



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Expresión alotópica del gen mitocondrial *cox2* en *Saccharomyces cerevisiae*:
caracterización de la citocromo c oxidasa resultante.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. Valentín De La Cruz Torres

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Diego González Halphen,
Instituto de Fisiología Celular, UNAM.**

**COMITÉ TUTOR: Dr. Salvador Uribe Carvajal,
Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
Dr. Horacio Reyes Vivas,
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

MÉXICO, D.F. ENERO, 2014.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Expresión alotópica del gen mitocondrial *cox2* en *Saccharomyces cerevisiae*:
caracterización de la citocromo c oxidasa resultante.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. Valentín De La Cruz Torres

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Diego González Halphen,
Instituto de Fisiología Celular, UNAM.**

**COMITÉ TUTOR: Dr. Salvador Uribe Carvajal,
Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
Dr. Horacio Reyes Vivas,
Instituto Nacional de Pediatría.**

MÉXICO, D.F. ENERO, 2014.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, celebrada el día 9 de septiembre de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno, **DE LA CRUZ TORRES VALENTIN** con número de cuenta **094630910** con la tesis titulada **"EXPRESIÓN ALOTÓPICA DEL GEN MITOCONDRIAL COX2 EN SACCHAROMYCES CEREVISIAE: CARACTERIZACIÓN DE LA CITOCROMO C OXIDASA RESULTANTE"**, realizada bajo la dirección del **DR. DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN**.

Presidente:	DRA. BERENICE GARCÍA PONCE DE LEÓN
Vocal:	DRA. ERIKA PATRICIA RENDÓN HUERTA
Secretario:	DR. HORACIO REYES VIVAS
Suplente:	DR. OSCAR FLORES HERRERA
Suplente:	DR. J. ELEAZAR MARTÍNEZ BARAJAS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 8 de octubre de 2013.



M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

Agradecimientos

Gracias al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Este proyecto fue financiado por el CONACyT (128110) y por la DGAPA, UNAM (IN203311).

Gracias al CONACyT por el apoyo con la beca de Doctorado con número de registro de becario 169058.

Esta tesis se realizó bajo la asesoría del Dr. Diego González Halphen en el laboratorio 324-Norte en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de este trabajo estuvo formado por:

Dr. Salvador Uribe Carvajal, Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Dr. Horacio Reyes Vivas, Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Pediatría.

Dr. Diego González Halphen, Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Se reconoce la colaboración, asesoría y asistencia de la QBP. Miriam Vázquez Acevedo del laboratorio 324-N, Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Se reconoce la colaboración y asesoría a este trabajo de la Dra. Xochitl Pérez Martínez y al LIBB Rodolfo García Villegas, del laboratorio 204-O, Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Se reconoce la asesoría técnica de la Dra. Laura Ongay Larios, la Bióloga Guadalupe Códiz Huerta y la M en C. Minerva Mora Cabrera de la unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Se reconoce el apoyo del Auxiliar de laboratorio Alfredo Octaviano García del laboratorio 324-N, Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Agradecimientos Personales

A mi Familia y a la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Dr. Diego González Halphen por permitirme estar en su laboratorio. Muchas gracias por su apoyo constante e incondicional. Muchas gracias por su ejemplo como académico y como persona.

Muchas gracias a mis compañeros de laboratorio: Al señor Alfredo por su amistad y ayuda incondicional. A Miriam por su amistad, por tu apoyo en el laboratorio y con los experimentos del artículo, tu generosa ayuda fue imprescindible. A Paco (ahora el Dr. Figueroa) por su amistad y su excelsa ayuda en el laboratorio. Araceli por los buenos ratos con bebidas espirituosas. Ale por los ratos de ajedrez y pizza. A mi compañera Eli por las charlas de filosofía y recomendarme a Murakami y a Yoshimoto. A mi compañero Alain por su amistad. A mi compañera Lorena por su amistad. A mi compañero Héctor por su amistad. A mi compañero Lorenzo por su amistad. A mi compañera Lili por su apoyo y por recomendarme a Arcade Fire. A Alexa por su amistad y apoyo incondicional, gracias Puca. A mis compañeros del laboratorio vecino: Chava, Chore, Vic, Pao, Nitro, La Chispa, Dana, Nadia y Harry.

Gracias a todos los integrantes de los laboratorios que siempre me apoyaron: Al laboratorio del Dr. Salvador Uribe. Al laboratorio de la Dra. Soledad Funes. Al laboratorio de la Dra. Xochitl Pérez. Al laboratorio del Dr. Antonio Peña. Y muchas gracias a los demás laboratorios del Instituto de Fisiología Celular que siempre están dispuestos a apoyar. Al laboratorio del Dr. Roberto Ramoni, al Dr. Stefano Grolli y a Virna de la Universidad de Parma. Gracias a Chayito y a Gaby por su apoyo en las cuestiones burocráticas.

Gracias a mis maestros de toda la vida. A unos les he aprendido a través de su obra y a otros a través de su ejemplo: A mi Madre y a mi Padre. A Hirokazu Kanazawa e Hiroshi Ishikawa por enseñarme la templanza y serenidad a través del Karate Do. A Platón, Aristóteles y Séneca por mostrarme los principios éticos y morales. A Friedrich Nietzsche por mostrarme la importancia de la filosofía en la vida humana. A Haruki Murakami por la sencillez y humildad. A mi maestro Masahiko Hiyama que a partir de un pincel me muestra lo bello de la vida. A mi maestro Diego González por mostrarme con su ejemplo tan elevadas cualidades humanas. A los poetas Nezahualcoytl, Santoka Taneda y Basho. A los maestros budistas como Shunryu Suzuki. A los maestros masones de la calle de Puente de Alvarado y de la calle de Cadet en París. A los maestros que me relajaron con su obra en mi paso por el laboratorio: Verdi, Puccini, Wagner, Miyazaki, Hisaishi, Leoncavallo, Catalani, Tartini, Hokusai, Kim Ki-duk, Tan Dun y Li Xiang-Ting.

Índice

	Páginas
1-Resumen	3
2-Abstract	4
3-Introducción	5
3.1-La mitocondria	5
3.2-Fosforilación oxidativa	5
3.3-Estructura y función de la citocromo c oxidasa	8
3.4-Importación de proteínas mitocondriales	10
3.5-Biogénesis de la citocromo c oxidasa en la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
3.6-Expresión alotópica	15
3.7-Explorando la expresión alotópica de la subunidad Cox2 fragmentada	20
4-Antecedentes Directos	23
5-Hipótesis	25
6-Objetivo General	25
7-Objetivos particulares	25
8-Materiales y métodos	26
8.1-Reactivos	26
8.2-Material biológico	26
8.3-Medios de Cultivo	26
8.4-Diseño del gen	27
8.5-Transformación de levaduras	28
8.6-Determinación del consumo de oxígeno	28
8.7-Obtención de extractos totales de levadura	29
8.8-Obtención de mitocondrias	29
8.9-Purificación de la citocromo c oxidasa	30
8.10-Actividad de oxidasa en placa y gel	30
8.11-Oximetría de la citocromo c oxidasa pura	31
8.12-Espectros diferenciales de citocromos	31
8.13-Actividad de ATPasa en gel del complejo V	31
8.14-Experimentos de pulso y caza	32
8.15-Geles desnaturalizantes	33
8.16-Electroforesis en geles azules en condiciones nativas (BN-PAGE)	34
8.17-Preparación de mitocondrias para BN-PAGE	36

8.18-Electroforesis de segunda dimensión (2D-SDS-PAGE)	36
8.19-Inmunoréplicas tipo western blot	37
9-Resultados	39
9.1-Curva de crecimiento de la cepa complementada y determinación de la presencia de la subunidad Cox2 alotópica en mitocondrias aisladas.	39
9.2-Actividad de la citocromo c oxidasa ensamblada con la subunidad Cox2 ^{W56R} expresada alotópicamente.	47
9.3-Regulación de la biogénesis de la citocromo c oxidasa por la subunidad Cox1 en presencia de la subunidad Cox2 expresada alotópicamente.	53
10-Discusión	55
11-Conclusiones	62
12-Bibliografía	63
13-Apéndices	70
13.1-Expresión alotópica de los genes fragmentados COX2A y COX2B en levadura	70
13.2-Secuencias utilizadas	80
13.3-Artículo publicado	82

Resumen

La cepa mutante Δcox2 tiene una delección del gen COX2 que codifica para la subunidad 2 (Cox2) de la citocromo c oxidase (CcO), la cual no puede respirar. Supekova y colaboradores (2010) transformaron a la cepa mutante Δcox2 con un vector de expresión que contiene el gen Cox2 y una presecuencia de direccionamiento a la mitocondria (MTS) que contiene a la mutación puntual W56R (Cox2W56R), logrando recuperar la respiración. En este trabajo se caracterizó a la CcO resultante de la expresión alotópica de la subunidad Cox2W56R. Mitocondrias de la cepa silvestre (WT) y de la cepa complementada $\Delta\text{cox2}+\text{Cox2W56R}$ se analizaron por electroforesis Azul-Nativa. Por medio de ensayos de actividad en gel de la CcO y de la cuantificación de citocromos se observó que solo el 60% de la CcO está presente en la cepa complementada y, que se encuentra menos CcO asociada a supercomplejos con respecto a la cepa silvestre. La CcO de la WT y de la cepa complementada tienen cantidades similares en la composición de subunidades, aunque la actividad es menor en un 20 a 25% en la enzima que contiene a la subunidad Cox2W56R con respecto a la Cox2WT. La espectrometría de masas confirmó la sustitución del aminoácido W56 por el R56 en la Cox2W56R. Además la Cox2W56R presentó el mismo N-terminal que la Cox2WT, demostrando que la MTS de Oxa1 y la secuencia de 15 aminoácidos se procesan para la maduración de la proteína. De esta forma, la Cox2W56R es idéntica a Cox2WT excepto por la mutación puntual W56R. Además la síntesis mitocondrial de Cox1 es fuertemente reducida en la mutante Δcox2 , pero al complementar la cepa mutante con Cox2W56R permite la restauración completa de la síntesis de Cox1. Nosotros concluimos que la Cox2W56R sintetizada desde el citosol tiene un paso limitante en el proceso de importación, maduración o ensamblaje, que resulta en un bajo rendimiento en los niveles basales de CcO. Aun así, la Cox2W56R restaura la actividad de la CcO y permite la síntesis mitocondrial de Cox1 a niveles de la WT.

Abstract

Deletion of the yeast mitochondrial gene COX2 encoding subunit 2 (Cox2) of cytochrome c oxidase (CcO) results in loss of respiration (Δ cox2 strain). Supekova et al. (2010) transformed a Δ cox2 strain with a vector expressing Cox2 with a mitochondrial targeting sequence (MTS) and the point mutation W56R (Cox2W56R), restoring respiratory growth. Here, the CcO carrying the allotopically-expressed Cox2W56R was characterized. Yeast mitochondria from the wild-type (WT) and the Δ cox2+Cox2W56R strains were subjected to Blue Native electrophoresis. In-gel activity of CcO and spectroscopic quantitation of cytochromes revealed that only 60% of CcO is present in the complemented strain, and that less CcO is found associated in supercomplexes as compared to WT. CcOs from the WT and the mutant exhibited similar subunit composition, although activity was 20–25% lower in the enzyme containing Cox2W56R than in the one with Cox2WT. Tandem mass spectrometry confirmed that W56 was substituted by R56 in Cox2W56R. In addition, Cox2W56R exhibited the same N-terminus than Cox2WT, indicating that the MTS of Oxa1 and the leader sequence of 15 residues were removed from Cox2W56R during maturation. Thus, Cox2W56R is identical to Cox2WT except for the point mutation W56R. Mitochondrial Cox1 synthesis is strongly reduced in Δ cox2 mutants, but the Cox2W56R complemented strain led to full restoration of Cox1 synthesis. We conclude that the cytosol-synthesized Cox2W56R follows a rate-limiting process of import, maturation or assembly that yields lower steady-state levels of CcO. Still, the allotopically-expressed Cox2W56R restores CcO activity and allows mitochondrial Cox1 synthesis to advance at WT levels.

Introducción

3.1-La mitocondria

La mitocondria es un organelo producto de un evento endosimbiótico entre una α -proteobacteria y un hospedero, probablemente una arquea, con lo que se dio origen al eucarionte ancestral. Una evidencia que apoya esta hipótesis, es que la mitocondria tiene su propio genoma. Morfológicamente este organelo tiene dos membranas, una externa y una interna, la interna forma invaginaciones denominadas crestas, que al parecer forman pequeños compartimentos involucrados en la difusión interna de iones (Mannella y cols. 2013). Entre la membrana externa e interna se localiza el espacio intermembranal y delimitada por la membrana interna se encuentra la matriz mitocondrial (Mannella y cols. 2006). En la mitocondria se llevan a cabo varios procesos metabólicos fundamentales como el ciclo de Krebs, la β -oxidación, parte del ciclo de la urea y la fosforilación oxidativa (figura 1).

