electrones en la cadena respiratoria, en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* consta de 12 subunidades. Cox1 es la subunidad más grande y junto con Cox2 y Cox3 forman el núcleo catalítico de la enzima. Estas subunidades son codificadas en el DNA mitocondrial y su síntesis depende de activares traduccionales que actúan sobre la región UTR 5' del mRNA. La síntesis de Cox1 requiere de diferentes activadores, entre ellos Mss51 y Pet309. Mss51 no solo promueve la traducción de Cox1 sino también interactúa con el extremo carboxilo terminal de Cox1 recién sintetizado. Mss51 es un coordinador de la síntesis y el ensamblaje de Cox1, de tal forma que promueve la síntesis y acumulación de Cox1 cuando hay defectos de ensamblaje de la citocromo *c* oxidasa.

En estudios previos se ha demostrado que en una cepa de levadura que tiene eliminados los últimos 15 aminoácidos del extremo carboxilo terminal (Cox1 Δ C15), así como una cepa con dos mutaciones puntuales en los residuos P521 y P522 (Cox1-P521A/P522A), no regulan la síntesis de Cox1, de tal forma que aunque la citocromo *c* oxidasa no se ensamble, la síntesis de Cox1 es elevada. Por lo tanto, Cox1 se produce a niveles normales aun cuando la CcO no se ensambla correctamente. Es de esperar que si el sistema de regulación de la síntesis de Cox1 está deteriorado, la célula sufra cambios en su capacidad de utilización de fuentes de carbono, ya que ésta depende de la capacidad respiratoria de la célula. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el crecimiento de las mutantes Cox1 Δ C15 y Cox1-P521A/P522A en diferentes medios fermentativos o respiratorios a 30° y 37°. También se evaluó la capacidad de las mutantes de adaptarse al cambio de fuente de carbono de glucosa (medio fermentable) a lactato o glicerol (medio respiratorio). En este trabajo se encontró que el crecimiento de la mutante Cox1 Δ C15 se ve afectado en medios respiratorios a 37°C y en lactato desde los 30°C. Se encontró también que a las mutantes se les dificulta adaptarse cuando son sometidas a un cambio de glucosa a lactato. Los datos indican que mutaciones en el extremo carboxilo terminal de Cox1, que promueven una desregulación de la

síntesis de Cox1, afectan la capacidad de crecimiento y adaptación de las células en diferentes fuentes de carbono, y confieren sensibilidad a temperatura.

Introducción

La mitocondria

Las mitocondrias son orgánulos que están en la mayoría de los organismos eucariotas. Su origen más aceptado es que la mitocondria evolucionó a partir de un endosimbionte α -proteobacteriano (Gray, 2012). Este proceso de transición de un endosimbionte a un organelo estable involucró la aparición de nuevos genes, así como de una maquinaria de importación de proteínas y la integración del metabolismo de los dos organismos (Roger *et al.*, 2017). Además, el genoma mitocondrial es bastante reducido comparado con el de su ancestro bacteriano, ya que parte se ha perdido a lo largo de la evolución o ha sido transferido al núcleo (Malina *et al.*, 2018). Las mitocondrias poseen dos membranas: una membrana externa y una interna, la membrana externa (MEM) es permeable para una gran cantidad de moléculas e iones ya que posee muchos canales y proteínas integrales que facilitan el transporte. La membrana interna (MIM) es altamente selectiva incluso para el ión H^+ . Las moléculas e iones únicamente pueden atravesar la membrana con transportadores específicos. En la membrana interna se localizan los complejos respiratorios así como la ATP sintasa. Entre la MEM y la MIM está el espacio intermembrana. La matriz mitocondrial está rodeada por la membrana interna y es aquí donde se llevan a cabo varias rutas oxidativas de compuestos energéticos, a excepción de la glucólisis, que se lleva a cabo en el citosol. En la mitocondria se localizan muchas enzimas, como las que actúan durante la β -oxidación de los ácidos grasos y las del ciclo de Krebs. También aquí se encuentra el DNA mitocondrial y las proteínas para la expresión de éste (Nelson & Cox, 2009).

***Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudio**

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un organismo modelo muy utilizado para el estudio de diferentes funciones celulares ya que están conservadas entre las células eucariotas. Su uso para el estudio de las funciones mitocondriales radica

en que es uno de los pocos organismo en los que es posible manipular su DNA mitocondrial. *S. cerevisiae* tiene capacidad fermentativa y obtiene la mayoría de su energía por esta vía metabólica, por lo que puede sobrevivir a mutaciones que inactivan la fosforilación oxidativa, además de que puede sobrevivir aun si ha perdido todo el DNA mitocondrial (Lasserre *et al.*, 2015). Sus genomas, nuclear y mitocondrial, están completamente secuenciados y el cultivo es rápido, así que es fácil obtener grandes cantidades de material biológico para diferentes estudios bioquímicos. El conocimiento que se obtiene de los sistemas mitocondriales en levadura puede ser relevante para poder generar nuevos horizontes en el estudio de las enfermedades mitocondriales humanas (Altmann *et al.*, 2007).

El genoma mitocondrial de *S. cerevisiae*

El DNA mitocondrial (mtDNA) de animales y hongos codifica para RNAs mensajeros que se traducen en la misma mitocondria, por lo que necesita de una maquinaria completa para la expresión de genes. El genoma mitocondrial codifica genes de RNAs ribosomales y RNAs de transferencia suficientes para la síntesis de proteínas y se complementan con factores que son codificados en el genoma nuclear e importados a la mitocondria (Ott *et al.*, 2016). (García-Guerrero *et al.*, 2018).

En *S. cerevisiae* el mtDNA codifica todos sus RNAs de transferencia así como subunidades de los complejos respiratorios; Cytb (subunidad del complejo III o complejo *bc1*), Cox 1, Cox2 y Cox3 (subunidades del complejo IV o citocromo c oxidasa); Atp6, Atp8 y Atp9 (subunidades de la ATP sintasa) y Var1 que se traduce a una proteína que forma parte de la subunidad pequeña del ribosoma (Friedman & Nunnari, 2014) (Ott *et al.*, 2016) (Figura 1)

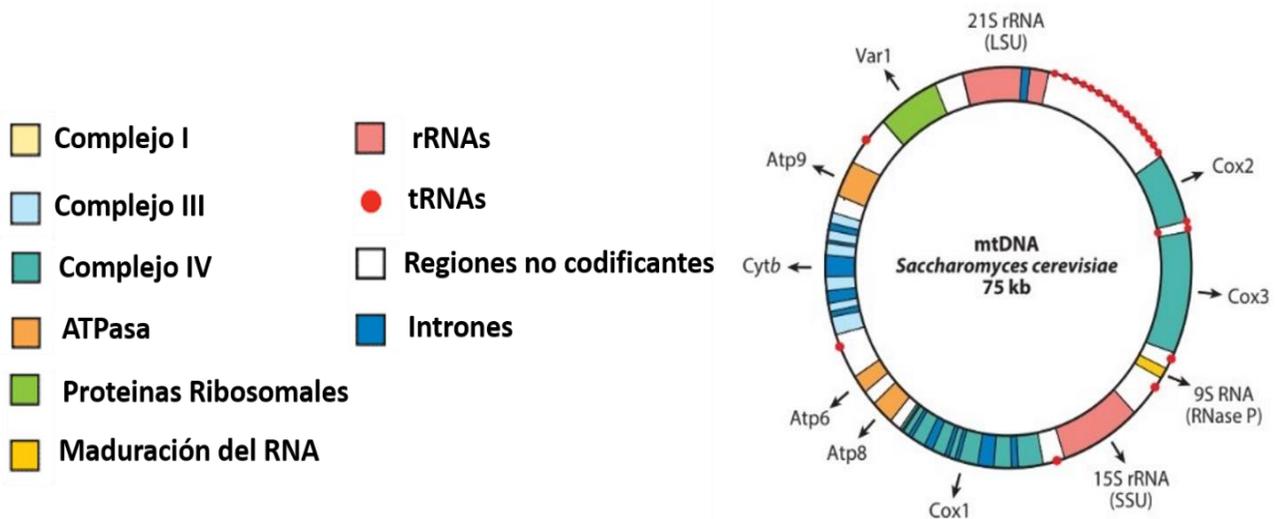


Figura 1. Organización del genoma mitocondrial en *S. cerevisiae*. El genoma mitocondrial de levadura codifica 2 rRNAs, 24 tRNAs, 7 mRNA y el componente 9S RNA de la RNasa (Ott, 2016).

La cadena respiratoria de *S. cerevisiae*

Las células eucariotas son capaces de producir energía, en forma de ATP, por dos vías diferentes, la energía puede ser generada por la glucólisis o por la oxidación de la glucosa a etanol o ácido láctico. En condiciones oxigénicas, la completa oxidación de los carbohidratos, proteínas y lípidos a CO₂ y H₂O se da mediante la cadena de transporte de electrones (Fontanesi *et al.*, 2006)

Los complejos respiratorios acoplan el transporte de electrones hacia al O₂ con el bombeo de protones de la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal, para generar un gradiente electroquímico que es aprovechado por la ATP sintasa y así generar ATP.

La maquinaria respiratoria eucariota consiste de cinco complejos multiproteicos (I-V) y dos acarreadores de electrones libres, el citocromo *c* y la coenzima Q. En *S. cerevisiae* el complejo I es reemplazado por tres NADHs deshidrogenasas alternas (dos en la cara externa de la MIM y una en la cara interna de la MIM) que catalizan la transferencia de un electrón desde el NADH a la quinona vía FAD sin bombeo de

protones. Las NADH deshidrogenasas son la principal ruta para la oxidación de NADHs generados por la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico durante la respiración. (Iwata *et al.*, 2012).

El complejo II o succinato deshidrogenasa que también es una enzima del ciclo del ácido cítrico oxida el succinato a fumarato; los electrones son acarreados desde FADH reducido por el succinato hacia la coenzima Q reduciéndola a ubiquinol sin bombeo de protones.

La coenzima Q recibe electrones de diferentes vías redox, principalmente del NADH y el FADH, también desde las vías del ácido tricarboxílico, flavoproteínas de transferencia de electrones y la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa. (Alcázar-Fabra, Navas & Brea-Calvo, 2019)

El complejo III o complejo *bc1* cataliza la transferencia de electrones desde el ubiquinol al citocromo *c*. Finalmente, la *citocromo c* oxidasa (CcO) o complejo IV acarrea electrones desde el *citocromo c* al O₂ reduciéndolo en dos moléculas de H₂O. Los complejos III y IV son los únicos que acoplan la transferencia de electrones con la transferencia de protones hacia el espacio intermembranal, y por lo tanto contribuyen a la generación de un gradiente electroquímico que aprovecha el complejo V o ATP sintasa para producir ATP (Kowaltowski *et al.*, 2009) (Figura 2).

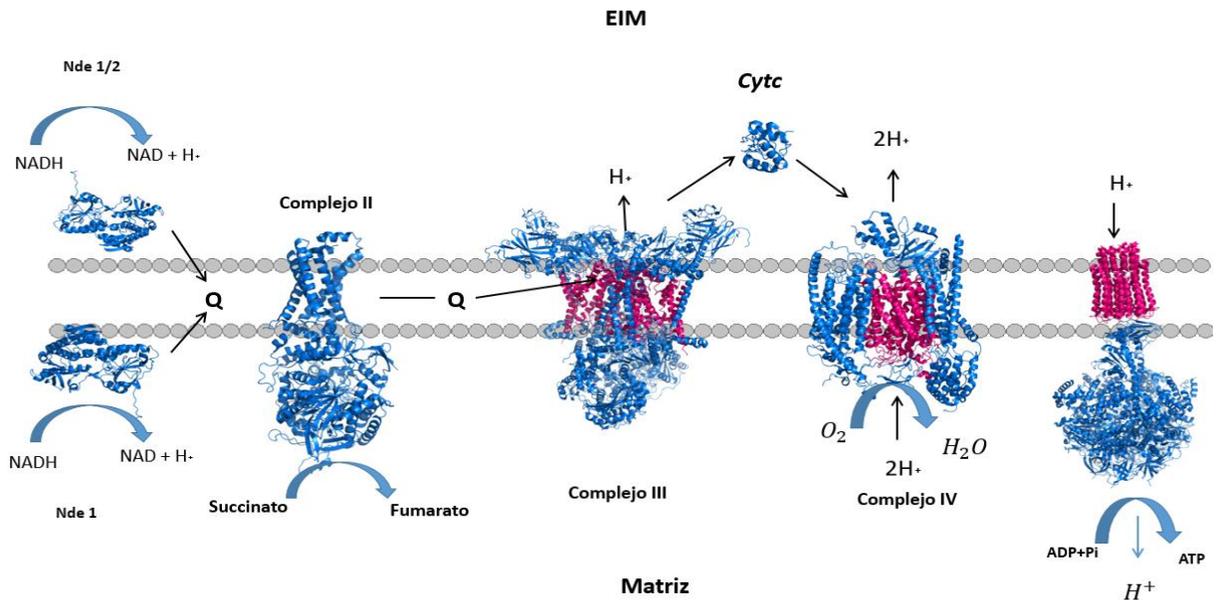


Figura 2. Cadena respiratoria de *S. cerevisiae*. En color azul se muestran las subunidades codificadas por el DNA nuclear mientras las que son codificadas por el DNA mitocondrial se muestran en color magenta. Q= Poza de quinonas, EIM= espacio intermembrana, Nde 1/2= se muestra solo una de las dos NADH deshidrogenasas que se encuentran del lado del espacio intermembrana. NADH, PDB: 4G-6G. Complejo II, PDB: 1ZOY. Complejo III, PDB: 1KYO. Complejo IV, PDB: 6HU9 modificado de (Letts & Sazanov, 2017).

Metabolismo en *S. cerevisiae*

El metabolismo de los carbohidratos en *S. cerevisiae* está fuertemente regulado por la concentración y la naturaleza de la fuente de carbono (Görks, 1967). Aunque *S. cerevisiae* puede adaptarse a una gran variedad de fuentes de carbono, la glucosa tiene un efecto dominante y claramente es la fuente de energía preferida para la levadura, incluso ante la presencia de oxígeno. La glucosa ofrece a la célula carbono y energía más rápido para su crecimiento a través de la fermentación, en la que los NADHs generados por la glucólisis ceden electrones a moléculas diferentes al oxígeno. Un ejemplo de ello es la reducción de piruvato a lactato, oxidando NADH a NAD⁺ (Kayikci & Nielsen, 2015).

Cuando la glucosa está presente, las enzimas requeridas para la utilización de fuentes de carbono alternativas se sintetizan a tasas bajas o no se sintetizan en absoluto, por lo que puede inhibir procesos como la gluconeogénesis y la respiración. Este fenómeno se conoce como represión por catabolito de carbono, o simplemente represión por catabolito. Este fenómeno en *S. cerevisiae* no ocurre con la galactosa y rafinosa, que también son fuentes de carbono que se metabolizan a través de la vía fermentativa. Por lo que las levaduras que crecen en estos medios sí expresan genes mitocondriales. (Sanchez & Demain, 2002).

Mecanismo de represión por glucosa

El mayor efecto de represión por la glucosa se da a nivel transcripcional y aunque no todos los genes reprimibles por la glucosa se reprimen de la misma manera, se ha identificado una maquinaria de represión general de la glucosa involucrada en la regulación de un gran número de genes. Sus componentes centrales son el represor transcripcional Mig1, el complejo Snf1-proteína-cinasa y la proteína fosfatasa1 (Gancedo, 1992).

Mig1 es una proteína con motivos de dedos de zinc que se une al DNA. Esta proteína recluta otras proteínas co-represoras como Ssn6 y Tup1 para ejercer la represión de diversas familias de genes y sus genes inductores de la transcripción, como los genes de la familia GAL que producen enzimas encargadas de metabolizar la galactosa. Por tal motivo la galactosa no produce represión por catabolito. La localización de Mig1 es esencial. Cuando las células están en presencia de glucosa Mig1 se encuentra en el núcleo, donde se une a los promotores de genes reprimibles por glucosa. Cuando se priva de glucosa a las células, Mig1 se mueve hacia el citoplasma (Trumbly, 1992).

La transcripción de los genes que se reprimen por la glucosa depende del complejo Snf1- proteína-cinasa. En ausencia de glucosa Snf1 probablemente fosforila y, por lo tanto, provoca la translocación de Mig1 al citoplasma. La Cinasa Ser/Thr Snf1 está asociada con una subunidad activadora y tres proteínas de andamiaje en

complejos de alto peso molecular. La subunidad activadora Snf4 (cat3) es necesaria para la actividad de Snf1, mientras que las proteínas Sip1 Sip2 y Gal 83 mantienen la asociación de Snf4 y Snf1. La glucosa inhibe la actividad de Snf1 y la estimula cuando la glucosa es limitante (Figura 3) (Carlson, 1999).