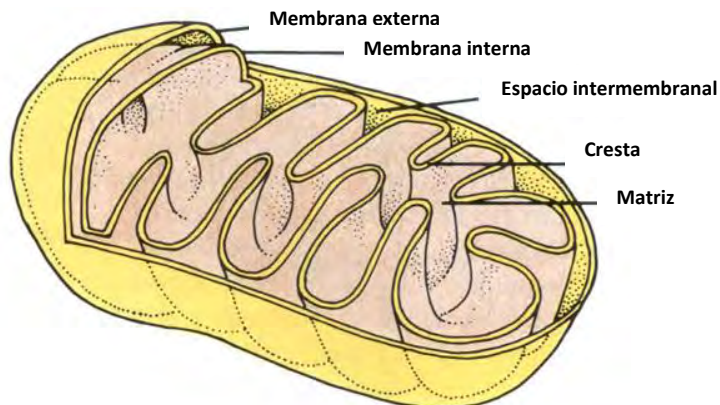


Figura 1. Estructura de la mitocondria donde se muestran las membranas y los compartimentos. Tomado de <http://animalcellbiology.wordpress.com/2011/08/17/chapter-5-the-cell-powerhouse-mitochondria-structure/>

3.2-La fosforilación oxidativa

El mecanismo por el cual las células eucariontes no fotosintéticas obtienen la mayor parte de su energía se denomina fosforilación oxidativa, es decir, la síntesis de ATP acoplada a un gradiente de protones generado por una cadena de transporte de electrones llamada cadena respiratoria. La cadena de transporte de electrones está formada por cuatro complejos embebidos en la membrana interna mitocondrial, los

complejos I, II, III y IV. Estas proteínas oligoméricas se encargan de oxidar moléculas de alto poder reductor como el NADH y el FADH₂ y de transferir los electrones desde el complejo I hasta el IV donde se forma agua a partir de electrones, protones y el oxígeno. El flujo de electrones a través de los complejos respiratorios genera la translocación de protones al espacio intermembranal de la mitocondria, resultando en un gradiente de protones, es decir, la fuerza protón motriz que utiliza el complejo V o ATP sintasa para sintetizar ATP a partir de ADP y fosfato (Nelson D.L. y col. 2005) (figura 2).

De manera general, en la mayoría de los organismos, la transferencia de electrones en la cadena de transporte se inicia en el complejo I (NADH: ubiquinona oxidoreductasa). Esta es una enzima con dos brazos en forma de "L" de 45 subunidades, con ocho a nueve grupos hierro-azufre (Fe-S) y un mononucleótido de flavina. Estos grupos prostéticos se encuentran en el brazo de la enzima que se orienta hacia la matriz mitocondrial. El brazo hidrofóbico embebido en la membrana interna es el sitio por donde se translocan los protones. Esta enzima se encarga de transferir dos electrones desde el NADH a la ubiquinona (Q) acoplada a la translocación de cuatro protones (Efremov y cols. 2011). Cabe destacar que en nuestro modelo de estudio, la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, no cuenta con el complejo I, pero tiene dos NADH deshidrogenasas alternas asociadas a la membrana interna, una viendo hacia el lado del espacio intermembranal y la otra expuesta hacia la matriz mitocondrial. Estas deshidrogenasas no translocan protones pero cumplen la función de aceptar los electrones provenientes del NADH citosólico y transferirlo a la ubiquinona (Bradshaw Y Cols. 2006). En el caso de *S. cerevisiae* cuenta con una ubiquinona tipo 6 (Q₆) (Tran U.C. y cols. 2007).

El complejo II o succinato deshidrogenasa: Es una enzima involucrada tanto en la cadena de transporte de electrones como en el ciclo de Krebs. Esta enzima contiene cinco grupos prostéticos (hemo *b*, tres centros 2Fe-2S y FAD) y cuatro subunidades, dos de ellas embebidas en la membrana. Contienen el grupo hemo *b* y un sitio de unión para ubiquinona. Las otras dos subunidades se extienden hacia la matriz mitocondrial, contienen los tres centros hierro-azufre (2Fe-2S), el FAD y un sitio de unión para el succinato. La oxidación de succinato a fumarato reduce al FAD, luego los electrones pasan a través de los centros hierro-azufre hasta reducir a la ubiquinona (Sun y cols. 2005).

El complejo III o complejo bc_1 o ubiquinol: citocromo c oxidoreductasa. Es una enzima que funciona como homodímero y cada monómero contiene tres subunidades catalíticas con grupos prostéticos como el citocromo b , el citocromo c_1 y la proteína hierro azufre de Rieske con un centro $2Fe-2S$. El complejo tiene además ocho subunidades estructurales. Esta enzima transfiere los electrones desde el ubiquinol (QH₂) hasta el citocromo c , una proteína soluble de 13 kDa localizada en el espacio intermembranal. El complejo bc_1 también bombea protones desde la matriz mitocondrial hasta el espacio intermembranal a través de un mecanismo redox bien caracterizado conocido como ciclo Q (Hunte y cols. 2003).

El complejo IV o citocromo c oxidasa consta de varias subunidades, de 11 a 13 dependiendo de la especie. La enzima tiene 4 grupos prostéticos que están localizados en las subunidades I y II. En la subunidad II (Cox2) se encuentra un centro binuclear de cobre (Cu_A) y en la subunidad I (Cox1) se encuentra el centro binuclear Fe-Cu y los grupos hemos tipo a (a y a_3). Esta enzima recibe los electrones del citocromo c , los cuales son utilizados para reducir el oxígeno molecular a agua. Al mismo tiempo, transloca protones desde la matriz mitocondrial hasta el espacio intermembranal, contribuyendo así a la formación del gradiente electroquímico de protones. El gradiente de protones es utilizado por el complejo V o ATP sintasa para formar ATP. Esta enzima consta de dos regiones, el sector Fo y el sector F1; la porción Fo se encuentra embebida en la membrana interna mitocondrial donde los protones son utilizados para darle movilidad a un anillo de subunidades c que a su vez hace girar el tallo central de la enzima (subunidad gamma). La rotación del tallo central induce cambios conformacionales en la región F1, donde se encuentran los sitios catalíticos en los cuales se forma ATP a partir de ADP y Pi (subunidades beta) (Carr y cols. 2003).

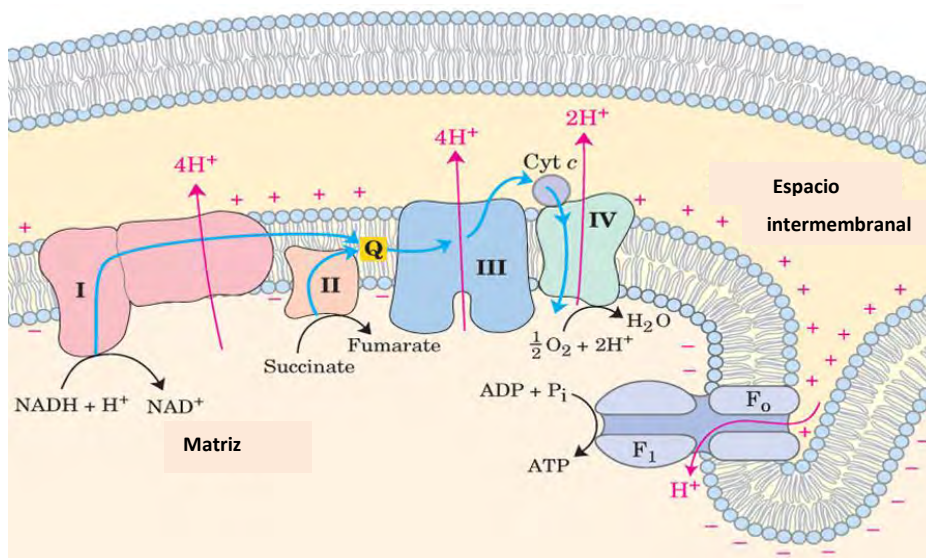


Figura 2. Complejos de la fosforilación oxidativa. Tomado y modificado de Nelson D.L. and Cox M.M. *Lehninger, Principles of Biochemistry*. Fourth edition. Freeman and company, USA. 2005.

3.3-Estructura y función de la citocromo c oxidasa

La citocromo c oxidasa o complejo IV se encuentra en la membrana de bacterias y en la membrana interna mitocondrial en organismos eucariontes. En bacterias como *Paracoccus denitrificans* está compuesta por cuatro subunidades, en mamíferos por 13 subunidades y en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* por 12 subunidades. Las subunidades I y II (Cox1, Cox2) forman el centro catalítico de la enzima y, junto con la subunidad III (Cox3), forman el núcleo estructural fundamental del complejo. Esta enzima recibe los electrones del citocromo c y reduce el oxígeno molecular en agua. También contribuye a la formación del gradiente de protones bombeando un protón por cada electrón que se transfiere al oxígeno. Las subunidades Cox1, Cox2 y Cox3 forman la unidad mínima necesaria para que la enzima sea activa. Las subunidades Cox1 y Cox2 contienen los grupos prostéticos del complejo y la subunidad Cox3 es necesaria para la estabilidad y actividad del complejo. La secuencia de aminoácidos y la estructura terciaria de estas tres subunidades se encuentra muy conservada en las distintas especies, tal como se observa en las estructuras cristalográficas de las oxidasas de *P. denitrificans*, *Rhodobacter sphaeroides* y bovino (Lucas y cols. 2011).

La subunidad Cox1 tiene 12 cruces transmembranales y contiene los grupos hemo a , hemo a_3 , y un átomo de cobre (Cu_B), estos dos últimos forman el centro binuclear Fe-Cu. La subunidad Cox2 consta de dos cruces transmembranales y una parte globular expuesta hacia el espacio intermembranal donde se encuentra el centro binuclear Cu_A . Este centro Cu_A recibe los electrones provenientes del citocromo c , que son transferidos al grupo hemo a y luego al centro Fe-Cu vecino donde el oxígeno es reducido para formar agua (figura 3). En este sitio también se unen los inhibidores clásicos de la enzima como el cianuro y el monóxido de carbono. La subunidad Cox3 de siete cruces transmembranales interacciona con la subunidad Cox1 proporcionándole estabilidad a la enzima. Se ha observado que si se elimina la subunidad Cox3 del complejo al disociarla con detergentes, disminuye de manera importante el bombeo de protones y el consumo de oxígeno de la enzima (Bratton y cols. 1999).

En la reacción global de la citocromo c oxidasa ($O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$) se necesitan cuatro electrones y cuatro protones para la formación de dos moléculas de agua. Al mismo tiempo la enzima bombea cuatro protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal. Los protones son bombeados a través de la enzima por los canales "D" y "K", nombrados así por tener residuos conservados de aspártico y lisina, respectivamente (Abramson y cols. 2001).

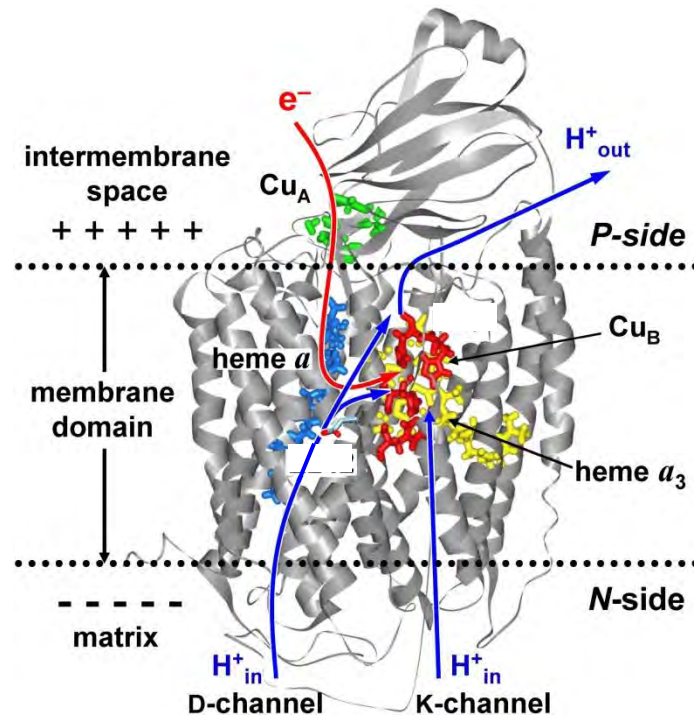


Figura 3. Estructura de las subunidades catalíticas del complejo IV de bovino. Se muestran las subunidades 1 y 2 con sus respectivos grupos prostéticos, así como los límites de la membrana interna, el lado de la matriz y el espacio intermembranal. También se indica la ruta de los electrones hasta el grupo hemo *a*₃-Cu_B y la ruta de protones por los canales D y K (D-channel y K-channel). También se indica el lado positivo (P-side) y el lado negativo (N-side) de la membrana interna mitocondrial. Figura tomada y modificada de Popović y cols. 2012.