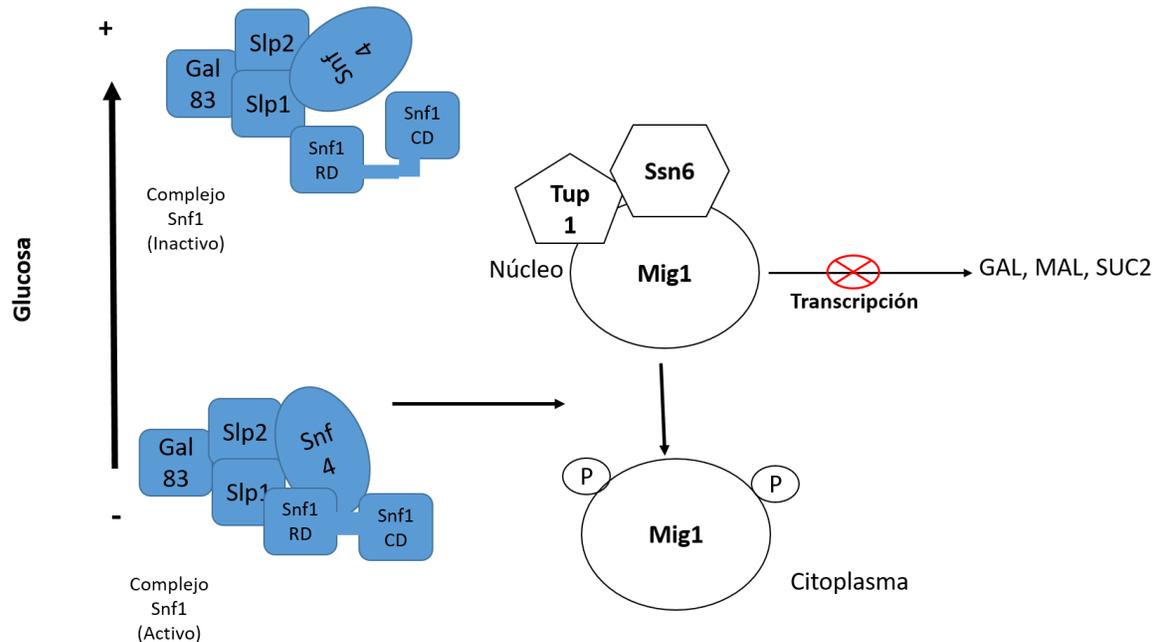


Figura 3. Representación del modo de acción de Mig1 y su regulación. En presencia de glucosa, Mig 1 se encuentra en el núcleo, donde reprime la transcripción de genes que codifican proteínas que intervienen en el metabolismo de fuentes de carbono alternativas. Snf1 regula la localización de Mig1. Cuando la glucosa no está disponible, el complejo Snf1 fosforila a Mig1 facilitando su translocación al citoplasma. La glucosa induce un cambio conformacional en el complejo Snf1. Modificado de (Gancedo, 1998).

Metabolismos de la Galactosa

La conversión de la galactosa en glucosa requiere de las enzimas de la vía Leloir, el azúcar es fosforilado por la galactocinasa (codificado por el gen Gal1) para producir galactosa-1-fosfato. Sin embargo, la enzima galactocinasa solo convierte la forma α del azúcar en esta reacción. Los anómeros α y β del azúcar difieren en la estereoquímica del carbono C-1. Por lo tanto, el paso inicial de la vía de Leloir es la conversión de β -D-galactosa en α -D-galactosa por una enzima mutarotasa

(codificada por el gen GAL10). Una vez en forma de galactosa-1-fosfato, la galactosa intercambia el grupo fosfato por el UDP de la UDP-glucosa para crear UDP-galactosa y liberar glucosa-1-fosfato reacción catalizada por la enzima Galactosa-1-fosfato uridiltransferasa (Codificada por el gen GAL7). Una enzima epimerasa la “UDP galactosa-4-epimerasa” (Codificada por el gen GAL10) cambia la estereoquímica del carbono 4 en UDP-galactosa, creando UDP-glucosa. En la siguiente ronda de la reacción de transferencia, la glucosa se libera en forma de glucosa-1-fosfato. Una vez liberado, la glucosa-1-fosfato se convierte en glucosa-6-fosfato reacción que cataliza la enzima fosfoglucomutasa (figura 4). La glucosa-6-fosfato puede ingresar a la glucólisis para generar energía (Sellick *et al.*, 2008)

La transcripción de GAL1, GAL7 y GAL10 se activan mediante la unión del activador de transcripción de dedos de zinc Gal4 a sus secuencias. Los genes GAL4 y GAL1 esta reprimidos por Mig1 (Klein *et al.*, 2008).

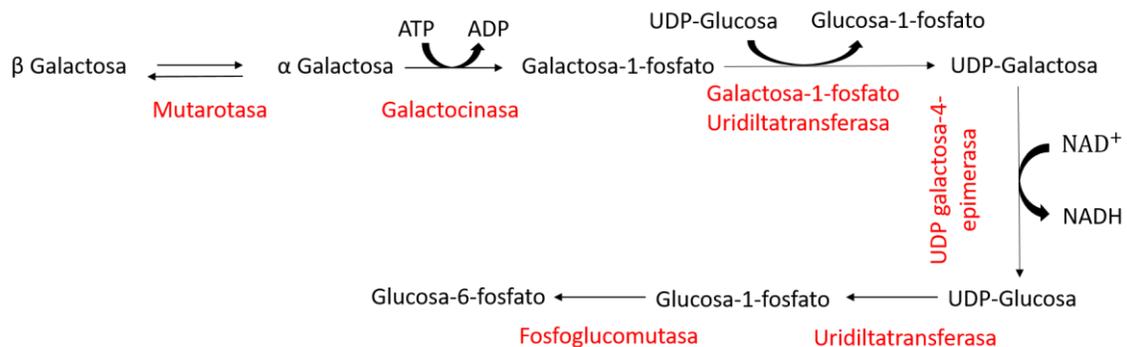


Figura 4. Metabolismo del glicerol, en rojo se muestran las enzimas que catalizan cada reacción. La vía Leloir promueve la conversión de β-D-galactosa en glucosa-1-fosfato que subsecuentemente puede ser convertida en la glucosa-6-fosfato por la acción de la enzima fosfoglucomutasa y entrar a la vía de la glucólisis. Modificado de (Sellick *et al.*, 2008).

Metabolismo de fuentes no fermentables en *S. cerevisiae*: Glicerol y Lactato

S. cerevisiae puede metabolizar el ácido láctico ya que contiene diferentes tipos de lactato deshidrogenasa. Las más estudiadas son dos enzimas que son

estereoespecíficas para la L- y D- lactato y son inducidas por la presencia de oxígeno (Pajot y Claisse, 1974). Estas dos enzimas son: la L-(+)- lactato ferrocitocromo c oxidorreductasa (o citocromo b2) que se encuentra en el espacio intermembrana, codificado por el gen *CYB2* y la D-lactato ferrocitocromo c oxirreductasa, codificado por el gen *DLD1*, que se localiza en la membrana interna mitocondrial. Ambas enzimas tienen la particularidad de ser capaces de transferir los electrones del lactato, directamente al citocromo c, para alimentar la cadena de transporte de electrones. La expresión de estas enzimas está fuertemente reprimida por la presencia de glucosa (Grad, Sayles & Lemire, 2005).

Se han encontrado dos enzimas más, que presentan actividad de D-lactato deshidrogenasa, la Dld3 que se encuentra en el citoplasma, codificada por el gen *DLD3*, y la Dld2 que se encuentra en la matriz mitocondrial, codificada por el gen *DLD2*. Estas enzimas pueden tener otros sustratos principales además del D-lactato, ya que no se ha observado ningún fenotipo de crecimiento significativo o requisitos de fuente de carbono asociados con la delección de sus genes o células mutantes dobles (Chelstowska *et al.*, 1999). La oxidación completa del lactato requiere de toda la cadena de transporte de electrones, el piruvato que resulta de la oxidación del lactato puede entrar al ciclo de Krebs, donde se obtienen NADHs que posteriormente pueden ser oxidados por las NADHs deshidrogenasas o entrar al complejo II a través del succinato (Bricker *et al.*, 2012).

El metabolismo del glicerol empieza por la fosforilación del glicerol a Glicero-3-fosfato, por el glicerol cinasa, el cual es oxidado por la Glicerol 3 fosfato deshidrogenasa dependiente de FAD (mG3PDH) a dihidroxicetona fosfato. Esta enzima está localizada en la cara externa de la membrana mitocondrial interna, y envía electrones hacia la cadena respiratoria reduciendo a la ubiquinona (Nevoigt, 1997) (figura 5).

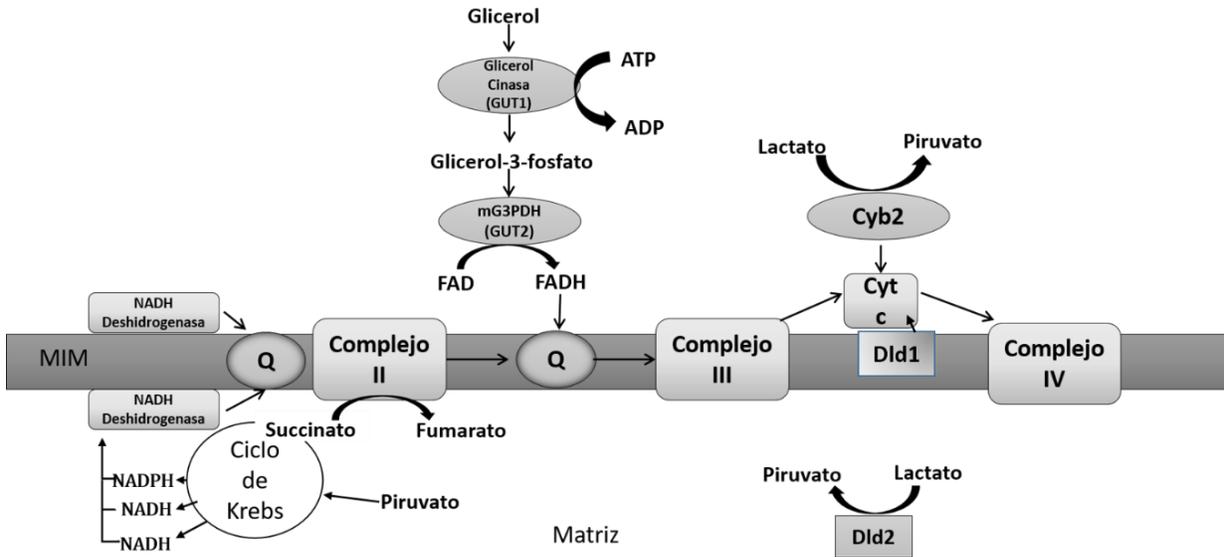


Figura 5. Metabolismo de fuentes no fermentativas: glicerol y lactato. El glicerol se fosforila y oxida mediante las enzimas glicerol cinasa, codificado por el gen GUT1 y por la Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial mG3PDH codificado por el gen GUT2. Los electrones se donan a la poza de quinonas (Q). El lactato puede donar electrones a la cadena respiratoria al oxidarse a piruvato por dos rutas diferentes: Las enzimas Dld2 y Dld3 con actividad de lactato deshidrogenasa generan piruvato que puede entrar al ciclo de Krebs, que después alimenta la cadena respiratoria a través de las NADH deshidrogenasa interna o del complejo II. La otra ruta de entrada a la cadena respiratoria es a través del citocromo c (Cyt c) que recibe electrones de dos enzimas posibles; el citocromo b2 y la Dld1, generando piruvato que entrará a la cadena respiratoria por los NADHs generados en el ciclo de Krebs. Modificado de (Grad, Sayles & Lemire, 2005).

Síntesis de proteínas mitocondriales

Uno de los procesos sensible a la fuente de carbono, y que se regula por represión catabólica es la síntesis de proteínas que se encuentran codificadas en el genoma mitocondrial (Kayikci & Nielsen, 2015). A pesar de su origen bacteriano, la maquinaria de traducción mitocondrial cambió a lo largo del tiempo, adaptándose a las condiciones del orgánulo. Los mRNAs en la mitocondria no tienen modificación cap 5' como en el citosol (García-Guerrero *et al.*, 2018). En *S. cerevisiae* la traducción de los mRNAs codificados en el mtDNA depende de proteínas conocidas como activadores traduccionales. Estos activadores actúan sobre la UTRs 5' de los mRNAs. Los activadores de la traducción pueden regular las síntesis de proteínas

por dos mecanismos: 1) la abundancia de los activadores traduccionales dentro de la mitocondria los cuales son codificados en el núcleo, 2) mediante mecanismos que detectan el correcto ensamblaje de los complejos respiratorios y que coordinan este proceso con la síntesis de proteínas (Costanzo & Fox, 1990)

Citocromo c oxidasa

La citocromo c oxidasa (CcO, Complejo IV) es el último aceptor de electrones de la cadena respiratoria. Esta enzima contiene dos sitios hierro y dos de cobre (Fe_a , Fe_{a_3} , Cu_A y Cu_B) (Tsukihara *et al.*, 1996). La CcO de los eucariontes consta de 12 subunidades con un origen dual, ya que pueden estar codificadas tanto por el DNA nuclear como mitocondrial. Las proteínas codificadas en el núcleo son traducidas por ribosomas que se encuentran en el citosol, estas proteínas contienen precursores con información que hace que se dirijan hacia la mitocondria. Estos precursores son reconocidos y transportados a través de las membranas mitocondriales por dos translocasas; primero por la translocasa de la membrana externa (TOM) y luego por las translocasas de la membrana interna (TIM23 y TIM22) (Pfanner & Meijer, 1997).

Cox1, Cox2 y Cox3 están codificadas por el mtDNA, las subunidades Cox1 y Cox2 son esenciales para la función de la enzima y se sabe poco acerca de la función de Cox3. Estas subunidades tienen un alto grado de conservación de la secuencia entre las diversas oxidasas terminales. La subunidad I contiene dos centros hemo. Se cree que el primero de ellos, el hemo a es la entrada de electrones para el segundo, el hemo a_3 . El hemo a_3 es parte del centro binuclear, con un átomo de cobre (Cu_B), y es el sitio de reducción del oxígeno molecular. Se ha demostrado que la subunidad II, que contiene otro centro de cobre (Cu_A) con dos átomos de Cu, es el principal receptor de electrones provenientes del citocromo c reducido (Carr & Winge, 2003). Las subunidades codificadas en el genoma nuclear forman la periferia del núcleo catalítico. La CcO está embebida en la membrana interna mitocondrial (MIM) y puede formar supercomplejos (Khalimonchuck *et al.*, 2012). La composición de los diversos supercomplejos puede cambiar según los tipos de

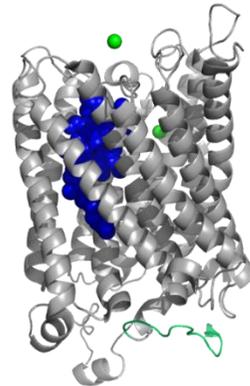
células y sus necesidades fisiológicas. En las células de levadura que carecen del complejo I, los supercomplejos consisten en un dímero del complejo III y una o dos copias del complejo IV (III2 + IV1–2) (Schägger & Pfeiffer, 2000).

Los complejos respiratorios están dispuestos como supercomplejos para facilitar el transporte de electrones, estabilizar los complejos individuales y reducir la producción de especies reactivas de oxígeno (Genova & Lenaz, 2014).

Subunidad 1 de la citocromo c oxidasa: Cox1

Cox1 es la subunidad más grande de la citocromo c oxidasa, tiene 12 dominios transmembrana. Tanto el extremo amino terminal como el carboxilo terminal están expuestos hacia la matriz mitocondrial, cuando la enzima esta ensamblada. (Soto *et al.*, 2012) (Figura 6).

Figura 6. Subunidad 1 de la citocromo c oxidasa (Cox1). Los grupos hemo se muestran en color azul, los cofactores CU_B se muestran como esferas verdes, mientras el extremo carboxilo terminal se presenta en color verde. PDB: 6HU9, Modificado de (Hartley *et al.*, 2018).



Ensamblaje de la Citocromo c Oxidasa

El ensamblaje de la CcO es un proceso complicado, que involucra más de 25 cofactores y chaperonas. El ensamblaje de la enzima comienza con la activación de la traducción de los ARNm codificados en la mitocondria COX1, COX2 y COX3 por sus activadores traduccionales. Estas proteínas tiene como diana el extremo 5'-UTR del ARNm para permitir que la traducción se inicie en los ribosomas. La activación traduccional del ARNm de COX1 depende de Pet309, Mss51, Pet 54 y Mss116, la traducción de COX2 depende de Pet111 mientras que la traducción del ARNm de COX3 depende de Pet54, Pet122 y Pet494 (Dennerlein *et al.*, 2017).

En el caso de Cox1, Mss51 además de ser un activador traduccional también interactúa con el péptido nascente para coordinar el ensamblaje de Cox1 dentro de la citocromo c oxidasa. (Perez-Martinez, 2003)

Después Cox1 se ensambla con las primeras subunidades codificadas nuclearmente Cox 5 y Cox6. (Soto *et al.*, 2012). Investigaciones en mutantes sugieren que se forman el complejo Cox1–Cox5–Cox6. Se sabe poco acerca de la serie de eventos que siguen a la asociación de Cox2 y Cox3 con el complejo Cox1-Cox5-Cox6, ya que no se han encontrado intermediarios de ensamblaje estables. Cox7, Cox8 y Cox9 forman un complejo antes de su incorporación, que está mediado por Pet100. Con la incorporación de Cox12 y Cox13 concluye la formación del complejo. Sin embargo, ninguno de estas dos subunidades es esencial para la actividad enzimática del complejo, que permanece estable en su ausencia (Mick, Fox & Rehling, 2010).

Regulación de la síntesis de Cox1

La síntesis de Cox1 está altamente regulada como un mecanismo para asegurar una correcta síntesis de la plataforma central de toda la enzima. La síntesis de Cox1 se reduce cuando el ensamblaje de la citocromo c oxidasa presenta algún defecto ya que algunas especies de Cox1 sin ensamblar actúan como agentes prooxidantes (Khalimonchuk *et al.*, 2007). La proteína Mss51 tiene papel importante en la regulación de la síntesis de Cox1, ya que no solo tiene la función de activar la traducción del mRNA de COX1, además interactúa con Cox1 para formar los primeros intermediarios de alto peso molecular (complejos COA) que incluyen las chaperonas Cox14 y Coa3 (Pérez-Martínez, 2003), (Barrientos *et al.*, 2004). Esta interacción mantiene secuestrado a Mss51 impidiendo que inicie la activación de la síntesis de Cox 1 nuevamente hasta que el ensamblaje de la CcO termine de forma correcta y la enzima sea funcional (Figura 7). De esta forma, Cox14 y Coa3 son reguladores negativos, porque su eliminación restaura la síntesis de Cox1 aun cuando el ensamblaje de la CcO es deficiente (Mick *et al.*, 2010).

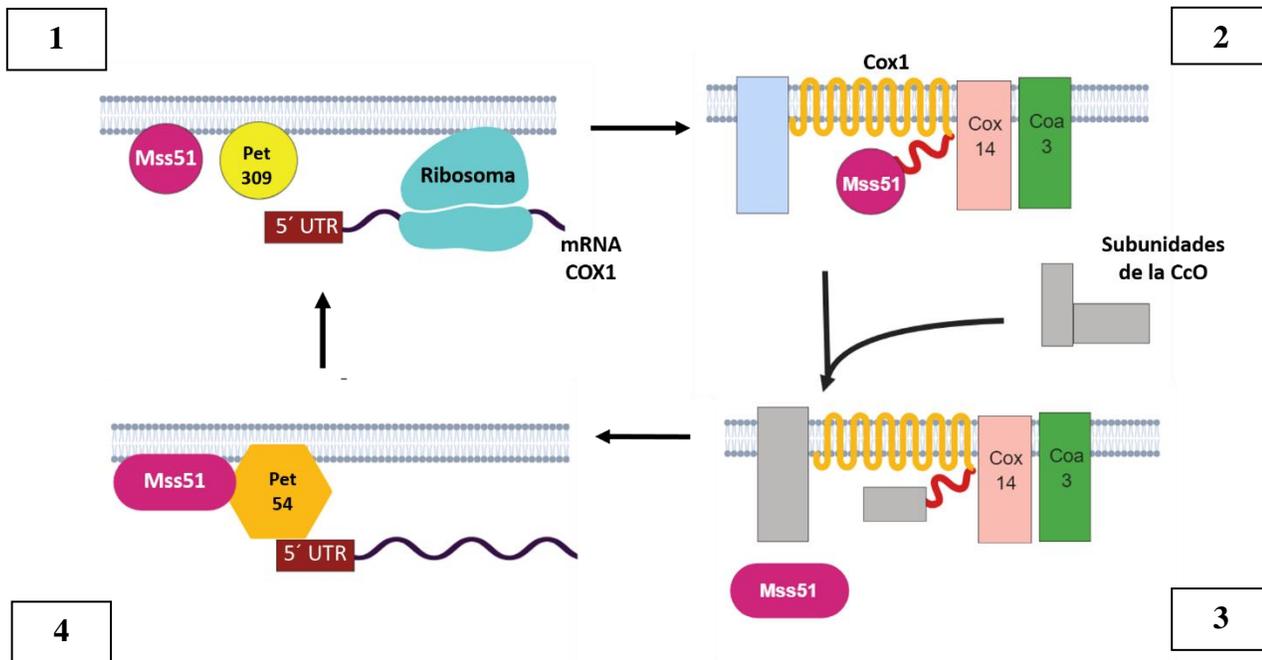


Figura 7. Modelo de la regulación de la síntesis de Cox1 en *S. cerevisiae* 1) Cox 1 es sintetizado por los ribosomas una vez que la traducción es activada por Mss51 y Pet 309, los cuales actúan en el extremo 5´ UTR del mRNA de *COX1*, la conformación activa traduccionalmente de Mss51 se muestra en forma de un círculo. 2) Mss51 interactúa con el extremo C- terminal de Cox1 y con las proteínas transmembranales Cox14 y Coa3, llevando a Mss51 a un estado de secuestro. Esto impide que Mss51 vuelva a activar la síntesis de Cox1. 3) La formación de una CcO funcional promueve la liberación de Mss51, pero con una conformación poco eficiente para activar la traducción del mRNA de *COX1*. Mss51 inactivo aquí se muestra en forma de un óvalo 4) la interacción de Pet54 con Mss51 promueve que adquiera la conformación adecuada para activar la síntesis de Cox1 (Mayorga *et al.*, 2016).

Las mutantes Cox1-P521/P522 y Cox1ΔC15 no regulan su síntesis

Actualmente no se conocen totalmente los mecanismos por los cuales se detecta el estado de ensamblaje de CcO para regular la síntesis de Cox1. Así que para entender mejor este mecanismo se estudió el papel del dominio C-terminal de Cox1 por mutagénesis dirigida.

El extremo C-terminal de Cox1 comprende 59 aminoácidos y está expuesto del lado de la matriz mitocondrial (Hartley *et al.*, 2018). Estudios previos de nuestro

laboratorio han demostrado que la eliminación de los últimos 15 residuos del extremo C-terminal de Cox1 (Cox1 Δ C15) provoca que se desregule la síntesis normal de Cox1, ya que en vez de que los niveles de Cox1 se reduzcan en mutantes de ensamblaje de la CcO, éstos se mantenían muy parecidos a los de una cepa WT (Shingú *et al.*, 2010). Lo mismo se observó en una cepa con dos mutaciones puntuales de esta región, Cox1-P521A/P522A. (Garcia-Villegas *et al.*, 2018).

El extremo C-terminal de Cox1 es por tanto un regulador negativo de la síntesis de Cox1. Pensamos que el extremo C-terminal de Cox1 une a Mss51 y lo atrapa cuando la CcO no se ensambla. Si el extremo C-terminal está ausente, entonces Mss51 está siempre libre, y por lo tanto no regula a la baja la síntesis de Cox1, aunque la CcO no se ensamble. (Shingú *et al.*, 2010)(Garcia-Villegas *et al.*, 2017).

Cabe mencionar que las mutaciones en el extremo C-terminal de Cox1 Cox1 Δ C15 y Cox1-P521A/522 no parecen afectar el crecimiento respiratorio de las células, al menos mediante crecimiento en medios sólidos a 30°C, que es la temperatura óptima de crecimiento de la levadura (García-Villegas *et al.*, 2017). Más aún, el ensayo de crecimiento se realizó mediante diluciones seriales en medio sólido, el cual es un método cualitativo que no detecta diferencias pequeñas entre las cepas (Figura 8). En este trabajo nos preguntamos, ¿cómo se ve afectado el crecimiento de las mutantes de Cox1, Cox1 Δ C15 y Cox1-P521A/522A cuando crecemos en medios líquidos con diferentes fuentes de carbono y a diferentes temperaturas?

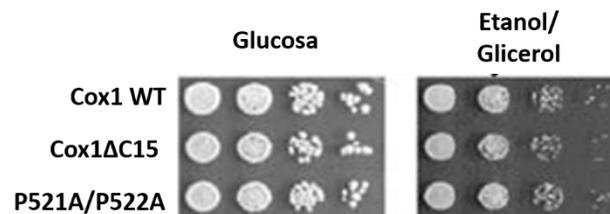


Figura 8. Las mutantes en el extremo C-terminal de Cox1 presentan un crecimiento similar en un medio respiratorio. Se llevaron a cabo diluciones seriadas a 30° durante 3 días en un medio fermentativo (Glucosa) y uno respiratorio (Etanol/ Glicerol) para comparar el crecimiento de las dos cepas mutantes con respecto a la cepa WT (García -Villegas *et al.*, 2017).

También se ha observado que la cepa Cox1 Δ C15 provoca una disminución en el tiempo de vida cronológica, a comparación de la cepa Cox1 WT. La cepa Cox1-P521A/P522A no cambió su tiempo de vida cronológico con respecto a la cepa WT (García –Villegas y de Luna, sin publicar). El período de vida cronológico es una medida del tiempo de supervivencia en un medio sin fuente de carbono de las poblaciones de levaduras no divisorias (Fabrizio & Longo, 2003).

Es de esperar que si desactivamos el sistema de regulación de la síntesis de Cox1 la célula sufra cambios en su capacidad de utilización de fuentes de carbono, ya que ésta depende de la capacidad respiratoria de la célula, y de ensamblar correctamente a la CcO. Esperamos además que las mutantes de Cox1 induzcan un fenotipo de sensibilidad a temperatura, ya que se ha demostrado que la proteína Cox1 juega un papel importante en la termotolerancia en cepas de levadura (Li *et al.*, 2019).

Justificación

El mal funcionamiento de la citocromo *c* oxidasa tiene severas implicaciones para el metabolismo energético de la célula. La deficiencia de la CcO está asociada mayormente a encefalopatías, ya que los tejidos musculares y del sistema nervioso tienen una alta demanda energética. Las mutaciones que afectan a las subunidades de la CcO codificadas nuclearmente son raras, mientras que las mutaciones que afectan a las proteínas de ensamblaje representan la mayoría de las deficiencias de la CcO. El inicio de este tipo de desórdenes es generalmente en la infancia y la supervivencia a la adolescencia o la vida adulta es infrecuente (DiMauro, Tanji y Schon, 2012). El trastorno neurológico más común es el síndrome de Leigh, es un trastorno neurológico altamente progresivo. Se da durante la infancia y se caracteriza por lesiones necrotizantes en el mesencéfalo y tronco encefálico. Los pacientes con este síndrome típicamente tienen mutaciones que afectan el complejo I o el complejo IV (citocromo *c* oxidasa). Los pacientes con una deficiencia específica de CcO con mayor frecuencia tienen mutaciones en el gen SURF1 que codifica un factor de ensamblaje de CcO y que en la levadura tiene una proteína homóloga Shy1. (Bestwick *et al.*, 2010). Además Se ha encontrado una mutación

heteroplasmática en el gen que codifica la subunidad I (CO1) de COX en un paciente que padece anemia, convirtiendo el triptófano en un codón de parada prematuro, se reportó que el extremo c-terminal es importante para la estabilidad de la proteína (Hornig-Do *et al.*, 2012). Por tal motivo es necesario seguir investigando cómo se regula el ensamblaje de la CcO y las regiones de la enzima que en ello intervienen.

Hipótesis

Dado que las mutantes Cox1 Δ C15 y Cox1-P521A7P522A no regulan la síntesis de Cox1, se espera que las cepas con dichas mutantes mostrarán un fenotipo de crecimiento diferente a la cepa silvestre cuando se vean sometidas a diferentes fuentes de carbono y diferentes tipos de estrés.

Objetivo

Evaluar el crecimiento de las mutantes Cox1 Δ C15 y Cox1-P521A/P522A en diferentes medios fermentativos o respiratorios a 30° y 37°. Evaluar la capacidad de las mutantes de adaptarse al cambio de fuente de carbono de glucosa a uno respiratorio.

Objetivos particulares

- Realizar curvas de crecimiento a 30° y 37° en medios fermentativos de glucosa y galactosa.
- Realizar curvas de crecimiento a 30° y 37° en medios respiratorios con lactato y glicerol.
- Evaluar las primeras horas de adaptación de las cepas cuando pasan de un medio con glucosa a un medio respiratorio a 30°.
- Evaluar la capacidad de crecimiento de las cepas en un medio sólido que contiene lactato y antimicina A

Materiales y Métodos

Lista de cepas utilizadas en este estudio

Todas estas cepas son congénitas para D273-10B (ATCC 24657). Los genotipos mitocondriales se muestran entre paréntesis. $\Delta\Sigma ai$ se refiere a un gen COX1 sin intrones.

Nombre	Genotipo nuclear (mitocondrial)	Referencia
XPM201	<i>Matα, lys, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112 (ρ^+, $\Delta\Sigma ai^a$)</i>	(Shingú-Vázquez, 2010)
XPM209	<i>Matα, lys, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112 (ρ^+, $\Delta\Sigma ai$, <i>Cox1</i>ΔC15)</i>	(Shingú-Vázquez, 2010)
MS62a	<i>Matα, lys, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112 (ρ^+, $\Delta\Sigma ai$, <i>Cox1-P521A/P522A</i>)</i>	(García-Villegas,2017)

Medios

Las cantidades son para un litro de medio de cultivo, los medios líquidos llevan las mismas cantidades, pero no se les agrega agar. Los medios se esterilizan en la autoclave durante 20 minutos a 120° C.

Medio YPD: 10 g de extracto de levadura, 20 g de BactoTM peptona (BD, USA), 20 g de glucosa, 20 g de Bacto agar (BD, USA), y agua destilada hasta alcanzar 1000 mL

Medio YPGal: 10 g de extracto de levadura, 20 g de BactoTM peptona (BD, USA) 20 g de galactosa, 20 g de BactoTM agar (BD, USA), y agua destilada hasta alcanzar 1000 mL

Medio YPEG: 10 g de extracto de levadura, 20 g de BactoTM peptona, 20 g de glucosa, 20 g de Bacto agar, 30 mL de glicerol, 30 mL de etanol, y agua destilada hasta alcanzar 1000 mL

Medio Lactato: 10 g de extracto de levadura, 10 g de BactoTM peptona, 1.2 g de $(NH_4)_2SO_4$, 1 g de KH_2PO_4 , 23.5 mL de ácido láctico y agua destilada hasta alcanzar 1000 mL. Ajustar a un pH de 5.5 con NaOH.

Para los medios sólidos con antimicina A se agregaron 10 ng/mL de antimicina A, después de esterilizar, cuando los medios se encontraban a una temperatura de menos de 50 °C en constante agitación, Una vez se solidificaron las cajas se almacenaron a 4° C

*Para todos los experimentos se toman colonias aisladas y se comprueba que tengan DNA mitocondrial a través de réplicas en medios respiratorios. Cada experimento es por triplicado

Curva de crecimiento

Por cada cepa se toman de 5-8 colonias aisladas para inocular 2 mL de medio para un precultivo. Crecer durante una noche (dos noches si el medio es respiratorio) a 30°C con agitación constante. Una vez que el precultivo esté saturado se vacía a 15 mL de medio fresco y se deja crecer durante una noche a 30°C a 250 RPM. A este medio de 15mL se le llama stock. Para ajustar la curva primero se debe medir la densidad óptica a 600 nm de cada stock, y utilizar la siguiente formula; $V_1C_1 = V_2C_2$ para saber qué cantidad de stock se necesita para llevar 50mL de medio fresco a una densidad óptica de 0.1. Es importante ser lo más preciso posible. Una vez ajustados los medios se llevan a la incubadora de 30°C o 37°C según sea el caso y se agitan a 250 RPM. Medir la densidad óptica a 600 nm cada hora si es en un medio respiratorio, y cada 30 min si es un medio fermentativo.

La densidad óptica se midió con un espectrofotómetro de Thermo ScientificTM GENESYSTM 20 modelo 4001/4

Adaptación de glucosa a un medio respiratorio Modificado de (Roloff & Henry, 2015).

Se prepara un precultivo de 2mL por cada cepa tomando 5-8 colonias aisladas y se crecen una noche en un medio con glucosa (YPD) a 30°C. Una vez que el precultivo esté saturado, se inoculan 50 mL de medio fresco (YPD) con 10 µL de este precultivo. Crecer alrededor de 16 horas a 30° y 250 RPM hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0.5-0.7. Después centrifugar y quitar el medio, se lava con agua estéril dos veces. Resuspender en 20 mL de medio respiratorio (glicerol o lactato), este se utilizará como stock. Ajustar 50 mL de medio respiratorio fresco a una densidad óptica de 0.3 a partir del stock. Medir la densidad óptica del cultivo a 600 nm cada hora durante 9 horas.

Diluciones seriadas 1:10 en medios sólidos con antimicina A

Se prepararon precultivos en 2 mL por cada medio que se utilizó (YP-glucosa, -glicerol y -lactato) durante una noche a cada cepa. Al día siguiente se pesaron 9 tubos eppendorf de 1.5 mL en la balanza analítica. En esos mismos tubos se centrifugó 1 mL de cada precultivo a 14000 rpm. Se quitó el sobrenadante y se lavó con agua destilada estéril. Una vez que se quitó el sobrenadante, se pesó el tubo con el pellet, posteriormente se estimó el peso del botón celular restando el peso del tubo con pellet menos el peso del tubo vacío. Se diluyeron los pellets con agua estéril para tener una concentración de 0.02g/mL.

Para la impresión de las células primero se colocó en una placa de 96 pozos (en los pozos de A2 a A7, de B2 a B7 y de C2 a C7) 135 µL de agua destilada estéril con una pipeta multicanal. En el pozo A1 se colocó 150 µL de solución celular de la cepa WT, en el pozo B1 se colocó 150 µL de solución celular de la cepa Cox1ΔC15 y finalmente se colocó en el pozo C1 la solución celular de la cepa Cox1 P521A/P522A. Con una pipeta multicanal, se tomaron 15 µL de cada primer pozo de la primera columna y se transfirieron a la siguiente columna (pozos A2, B2 y C2). Se repitió este paso hasta llegar a la columna (A7, B7 y C7). Después se

esterilizó el replicador sumergiendo en etanol que estaba contenido en una caja Petri de vidrio. Se puso a la flama y se dejó enfriar por unos segundos finalmente se imprimió en el medio a analizar. Se llevaron los medios a 30° y se fotodocumentaron al tercer día a excepción del medio de lactato con antimicina A donde se dejó alrededor de 6 días.