3.4-Importación de proteínas mitocondriales

Muchas de las proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo requieren de secuencias de direccionamiento a la mitocondria (MTS, del inglés, mitochondrial targeting sequences), las cuales son eliminadas por una proteasa una vez que ingresan a la mitocondria. La presencia de una MTS no es requerimiento absoluto, ya que muchas proteínas también pueden utilizar una señal interna que las dirige a la mitocondria. En general las subunidades codificadas en el núcleo se importan al interior de la mitocondria a través de la translocasa de membrana externa TOM (del inglés, translocase of the outer membrane) y a través de la translocasa de membrana interna TIM (del inglés, translocase of the inner membrane) conocidas en su conjunto como el complejo TIM y TOM. Hay diferentes rutas de importación e integración de una proteína a la mitocondria dependiendo de su localización final en el organelo. Cualquier proteína que se dirija a la mitocondria contactará primero con el complejo

TOM en la membrana externa. Posteriormente puede ser integrada a la membrana externa por el complejo SAM (del inglés, sorting and assembly machinery). Si es una proteína de espacio intermembranal tendrá que atravesar al complejo TOM y finalizar su plegamiento por la vía MIA (del inglés, mitochondrial intermembrane space import and assembly) para residir finalmente en el espacio intermembranal. En caso de ser una proteína de membrana interna, como la familia de los transportadores de 6 cruces transmembranales, será integrada a la membrana de manera lateral por el complejo TIM22. Si la proteína reside en la matriz mitocondrial o en la membrana interna mitocondrial, deberá translocarse por el complejo TIM23 de la membrana interna con ayuda del complejo PAM que contribuye a translocar proteínas que contienen una presecuencia. Las proteínas que siguen esta última ruta tienen una MTS y requieren de la presencia de un potencial de membrana ($\Delta\psi$) a través de la membrana interna mitocondrial para ser translocaladas. En la matriz mitocondrial la MTS es procesada y eliminada de la proteína madura por una proteasa mitocondrial (MPP, del inglés mitochondrial processing peptidase) (Gabriel y cols. 2007) (figura 4).

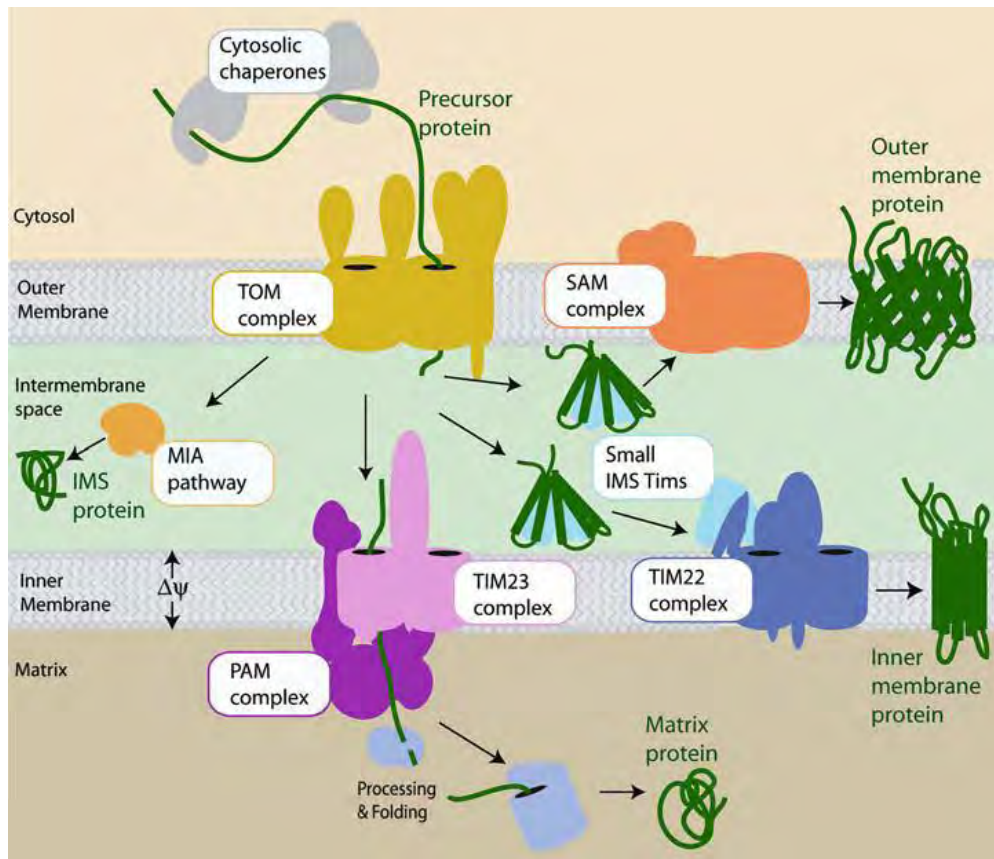


Figura 4. Maquinaria de importación mitocondrial. Se muestra los complejos translocadores residentes en las membranas mitocondriales y los distintos caminos que siguen las proteínas provenientes del citosol para integrarse a su correspondiente compartimento mitocondrial (Gabriel y cols. 2007).

3.5-Biogénesis de la citocromo c oxidasa en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

En el genoma mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae* se encuentran los genes que codifican 7 subunidades de los complejos de la fosforilación oxidativa. Del complejo III se encuentra el gen del citocromo *b* y del complejo V los genes *ATP6*, *ATP8* y *ATP9*. Los genes mitocondriales de la citocromo c oxidasa son *COX1*, *COX2* y *COX3*, mientras que los genes de las otras 8 subunidades se encuentran en el genoma nuclear (Foury y cols. 1998). Así, la biogénesis de la citocromo c oxidasa de *S. cerevisiae* se lleva a cabo a través de un proceso secuencial donde participan tanto proteínas sintetizadas en el citosol como de la propia mitocondria. Por lo tanto, las proteínas de la citocromo c oxidasa que se sintetizan en el citosol deben importarse al interior de la mitocondria, atravesar la membrana externa por el complejo TOM, seguir alguna de las rutas de importación e integrarse a la membrana interna mitocondrial

para ensamblarse al complejo enzimático junto con las subunidades mitocondriales Cox1, Cox2 y Cox3. En este complejo proceso participan factores de ensamblaje, que incluyen activadores traduccionales, translocasas, chaperonas moleculares, metalo-chaperonas de grupos cobre y enzimas biosintéticas de grupos hemo. El modelo de levadura ha sido ampliamente utilizado para el estudio de la biogénesis de la citocromo c oxidasa, donde la subunidad Cox1 desempeña un papel regulatorio central (Lucas y cols. 2011).

Las subunidades de la oxidasa codificadas en genes mitocondriales (Cox1, Cox2 y Cox3) tienen una ruta de ensamblaje diferente, ya que sus ARNs mensajeros son traducidos por ribosomas de la matriz mitocondrial e insertadas en la membrana interna por la proteína Oxa1 en un proceso cotraduccional. Oxa1 pertenece a la maquinaria de inserción de proteínas sintetizadas en la mitocondria. El extremo C-terminal de Oxa1 interactúa con los ribosomas mitocondriales para insertar cotraduccionalmente los dominios hidrofóbicos de las proteínas a la membrana interna y ayuda a translocar los dominios hidrofílicos a través de la membrana interna hasta el espacio intermembranal. Oxa1 también inserta a la membrana interna otras proteínas que son sintetizadas en el citoplasma y que se importan hasta la matriz mitocondrial (Herrmann y cols. 2005).

En *S. cerevisiae*, Cox1 actúa como el núcleo central en el ensamblaje de la enzima, su mecanismo de regulación depende de la disponibilidad de las demás subunidades. Cuando Cox1 es sintetizada, promueve la interacción con una gran variedad de proteínas como Cox14, Pet309 y Mss51, Coa1 y Coa3. Pet309 y Mss51 son activadores traduccionales que actúan sobre el extremo UTR5' (del inglés, untranslated region) del ARNm del gen COX1. Mss51 tiene una segunda función, interaccionar con el extremo C-terminal de la subunidad Cox1 después de la traducción para regular el ensamblaje. Este C-terminal también promueve la interacción y estabilización entre Mss51 y Cox14 (Shingú-Vázquez y cols. 2010). Posteriormente Coa3 promueve la interacción Cox1-Mss51-Cox14 formando un estado activo de la traducción y uno inactivo al unirse Coa1 a este complejo. A este estado inactivo se une la proteína Shy1 para promover la inserción del hemo a_3 en Cox1 previo a la unión de las otras subunidades, lo que le da estabilidad antes de que se una Cox2 (Mick y cols. 2011; Pierrel y cols. 2007). Se ha sugerido que para la inserción de los grupos prostéticos del hemo a se requiere de Cox10 y Cox15, y para la inserción del Cu_B de Cox17 y Cox11 (Herrmann y cols. 2005).

Para que la ruta de ensamblaje de las subunidades codificadas en el núcleo prosiga, Mss51 debe liberarse de su interacción con Cox1 mediante Cox6 formando el complejo Cox1-Cox14-Coa3-Coa1-Shy1 (Shingú-Vázquez y cols. 2010). Después de esto Cox1 se ensambla con las subunidades nucleares Cox6 y Cox5 (Pierrel y cols. 2007). Posteriormente Pet111 promueve la traducción del ARNm del gen COX2. La proteína Cox2 es relativamente menos hidrofóbica que Cox1 y Cox3 ya que sólo contiene dos cruces transmembranales. Una vez traducida, Cox2 es insertada a la membrana interna mitocondrial por Oxa1 donde interacciona con Cox20 para ser presentada a la proteasa Imp1 en el espacio intermembranal, la cual procesa la extensión de 15 aminoácidos del N-terminal de Cox2. Esta extensión es única de levadura. Una vez insertada Cox2, adquiere su grupo prostético Cu_A mediante la acción de Cox17 y Sco1 (Herrmann y cols. 2005).

Por su parte, la expresión del gen COX3 está regulada por los factores traduccionales Pet54, Pet122 y Pet494. El ARNm de COX3 también contiene una región UTR3' que es reconocida por las proteínas activadoras. Hay discrepancias sobre el orden en que se unen Cox2 y Cox3 a Cox1. Sin embargo, se sabe que antes de unirse Cox2 al complejo Cox1-Cox5-Cox6 necesita adquirir el grupo prostético de cobre. Otras subunidades como Cox7, Cox8 y Cox9 forman un complejo aparte antes de integrarse al resto de las proteínas de la enzima. Estas tres subunidades son activadas por la proteína Pet100. El último paso en el ensamblaje es la unión de Cox12 y Cox13 para la formación del complejo maduro (Herrmann y cols. 2005; Shingú-Vázquez y cols. 2010) (figura 5).

En general, el punto central de la biogénesis de la citocromo c oxidasa es la regulación de la síntesis de Cox1. Por ejemplo, se ha visto que su síntesis se ve disminuida cuando hay mutaciones en alguna de las otras subunidades involucradas en el ensamblaje, lo cual indica un mecanismo de retroalimentación acoplado a la traducción de Cox1. Por eso, esta subunidad funge como el centro de ensamblaje de la citocromo c oxidasa. Otros factores importantes en la biogénesis es el que desempeñan las proteasas que se encuentran ancladas a la membrana interna mitocondrial, m-AAA e i-AAA, porque están involucradas en la degradación de subunidades de la citocromo c oxidasa que no se integraron adecuadamente al complejo. Parece ser que estas enzimas proteolíticas forman complejos con propiedades parecidas a chaperonas y translocasas, porque se encargan de la degradación selectiva de proteínas dañadas y no ensambladas en el complejo, lo cual

tiene implicaciones en la regulación de la enzima (Stiburek y cols. 2010). Hay otros factores importantes para la formación y estabilidad de la citocromo c oxidasa, como son la presencia del citocromo c soluble, el flujo de electrones y la presencia del complejo V (Fontanesi y cols. 2008).