Análisis estadístico

Para comprobar si hay diferencias significativas entre las cepas, graficar y calcular el área bajo la curva del promedio de las tres repeticiones hechas con cada cepa. Se usa el paquete estadístico Graphpad prism 8 (GraphPad Software Inc.). Este programa no sólo determina el área bajo la curva, sino también el error estándar. Posteriormente se aplica el análisis ANOVA de una sola vía y se comparan las medias del área bajo la curva a través de la prueba de Tukey.

Resultados

Para conocer si la presencia de las mutaciones Cox1 Δ C15 y Cox1-P521A/P522A afectaban a la célula, se llevaron a cabo curvas de crecimiento en medios fermentables de glucosa o galactosa a 30 y 37°C. Para ello se iniciaron cultivos a una densidad óptica a 600 nm de alrededor de 0.1 y se monitoreó el incremento en densidad óptica. En el anexo 1, tablas 1 a6 se muestran los resultados obtenidos de las curvas de crecimiento, los datos representa la densidad óptica a través del tiempo.

Las mutantes Cox1 Δ C15 y Cox1- P521A/P522A crecen de manera similar a la cepa WT a 30° y 37° en medios fermentativos.

Una vez que se obtuvieron los datos, se trataron en el programa Graphpad 8 para obtener el gráfico del promedio de los tres tratamientos por cepa en glucosa a 30° (figura 9A). Esos mismo datos se utilizaron para obtener el área bajo la curva y el

error estándar del área bajo la curva por cepa, Para comprobar si el área bajo la curva entre las cepas es estadísticamente diferente se realizó un análisis de varianza ANOVA tomando como base los datos de la figura 9B. Para determinar si hay diferencias, se compara el valor p con el nivel de significancia a evaluar $\alpha=0.05$. La hipótesis nula indica que las medias (área bajo la curva) entre las cepas son todas iguales. Si el valor p es menor o igual al nivel de significancia, se rechaza la hipótesis nula y se concluye que no todas las medias de población son iguales. En el caso de la glucosa a 30° el valor de p es mayor al valor de alfa y por lo tanto se acepta la hipótesis nula, así que no existen diferencias significativas entre las medias.

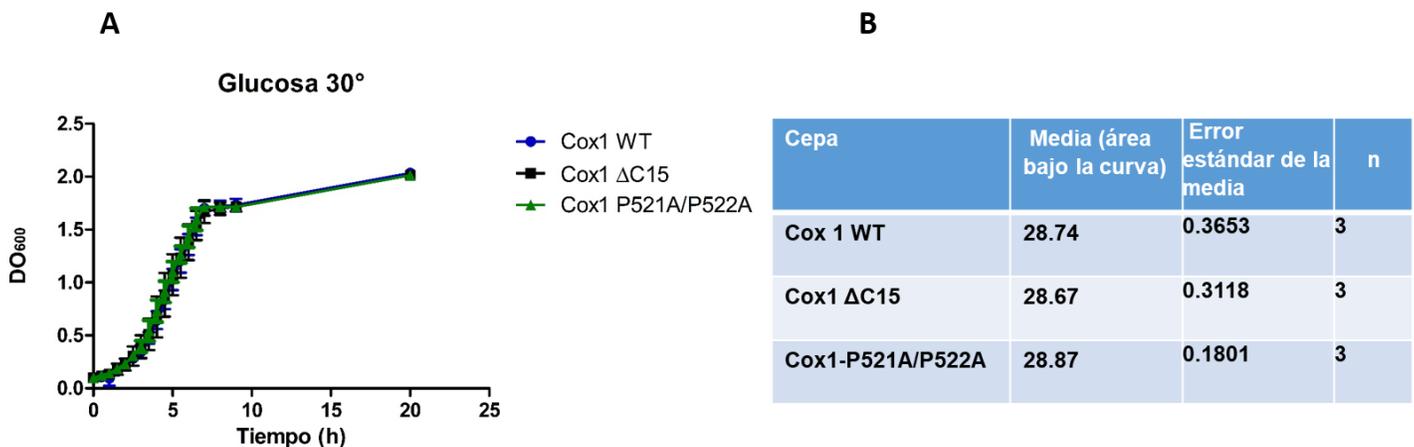


Figura 9. Curvas de crecimiento en glucosa a 30°C. **A** Curva de crecimiento a partir de los datos de la tabla 1 del anexo 1 (Glucosa 30°), los datos que se muestran son las medias (n=3). **B** Promedio del área bajo la curva y error estándar de los tres ensayos por cada cepa. Se realizó un análisis de varianza ANOVA con los datos de la tabla B y un $\alpha=0.05$, obteniendo un valor de $P=0.8912$.

El crecimiento también fue evaluado en glucosa a 37°C ya que es una condición que se considera de estrés térmico para la levadura. Esta información puede ayudar a distinguir un fenotipo cuando las proteínas que participan en el proceso de estudio son inestables y por lo tanto susceptibles a degradarse fácilmente, o a que los complejos se desensamblen. Se utilizaron los datos de la tabla 2 del anexo 1 para generar la gráfica y obtener el área bajo la curva y el error estándar de cada cepa. El análisis de varianza con un $\alpha=0.05$ indica que no hay diferencias significativas entre las cepas (figura 10).

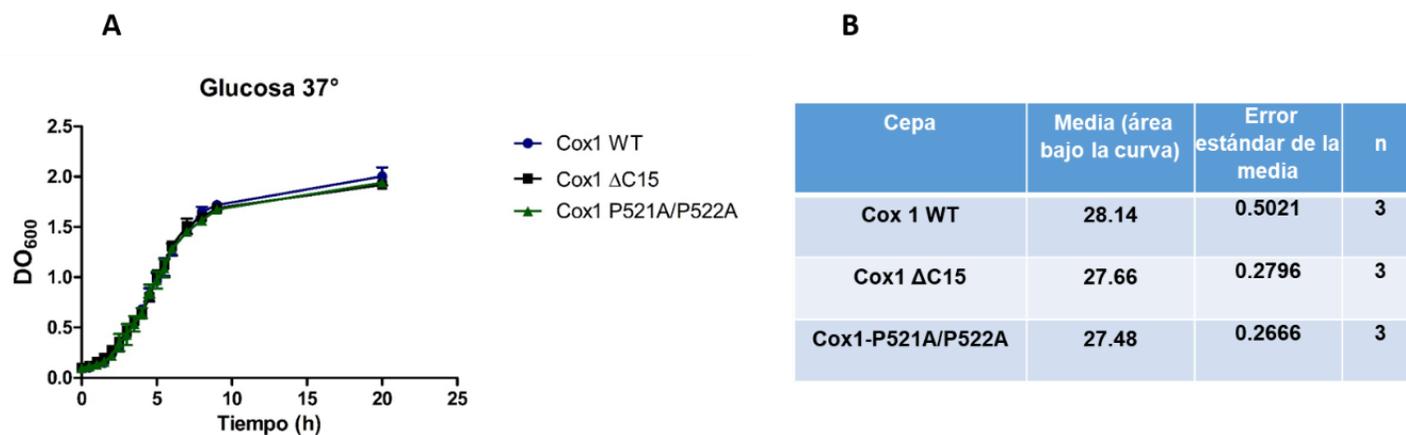


Figura 10. Curvas de crecimiento en glucosa a 37°C. **A** Curva de crecimiento a partir de los datos de la tabla 2 del anexo 1 (Glucosa 37°C), los datos que se muestran son las medias (n=3). **B** Promedio del área bajo la curva y error estándar de los tres ensayos por cada cepa. Se realizó un análisis de varianza, con los datos obtenidos con un $\alpha=0.05$. Obteniendo un valor de $P=0.4658$

Para seguir con la búsqueda de diferencias en el crecimiento que pueden existir entre las cepas mutantes y la silvestre, se analizó el crecimiento en galactosa, ya que en este medio de cultivo la expresión de los genes mitocondriales no se reprimen.

El análisis estadístico mostró que no existen diferencias significativas entre las curvas de cada cepa. Por lo que en galactosa ambas cepas Cox1 Δ C15 y Cox1-P521A/P522A crecen de manera similar a la cepa Cox1 WT tanto en 30° como 37° (Figuras 11 y 12).

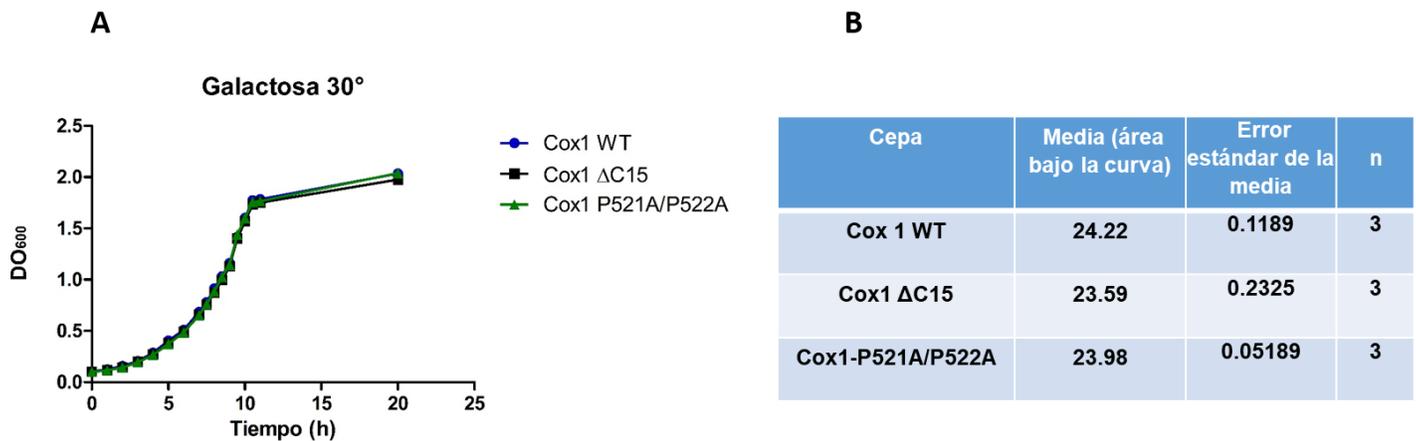


Figura 11. Curvas de crecimiento en galactosa a 30°C. **A** Curva de crecimiento a partir de los datos de la tabla 3 del anexo 1 (Galactosa 30°), los datos que se muestran son las medias (n=3). **B** Promedio del área bajo la curva y error estándar de los tres ensayos por cada cepa. Se realizó un análisis de varianza ANOVA con los datos de la tabla B de esta misma figura y un $\alpha=0.05$, obteniendo un valor de $P=0.0700$

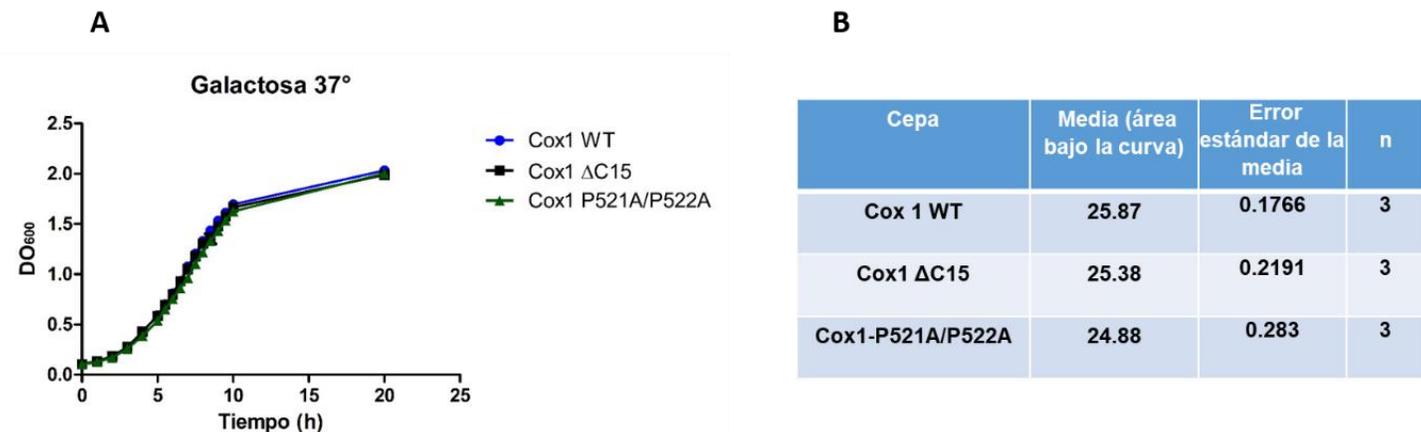
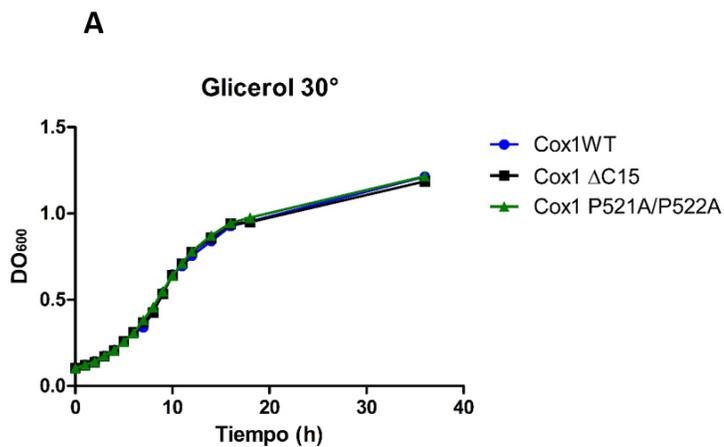


Figura 12. Curvas de crecimiento en galactosa a 37° C. **A** Curva de crecimiento a partir de los datos de la tabla 4 del anexo 1 (Galactosa 37°), los datos que se muestran son las medias (n=3). **B** Promedio del área bajo la curva y error estándar de los tres ensayos por cada cepa. Se realizó un análisis de varianza ANOVA con los datos de la tabla B de esta misma figura y un $\alpha=0.05$, obteniendo un valor de $P=0.0611$

La mutante Cox1 Δ C15 presenta un fenotipo sensible a temperatura en glicerol como fuente de carbono respiratoria.

Para comprobar que las cepas presentan diferencias en el crecimiento al emplear un metabolismo respiratorio, en donde es indispensable para la levadura el uso de nuestra proteína de interés, utilizamos glicerol. En condiciones óptimas de crecimiento a 30°C las curvas de crecimiento fueron similares entre la cepa WT, la cepa con Cox1 Δ C15 y con P521A/P522A (figura 13). En contraste, al ser sometidas a estrés térmico a 37° se encontró que había un crecimiento ligeramente retrasado durante la fase exponencial de las cepas con mutaciones en Cox1 (figura 14). La prueba de ANOVA mostró que existían diferencias entre las áreas bajo la curva de las cepas, por lo que se realizó una comparación múltiple por la prueba de Tukey. La prueba muestra una diferencia estadísticamente significativa entre las cepas Cox1 Δ C15 y Cox1 WT un dato que no podía ser cuantificable con las diluciones seriadas. Sin embargo, la cepa Cox1-P521A/P522A no presenta diferencias significativas con respecto a la cepa con Cox1 WT.



B

Cepa	Media (área bajo la curva)	Error estándar de la media	n
Cox 1 WT	29.03	0.3484	3
Cox1 Δ C15	28.86	0.3895	3
Cox1-P521A/P522A	29.51	0.1445	3

Figura 13. Curvas de crecimiento en glicerol a 30° C. **A** Curva de crecimiento a partir de los datos de la tabla 5 del anexo 1 (Glicerol 30°), los datos que se muestran son las medias (n=3). **B** Promedio del área bajo la curva y error estándar de los tres ensayos por cada cepa. Se realizó un análisis de varianza ANOVA con los datos de la tabla B de esta misma figura y un $\alpha=0.05$, obteniendo un valor de $P=0.3751$

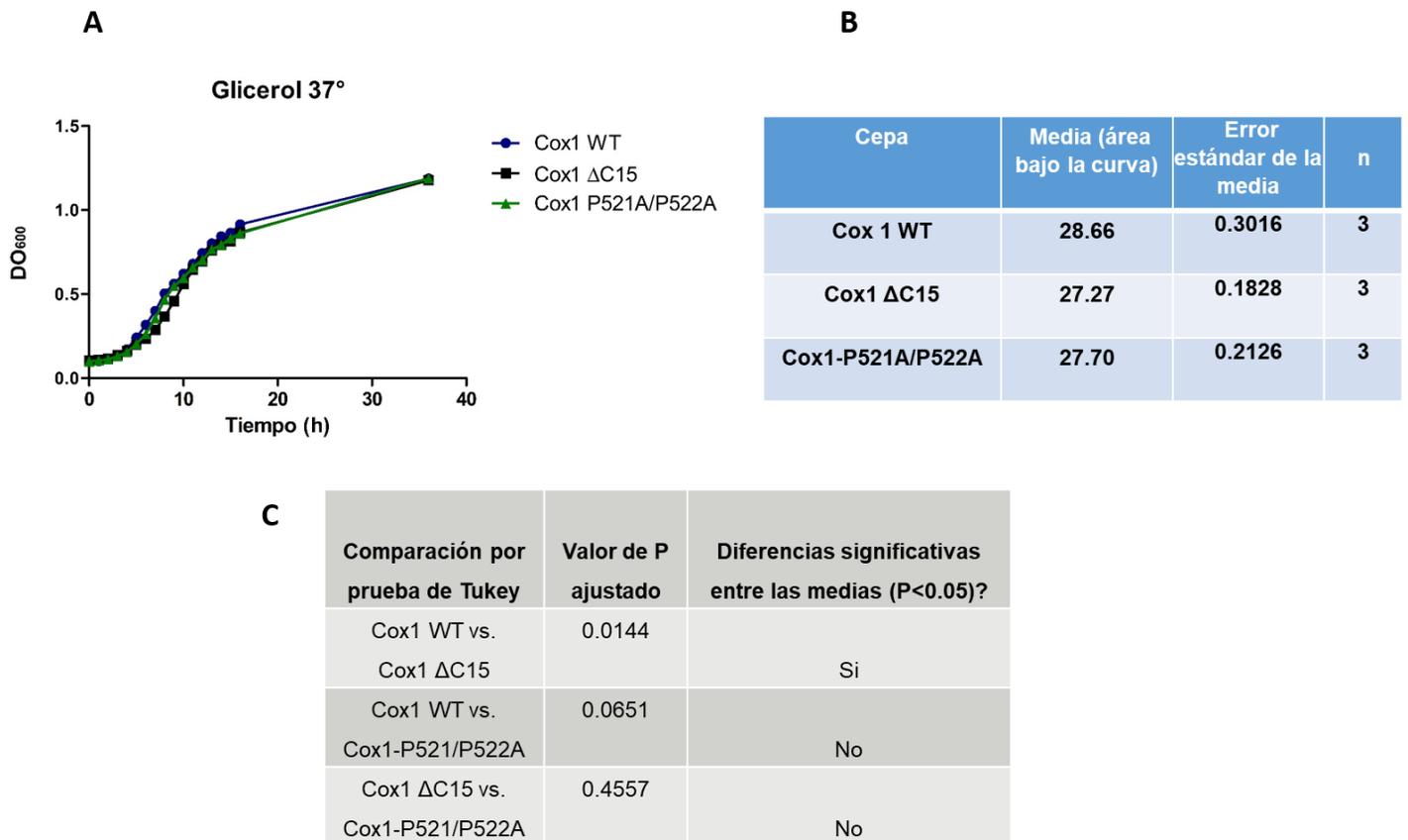


Figura 14. Curvas de crecimiento en glicerol a 37°C. **A** Curva de crecimiento a partir de los datos de la tabla 6 del anexo 1 (Glicerol 37°), los datos que se muestran son las medias (n=3). **B** Promedio del área bajo la curva y error estándar de los tres ensayos por cada cepa. Se realizó un análisis de varianza ANOVA con los datos de la tabla B de esta misma figura y un $\alpha=0.05$, obteniendo un valor de $P=0.0158$. **C** Comparación por prueba de Tukey

La mutante Cox1ΔC15 Presenta un fenotipo de crecimiento diferente con respecto a la cepa Cox1WT tanto a 30°C como a 37°C en lactato.

Para continuar en busca de diferencias en el fenotipo de las mutantes. Se evaluó el crecimiento en otro medio respiratorio, esta vez con lactato a 30° y 37° C. Al probar con este medio se esperaba encontrar alguna diferencia ya que el glicerol y el lactato proveen de electrones a diferentes alturas en la cadena de transporte de electrones. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 7 y 8 del anexo 1. Nuestros datos indicaron que la cepa con Cox1ΔC15 tiene un crecimiento retardado en lactato como fuente de carbono a ambas temperaturas, mientras que la mutante con

P521A/P522A no mostró diferencias respecto a la cepa silvestre. La estadística indica que a 30° la mutante Cox1ΔC15 tiene un área bajo la curva menor que Cox1WT (figura 15), este hecho ocurre de manera más marcada a 37°C. En la cepa Cox1 P521A/P522A se comporta de manera similar a la cepa silvestre en ambas condiciones de temperatura (figuras 15 y 16). Las diferencias en crecimiento de la cepa con Cox1ΔC15 son más marcadas a 37°C que a 30°C. Esto indica que la cepa presenta una sensibilidad a alta temperatura.

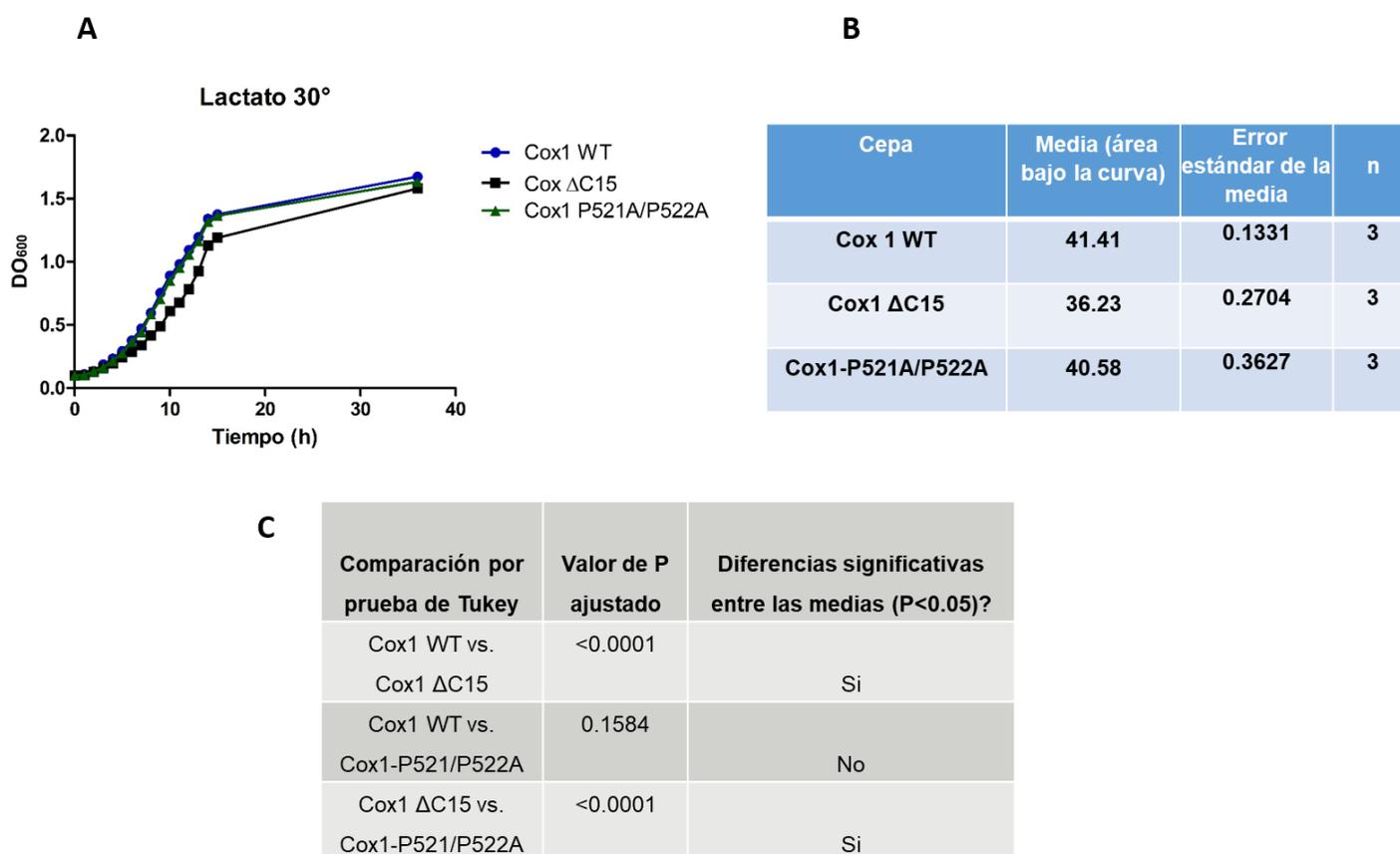


Figura 15. Curvas de crecimiento en lactato a 30° C. **A** Curva de crecimiento a partir de los datos de la tabla 7 del anexo 1 (lactato 30°), los datos que se muestran son las medias (n=3). **B** Promedio del área bajo la curva y error estándar de los tres ensayos por cada cepa. Se realizó un análisis de varianza ANOVA con los datos de la tabla B de esta misma figura y un $\alpha=0.05$, obteniendo un valor de $P<0.0001$ **C** Comparación por prueba de Tukey.

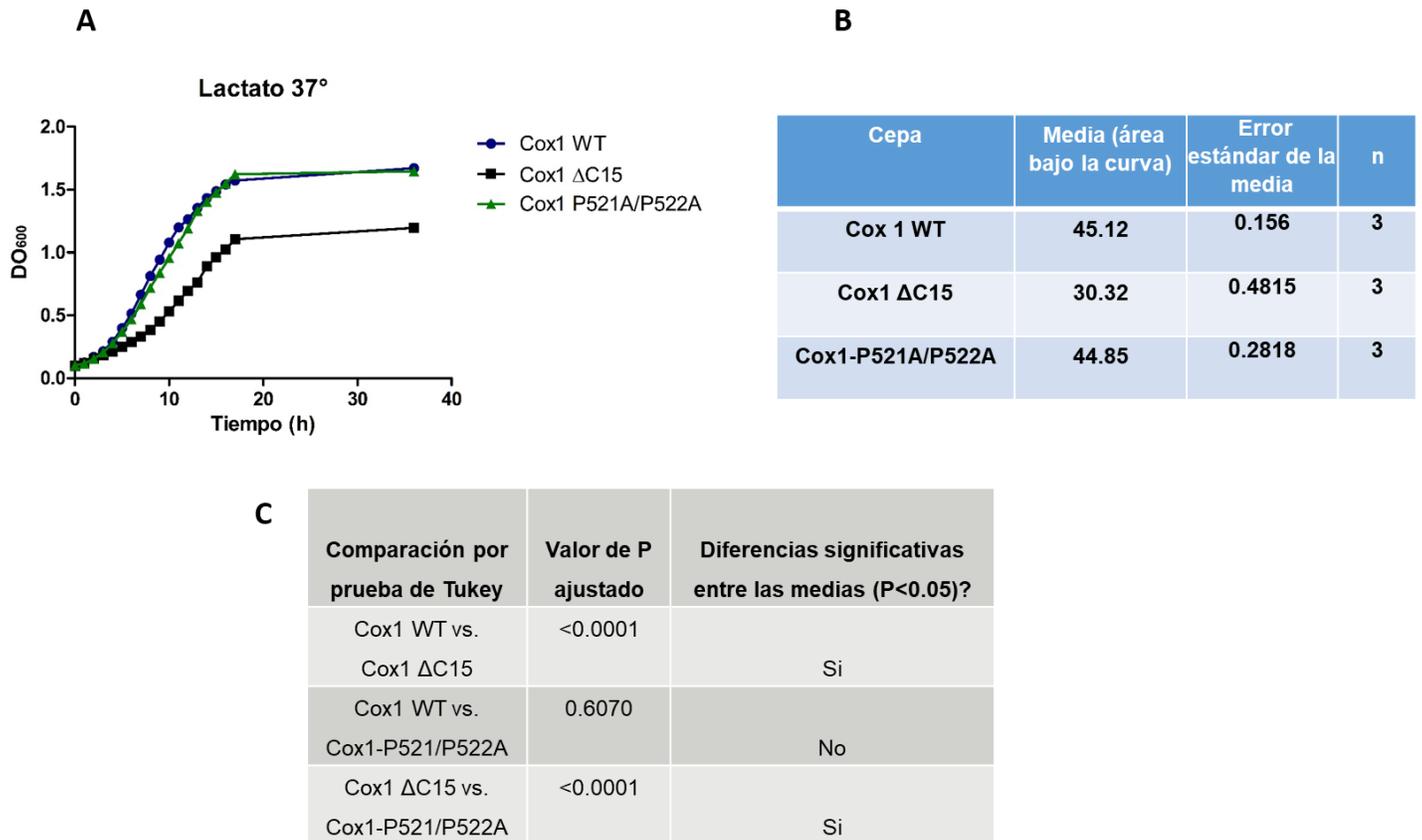


Figura 16. Curvas de crecimiento en lactato a 37°C **A** Curva de crecimiento a partir de los datos de la tabla 8 del anexo 1 (lactato 37°), los datos que se muestran son las medias (n=3). **B** Promedio del área bajo la curva y error estándar de los tres ensayos por cada cepa. Se realizó un análisis de varianza ANOVA con los datos de la tabla B de esta misma figura y un $\alpha=0.05$, obteniendo un valor de $P<0.0001$ **C** Comparación por prueba de Tukey.

La mutante con Cox1 Δ C15 presenta un crecimiento retardado durante el cambio de glucosa a un medio respiratorio.

Dado que la expresión de genes involucrados en la respiración están reprimidos en presencia de glucosa, se decidió utilizar este hecho como estrategia para tratar de encontrar algún fenotipo en el crecimiento de las mutantes. Nos preguntamos si la adaptación al cambio de un medio fermentativo con glucosa como fuente de carbono a un medio respiratorio con glicerol sería diferente en las mutantes. El diseño experimental consiste en crecer las cepas en glucosa durante las primeras horas de la fase exponencial hasta llegar a una densidad óptica de entre 0.5 y 0.7 a 600nm para ser cambiadas a un medio respiratorio. Se inició la curva en el medio respiratorio a 0.3 de densidad óptica, ya que el crecimiento se ve agilizado cuando los cultivos han entrado a la fase exponencial. Todos los experimentos se hicieron a 30°C para evitar condiciones de estrés adicionales. Los datos obtenidos se muestran en el anexo 2.

En el cambio de glucosa a glicerol el análisis de varianza prueba que no hay diferencias significativas entre el tamaño del área bajo la curva entre las mutantes y la cepa WT (figura 17).

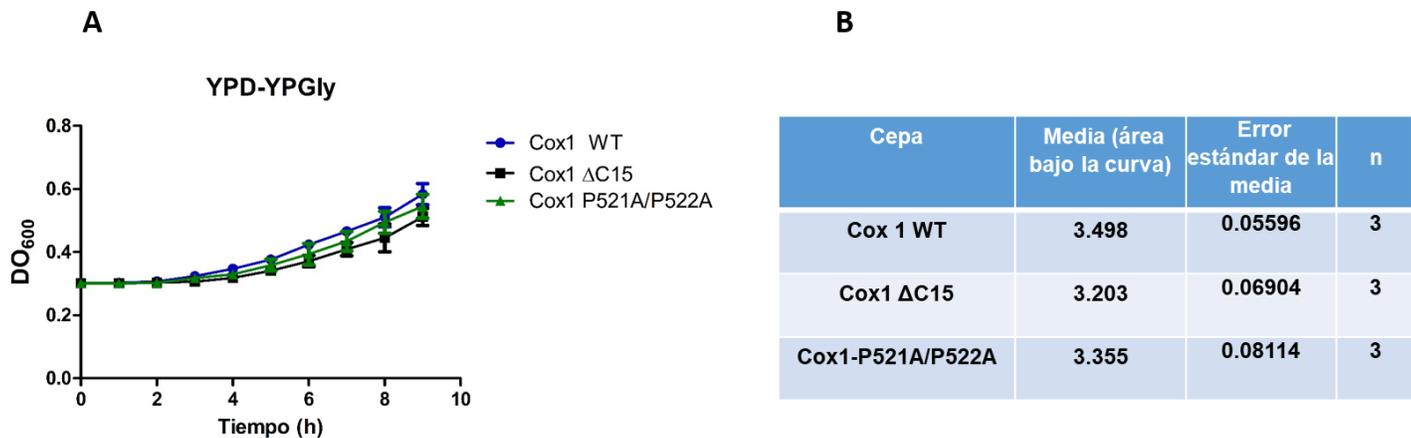


Figura 17. **A** Curva de crecimiento a partir de los datos de la tabla 1 del anexo 2 (Glucosa-glicerol, 30°), los datos que se muestran son las medias (n=3). **B** Promedio del área bajo la curva y error estándar de los tres ensayos por cada cepa. Se realizó un análisis de varianza ANOVA con los datos de la tabla B de esta misma figura y un $\alpha=0.05$, obteniendo un valor de $P=0.0638$.