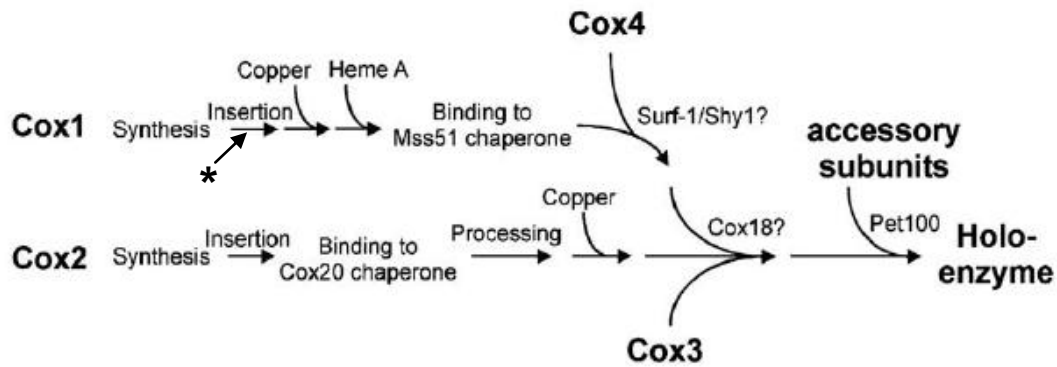


Figura 5. Biogénesis del complejo IV. Modelo de ensamblaje de la citocromo c oxidasa. Se muestra el progreso de ensamblaje de las subunidades Cox1 y Cox2 por separado, la unión posterior de Cox3 y finalmente la unión de las demás subunidades del complejo. El asterisco con la flecha indica el posible sitio de formación del complejo Cox1-Cox14-Coa3-Coa1-Shy1 (Figura tomada y modificada de Herrmann y cols. 2005).

3.6-Expresión alotópica

El término alotópico deriva del griego “en otro lugar” (Nagley y cols. 1989). Por lo tanto, la expresión alotópica se define como la localización y expresión de una nueva copia de un gen en un compartimento celular diferente al original (Claros y cols. 1996) (figura 6). Se han expresado genes alotópicamente en líneas celulares y en modelos de ratón. Sin embargo, el modelo más utilizado para este tipo de expresión es el de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Se puede expresar un gen mitocondrial desde el núcleo integrándolo directamente al cromosoma o bien utilizando un vector de expresión. Así, el producto de síntesis citosólica, la proteína, debe dirigirse hasta la mitocondria, atravesar las dos membranas mitocondriales, llegar hasta la matriz mitocondrial y ensamblarse en el complejo de la fosforilación oxidativa que le corresponde. Al diseñar un gen mitocondrial para su expresión alotópica hay que considerar varios aspectos: a) cambiar el uso de codones, por ejemplo, el codón UAG codifica para el triptófano en el genoma mitocondrial y en el nuclear es un codón de paro (Bonitz y cols. 1980); b) adicionarle al gen, una secuencia nucleotídica que codifique para una presecuencia de direccionamiento a la mitocondria (MTS, del inglés mitochondrial targeting sequence) y c) disminuir la hidrofobicidad de la proteína para

facilitar su importación (Popot y cols. 1990). La expresión alotópica es una herramienta para entender cómo se importan las proteínas mitocondriales de membrana desde el núcleo o el citosol. Es de interés también porque tiene potencial para utilizarse como estrategia para desarrollar terapias génicas para el tratamiento de enfermedades mitocondriales en humanos.

El primer ejemplo de expresión alotópica se llevó a cabo con la madurasa de ARN b14, una proteína de matriz mitocondrial de la levadura que se encuentra codificada en un intrón del gen del citocromo *b* mitocondrial y que se encarga de procesar el ARNm de Cox1. Banroques y colaboradores diseñaron un gen quimérico que contenía la secuencia del gen de la madurasa de levadura antecedido por una secuencia que codificaba a la MTS del gen *ATP9* de la ATP sintasa de *Neurospora crassa*. Este gen quimérico se insertó en un vector de expresión para levadura y se transformó en una cepa mutante de *S. cerevisiae* que carecía de la secuencia del gen mitocondrial que codifica para la madurasa de RNA. Es decir, se intentó complementar una mutante imposibilitada para crecer en fuentes de carbono no fermentables. Al expresar el gen quimérico en la cepa mutante, esta recuperó el fenotipo respiratorio y creció en fuentes de carbono no fermentables. Con este experimento pionero se comprobó que la MTS del gen *ATP9* de *N. crassa* permitía la importación de una proteína a la mitocondria de levadura y su expresión funcional (Banroques y cols. 1986).

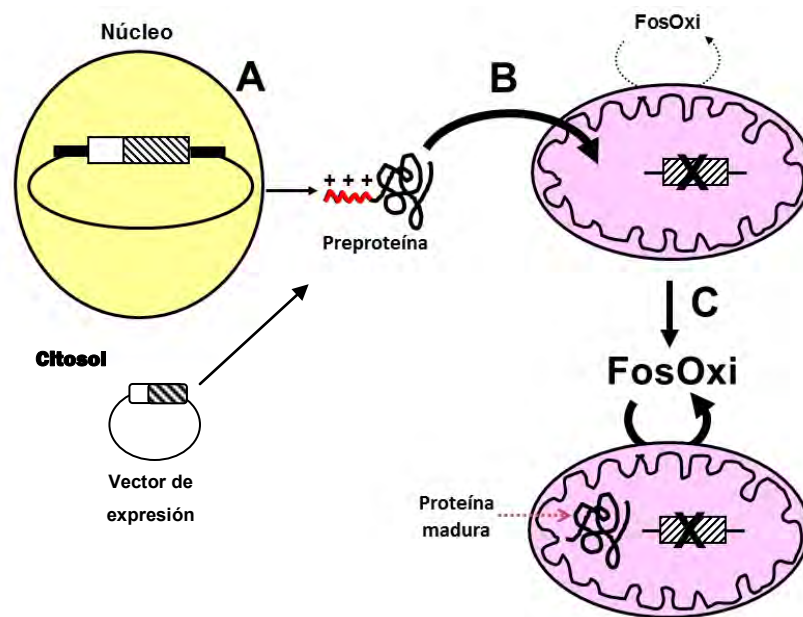


Figura 6. Modelo de expresión alotópica de un gen mitocondrial. A: Muestra las dos opciones de expresar alotópicamente un gen, desde el núcleo de la célula o desde un vector de expresión en el citosol. B: Mitocondria con la fosforilación oxidativa (FosOxi) dañada y el gen responsable (marcado con una X). C: Mitocondria con la proteína madura expresada alotópicamente en el interior de la mitocondria, permitiendo la recuperación de la fosforilación oxidativa. También se observa la preproteína con la MTS en color rojo.

Sin embargo, la madurasa de RNA no es una proteína integral de membrana, es una proteína soluble que actúa en la matriz mitocondrial. Por lo tanto, el primer ejemplo de expresión alotópica de una proteína de membrana fue el de la subunidad Atp8, normalmente codificada en el genoma mitocondrial de *S. cerevisiae*. Atp8 es una proteína de un solo cruce transmembranal que se encuentra en el sector Fo de la ATP sintasa de levadura. Cuando expresaron alotópicamente al gen quimérico *ATP8* con la MTS de *ATP9* de *N. crassa* en células de levadura que tenía una deleción del gen *ATP8* mitocondrial, éstas recuperaron el fenotipo respiratorio. Además, se comprobó con experimentos bioquímicos que al expresar alotópicamente a la proteína hidrofóbica ATP8 (que contiene un solo cruce transmembranal), la proteína se importaba hasta la matriz mitocondrial y se ensamblaba con el complejo de la ATP sintasa (Nagley y cols. 1998; Law y cols. 1990).

La disminución de la hidrofobicidad promedio en una proteína es importante para su importación a la mitocondria (Bonitz y cols. 1980). Mediante la expresión alotópica e importación *in vitro* con construcciones que contenían mutaciones puntuales en las

que se eliminaron uno, dos o tres de los aminoácidos cargados positivamente del extremo C-terminal de la proteína Atp8, se observó que la proteína seguía siendo activa cuando solamente se eliminaba uno de los residuos cargados. Esto sugiere que la hidrofobicidad total promedio de la proteína era quizás el parámetro más importante para permitir o no la importación de proteínas a la mitocondria (Nero y cols. 1990).

Además de la hidrofobicidad también se ha observado que el número de cruces transmembranales de la proteína es una limitante en la expresión alotópica. Se han llevado a cabo experimentos de importación *in vitro* con la proteína Atp9, una proteína con dos cruces transmembranales que forma parte del canal de protones del sector Fo de la ATP sintasa y que esta codificada por el gen *ATP9* mitocondrial de *S. cerevisiae*. Para importar a esta proteína *in vitro*, se incluyó la MTS de *ATP9* de *N. crassa* y se observó que la MTS se editaba y que la proteína Atp9 se importaba a la mitocondria. Sin embargo, no se encontró a la proteína ensamblada en el complejo V. Además, llevando a cabo la misma expresión alotópica de Atp9 en mutantes que carecían del gen *ATP9* mitocondrial, se corroboró que la levadura no recuperaba el fenotipo respiratorio. Por lo tanto se concluyó que se puede importar una proteína de dos cruces transmembranales como Atp9, aunque no se lograra su ensamblaje funcional en el complejo enzimático de la ATP sintasa (Farrell y cols. 1988).

Al tratar de disminuir la hidrofobicidad promedio de la proteína también se puede afectar la interacción con las demás subunidades del complejo, teniendo repercusiones en la función, tal como se demostró al cambiar dos aminoácidos hidrofóbicos por dos con carga negativa en la región central del cruce transmembranal de Atp8. Al expresar alotópicamente a esta proteína se observó una reducción de la actividad de ATPasa de la enzima. Esto indicaba la importancia del carácter hidrofóbico de la subunidad Atp8 para preservar la estructura y la actividad del complejo (Roucou y cols. 1999).

También se ha observado que posiblemente el tamaño y la secuencia de la MTS influyen en la importación de proteínas a la mitocondria. En el diseño de una proteína con la MTS de Atp9 de *N. crassa* de 66 aminoácidos permite la importación de la subunidad Atp8 sin problemas (Gearing y cols. 1986). En otro trabajo con el diseño de una proteína con esta misma MTS de 66 aminoácidos duplicada en tándem y fusionada a las subunidades Atp8 y Atp9 se observó que aumentaba la eficiencia de la importación *in vitro* de dichas proteínas en mitocondrias de *S. cerevisiae* (Galanis y

cols. 1991). Sin embargo en otro experimento semejante se utilizó la MTS de 40 aminoácidos de la subunidad VIb de la citocromo c oxidasa y se observó que esta presecuencia no funcionaba para direccionar a la proteína Atp8 de *S. cerevisiae* hacia la mitocondria (Gearing y cols. 1986). Lo anterior indica que hay cierta especificidad en las MTS para direccionar proteínas hacia los distintos compartimentos mitocondriales, y que experimentalmente hay que realizar diversas pruebas para encontrar la más eficiente para importar nuestra proteína de interés.

Un experimento que denotó la importancia del número de cruces transmembranales en la importación fue el que se llevó a cabo con el apocitocromo *b* de *S. cerevisiae*, una subunidad del complejo III mitocondrial que contiene ocho cruces transmembranales. Se diseñó una construcción quimérica insertada en el genoma nuclear que contenía tres regiones nucleotídicas; la secuencia de la MTS de ATP9 de *N. crassa*, la secuencia del apocitocromo *b* y en la región que codifica para el extremo carboxilo terminal a la madurasa de ARN (esta última como reportero). A partir de este diseño, se obtuvieron varias construcciones, en las cuales se incluían las secuencias que codifican para un diferente número de cruces transmembranales del apocitocromo *b*. Al expresar estas construcciones alotópicamente en mutantes que carecían de la madurasa de ARN fue posible seguir la complementación, de tal modo que si se recuperaba la respiración era indicativo de que la madurasa de ARN se expresaba en la matriz mitocondrial junto con la proteína apocitocromo *b* y sus diferentes cruces transmembranales. La conclusión de este experimento fue que es posible importar las construcciones del apocitocromo *b* que contenían hasta 4 cruces transmembranales. Aquellas construcciones con más de cuatro cruces transmembranales ya no recuperaban un fenotipo respiratorio, indicando que eran demasiado hidrofóbicas para ser importadas (Claros y cols. 1995).

El primer ejemplo de expresión alotópica funcional de una proteína de dos cruces transmembranales fue el de la subunidad Cox2 de la citocromo c oxidasa de *S. cerevisiae* (Supekova y col. 2010). La proteína Cox2 normalmente se encuentra codificada en el genoma mitocondrial. Supekova y colaboradores utilizaron cepas mutantes de *S. cerevisiae* con el gen COX2 mitocondrial interrumpido y se intentó expresar a la proteína COX2 alotópicamente. Para lograr esto, se le adicionó una MTS de la proteína mitocondrial Oxa1. Se observó que la proteína Cox2 sintetizada desde el citosol era incapaz, por sí sola, de restaurar el fenotipo respiratorio. Sin embargo, después de llevar a cabo una mutagénesis aleatoria sobre el cDNA de la proteína,

observaron que era suficiente el cambio de un aminoácido hidrofóbico por uno con carga positiva en el primer cruce transmembranal para recuperar el fenotipo respiratorio. En el caso de COX2 de levadura, se encontró que la mutación W56R permitía la importación de la proteína correspondiente y la consecuente restauración del crecimiento en fuentes de carbono no fermentables. Observaron la complementación de la cepa mutante con diversos experimentos como: i) crecimiento de las células en fuentes de carbono no fermentables como el glicerol, ii) velocidad de consumo de oxígeno e iii) inmunodetección de la proteína COX2 alotópica en extractos totales y mitocondrias aisladas. La mutación W56R permitía el desarrollo de las levaduras, aunque no recuperaban al 100% el crecimiento y el consumo de oxígeno en comparación a una cepa silvestre (Supekova y col. 2010). Se concluyó que basta con el cambio de un solo aminoácido para disminuir la hidrofobicidad del primer cruce transmembranal y por lo tanto, para importar a la proteína citosólica y recuperar un complejo IV funcional. Sin embargo, en este trabajo solamente se presentó evidencia genética, faltó demostrar si efectivamente la Cox2 alotópica se encontraba ensamblada al complejo de la citocromo c oxidasa, lo cual es importante determinar si se quiere caracterizar un modelo con implicaciones en terapia génica. También, quedaba abierta la pregunta sobre si la disminución en la capacidad respiratoria de la cepa complementada se debía a la presencia de menos citocromo c oxidasa ensamblada o a que la presencia de la mutación W56R disminuía la actividad de la enzima.