Las mutantes Cox1 Δ C15 y Cox1-P521A/P522A presentan dificultad para adaptarse a un medio respiratorio con lactato

No se han observado diferencias en el crecimiento de las mutantes cuando se crecen en medios fermentables. En la fuente de carbono respiratoria glicerol las diferencias son muy sutiles, estadísticamente indistintas, mientras que en lactato sólo la mutante con Cox1 Δ C15 muestra un menor crecimiento. Sin embargo, cuando se cambiaron células crecidas en glucosa en fase exponencial a un medio respiratorio de lactato, pudimos observar que incluso la mutante Cox1-P521A/P522A tuvo dificultades para adaptarse al medio respiratorio. En la condición de cambio de glucosa a lactato el análisis estadístico sugiere que hay diferencias significativas entre las tres cepas, por lo que se realizó una prueba de Tukey para observar entre qué cepas existen esas diferencias. Se encontró que Cox1 Δ C15 y Cox1-P521A/P522A son estadísticamente diferentes entre sí y ambas son diferentes a Cox1 WT. Es la única condición en la que se encontró un fenotipo en la mutante Cox1-P521A/P522A (figura 18). Este resultado nos indica que ambas mutantes en el extremo C-terminal de Cox1, Cox1 Δ C15 y Cox1-P521A/P522A

presentan dificultades para adaptarse al cambio de un medio fermentativo a uno respiratorio

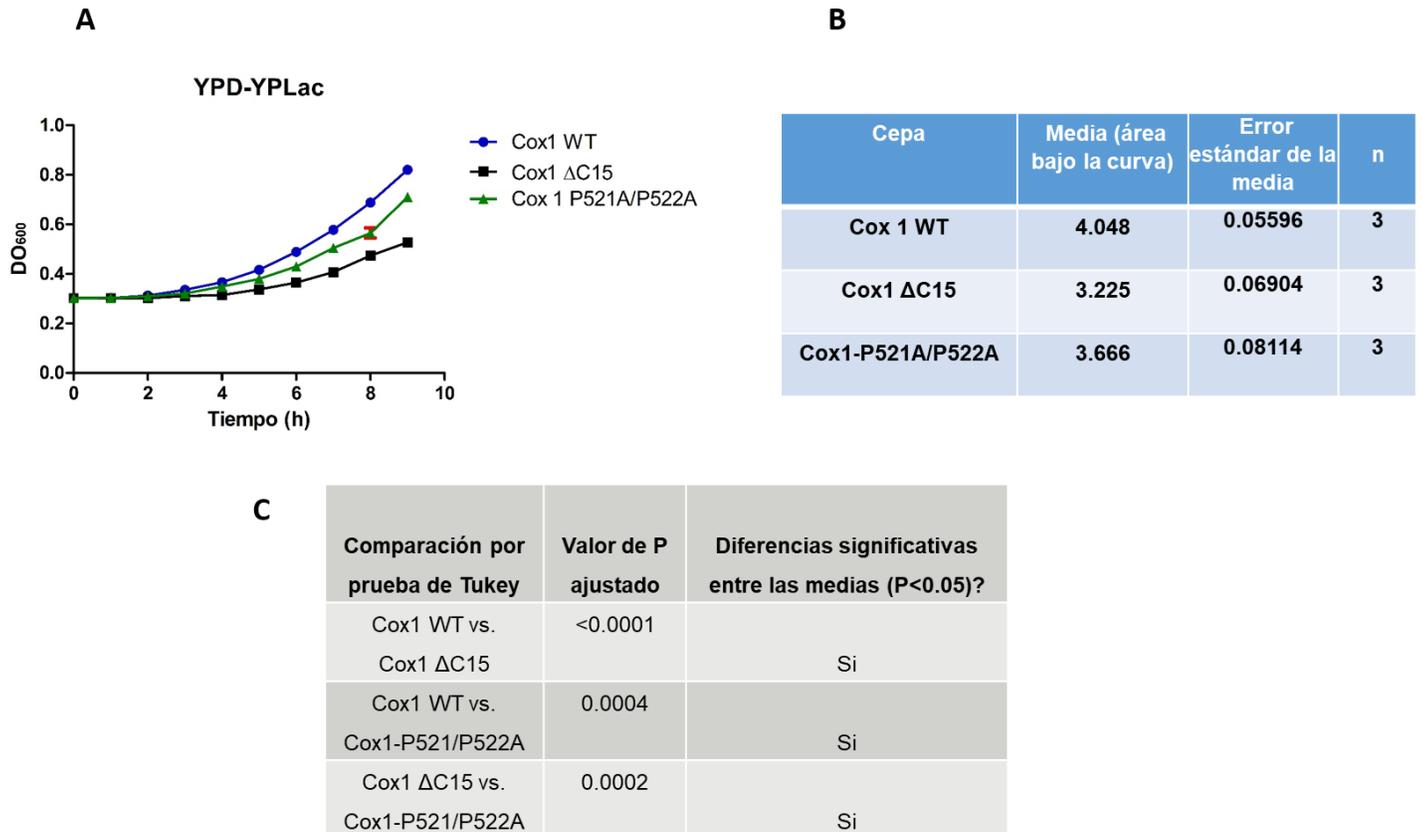


Figura 18. **A** Curva de crecimiento a partir de los datos de la tabla 2 del anexo 2 (Glucosa-lactato 30°), los datos que se muestran son las medias (n=3). **B** Promedio del área bajo la curva y error estándar de los tres ensayos por cada cepa. Se realizó un análisis de varianza ANOVA con los datos de la tabla B de esta misma figura y un $\alpha=0.05$, obteniendo un valor de $P<0.0001$. **C** Comparación por prueba de Tukey.

La cepa Cox1 Δ C15 no puede crecer en un medio con antimicina A y lactato

La antimicina A es conocida por bloquear la cadena de transporte de electrones al nivel del citocromo b, por lo tanto inhibe la oxidación de fuentes de carbono no fermentables como el glicerol o el etanol. Ya se ha demostrado que la oxidación parcial del lactato a piruvato es suficiente para proporcionar la energía necesaria para mantener la vida celular en presencia de antimicina A (Pajot y Claisse, 1974) Esto es por la transferencia directa de electrones al citocromo c pasando por alto las NADHs deshidrogenasas alternas y los complejos II y III. Es por esto que decidimos evaluar si las cepas con mutaciones en el extremo carboxilo terminal de Cox1 tienen la misma capacidad de crecimiento que la cepa Cox1WT, ya que solo dependerían de la energía proporcionada a través del complejo IV complejo al que pertenece la subunidad de nuestro interés. Las cepas silvestres, Cox1 Δ C15 y Cox1-P521A/P522A se crecieron a 30° en diferentes fuentes de carbono. Primero un medio fermentativo como la glucosa con y sin antimicina A, donde se esperaba ver un crecimiento parecido entre las cepas en todos los casos. Otro control, donde la inhibición del complejo III bloquee el crecimiento por completo, en este caso se eligió un medio con etanol y glicerol al 30% con y sin antimicina A. En este caso se esperaba que las cepas crecieran de manera similar en el medio sin antimicina A como ya se ha demostrado, mientras que en el medio con antimicina A no se vería crecimiento en ninguna de las cepas, esto demostraría que la antimicina estaba funcionando. Finalmente se utilizó lactato con y sin Antimicina A. Se esperaba que las cepas mostraran con antimicina A un menor crecimiento ya que solo se aprovecharía una parte de la energía que puede proveer el lactato, la derivada de donar electrones directamente a complejo IV. Se observó en la figura 19 que la cepa Cox1 Δ C15 fue incapaz de crecer en un medio con lactato y antimicina A. En contraste, la cepa Cox1-P521A/P522A creció muy parecido a la cepa Cox1WT.

Estos resultados demuestran que la mutante Cox1 Δ C15 presenta una gran deficiencia en la actividad del complejo IV, ya que no pudo recibir electrones directamente de lactato cuando se inhibe la parte anterior de la cadena respiratoria con antimicina A.

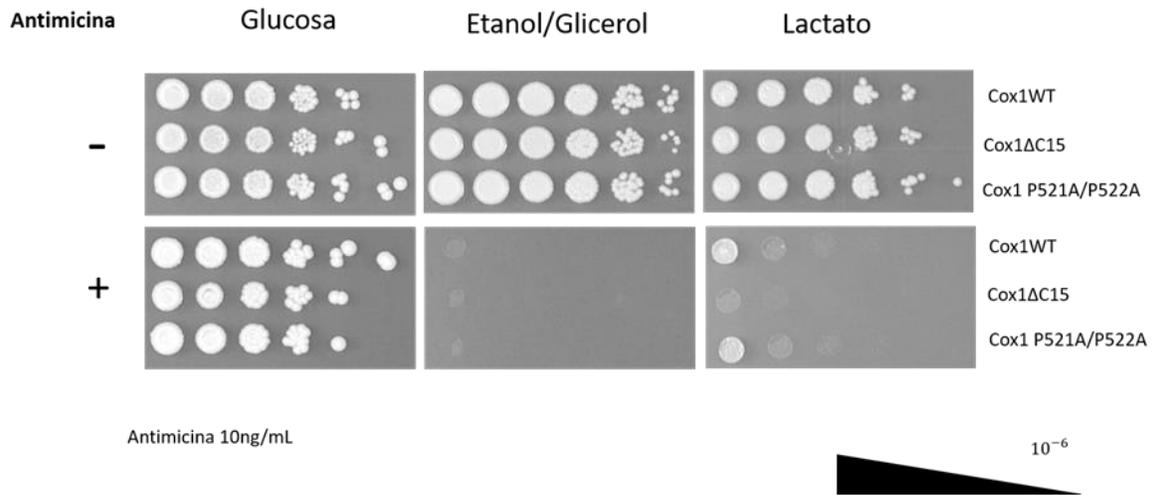


Figura 19. Diluciones seriadas 1:10 en YP con glucosa, glicerol ó lactato, con y sin antimicina A. El símbolo (-) se refiere a que los medios a la derecha de este no contienen antimicina A y el símbolo (+) se refiere a que los medios a la derecha de este contienen antimicina A. Experimento realizado una sola vez, serán necesarias dos repeticiones más para confirmar el resultado.

Discusión

En este trabajo se planteó la siguiente pregunta ¿Cómo se afecta la fisiología celular en cepas de levadura con incapacidad de regular la síntesis, estabilidad y la acumulación en supercomplejos de Cox1? Para responder esta pregunta utilizamos dos mutantes en el extremo C-terminal de Cox1. La mutante Cox1ΔC15 no regula la síntesis de Cox1, acumula Cox1 y no regula su ensamblaje en supercomplejos (García-Villegas *et al*, 2017). Por otro lado, la mutante Cox1-P521A/P522A es incapaz de regular la síntesis de Cox1, más no presenta defectos en la acumulación de Cox1 o en la formación de supercomplejos (García-Villegas *et al*, 2017).

Las cepas mutantes no mostraron ningún defecto en el crecimiento en medios fermentativos tanto a 30° como a 37°. Entre los medios fermentativos incluimos glucosa, que induce represión catabólica, y galactosa, que no induce represión

catabólica, y por lo tanto se espera que tenga una mayor expresión de genes mitocondriales. En la fuente de carbono respiratoria glicerol observamos que ninguna mutante presentó diferencias en su crecimiento a 30°C. Sin embargo, a 37°C la cepa Cox1ΔC15 crece ligeramente más lento. La mutante Cox1-P521/P522 no presentó diferencias con la silvestre. En contraste, en el medio respiratorio con lactato si fue posible observar un defecto de crecimiento de la cepa con Cox1ΔC15, tanto a 30° como a 37°C. ¿Cómo explicar este fenotipo?

Para el crecimiento fermentativo es fácil explicarlo, ya que las células en glucosa y galactosa no necesitan de la obtención de energía por medio de la cadena respiratoria, por lo tanto es claro que estas mutaciones no afectan el proceso de la fermentación (Gasmi *et al.*, 2014). Sin embargo, cuando se compara el crecimiento de las cepas mutantes en glicerol y lactato esta explicación se vuelve más compleja. Es interesante que a pesar de que en ambos medios la célula recurre al metabolismo respiratorio, las mutantes, en particular la que contiene a Cox1ΔC15 no presenta un mismo fenotipo. Consideramos que la explicación radica en el punto en el que el lactato y glicerol donan sus electrones (Grad, Sayles & Lemire, 2005).

Cuando se metaboliza el glicerol sus electrones entran a la cadena respiratoria a través de la poza de quinonas, estos electrones pasaran a través del complejo III, el citocromo *c* y finalmente por el complejo IV antes de reducir al oxígeno (Nevoigt, 1997). Por lo que la actividad del complejo III podría estar enmascarando un posible mal funcionamiento de la CcO. Esto podría derivar de que la CcO no necesariamente es la enzima limitante de la vía en las condiciones que se emplearon (Bianchi *et al.*, 2004). Por otro lado, la oxidación completa del lactato requiere de toda la cadena respiratoria, pero se ha observado que una parte de los electrones entran directamente a través del citocromo *c*, el cual recibe electrones de las enzimas Cyb2 y Dld1 (Chelstowska *et al.*, 1999). Después los electrones pasan al complejo IV, mientras el piruvato resultante de la oxidación del lactato alimentará la cadena respiratoria desde las NADHs deshidrogenasas, como podemos observar en la figura 3. Por lo que una parte de los electrones que se obtienen de la oxidación del lactato solo pasan por el citocromo *c* y el complejo IV y

otra parte atraviesan toda la cadena respiratoria. De esta forma, si el complejo IV tiene deficiencia en su actividad, la célula dependería mayoritariamente del gradiente de protones generado por el complejo III como se ha visto en la mutante Cox1 Δ C15, por lo que estas mitocondrias presentarían un potencial de membrana disminuido, y por lo tanto una menor producción de ATP. Esta condición también podría conllevar a una posible sobreexpresión de las proteínas de toda la cadena respiratoria como las NADHs deshidrogenasas o proteínas del complejo III. Todo esto podría explicar el menor crecimiento de la mutante Cox1 Δ C15 en lactato. Este fenómeno se puede ver agravado al someter a la célula a un estrés adicional como lo es el aumento de la temperatura, en donde las proteínas con defectos son más susceptibles a degradarse o a sufrir problemas de ensamblaje por la pérdida de muchas interacciones no covalentes estabilizadoras por la eliminación de algunos aminoácidos (como interacciones hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno e interacciones de van der Waals) en una enzima típica, estas fuerzas estabilizadoras están contrarrestadas por factores entrópicos, que favorecen el despliegue de las estructuras secundarias y terciarias de la enzima (Fields *et al.*, 2015). Esto explicaría el marcado defecto de células crecidas en lactato a 37°C, y también en el sutil defecto observado en la misma mutante crecida en glicerol. En este caso, durante la fase exponencial, la mutante sin los últimos 15 aminoácidos de Cox1 retrasó ligeramente su crecimiento con respecto a la cepa WT, ya que no puede compensar por completo la deficiencia de la CcO. Además con los resultados de las diluciones en lactato con antimicina A podemos ver que la actividad del complejo IV está muy comprometida en la cepa Cox1 Δ C15 ya que la energía que se aprovecha del lactato por esta vía no es suficiente para crecer bajo esta condición.

Se debe recordar que el ácido láctico utilizado es una mezcla racémica de D y L-lactato y es necesario comprobar si, las enzimas Cyb2 y Dld1 sufren algún cambio en su expresión en la mutante Cox1 Δ C15 con respecto a la WT, para descartar una posible disminución en el metabolismo de alguno de los estereoisómeros del lactato.

Todo lo anterior cobra sentido al comparar mis resultados con los obtenidos por mi compañera de Laboratorio, la licenciada Ana Paulina Gutiérrez Alejandre, que ha

comparado la actividad de la CcO entre las diferentes cepas crecidas en lactato. Ella ha visto que la CcO con la mutación Cox1 Δ C15 tiene una menor actividad comparado con las cepas Cox1WT y Cox1-P521A/P522A. Adicionalmente, comparó la actividad de las NADHs deshidrogenasas mitocondriales, y observó un incremento de la actividad de estas enzimas en la mutante Cox1 Δ C15. Esto sugiere que probablemente nuestra mutante se ve forzada a incrementar la síntesis de proteínas de la cadena de transporte de electrones en un intento de compensar la pérdida de la actividad del complejo IV.

Se ha encontrado que la resistencia a altas temperaturas en *S. cerevisiae* está relacionado con el gen COX1, aunque su crecimiento a altas temperaturas no depende únicamente de este gen mitocondrial (Li X. *et al*, 2019). Es posible que la deficiencia de los últimos 15 aminoácidos de su extremo c-terminal puede disminuir esta tolerancia a alta temperatura, explicando el marcado fenotipo de crecimiento en lactato y a 37C de la mutante con Cox1 Δ C15.

Hasta ese momento habíamos encontrado que la mutante con Cox1-P521/P522 no mostraba un claro fenotipo. Esto podría explicarse porque, mientras la mutante Cox1 Δ C15 afecta tres puntos diferentes de la biogénesis de la CcO (síntesis de Cox1, estabilidad de Cox1, incorporación en supercomplejos), la mutante Cox1-P521A/P522A sólo afecta la síntesis de Cox1 (García-Villegas *et al.*, 2017). Sin embargo, las dos mutantes, Cox1 Δ C15 y Cox1-P521A/522A tienen dificultades para adaptarse cuando se hace un cambio de glucosa a lactato como fuente de carbono. En las células Cox1 WT, los componentes de la cadena respiratoria mitocondrial se mantienen a niveles basales durante la fermentación y aumentan cuando las células cambian al metabolismo respiratorio (Ohlmeier *et al.*, 2004). Cuando las células cambian rápidamente de una fuente de carbono fermentable a una respiratoria, este nivel basal de actividad de la cadena respiratoria proporciona suficiente energía, ya que las células aumentan su capacidad respiratoria. La adaptación respiratoria es más difícil para las células Cox1 Δ C15 porque Cox1 está prácticamente ausente durante la fermentación, ya que la expresión de proteínas mitocondriales está fuertemente inhibidas por la presencia de glucosa. Entonces al momento del cambio

de fuente de carbono la actividad del complejo IV con mutaciones exhibe deficiencias más marcadas. Ya que ambas mutantes mostraron este fenotipo, puede que la mutante Cox1-P521A/P522A tenga un poco menos de actividad que la cepa WT, casi imperceptible al momento de realizar los ensayos de geles de actividad del complejo.