3.7-Explorando la expresión alotópica de la subunidad Cox2 fragmentada.

La expresión alotópica nos ha permitido saber que las proteínas codificadas de manera natural en el genoma mitocondrial son más hidrofóbicas que las traducidas en el citoplasma, ya que es necesario disminuir la hidrofobicidad de la proteína para que se internalice en la mitocondria. Probablemente la migración de genes de la mitocondria al núcleo también puede ser un fenómeno limitado por la hidrofobicidad, ya que aquellas proteínas altamente hidrofóbicas son difíciles de importar y deben sintetizarse e insertarse cotraduccionalmente en la membrana interna mitocondrial (Claros y cols. 1995). Un modelo muy interesante es el caso de la subunidad Cox2 de ciertas algas verdes y de parásitos apicomplejos. Se ha observado que en algas clorofíceas como *Polytomella sp.* y *Chlamydomonas reinhardtii* y en parásitos apicomplejos como *Toxoplasma gondii* y *Plasmodium falciparum*, la subunidad Cox2 se encuentra atípicamente codificada en el núcleo; además, el gen se encuentra

fragmentado en dos segmentos denominados *COX2A* y *COX2B* (Pérez-Martínez y cols. 2001; Funes y cols. 2002b). El gen *COX2A* codifica para la proteína Cox2a que corresponde a la porción N-terminal de una proteína Cox2 típica, y el gen *COX2B* codifica para la proteína Cox2b que corresponde a la porción C-terminal de la subunidad ortodoxa (figura 7).

En algas clorofíceas y parásitos apicomplejos la subunidad Cox2a es la porción hidrofóbica de la proteína y contiene una MTS. La proteína forma dos cruces transmembranales tipo alfa-hélice que se insertan en la membrana interna mitocondrial, y en su extremo C-terminal presenta una extensión atípica de 21 aminoácidos. La subunidad Cox2b es la parte soluble de la proteína y contiene el sitio de unión para el Cu_A . Este sitio se encuentra conservado en todas las Cox2 conocidas. La subunidad Cox2a también cuenta con una extensión atípica de 43 residuos en su extremo N-terminal. Las extensiones no se encuentran en una subunidad Cox2 ortodoxa y aún no se conoce su función. Estas extensiones contienen cargas positivas y negativas, que se cree son necesarias para estabilizar el heterodímero formado entre la subunidades Cox2a y Cox2b en la citocromo c oxidasa de las algas clorofíceas y de los parásitos apicomplejos (Pérez-Martínez y cols. 2001).

Para que las proteínas Cox2a y Cox2b se ensamblen en el complejo de la citocromo c oxidasa en la membrana interna mitocondrial, tienen primero que internalizarse a la mitocondria. Cox2a es direccionada a la matriz mitocondrial por su presecuencia que luego es procesada proteolíticamente; posteriormente, los dos cruces transmembranales se insertan en la membrana interna orientando hacia el espacio intermembranal la extensión de C-terminal. Aparentemente, la subunidad Cox2b carece de presecuencia porque solamente tiene que importarse hasta el espacio intermembranal (Jiménez-Suárez y cols. 2012).

No se sabe si las extensiones en Cox2a y Cox2b son indispensables para la formación del heterodímero Cox2. En el inicio de este proyecto intentamos emular las propiedades de los genes fragmentados *COX2A* y *COX2B* de algas clorofíceas complementando a cepas mutantes de levadura interrumpidas en el gen *COX2* mitocondrial. Con este fin diseñamos cDNAs fragmentados que codificaban a las proteínas Cox2a y Cox2b con las secuencias de levadura y los expresamos alotópicamente en levadura. A pesar de que nunca pudimos recuperar un fenotipo respiratorio en estos experimentos, obtuvimos algunos resultados interesantes. Todo

lo referente a la expresión alotópica de los genes fragmentados lo resumimos separadamente en el apéndice 1. Sin embargo, al estar trabajando en este proyecto, se publicó un trabajo sobre la expresión alotópica de Cox2 en levadura (Supekova y cols. 2010). Esto nos permitió rediseñar nuestra estrategia y dar lugar a los resultados presentados en este trabajo.

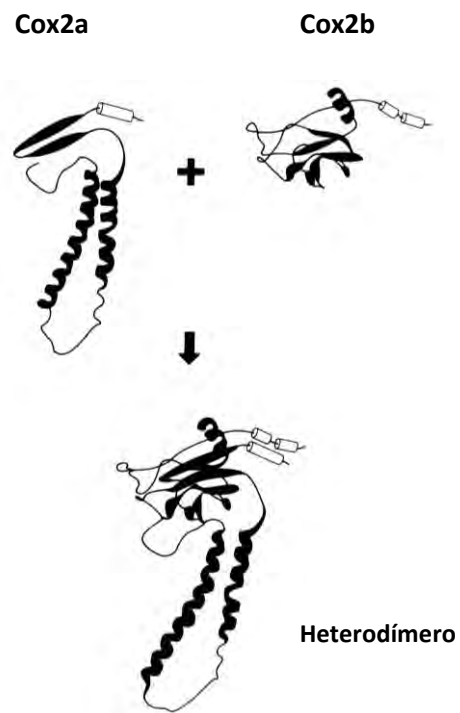


Figura 7. Modelo de interacción de las subunidades Cox2a y Cox2b formando el heterodímero Cox2 de *Chlamydomonas reinhardtii*. En ambas subunidades se muestran las extensiones en forma de cilindro transparente en el C-terminal de Cox2a y en forma de dos cilindros en la región N-terminal de Cox2b. Imagen tomada de Pérez-Martínez y cols. 2001.

4-Antecedentes Directos

En el caso de los vertebrados, el 99% de las proteínas mitocondriales se encuentran codificadas en el núcleo y sólo 13 proteínas hidrofóbicas se codifican en el genoma mitocondrial. Su expresión requiere de maquinarias transcripcionales y traduccionales complejas (Shokolenko y cols. 2010). Con experimentos de expresión alotópica se ha explicado cómo se importan algunas proteínas a la mitocondria y cómo se ensamblan en sus complejos correspondientes (Gunnar y cols. 1986; Banroques y cols. 1986; Nagley y cols. 1988; Law y cols. 1990). La expresión alotópica también tiene importancia por su potencial para la terapia génica de enfermedades mitocondriales. Incluso, se ha experimentado en modelos animales con estos fines (Guy y cols. 2009; Ellouze y cols. 2008). Sin embargo, los datos obtenidos en estos modelos no son muy claros, ya que no se ha aportado evidencia bioquímica contundente de que las proteínas sintetizadas en el citosol verdaderamente se hayan integrado a su complejo correspondiente. La expresión alotópica en líneas celulares humanas tampoco se ha demostrado todavía (Perales-Clemente y cols. 2011). La mayoría de los reportes en los diferentes modelos, también indican una recuperación parcial del fenotipo sin demostrar contundentemente la incorporación de la proteína al complejo mitocondrial. Sólo hay tres casos de expresión alotópica donde la demostración bioquímica es clara, el de ND7 en tabaco (Nagley y cols. 1988) y los de ATP8 y COX2 en levadura (Law y cols. 1990; Nagley y cols. 1988; Supekova y cols. 2010; Cruz-Torres y cols. 2012). En el caso de ND7, una subunidad del complejo I mitocondrial de *Nicotiana sylvestris* (planta del tabaco), se expresó en una mutante con una delección del gen mitocondrial *nd7* y se observó la recuperación del fenotipo respiratorio. También se demostró que la proteína expresada alotópicamente se encontraba ensamblada en el complejo I por medio de geles azules nativos y espectrometría de masas. Como se mencionó arriba, en el modelo de levadura con el gen *ATP8* se logró la expresión alotópica en una cepa con una ablación del gen *ATP8* mitocondrial (Law y cols. 1990; Nagley y cols. 1988). Además de recuperar el fenotipo respiratorio se pudo aportar evidencia de que la proteína expresada alotópicamente se había integrado al complejo V de manera efectiva. En el caso de la subunidad Cox2 de levadura, se demostró que una mutación en el primer cruce transmembranal reducía la hidrofobicidad promedio y que esta reducción era suficiente para recuperar la respiración en una mutante con el gen *COX2* mitocondrial interrumpido. Sin embargo, quedó sin demostrarse si la reducción en la respiración en la cepa curada alotópicamente se debía a una menor cantidad de citocromo c oxidasa ensamblada, o bien, a que la mutación W56R en la cepa mutante

disminuía la actividad del complejo.

Para una expresión alotópica eficaz se deben considerar varios puntos en el diseño de genes, el cambio en el uso de codones del mitocondrial al nuclear, la MTS que se le adicionará a la proteína y la disminución de la hidrofobicidad en la proteína. Debido a la importancia de la expresión alotópica en la terapia génica, es necesario demostrar de manera experimental que las proteínas expresadas se encuentran integradas en el complejo membranal correspondiente. En este trabajo utilizamos el sistema de levadura para expresar a la subunidad Cox2 que contiene a la mutación W56R reportada por Supekova y colaboradores en 2010, la cual al tener sustituido un aminoácido hidrofóbico por uno con carga positiva disminuye la hidrofobicidad de la proteína, permitiendo así su importación a la mitocondria. Nuestro trabajo consistió en aprovechar este modelo y analizar bioquímicamente al complejo enzimático de la citocromo c oxidasa resultante de dicha expresión. A lo largo del trabajo exploramos si la disminución de la respiración de la cepa que expresa alotópicamente Cox2^{W56R} se debía a que la citocromo c oxidasa presenta una actividad disminuida al tener una subunidad mutada, o bien, a que se ensambla menos enzima en la membrana interna mitocondrial.

5-Hipótesis

La presencia de la subunidad Cox2 con la mutación puntual W56R expresada alotópicamente provee propiedades funcionales y estructurales semejantes a la subunidad nativa, aunque conduce a que se ensamble menos complejo de la citocromo c oxidasa en la membrana interna mitocondrial.

6-Objetivo General

Demostrar que la subunidad Cox2 expresada alotópicamente con la mutación puntual W56R, la cual permite la recuperación del fenotipo respiratorio en una mutante carente del gen Cox2 mitocondrial funcional, se ensambla en la citocromo c oxidasa. Explorar si la disminución de la respiración de la cepa que expresa alotópicamente Cox2^{W56R} se debe a que la citocromo c oxidasa presenta una actividad disminuida o a que se ensambla menos enzima en la membrana interna mitocondrial.

7-Objetivos Particulares

- Obtener el tiempo de duplicación de la cepa complementada (curada) y la cepa silvestre en medios líquidos.
- Comprobar la presencia de la proteína expresada alotópicamente en las células por medio de inmunoréplicas tipo Western blot, tanto en células como en mitocondrias aisladas.
- Analizar por medio de geles nativos la actividad de ATPasa y de citocromo c oxidasa.
- Analizar la estequiometría de todas las subunidades que forman parte del complejo IV por medio de análisis densitométricos.
- Cuantificar la cantidad de citocromo c oxidasa ensamblada analizando los espectros de los citocromos en mitocondrias solubilizadas obtenidas tanto de la cepa silvestre como de la curada.
- Aislar el complejo de la citocromo c oxidasa tanto de la cepa silvestre como de la cepa complementada y analizar su composición y actividad de consumo de oxígeno.
- Analizar por espectrometría de masas la presencia de la mutación puntual W56R en la subunidad Cox2 expresada alotópicamente.
- Analizar por experimentos de pulso y caza la estabilidad de la subunidad Cox1 en mutantes Δ COX2 y en aquellas complementadas con la Cox2 expresada alotópicamente.