Para resumir, en este trabajo encontramos que mutaciones que afectan el extremo carboxilo terminal de Cox1, presentan defectos en el crecimiento de las células en diferentes condiciones. La mutante con Cox1 Δ C15 afecta el crecimiento de las células en medios respiratorios de lactato, efecto que se remarca a altas temperaturas. Esta mutante presenta también defectos en la adaptación al cambio metabólico inducido por un cambio de glucosa como fuente de carbono fermentable a lactato, como fuente de carbono respiratoria. En estas condiciones incluso la mutante con Cox1-P521/A/P522A presentó una mayor dificultad para adaptarse a dicho cambio, aunque las dos cepas no regulen la síntesis de Cox1 no se puede relacionar esto completamente con la disminución de la actividad del complejo IV ya que Cox1 Δ C15 no solo no regula su síntesis sino también se afecta su estabilidad y la incorporación en supercomplejos.

Conclusiones

En esta tesis se evaluó el crecimiento de las mutantes Cox1 Δ C15 y Cox1-P521A/P522A en diferentes medios fermentativos o respiratorios a 30° y 37° y se evaluó la capacidad de las mutantes de adaptarse al cambio de fuente de carbono de glucosa a uno respiratorio, con el fin de mostrar diferencias en el crecimiento entre las mutantes que no regulan la síntesis de Cox1 y con respecto a una cepa Cox1 silvestre cuando se someten a diferentes fuentes de carbono y diferentes tipos de estrés.

Se realizaron curvas de crecimiento a 30° y 37° en medios fermentativos de glucosa y galactosa donde no se obtuvieron diferencias significativas en el crecimiento entre las diferentes cepas utilizadas. Se realizaron curvas de crecimiento a 30° y 37° en

medios respiratorios con lactato y glicerol. En glicerol a 30° no se obtuvo diferencias significativas entre las mutantes en cambio a 37°, en ese mismo medio se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre la cepa silvestre y la mutante Cox1ΔC15. En lactato se encontraron diferencias fenotípicas, la cepa Cox1ΔC15 crece más lento en lactato en 30° y 37° con respecto a las otras cepas, además se encontró que la mutante Cox1ΔC15 presenta un fenotipo marcado a 37° en lactato. La mutante Cox1-P521A/P522A no presentó diferencias respecto a la cepa silvestre cuando se creció en medios fermentables y respiratorios, tanto a 30°C como a 37°C.

Se evaluaron las primeras horas de adaptación de las cepas de un medio con glucosa a un medio respiratorio a 30°, en glicerol las tres cepas crecieron estadísticamente igual, pero en lactato Cox1ΔC15 y Cox1 P521A/P522A crecieron más lento con respecto a Cox1WT mostrando nuevamente un cambio fenotípico

Se evaluó la capacidad de crecimiento de las cepas en un medio sólido que contiene lactato y antimicina A, la antimicina funcionó de forma correcta y se pudo observar que la mutante Cox1ΔC15 no puede crecer en un medio con lactato y antimicina A.

Se encontraron diferencias fenotípicas en la mutante Cox1ΔC15 con respecto a las otras cepas, diferencias relacionadas con el metabolismo del lactato, demostrando una deficiencia en la actividad del complejo IV cuando la subunidad Cox1 está incompleta, mientras la mutante Cox1-P521/P522A no presenta todas esas diferencias fenotípicas solo en el cambio de fuente de carbono de glucosa a lactato, por lo que la desregulación de la síntesis de Cox1 no es el único factor que provoca la disminución de la actividad del complejo IV en la mutante sin los últimos 15 aminoácidos del extremo carboxilo terminal.

Perspectivas

- Comparar el potencial de membrana generado por cada cepa, Esto nos daría información si la disminución de crecimiento está relacionado con una disminución en el bombeo de protones.
- Medir el consumo de oxígeno a las tres cepas para saber qué cantidad de oxígeno se reduce por la el complejo IV.
- Evaluar el crecimiento en L-lactato y D-lactato por separado, para comprobar si la disminución en el crecimiento también está relacionado con la disminución del metabolismo de uno de los estéreoisómeros.

Bibliografía:

1. Alcázar-Fabra, M., Navas, P., & Brea-Calvo, G. (2016). Coenzyme Q biosynthesis and its role in the respiratory chain structure. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1857(8), 1073-1078. doi: 10.1016/j.bbabi.2016.03.010
2. Altmann, K., Dürr, M., & Westermann, B. (2007). *Saccharomyces cerevisiae* as a Model Organism to Study Mitochondrial Biology. *Methods In Molecular Biology*, 81-90.
3. Barrientos, A., Zambrano, A., & Tzagoloff, A. (2004). Mss51p and Cox14p jointly regulate mitochondrial Cox1p expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 23(17), 3472-3482. doi: 10.1038/sj.emboj.7600358
4. Bestwick, M., Jeong, M., Khalimonchuk, O., Kim, H., & Winge, D. (2010) Analysis of Leigh Syndrome Mutations in the Yeast SURF1 Homolog Reveals a New Member of the Cytochrome Oxidase Assembly Factor Family. *Molecular and Cellular Biology*, 30(18), 4480-4491.
5. Bianchi, C., Genova, M., Parenti Castelli, G., & Lenaz, G. (2004). The Mitochondrial Respiratory Chain Is Partially Organized in a Supercomplex Assembly. *Journal Of Biological Chemistry*, 279(35), 36562-36569. doi: 10.1074/jbc.m405135200
6. Bricker, D., Taylor, E., Schell, J., Orsak, T., Boutron, A., & Chen, Y. et al. (2012). A Mitochondrial Pyruvate Carrier Required for Pyruvate Uptake in Yeast, *Drosophila*, and Humans. *Science*, 337(6090), 96-100. doi: 10.1126/science.1218099
7. Carlson, M. (1999). Glucose repression in yeast. *Current Opinion in Microbiology*, 2(2), pp.202-207.
8. Carr, H. and Winge, D. (2003). Assembly of CytochromecOxidase within the Mitochondrion. *Accounts of Chemical Research*, 36(5), pp.309-316
9. Chelstowska, A., Liu, Z., Jia, Y., Amberg, D., & Butow, R. (1999). Signalling between mitochondria and the nucleus regulates the expression of a newd-

- lactate dehydrogenase activity in yeast. *Yeast*, 15(13), 1377-1391. doi: 10.1002/(sici)1097-0061(19990930)15:13<1377::aid-yea473>3.0.co;2-0
10. Contanzo, M., & Fox, T. (1990). Control of Mitochondrial Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review of Genetics*, 24(1), 91-108.
 11. Dennerlein, S., Wang, C., & Rehling, P. (2017). Plasticity of Mitochondrial Translation. *Trends In Cell Biology*, 27(10), 712-721.
 12. DiMauro, S., Tanji, K., & Schon, E. (2012). The Many Clinical Faces of Cytochrome c Oxidase Deficiency. *Advances In Experimental Medicine And Biology*, 341-357. doi: 10.1007/978-1-4614-3573-0_14
 13. Fabrizio, P., & Longo, V. (2003). The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell*, 2(2), 73-81. doi: 10.1046/j.1474-9728.2003.00033.x
 14. Fields, P., Dong, Y., Meng, X., & Somero, G. (2015). Adaptations of protein structure and function to temperature: there is more than one way to 'skin a cat'. *Journal of Experimental Biology*, 218(12), 1801-1811. doi: 10.1242/jeb.114298
 15. Fontanesi, F., Soto, I., Horn, D., & Barrientos, A. (2006). Assembly of mitochondrial cytochromec-oxidase, a complicated and highly regulated cellular process. *American Journal Of Physiology-Cell Physiology*, 291(6), C1129-C1147.
 16. Friedman, J., & Nunnari, J. (2014). Mitochondrial form and function. *Nature*, 505(7483), 335-343.
 17. Gancedo, J. (1992). Carbon catabolite repression in yeast. *European Journal of Biochemistry*, 206(2), pp.297-313.
 18. Gancedo, J. (1998). Yeast Carbon Catabolite Repression†. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 62(2), 334-361. doi: 10.1128/mnbr.62.2.334-361.1998
 19. García-Guerrero, A., Zamudio-Ochoa, A., Camacho-Villasana, Y., García-Villegas, R., Reyes-Prieto, A., & Pérez-Martínez, X. (2018). Evolution of the protein synthesis machinery and its regulation (pp. 109-142). SPRINGER.

20. García-Villegas, R., Camacho-Villasana, Y., Shingú-Vázquez, M., Cabrera-Orefice, A., Uribe-Carvajal, S., Fox, T., Pérez-Martínez, X. The Cox1 C-terminal domain is a central regulator of cytochrome c oxidase biogenesis in yeast mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 292(26), 10912-10925.
21. Gasmi, N., Jacques, P., Klimova, N., Guo, X., Ricciardi, A., Robert, F. and Turcotte, B., 2014. The Switch from Fermentation to Respiration in *Saccharomyces cerevisiae* Is Regulated by the Ert1 Transcriptional Activator/Repressor. *Genetics*, 198(2), pp.547-560.
22. Genova, M. and Lenaz, G. (2014). Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1837(4), pp.427-443.
23. Genova, M., Baracca, A., Biondi, A., Casalena, G., Faccioli, M., Falasca, A., Formiggini, G., Sgarbi, G., Solaini, G. and Lenaz, G. (2008). Is supercomplex organization of the respiratory chain required for optimal electron transfer activity?. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1777(7-8), pp.740-746.
24. Görts, C. (1967). Effect of different carbon sources on the regulation of carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 33(1), 451-463. doi: 10.1007/bf02045597
25. Grad, L., Sayles, L., & Lemire, B. (2005). Introduction of an additional pathway for lactate oxidation in the treatment of lactic acidosis and mitochondrial dysfunction in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 102(51), 18367-18372. doi: 10.1073/pnas.0506939102
26. Gray, M. (2012). Mitochondrial Evolution. *Cold Spring Harbor Perspectives In Biology*, 4(9), a011403-a011403.
27. Hartley, A., Lukoyanova, N., Zhang, Y., Cabrera-Orefice, A., Arnold, S., & Meunier, B. et al. (2018). Structure of yeast cytochrome c oxidase in a supercomplex with cytochrome bc1. *Nature Structural & Molecular Biology*, 26(1), 78-83.

28. Hornig-Do, H., Tatsuta, T., Buckermann, A., Bust, M., Kollberg, G., & Rötig, A. et al. (2012). Nonsense mutations in the COX1 subunit impair the stability of respiratory chain complexes rather than their assembly. *The EMBO Journal*, 31(5), 1293-1307. doi: 10.1038/emboj.2011.477
29. Iwata, M., Lee, Y., Yamashita, T., Yagi, T., Iwata, S., Cameron, A. and Maher, M. (2012). The structure of the yeast NADH dehydrogenase (Ndi1) reveals overlapping binding sites for water- and lipid-soluble substrates, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109 (38) 15247-15252
30. Kayikci, Ö., & Nielsen, J. (2015). Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 15(6), fov068. doi: 10.1093/femsyr/fov068
31. Khalimonchuk, O., Bird, A., & Winge, D. (2007). Evidence for a Pro-oxidant Intermediate in the Assembly of Cytochrome Oxidase. *Journal Of Biological Chemistry*, 282(24), 17442-17449.
32. Khalimonchuk, O., Jeong, M., Watts, T., Ferri, E., Winge, R., (2012). Selective Oma1 Protease-mediated Proteolysis of Cox1 Subunit of Cytochrome Oxidase in Assembly Mutants. *Journal of Biological Chemistry*. 287(10): 7289–7300.
33. Klein, C., Olsson, L., & Nielsen, J. (1998). Glucose control in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of MIG1 in metabolic functions. *Microbiology*, 144(1), 13-24. doi: 10.1099/00221287-144-1-13
34. Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. (2009) Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine* Volume 47, Issue 4, 15 August 2009, pp. 333-343.
35. Lasserre, J., Dautant, A., Aiyar, R., Kucharczyk, R., Glatigny, A., Tribouillard-Tanvier, D. et al. (2015). Yeast as a system for modeling mitochondrial disease mechanisms and discovering therapies. *Disease Models & Mechanisms*, 8(6), pp. 509–526.
36. Letts, J., & Sazanov, L. (2017). Clarifying the supercomplex: the higher-order organization of the mitochondrial electron transport chain. *Nature Structural & Molecular Biology*, 24(10), pp. 800-808.

37. Li, X., Peris, D., Hittinger, C., Sia, E., and Fay, J. (2019). Mitochondria encoded genes contribute to evolution of heat and cold tolerance in yeast. *Science Advances*, 5(1), eaav1848.
38. Mick, U., Fox, T., & Rehling, P. (2010). Inventory control: cytochrome c oxidase assembly regulates mitochondrial translation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(1) . 14–20.
39. Mayorga, J., Camacho-Villasana, Y., Shingú-Vázquez, M., García-Villegas, R., Zamudio-Ochoa, A., García-Guerrero, A., Hernández, G., PérezMartínez, X., (2016). A Novel Function of pet 54 in Regulation of Cox1 Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 291(17), 9343-55.
40. Malina, C., Larsson, C., Nielsen, J., (2018). Yeast mitochondria: an overview of mitochondrial biology and the potential of mitochondrial systems biology, *FEMS Yeast Research*. 18(5).
41. Nelson, D., & Cox, M. (2009). Lehninger Principios de bioquímica, quinta edición. Barcelona: Omega
42. Nevoigt, E. (1997). Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 21(3), pp. 231-241. doi: 10.1016/s0168-6445(97)00058-2
43. Ohlmeier, S., Kastaniotis, A., Hiltunen, J. and Bergmann, U. (2003). The Yeast Mitochondrial Proteome, a Study of Fermentative and Respiratory Growth. *Journal of Biological Chemistry*, 279(6), pp.3956-3979.
44. Ott, M., Amunts, A., Brown, A., (2016). Organization and Regulation of Mitochondrial Protein Synthesis. *Annual Review of Biochemistry* 85(1) 77-101 doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014334
45. Pajot, P., & Claisse, M. (1974). Utilization by Yeast of d-Lactate and l-Lactate as Sources of Energy in the Presence of Antimycin A. *European Journal Of Biochemistry*, 49(1), pp. 275-285. doi: 10.1111/j.1432-1033.1974.tb03832.x
46. Perez-Martinez, X. (2003). Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. *The EMBO Journal*, 22(21), 5951-5961. doi: 10.1093/emboj/cdg566

47. Pfanner, N., & Meijer, M. (1997). Mitochondrial biogenesis: The Tom and Tim machine. *Current Biology*, 7(2), R100-R103.
48. Roger, A., Muñoz-Gómez, S., & Kamikawa, R. (2017). The Origin and Diversification of Mitochondria. *Current Biology*, 27(21), R1177-R1192
49. Rolland, F., Winderickx, J., & Thevelein, J. M. (n.d.). *Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast*. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2002.tb00084.x>
50. Roloff, G., & Henry, M. (2015). Mam33 promotes cytochrome c oxidase subunit I translation in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Molecular Biology Of The Cell*, 26(16), pp. 2885-2894. doi: 10.1091/mbc.e15-04-0222
51. Sanchez, S., & Demain, A. (2002). Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzyme And Microbial Technology*, 31(7), pp. 895-906. doi: 10.1016/s0141-0229(02)00172-2
52. Schägger, H. and Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *The EMBO Journal*, 19(8), pp.1777-1783.
53. Sellick, C. A., Campbell, R. N., & Reece, R. J. (2008). Chapter 3 Galactose Metabolism in Yeast—Structure and Regulation of the Leloir Pathway Enzymes and the Genes Encoding Them. *International Review of Cell and Molecular Biology*, pp. 111–150
54. Shingú-Vázquez M, Camacho-Villasana Y, Sandoval-Romero L, Butler CA, Fox TD, Pérez-Martínez X. (2010). The carboxyl-terminal end of Cox1 is required for feedback assembly regulation of Cox1 synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *J Biol Chem* 285(45):34382-9
55. Soto, I., Fontanesi, F., Liu, J., & Barrientos, A. (2012). Biogenesis and assembly of eukaryotic cytochrome c oxidase catalytic core. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1817(6), pp.883-897.
56. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. and Yoshikawa, S. (1996). The

Whole Structure of the 13-Subunit Oxidized Cytochrome c Oxidase at 2.8 Å.
Science, 272(5265), pp.1136-1144.