8-Materiales y Métodos

8.1-Reactivos

Se utilizaron medios y reactivos de diferentes compañías. De la compañía Formedium: galactosa, rafinosa, medio completo sin metionina, adenina, uracilo, arginina, histidina, leucina y lisina. De la compañía Becton Dickinson: base nitrogenada, extracto de levadura, bacto-triptona, bacto-peptona. De la compañía J. T. Baker: NaCl, KOH, KH_2PO_4 , NH_4Cl , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ácido láctico, etanol, glicerol. De Sigma-Aldrich: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, FeCl_3 , KCN, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, cicloheximida, glucosa, polietilenglicol 3350, ditioeritrol (DTT), acetato de litio, ADN de esperma de salmón, beta-mercaptoetanol, ácido 2-morfolino etano sulfónico (MES), trietanolamina (TEA), manitol, ácido maleico, albúmina de suero bovino (BSA), lauril maltósido (LM), trisaminometano (TRIS), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), tosi-lisina-clorometilcetona (TLCK), piperazina-N-etanosulfónico (HEPES), diaminobenzidina (DAB), tetrametil-*para*-fenilendiamino (TMPD), ATP (sal de sodio), citocromo *c* de corazón de caballo, glicina, sorbitol, y ascorbato de sodio. De la compañía Perkin Elmer: metionina [S^{35}].

8.2-Material biológico

Se utilizaron células de *Saccharomyces cerevisiae* de la cepa silvestre NB40-36A [genotipo: MAT α , lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, rho+] y de la cepa mutante NAB97 [genotipo: MAT α , lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3 112, his3-deltaHindIII, ydr494wHA, cox2-22, rho+] que contiene una delección del gen mitocondrial COX2. Estas cepas fueron donadas por el Doctor Thomas Fox de la Universidad de Cornell en EEUU. También se usaron cepas de bacteria de *Escherichia coli* DH5 α y pUC57 para conservar y purificar plásmidos.

8.3-Medios de Cultivo

Se utilizaron distintos medios de crecimiento para bacteria y levadura. Para bacteria se utilizó medio LB (Luria Bertani: extracto de levadura 5%, bacto-triptona 1%, NaCl 1%) adicionado con ampicilina a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Para crecer a las distintas cepas de levadura se utilizaron diversos medios: YPD (Yeast extract Peptone Dextrose: Extracto de levadura 1%, Bacto-Peptona 2%, glucosa 2%) como medio

fermentativo. Medios mínimos SD, SG y SR que contienen como única fuente de carbono glucosa, galactosa y rafinosa respectivamente, complementados con base nitrogenada, sulfato de amonio y los aminoácidos necesarios dependiendo de la auxotrofia que presente la cepa (SD, SG y SR: base nitrogenada 0.17%, sulfato de amonio 0.5%, glucosa, galactosa o rafinosa 2%, aminoácidos (g/ml): adenina 0.2, uracilo 0.2, arginina 1, histidina 1, leucina 1 y lisina 1). Como medio no fermentativo se utilizó YPEtOH/Gly (Yeast extract Peptone Ethanol/Glycerol: extracto de levadura 1%, Bacto-Peptona 2%, etanol 3% y glicerol 3%). Otro medio no fermentativo que se utilizó fue el medio YLac (Yeast extract: extracto de levadura 3 g, KH_2PO_4 1 g, NH_4Cl 1 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, NaCl 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.1 g, FeCl_3 3 mg, ácido láctico (90%) 22 ml. Se ajustó el pH a 5.5 con 10 M de KOH. Se aforó a 1000 ml de agua destilada. Herrmann y cols. 1994). Para el caso de medios sólidos se les agregó 2% de agar.

8.4-Diseño del gen

El gen quimérico utilizado se diseñó a partir del gen COX2 mitocondrial de *S. cerevisiae*. En el diseño del gen se consideró el uso de codones del núcleo. En la secuencia se incluyó la mutación W56R en el primer cruce transmembranal. Además, se le adicionó una secuencia que codifica a la MTS de la proteína Oxa1 de *S. cerevisiae* en el extremo 5'. A la secuencia se le colocaron distintos sitios de restricción para tener diversas opciones para insertar el gen quimérico en diferentes vectores (Apéndice 2). Este gen fue sintetizado por la compañía GenScript e insertado en el vector pUC57. Posteriormente el gen quimérico se insertó en los sitios de restricción NotI del vector pFL61. Este vector de expresión en levadura es de bajo número de copias, contiene el promotor de la fosfoglicerato cinasa (PGK), también contiene el gen de resistencia a ampicilina y un marcador para auxotrofia de uracilo (URA). Una célula transformada con este vector puede crecer en medios carentes de uracilo (medio -URA). Por lo tanto la construcción quedó de la siguiente forma: pFL61-MTS_Oxa1-Cox2W56R y al producto de síntesis lo nombramos Cox2^{W56R}.

8.5 Transformación de levaduras

Las células se transformaron con el plásmido vacío (pFL61) y con el plásmido que contiene el gen quimérico (pFL61-MTS_Oxa1-Cox2W56R). Los plásmidos se purificaron a partir de cultivos de *E. coli* de 100 ml de medio LB con un sistema comercial para purificar plásmidos (Plasmid Midi Protocol de Qiagen). Se obtuvo un rendimiento del plásmido puro de 3000 ng/μl.

Para transformar a las levaduras se crecieron las cepas en medio sólido YPD. A los dos días se tomaron dos colonias de cada cepa y se inocularon en 2 ml de medio YPD. Se incubaron a 30°C en agitación a 250 rpm durante 14 horas. Al siguiente día se tomaron 300 μl de cultivo y se centrifugó un minuto a 14000 rpm. Las células se lavaron con 1 ml de agua estéril. La pastilla de células se mezcló con 52.5 μl del amortiguador de transformación. Después se adicionó a la mezcla de 100 a 300 ng de plásmido. Se mezcló con el vortex por 3 segundos. Se incubó a 42°C por 30 minutos y se agitó 3 segundos en vortex cada 10 minutos. Después de los 30 minutos, las células se sembraron en medio mínimo SD sin uracilo (-URA) y se incubaron a 30°C. Al tercer día se eligieron 60 colonias aproximadamente y se sembraron nuevamente en medio SD para poder hacer réplicas en medio no fermentativo como etanol-glicerol. -Amortiguador de transformación: 40 μl de polietilén-glicol 3350 al 50%, 5 μl de ditioeritritol 1 M, 5 μl de acetato de litio 2 M y 2.5 μl de ADN de esperma de salmón (10 mg/ml). El esperma de salmón se desnaturaliza previamente a 95°C por 10 min y se coloca en hielo (Gietz y cols. 2007).

8.6-Determinación del consumo de oxígeno

La concentración de oxígeno se determinó en célula completa de levadura con un electrodo tipo Clark en una cámara de un volumen de 5 ml con agitación a 30°C. Se utilizó un oxímetro YSI-5300 con interface a una computadora a través de un voltímetro Steren. Para estos experimentos las células se crecieron en 50 ml de medio de etanol-glicerol. Se incubó toda la noche hasta llegar a una densidad óptica de 0.6 a 600 nanómetros de longitud de onda. Al día siguiente las células se centrifugaron a 10,000xg por 5 minutos y se lavaron con agua destilada. Para determinar el consumo de oxígeno se utilizaron 50 μl de células al 50% p/v en amortiguador de MES (0.1 M de ácido 2-morfolino etano sulfónico ajustando el pH a 6.0 con trietanolamina). El oxímetro se calibró previamente en presencia y ausencia de ditionita. Después se

agregaron los sustratos, 20 μ l de etanol puro y 3 μ l de cianuro sódico (NaCN 100 μ M) (Sánchez y cols. 2006).

8.7-Obtención de extractos totales de levadura

Para obtener la proteína total de las células de levadura, se crecieron cultivos de 10 ml a 30°C toda la noche en agitación a 250 rpm. Al día siguiente se tomaron 3 ml y se lavaron con agua destilada. La pastilla se mezcló con 150 μ l del amortiguador de ruptura (NaOH 1.85 M y beta-mercaptoetanol 7.4%), se agitó en un vortex y se incubó 15 minutos en hielo. Posteriormente, se interrumpió la reacción con 150 μ l de ácido tricloroacético al 50% incubando en hielo por 15 minutos. Después se centrifugó 10 minutos a 14000 rpm en una microcentrifuga y se lavó la pastilla con 1.5 ml de acetona previamente enfriada en hielo. Luego se retiró la acetona centrifugando a 14000 rpm por 5 minutos y se secó la pastilla a 40°C por 5 minutos. Al final, la muestra se resuspendió con 100 μ l de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 5% y se cuantificó en un espectrofotómetro (Nanodrop) a 280 nm de longitud de onda.

8.8-Obtención de mitocondrias

Las mitocondrias se obtuvieron a partir de cultivos de células de 3 y 10 L dependiendo el tipo de experimento. Las células utilizadas se crecieron en los diferentes medios. Las células se colectaron centrifugando a 5000 rpm por 10 minutos y se lavaron con agua. La pastilla de células se resuspendió en el amortiguador de extracción que contiene: 0.6 M de manitol, 10 mM de ácido maleico pH 6.8 y 1% de albúmina de suero bovino (BSA). Después se rompió la pastilla con perlas de vidrio de 0.45 mm de diámetro en un homogenizador con camisa de hielo (Bead-beater Biospec Products, U.S.A.). Para romper las células se dieron 3 pulsos por 20 segundos con 40 segundos de descanso entre cada pulso. Una vez rotas las células, las mitocondrias se aislaron por centrifugación diferencial a 750xg por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se colectó y se centrifugó a 12,000xg durante 10 minutos. La pastilla se resuspendió con un pincel fino con 1 ml de medio de extracción y se le agregó más medio. Posteriormente se centrifugó a 3000xg por 5 minutos y el sobrenadante se centrifugó a 17,500xg por 10 minutos. La pastilla de mitocondrias se resuspendió con 2 a 3 gotas de medio de extracción sin albúmina. Finalmente, se cuantificó la proteína mitocondrial en un espectrofotómetro (Nanodrop) a 280 nm de longitud de onda (Peña y cols. 1977).

8.9-Purificación de la citocromo c oxidasa

La enzima se purificó de células crecidas en 10 L de medio de lactato. Las células se centrifugaron a 3,000xg por 10 minutos y se lavaron con agua destilada fría 3 veces. Las mitocondrias se obtuvieron por el método descrito arriba y se determinó la concentración de proteína por el método de Lowry. Posteriormente las mitocondrias se solubilizaron con lauril maltósido a una concentración de 2g/g de proteína en amortiguador de solubilización que contiene: 50 mM de Tris, 1 mM de MgSO₄, 100 mM de NaCl, 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y 50 µg/ml de tosil lisina clorometil cetona (TLCK). El solubilizado mitocondrial se incubó en agitación a 4°C por 30 minutos y después se centrifugó por 40 minutos a 35,000 rpm en un rotor 60 Ti (Beckman). El sobrenadante se dializó contra un amortiguador de diálisis (50 mM de Tris, 1 mM de MgSO₄, pH 8.0) por 2 horas. El dializado se cargó a una columna de intercambio iónico (DEAE biogel A) equilibrada con amortiguador (50 mM de Tris, 1 mM de MgSO₄, 1 mM de PMSF, 50 µg/ml de TLCK, pH 8.0). El lavado se hizo con el mismo amortiguador de equilibrio con dos volúmenes de columna y después se aplicó un gradiente de 0 a 200 mM de NaCl de dos volúmenes de columna. Finalmente se lavó con amortiguador de equilibrio con 200 mM de NaCl donde se obtuvo la citocromo c oxidasa. Posteriormente, con 400 mM de NaCl en el mismo amortiguador se obtuvo el complejo bc₁. El perfil de elución de la columna se obtuvo a 280 nm de longitud de onda y además se le hizo el ensayo de actividad de oxidasa en placa de Elisa a las diferentes fracciones.

8.10-Actividad de oxidasa en placa y gel

En una placa de Elisa se colocaron 50 µl de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4 y 20 µl del gradiente o de los lavados de la purificación de la citocromo c oxidasa. Posteriormente se colocaron 10 µl de diaminobencidina (10 mg/ml en dimetil sulfoxido) y 10 µl de citocromo c de corazón de caballo (5 mg/ml). Se dejó que las muestras reaccionaran hasta que los pozos adquirieran un color café oscuro. Las muestras se leyeron en un lector de Elisa a una longitud de onda de 490 nm. Para el caso de actividad en gel se utilizó esta misma reacción. Los geles nativos con la muestra se incubaron en el amortiguador de fosfatos a temperatura ambiente en agitación y se añadió el citocromo c y la diaminobencidina. Los geles se incuban de 30 minutos a 2 horas. Las bandas de actividad se tiñeron de color café rojizo.

8.11-Oximetría de la citocromo c oxidasa pura

Para cuantificar el consumo de oxígeno de la oxidasa se utilizó un electrodo tipo Clark y una cámara de 0.1 ml. Se utilizó un oxímetro Strathkelvin modelo 782 (Warner/Strathkelvin Instruments) a una temperatura constante de 30°C. Se colocó el amortiguador de HEPES (50 mM de Hepes (Ácido N-(2-Hidroxietil)piperazina-N'-etanosulfónico), 0.1% de lauril-maltósido, pH 7.4) y los reactivos ascorbato 10 mM, tetrametil-p-fenilendiamina (TMPD) 200 μM , y citocromo c de corazón de caballo 50 μM en un volumen final de 0.1 ml. Se dejó estabilizar el oxímetro. Se agregó la citocromo c oxidasa cuantificada como 100 μM de hemos a+a₃. Se calcularon los ng atomo O/ min /nmol de a+a₃. Eventualmente para inhibir la reacción se utilizó KCN 100 μM .

8.12-Espectros diferenciales de citocromos

Para la cuantificación de los citocromos, las mitocondrias aisladas se solubilizaron con 2 mg de lauril maltósido/mg de proteína y se centrifugaron a 100,000×g por 30 minutos. Para obtener los espectros oxidados se hizo un barrido de 500 a 680 nm en presencia de ferricianuro en un espectro Aminco DW2000 que se asignó como línea base. Para reducir los hemos se adicionó con una espátula una pequeña cantidad de hidrosulfito de sodio (ditionita de sodio) en polvo a la cubeta. Los coeficientes de absorción diferencial fueron los siguientes (reducido menos el oxidado): citocromo c de caballo y de levadura (550–540 nm) 19.5 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$, para el citocromo b (560–575 nm) 25.0 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$, para los citocromos aa₃ (603–630 nm) 16.5 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$, y para el citocromo c₁ (553–541 nm) 17.5 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Degli y cols. 1984; W. de Vrij y cols. 1987; Yu y cols. 1980).

8.13-Actividad de ATPasa en gel del complejo V

Para estimar la actividad de ATPasa se utilizó las misma preparación mitocondrial que para la actividad de oxidasa excepto que se utilizaron geles claros (Witting y cols. 2005). Después de correr el gel, se preincubó durante 3 horas en la solución de glicina 270 mM y Tris-HCl 35 mM a pH 8.4. Uno de los carriles se incubó con 10 $\mu\text{g/ml}$ de oligomicina en el mismo amortiguador para observar la inhibición de la actividad. Posteriormente, se realizó el ensayo incubando el gel en el amortiguador de actividad (glicina 270 mM, Tris-HCl 35 mM pH 8.4, ATP 8 mM, 14 mM MgSO_4 y $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ al

0.2%) por 5 a 10 minutos. La actividad de ATPasa se observa como un depósito blanco contra un fondo oscuro. La reacción se paró con metanol 50% en agua durante 30 minutos y después con agua por 30 minutos más.

8.14-Experimentos de pulso y caza

Para estos experimentos se partió de 10 ml de un cultivo de levadura saturado en medio mínimo con rafinosa complementado con los aminoácidos necesarios y en ausencia de uracilo. De este cultivo, se inocularon cultivos de 60 ml con 6 ml de la cepa mutante y 3 ml de la cepa silvestre y se dejaron crecer 12 horas hasta alcanzar una densidad óptica a 600nm de 0.6 a 0.9. Los cultivos se centrifugaron a 6,000xg por 10 minutos. Las pastillas se resuspendieron con 2.5 ml de medio con rafinosa con todos los aminoácidos sin metionina (-Met) en tubos de 15 ml y se incubaron por 30 minutos a 30°C. Después se les adicionó 25 µl de cicloheximida (10 mg/ml disuelta en etanol al 100%) y se incubaron por 4 minutos a 30°C agitando manualmente. Al terminar este paso se inició con un pulso de 15 µCi de S³⁵-Metionina y se incubó por 15 minutos en hielo. Después se colectaron 500 µl de la muestra y se centrifugaron a 20,000xg por 1 minuto a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Se lavó la pastilla resultante con 200 µl de amortiguador SPH frío, con un coctel de inhibidores de proteasas de Sigma (3.3 µL/10ml). Se retiró el sobrenadante y el tubo se conservó en nitrógeno líquido. Posteriormente se continuó con la caza con los otros 2 ml de la muestra que se centrifugó a 20,000xg durante 1 minuto. Después se les colocaron 2 ml de medio de Rafinosa (-Met) adicionado con 100 µl de metionina fría 10 mM inicial. La muestra se incubó durante 4 horas a 30°C y se colectó una muestra de 500 µL cada hora durante 4 horas. Cada muestra se lavó con 200 µl de amortiguador SHP y las muestras se conservaron en nitrógeno líquido.

Al final de la colecta de 4 horas se procesaron las muestras para obtener mitocondrias. Se sacaron las muestras del nitrógeno líquido y se resuspendieron en 200 µl de amortiguador SHP frío (Hepes 20 mM y sorbitol 0.6 M) y se les adicionó un volumen de perlas de 200 a 250 µl previamente enfriadas a -70°C. Posteriormente se agitaron en vortex a velocidad máxima por 30 segundos y se enfriaron en hielo por 30 segundos, esto se repitió dos veces más. Luego se centrifugó a 600xg por 5 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo y al tubo con perlas se le agregó 200 µl de amortiguador SPH repitiendo los ciclos con vortex y centrifugando nuevamente. Las dos muestras se mezclaron y se obtuvieron las mitocondrias

centrifugando a 20,000xg por 12 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 10-15 µl de solución de carga. Las proteínas se resolvieron en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 16% en presencia de SDS. El gel se secó y se expuso toda la noche a una pantalla de fósforo. Posteriormente se analizó la emisión radioactiva de la pantalla en un Typhoon 8600 phosphoimager.

8.15-Geles desnaturalizantes

Gel desnaturalizante para experimento de pulso y caza:

Para visualizar las proteínas mitocondriales con marca radioactiva de los experimentos de pulso y caza se utilizaron geles de poliacrilamida al 16%. Se corrieron en una cámara de electroforesis vertical (GibcoBRL V16). Quince µl de la muestra se mezclaron con 10 µl de la solución de carga. El gel se corrió a 100 mA hasta que el frente del gel llegara a la orilla inferior del tamiz.

Soluciones para hacer un gel grande de 0.75 mm de espesor:

	Gel separador	Gel concentrador
	16%	5%
30% acrilamida	9 ml	0.83 ml
0.3% Bis-acrilamida		
Tris 2 M pH 8.8	3.28 ml	-
Tris 2 M pH 6.8	-	150 µl
H ₂ O	4.5 ml	4 ml
SDS 20%	83.5 µl	25 µl
Persulfato de amonio (APS)	100 µl	25 µl
Tetrametil etilendiamino (TEMED)	10 µl	5 µl

-Solución madre de acrilamida: acrilamida al 30%, bis-acrilamida al 0.98%, filtrarla con papel filtro y conservar a 4°C.

-Amortiguador electroforético: 3 g de Tris, 14.4 g de glicina, 10 mL de SDS 10%, llevar a 1 L de agua destilada.

-Solución de carga: Glicerol al 30%, SDS al 10%, azul de bromofenol al 0.3%, beta-mercaptoetanol al 4%, Tris-HCl 100 mM pH 6.8

-Amortiguador de corrida 4x: 9 g de Tris, 57.6 g de glicina. Para preparar 1 L tomar 250 ml más 10 ml de SDS 10% y se lleva a 1 L de agua destilada.

Geles desnaturalizantes para muestras de extracto total y mitocondrias:

Para las muestras de extractos totales de levadura y mitocondrias se siguió el protocolo reportado por von Jagow (SDS-tricina-PAGE) (Schägger y cols. 2006). La electroforesis se realizó en una cámara electroforética Mini-PROTEAN Tetra Bio-Rad.

Soluciones para un gel pequeño de 1.5 mm de espesor:

	Gel separador Acrilamida 15% (ml)	Gel concentrador Acrilamida 4% (ml)
Acrilamida 48.5% Bis-acrilamida 1.5 %	2.8	0.25
Amortiguador del gel 3x	3	1
Glicerol 80%	1.8	-
Agua destilada	1.7	1.75
TEMED	15 µl	15 µl
APS (10%)	100 µl	100 µl

-Solución madre de acrilamida: acrilamida al 48.5 %, bis-acrilamida al 1.5%, disolver en agua destilada.

-Amortiguador 3x: 3 M de Tris-HCl pH 8.45 con 0.3% de SDS

-Amortiguador del cátodo: 1 M de Tris, 1 M de Tricina, 1% de SDS

-Amortiguador del ánodo: 1M de Tris-HCl pH 8.9.

8.16-Electroforesis en geles azules en condiciones nativas (BN-PAGE)

Para las muestras de la oxidasa pura y de la actividad en gel se utilizaron geles nativos azules y geles claros. Se hicieron geles de gradiente del 5 al 15% de poli-acrilamida. La parte del gel concentrador se hizo del 4%. Se utilizó una cámara de electroforesis vertical grande (GibcoBRL V16).

-Soluciones para geles nativos:

	Acrilamida 15%	Acrilamida 5%	Gel concentrador 4%
48.5% de acrilamida 1.5% de bis-acrilamida	5.7 mL	1.9 mL	0.50 mL
Amortiguador para el gel 3x	6.2 mL	6.2 mL	20 mL
Glicerol 80%	4.73 mL	1.2 mL	-
Agua destilada	1.9 mL	9.2 mL	3.44 mL
TEMED	18 µl	18 µl	9 µl
Persulfato de Amonio 10%	50 µl	50 µl	32 µl

Para hacer el gel se utilizó un formador de gradientes de dos cilindros separados por una llave de paso, solo uno de los cilindros tiene una salida donde se conecta una manguera que se coloca entre los vidrios donde se forma el gel. Al formador de gradientes se le colocó una mosca magnética y se puso sobre un agitador magnético. Posteriormente se prepararon las soluciones del gel concentrador y separador y se les agregó el TEMED. Primero se agregó la solución del 15% de acrilamida en el cilindro más próximo a la manguera de salida. Luego se agregó el APS a la solución del 5% de acrilamida, se mezcló y se agregó en el otro cilindro. Después se agregó el APS a la solución del 15% y se agitó con la mosca magnética. Posteriormente se disminuyó la velocidad de la mosca magnética y se abrió la válvula del formador de gradientes para dejar salir la solución por la manguera. Posteriormente se agregó la solución del 4% de acrilamida para el gel concentrador y se colocó el peine. El gel concentrador se formó 1 cm por debajo de los pozos. Para el caso de los geles claros el amortiguador del cátodo lleva 0.1% de lauril maltósido y 0.5% de desoxicolato de sodio (DOC).

Soluciones:

-100 ml de amortiguador de geles 3x: 19.68 g de ácido amino-caproico 3.14/0.51 g de Bis-Tris, ajustar pH a 7.0 con HCl.

-Amortiguador del cátodo (superior) 1 L: 8.96 g de Tricina, 3.14/0.51 g de Bis-Tris, 200 mg de azul de Coomassie Serva G 0.02 %.

-Amortiguador del ánodo (inferior) 1L: 10.46/1.7 g de Bis-Tris, ajustar pH a 7.0 con HCl.

8.17-Preparación de mitocondrias para BN-PAGE

Las mitocondrias se centrifugaron a velocidad máxima en una microcentrífuga a 4°C por 5 minutos. La pastilla se resuspendió en el amortiguador de lavado (250 mM de sorbitol, 50 mM de Bis-Tris a pH 7.0) y se volvió a centrifugar por 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y a la pastilla se solubilizó con amortiguador de muestra (750 mM de ácido aminocaproico, 50 mM de Bis-Tris a pH 7.0) y 2 g de lauril-maltósido por gramo de proteína y se incubó por 30 minutos. Posteriormente se centrifugó la muestra a 100,000xg por 30 minutos a 4 °C. Luego se recuperó el sobrenadante y se le agregó amortiguador de Coomassie Serva Blue G y se mezcló invirtiendo el tubo, y se conservó en hielo. La muestra quedó en un volumen final de 200 µl, considerando que una pastilla de 1 mg de proteína mitocondrial de aproximadamente 25 µl lleva 20 µl de la solución de lauril-maltósido al 10% (para preparar 1 ml: 100 mg de dodecil-maltósido se disuelven en 1ml de agua), 10 µl de de una solución de Coomassie al 5% (para preparar 1 ml: 50 mg de azul de Coomassie Serva Blue G y disolver en 1 ml del amortiguador de muestra) y 145 µl de amortiguador de muestra. Por lo tanto las muestras de BN-PAGE se prepararon con el mismo detergente a una concentración final del 1% de lauril-maltósido y una relación de 4:1 de detergente azul de Coomassie. Las muestras se cargaron al gel. Previamente se enfrió la cámara de electroforesis y los amortiguadores a 4°C. El gel se corrió a 25 mA.

8.18-Electroforesis de segunda dimensión (2D-SDS-PAGE)

Después de una BN-PAGE las diferentes subunidades de los complejos respiratorios se resolvieron en una electroforesis en segunda dimensión en presencia de SDS. Se utilizaron geles desnaturizantes de tricina-SDS-PAGE.