57. Trumbly, R. (1992). Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular Microbiology, 6(1), pp.15-21.

Anexo 1

Glucosa 30°									
Tiempo (h)	Cox1WT			Cox1ΔC15			Cox1 P521A/P522A		
0	0.095	0.102	0.1	0.104	0.108	0.09	0.098	0.098	0.1
0.5	0.104	0.112	0.109	0.126	0.118	0.1	0.112	0.11	0.148
1	0.135	0.137	0.0121	0.15	0.15	0.107	0.12	0.145	0.165
1.5	0.161	0.175	0.145	0.216	0.206	0.121	0.179	0.16	0.215
2	0.217	0.239	0.18	0.26	0.254	0.16	0.22	0.218	0.26
2.5	0.291	0.313	0.24	0.357	0.355	0.2	0.29	0.275	0.355
3	0.362	0.396	0.278	0.46	0.45	0.27	0.367	0.36	0.46
3.5	0.498	0.517	0.415	0.602	0.59	0.339	0.506	0.47	0.655
4	0.671	0.71	0.55	0.8	0.77	0.45	0.68	0.66	0.85
4.5	0.861	0.908	0.74	1.037	0.965	0.65	0.86	0.85	1.03
5	1.07	1.1	0.913	1.195	1.175	0.85	1.065	1.025	1.21
5.5	1.238	1.295	1.08	1.355	1.332	1.015	1.22	1.215	1.355
6	1.42	1.41	1.244	1.48	1.48	1.185	1.392	1.36	1.55
6.5	1.58	1.575	1.435	1.62	1.615	1.38	1.535	1.54	1.72
7	1.752	1.73	1.623	1.73	1.73	1.544	1.713	1.695	1.73
8	1.752	1.75	1.66	1.73	1.73	1.63	1.713	1.7	1.73
9	1.78	1.75	1.665	1.75	1.73	1.67	1.713	1.7	1.73
20	2.01	2.042	2.05	1.998	2.03	2.011	1.988	2.025	2.03

Tabla 1. Curva en glucosa a 30°. Datos sin procesar de las tres diferentes cepas, cada cepa se midió por triplicado. Los datos muestran la densidad óptica de los cultivos a 600 nm.

Glucosa 37°									
Tiempo (h)	Cox1WT			Cox1ΔC15			Cox1 P521/P522A		
0	0.098	0.098	0.098	0.107	0.104	0.095	0.096	0.099	0.103
0.5	0.105	0.1	0.103	0.12	0.12	0.118	0.11	0.113	0.125
1	0.14	0.109	0.14	0.15	0.16	0.16	0.125	0.135	0.14
1.5	0.12	0.15	0.18	0.2	0.21	0.195	0.14	0.155	0.197
2	0.24	0.208	0.266	0.26	0.3	0.275	0.2	0.195	0.26
2.5	0.3	0.27	0.36	0.36	0.365	0.35	0.296	0.308	0.45
3	0.409	0.395	0.47	0.464	0.478	0.452	0.367	0.373	0.55
3.5	0.519	0.52	0.58	0.574	0.585	0.549	0.52	0.468	0.62
4	0.686	0.635	0.72	0.616	0.654	0.64	0.658	0.587	0.685
4.5	0.853	0.75	0.873	0.8	0.815	0.795	0.93	0.801	0.855
5	1.016	0.875	0.998	0.979	1.05	1.06	1.062	0.893	0.964
5.5	1.179	1.005	1.12	1.132	1.119	1.124	1.186	1.008	1.073
6	1.325	1.21	1.297	1.34	1.26	1.343	1.321	1.23	1.293
7	1.48	1.4	1.475	1.54	1.42	1.562	1.45	1.43	1.48
8	1.603	1.65	1.703	1.62	1.542	1.628	1.589	1.54	1.571
9	1.727	1.71	1.715	1.715	1.64	1.705	1.7	1.65	1.67
20	2.05	1.9	2.06	1.898	1.91	1.95	1.923	1.915	1.985

Tabla 2. Curva en glucosa a 37°. Datos sin procesar de las tres diferentes cepas, cada cepa se midió por triplicado. Los datos muestran la densidad óptica de los cultivos a 600 nm.

Galactosa 30°									
Tiempo (h)	Cox1 WT			Cox1 ΔC15			Cox1 P521A/P522A		
0	0.101	0.1056	0.106	0.098	0.104	0.103	0.098	0.105	0.099
1	0.133	0.115	0.121	0.128	0.116	0.112	0.11	0.121	0.117
2	0.15	0.18	0.143	0.142	0.143	0.142	0.146	0.14	0.14
3	0.221	0.201	0.196	0.198	0.202	0.202	0.195	0.197	0.19
4	0.299	0.283	0.275	0.265	0.275	0.276	0.265	0.277	0.255
5	0.42	0.399	0.399	0.389	0.376	0.384	0.393	0.386	0.342
6	0.541	0.492	0.495	0.492	0.494	0.485	0.492	0.505	0.455
7	0.68	0.67	0.7	0.656	0.66	0.653	0.667	0.665	0.63
7.5	0.78	0.775	0.786	0.76	0.745	0.758	0.787	0.76	0.74
8	0.915	0.909	0.918	0.875	0.86	0.88	0.9	0.88	0.875
8.5	1.03	1.028	1.04	0.995	0.99	0.998	1.046	1.015	1.02
9	1.172	1.15	1.16	1.115	1.135	1.14	1.157	1.15	1.13
9.5	1.42	1.4	1.425	1.4	1.41	1.396	1.415	1.41	1.489
10	1.615	1.6	1.589	1.588	1.595	1.52	1.58	1.588	1.63
10.5	1.785	1.786	1.754	1.76	1.773	1.664	1.75	1.755	1.768
11	1.788	1.79	1.775	1.775	1.78	1.7	1.761	1.766	1.77
20	2.046	2.006	2.05	1.95	1.999	1.981	2.033	2.035	2.045

Tabla 3. Curva en galactosa a 30°. Datos sin procesar de las tres diferentes cepas, cada cepa se midió por triplicado. Los datos muestran la densidad óptica de los cultivos a 600 nm.

Galactosa 37°									
Tiempo (h)	Cox1 WT			Cox1 ΔC15			Cox1 P521A/P522A		
0	0.104	0.099	0.106	0.103	0.108	0.105	0.106	0.103	0.098
1	0.135	0.13	0.14	0.13	0.135	0.136	0.135	0.13	0.115
2	0.175	0.181	0.18	0.185	0.185	0.182	0.165	0.175	0.17
3	0.258	0.27	0.27	0.28	0.28	0.265	0.25	0.28	0.25
4	0.438	0.42	0.418	0.44	0.43	0.413	0.38	0.4	0.38
5	0.572	0.615	0.582	0.61	0.553	0.593	0.49	0.594	0.53
5.5	0.684	0.72	0.691	0.718	0.67	0.697	0.63	0.661	0.661
6	0.8	0.83	0.8	0.82	0.78	0.8	0.76	0.72	0.78
6.5	0.922	0.925	0.947	0.954	0.902	0.935	0.877	0.821	0.882
7	1.045	1.095	1.094	1.08	1.01	1.06	0.99	0.92	0.98
7.5	1.173	1.226	1.212	1.197	1.155	1.18	1.118	1.08	1.111
8	1.3	1.358	1.33	1.315	1.3	1.3	1.24	1.19	1.225
8.5	1.41	1.454	1.437	1.399	1.25	1.404	1.352	1.32	1.325
9	1.501	1.55	1.545	1.48	1.45	1.5	1.45	1.43	1.41
9.5	1.605	1.609	1.622	1.596	1.56	1.568	1.576	1.523	1.505
10	1.713	1.67	1.7	1.707	1.66	1.63	1.69	1.59	1.6
20	2.045	2.001	2.05	2.001	1.968	1.998	2.013	1.995	2.003

Tabla 4. Curva en galactosa a 37°. Datos sin procesar de las tres diferentes cepas, cada cepa se midió por triplicado. Los datos muestran la densidad óptica de los cultivos a 600 nm.

Glicerol 30°									
Tiempo (h)	Cox1WT			Cox1 ΔC15			Cox1 P521A/P522A		
0	0.105	0.107	0.102	0.103	0.1	0.105	0.098	0.101	0.105
1	0.121	0.126	0.124	0.117	0.12	0.121	0.117	0.122	0.126
2	0.137	0.145	0.146	0.135	0.139	0.135	0.135	0.144	0.148
3	0.17	0.173	0.18	0.165	0.18	0.168	0.168	0.176	0.18
4	0.203	0.202	0.218	0.195	0.222	0.201	0.202	0.209	0.211
5	0.26	0.248	0.265	0.251	0.268	0.258	0.255	0.258	0.257
6	0.317	0.295	0.311	0.307	0.315	0.314	0.309	0.306	0.305
7	0.289	0.362	0.366	0.363	0.378	0.363	0.383	0.393	0.37
8	0.42	0.43	0.442	0.42	0.445	0.413	0.46	0.48	0.435
9	0.527	0.533	0.555	0.524	0.556	0.521	0.552	0.564	0.533
10	0.634	0.635	0.668	0.628	0.667	0.629	0.644	0.648	0.63
11	0.694	0.69	0.7	0.688	0.735	0.705	0.705	0.721	0.705
12	0.755	0.746	0.764	0.75	0.798	0.781	0.766	0.794	0.78
14	0.83	0.825	0.865	0.824	0.881	0.87	0.87	0.878	0.867
16	0.925	0.91	0.946	0.908	0.96	0.95	0.942	0.95	0.942
18	0.953	0.918	0.99	0.914	0.975	0.96	0.986	0.97	0.972
36	1.215	1.2	1.224	1.153	1.2	1.203	1.229	1.216	1.203

Tabla 5. Curva en glicerol a 30°. Datos sin procesar de las tres diferentes cepas, cada cepa se midió por triplicado. Los datos muestran la densidad óptica de los cultivos a 600 nm.

Glicerol 37°									
Tiempo (h)	Cox1 WT			Cox1 ΔC15			Cox1 P521A/P522A		
0	0.108	0.1	0.106	0.105	0.107	0.102	0.1	0.101	0.102
1	0.1	0.1	0.106	0.105	0.107	0.113	0.1	0.104	0.113
2	0.118	0.11	0.128	0.12	0.112	0.115	0.115	0.108	0.115
3	0.14	0.135	0.135	0.141	0.135	0.135	0.13	0.13	0.135
4	0.178	0.16	0.176	0.16	0.169	0.16	0.15	0.15	0.165
5	0.25	0.238	0.237	0.196	0.202	0.197	0.212	0.2	0.203
6	0.329	0.3	0.327	0.233	0.241	0.232	0.276	0.272	0.24
7	0.406	0.387	0.41	0.289	0.292	0.281	0.352	0.351	0.366
8	0.525	0.485	0.504	0.3698	0.379	0.355	0.455	0.46	0.49
9	0.561	0.551	0.573	0.445	0.469	0.46	0.549	0.54	0.554
10	0.616	0.61	0.64	0.567	0.58	0.53	0.59	0.6	0.6
11	0.674	0.705	0.663	0.635	0.66	0.637	0.67	0.645	0.666
12	0.74	0.744	0.75	0.695	0.688	0.7	0.7	0.696	0.716
13	0.81	0.795	0.8	0.757	0.755	0.766	0.765	0.764	0.77
14	0.84	0.835	0.86	0.78	0.799	0.796	0.788	0.8	0.795
15	0.85	0.87	0.875	0.82	0.81	0.815	0.817	0.84	0.842
16	0.93	0.901	0.916	0.86	0.867	0.873	0.842	0.874	0.87
36	1.21	1.195	1.159	1.19	1.186	1.15	1.177	1.193	1.2

Tabla 6. Curva en glicerol a 37°. Datos sin procesar de las tres diferentes cepas, cada cepa se midió por triplicado. Los datos muestran la densidad óptica de los cultivos a 600 nm.

Lactato 30°									
Tiempo (h)	Cox1 WT			Cox1ΔC15			Cox1 P521A/P522A		
0	0.1	0.102	0.097	0.102	0.102	0.101	0.1	0.1	0.102
1	0.114	0.11	0.106	0.105	0.1	0.105	0.1	0.1	0.108
2	0.143	0.13	0.133	0.149	0.1124	0.13	0.13	0.135	0.132
3	0.193	0.188	0.18	0.165	0.162	0.15	0.152	0.17	0.17
4	0.246	0.234	0.223	0.206	0.19	0.198	0.201	0.23	0.222
5	0.301	0.29	0.291	0.246	0.25	0.235	0.26	0.29	0.285
6	0.382	0.378	0.373	0.29	0.286	0.281	0.331	0.396	0.376
7	0.495	0.474	0.45	0.359	0.332	0.327	0.422	0.476	0.436
8	0.61	0.59	0.59	0.431	0.42	0.4	0.57	0.59	0.6
9	0.78	0.74	0.742	0.51	0.46	0.495	0.68	0.72	0.711
10	0.9	0.88	0.89	0.62	0.605	0.6	0.82	0.895	0.845
11	1.023	0.97	0.95	0.681	0.68	0.665	0.92	0.99	0.95
12	1.131	1.081	1.07	0.796	0.79	0.765	1.02	1.098	1.06
13	1.215	1.194	1.181	0.94	0.92	0.915	1.13	1.201	1.16
14	1.35	1.33	1.34	1.148	1.131	1.11	1.31	1.35	1.3
15	1.385	1.375	1.365	1.205	1.189	1.177	1.35	1.38	1.365
36	1.67	1.67	1.681	1.6	1.558	1.585	1.67	1.62	1.615

Tabla 7. Curva en lactato a 30°. Datos sin procesar de las tres diferentes cepas, cada cepa se midió por triplicado. Los datos muestran la densidad óptica de los cultivos a 600 nm.

Lactato 37°									
Tiempo (h)	Cox1 WT			Cox1 ΔC15			Cox1 P521A/P522A		
0	0.09	0.09	0.1	0.098	0.1	0.1	0.1	0.102	0.106
1	0.129	0.121	0.12	0.118	0.13	0.117	0.115	0.122	0.112
2	0.185	0.165	0.159	0.155	0.15	0.156	0.157	0.159	0.149
3	0.213	0.214	0.215	0.187	0.192	0.175	0.212	0.208	0.197
4	0.292	0.29	0.285	0.22	0.206	0.205	0.289	0.285	0.26
5	0.403	0.406	0.385	0.275	0.234	0.24	0.382	0.365	0.36
6	0.517	0.525	0.5	0.304	0.287	0.279	0.46	0.475	0.468
7	0.67	0.682	0.64	0.35	0.325	0.318	0.605	0.588	0.575
8	0.818	0.825	0.795	0.396	0.375	0.38	0.735	0.73	0.7
9	0.941	0.95	0.935	0.482	0.447	0.416	0.848	0.842	0.83
10	1.08	1.08	1.078	0.564	0.514	0.518	0.96	0.967	0.94
11	1.21	1.207	1.18	0.633	0.605	0.607	1.073	1.101	1.051
12	1.25	1.291	1.25	0.687	0.693	0.704	1.199	1.213	1.16
13	1.332	1.368	1.36	0.784	0.745	0.756	1.388	1.309	1.298
14	1.4	1.45	1.445	0.905	0.899	0.865	1.404	1.413	1.397
15	1.465	1.499	1.5	0.983	0.935	0.964	1.489	1.496	1.44
16	1.55	1.522	1.55	1.032	1	1.04	1.56	1.565	1.52
17	1.586	1.569	1.56	1.127	1.09	1.1	1.649	1.62	1.6
36	1.68	1.67	1.663	1.2	1.148	1.241	1.66	1.65	1.63

Tabla 8. Curva en lactato a 37°. Datos sin procesar de las tres diferentes cepas, cada cepa se midió por triplicado. Los datos muestran la densidad óptica de los cultivos a 600 nm.

Anexo 2

Glucosa-Glicerol									
Tiempo (h)	Cox1 WT			Cox1ΔC15			Cox1 P521A/P522A		
0	0.304	0.299	0.303	0.305	0.299	0.3	0.304	0.3	0.299
1	0.304	0.299	0.303	0.305	0.299	0.3	0.304	0.3	0.299
2	0.308	0.299	0.314	0.305	0.299	0.307	0.304	0.3	0.303
3	0.318	0.326	0.326	0.305	0.306	0.309	0.31	0.316	0.326
4	0.342	0.344	0.355	0.316	0.315	0.324	0.317	0.322	0.35
5	0.383	0.355	0.39	0.33	0.332	0.36	0.338	0.343	0.395
6	0.421	0.399	0.451	0.345	0.364	0.405	0.358	0.363	0.46
7	0.451	0.45	0.496	0.38	0.398	0.45	0.4	0.408	0.495
8	0.451	0.53	0.55	0.36	0.468	0.507	0.443	0.48	0.56
9	0.517	0.61	0.623	0.465	0.51	0.56	0.501	0.515	0.62

Tabla 1. Primeras nueve horas después del cambio de fuente de carbono de glucosa a glicerol. Se hizo el experimento en tres experimentos independientes por cepa. Los datos muestran la densidad óptica de los cultivos a 600 nm.

Glucosa-Lactato									
Tiempo (h)	Cox1 WT			Cox1ΔC15			Cox 1 P521A/P522A		
0	0.302	0.303	0.301	0.302	0.303	0.299	0.306	0.3	0.3
1	0.302	0.303	0.301	0.302	0.303	0.299	0.308	0.3	0.3
2	0.314	0.313	0.31	0.302	0.306	0.299	0.32	0.306	0.3
3	0.335	0.331	0.339	0.307	0.314	0.309	0.327	0.32	0.315
4	0.376	0.36	0.362	0.32	0.314	0.311	0.355	0.348	0.343
5	0.435	0.408	0.406	0.341	0.34	0.33	0.388	0.4	0.35
6	0.504	0.483	0.48	0.373	0.364	0.357	0.444	0.451	0.395
7	0.594	0.56	0.58	0.424	0.397	0.4	0.49	0.525	0.5
8	0.704	0.659	0.701	0.49	0.46	0.47	0.59	0.525	0.58
9	0.841	0.791	0.83	0.545	0.51	0.526	0.71	0.732	0.69

Tabla 2. Primeras nueve horas después del cambio de fuente de carbono de glucosa a lactato. Se hizo el experimento en tres experimentos independientes por cepa. Los datos muestran la densidad óptica de los cultivos a 600 nm.