Soluciones para un gel grande de tricina-SDS-PAGE

	Separador Acrilamida 15% (mL)	Concentrado Acrilamida 4% (mL)
Acrilamida 48.5% Bis-acrilamida 1.5 %	11.1	1
Amortiguador del gel 3x	12	4
Glicerol 80%	7.2	-
Agua destilada	5.7	7
TEMED	25 μ l	25 μ l
APS (10%)	150 μ l	100 μ l

Soluciones:

- Solución madre de acrilamida (100 mL): acrilamida al 48.5 % y 1.5 g bis-acrilamida al 1.5%,
- Amortiguador para el gel 3x: SDS 0.3% y Tris-HCl 3M pH 8.45
- Amortiguador del cátodo: Tris 1M, Tricina 1M, SDS 1%.
- Amortiguador del ánodo: Tris 1M pH 8.9

8.19-Inmuno réplicas tipo western blot

Las proteínas obtenidas del extracto total de levadura se separaron electroforéticamente en geles desnaturizantes (SDS-tricina-PAGE) al 15% de acrilamida (Schägger y cols. 2006). Se hicieron geles pequeños de 1.5 mm de espesor. Se utilizó 100 a 200 μ g de proteína por carril. El gel se corrió a 100 mA. Al finalizar la corrida, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa en una cámara húmeda a 350 mA durante 1 hora 30 minutos. Después se lavó la membrana dos veces con amortiguador TBS por 5 minutos y se bloqueó con 3% de gelatina en TBS por 5 horas. Posteriormente, se lavó la membrana dos veces con amortiguador TTBS por 5 minutos. Se añadió alguno de los anticuerpos primarios en una solución del 1% de gelatina en TTBS y se incubó de 1 a 8 horas dependiendo del anticuerpo. Luego se lavó la membrana dos veces por 5 minutos con TTBS. Posteriormente, dependiendo del caso, se incubó con el anticuerpo anti-conejo o anti-ratón acoplado a fosfatasa alcalina (de Sigma) a una dilución 1:3,000 en una solución de 1% de gelatina en TTBS y, se incubó por 3 horas. Se lavó dos veces con TTBS por 5 minutos. Para revelar la presencia de la proteína de interés se agregó a la

membrana 20 ml de una solución de revelado y posteriormente 200 µl de solución NBT y 200 µl de solución BCIP, se colocaron en agitación y se esperó hasta visualizar las bandas. Este método se utilizó para inmunodetectar proteínas de mitocondrias aisladas (Towbin y cols. 1979; Hawkes y cols. 1982).

Soluciones:

-Amortiguador de transferencia en cámara húmeda: 25 mM de Tris, 192 mM de glicina y metanol al 10%.

-Amortiguador de Tris (TBS): Tris-HCl 20 mM pH 7.5 con NaCl 0.5 M.

-Amortiguador de Tris y Tween (TTBS): Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 0.5 M, Tween-20 al 0.05%.

-Solución de revelado: NaHCO₃ 0.1 M, con MgCl₂ 1 mM, pH 9.8

-Solución de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP): 30 mg de BCIP en 4 ml de Dimetil formamida (DMF).

-Solución de cloruro nitro-azul de tetrazolio (NBT): 60 mg de NBT en 2.8 ml de DMF y 1.2 ml de Agua.

Lista de anticuerpos utilizados:

Anticuerpo primario	Dilución y tiempo de incubación	Anticuerpo secundario	Dilución y tiempo de incubación
anti-Cox1 humano	1:3,000 por 8 horas	Anti-ratón IgG acoplado a fosfatasa alcalina	1:3,000 por 2 horas
anti-Cox2 levadura	1:3,000 por 8 horas		
anti-Cox3 levadura	1:3,000 por 8 horas		
Anti-citrato sintasa levadura	1:1,000 por 1 hora	Anti-conejo IgG acoplado a fosfatasa alcalina	1:3,000 por 2 horas
Anti-proteína hierro-azufre de Rieske Bovino	1:5,000 por 8 horas		

9-RESULTADOS

9.1-Curva de crecimiento de la cepa complementada y determinación de la presencia de la subunidad Cox2 alotópica en mitocondrias aisladas.

Previamente se demostró que la subunidad Cox2 mitocondrial con la mutación puntual W56R expresada alotópicamente en una cepa $\Delta Cox2$ de *S. cerevisiae* recuperaba la función respiratoria en la levadura (Supekova y cols. 2010). Nosotros utilizamos este mismo modelo con un plásmido y una cepa de levadura diferentes para montar nuestro sistema y poder comprobar que la subunidad Cox2 con la mutación puntual W56R se encontraba ensamblada en el complejo enzimático. El primer paso fue la transformación de la cepa mutante NAB97 ($\Delta Cox2$) con la construcción del gen quimérico que contiene la MTS de Oxa1 y la proteína Cox2 con la mutación puntual W56R (MTSOxa1_Cox2W56R) en el vector pFL61. También se hicieron transformaciones control utilizando el vector vacío. A la construcción se le denominó $\Delta Cox2+Cox2^{W56R}$. Las cepas transformadas se crecieron en cajas de Petri con medio mínimo con rafinosa para seleccionar colonias con base en su auxotrofia al uracilo, es decir, aquellas células que crecían debían contener el plásmido. De estas cajas se seleccionaron varias colonias y se sembraron en forma ordenada en nuevas cajas. Posteriormente se hizo una réplica en otras cajas conteniendo un medio con una fuente de carbono no fermentable como es la mezcla etanol-glicerol (figura 8). Las células transformadas con el vector vacío, como era de esperarse, no crecieron en un medio de etanol-glicerol. Por su parte, la cepa complementada ($\Delta Cox2+Cox2^{W56R}$) si creció, indicando que había recuperado el fenotipo respiratorio. Fueron varias las transformantes $\Delta Cox2+Cox2^{W56R}$ que recuperaron el fenotipo respiratorio.

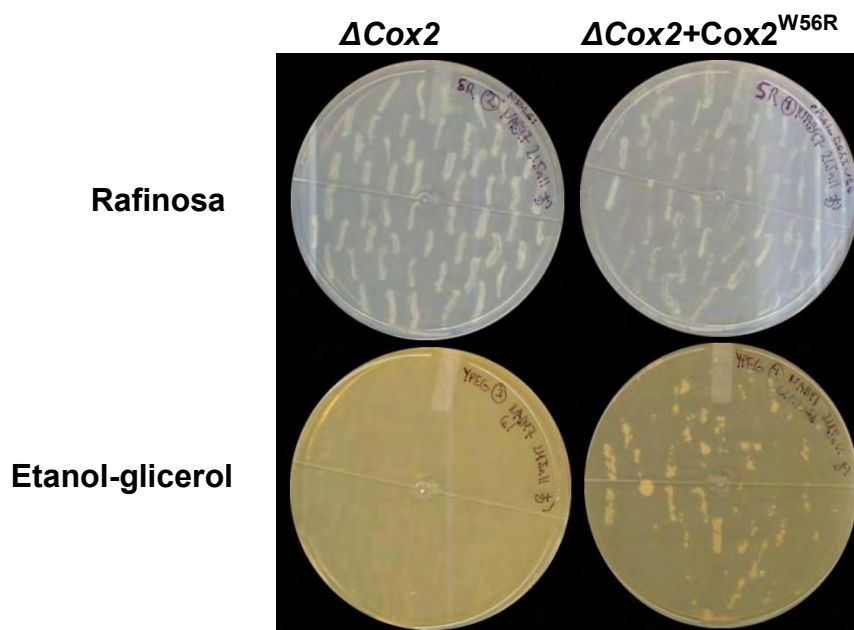


Figura 8. Recuperación del fenotipo respiratorio después de transformar a la cepa de levadura. Colonias seleccionadas (60 colonias aproximadamente) de la cepa mutante NAB97 ($\Delta Cox2$) después de ser transformada con el vector pFL61 (columna izquierda de la figura) y con la construcción que contiene al gen *COX2* con la mutación puntual W56R y la MTS de *OXA1* ($\Delta Cox2+Cox2^{W56R}$) como se muestra en la columna derecha de la figura. Las colonias seleccionadas se crecieron en medio mínimo con rafinosa (fila superior) y a los 5 días se retaron a medio respiratorio con etanol-glicerol (fila inferior).

El siguiente paso fue asegurarse de que la proteína $Cox2^{W56R}$ se expresaba en la levadura. Para esto se seleccionaron siete transformantes (A-G) y se crecieron en dos medios mínimos diferentes, conteniendo como fuente de carbono rafinosa y glucosa. A partir de estos cultivos se obtuvieron extractos totales y se inmunolocalizó a la proteína $Cox2^{W56R}$ con el anticuerpo anti-Cox2 de levadura (figura 9). Se observó una banda que corresponde a la proteína precursora $pCox2^{W56R}$, es decir, la $Cox2^{W56R}$ que todavía contiene a la MTS de Oxa1. Esta banda migra con una masa molecular aparentemente mayor a la proteína madura $Cox2^{WT}$, donde la letra "m" describe que es la proteína madura y, junto con el superíndice "WT" indica que es la cepa silvestre. Por su parte, la proteína madura $Cox2$ mutante, escrita como $mCox2^{W56R}$, donde la letra "m" describe a la proteína madura y el superíndice "W56R" describe a la cepa complementada, migra igual que su contraparte silvestre $mCox2^{WT}$. También se observó menos proteína precursora y procesada en las colonias crecidas en glucosa. Además, algunas colonias exhibían únicamente a la proteína precursora, indicando que algunas levaduras de la población transformada, no importaban y maduraban adecuadamente a la proteína $Cox2^{W56R}$.

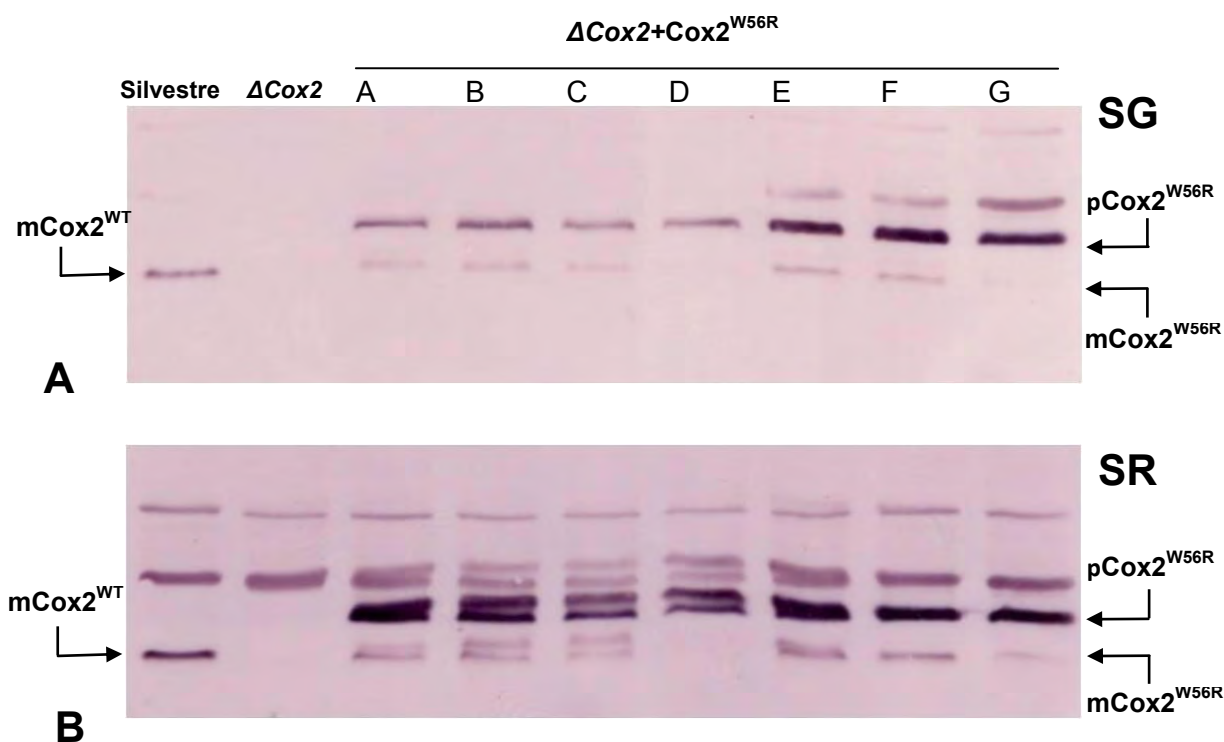


Figura 9. Presencia de la proteína Cox2 alotópica en las células de levadura. La figura muestra de izquierda a derecha las inmunorélicas tipo Western de diferentes extractos totales de las diferentes cepas, la cepa silvestre, la mutante (ΔCox2) y 7 colonias diferentes (A-G) de la cepa complementada ($\Delta\text{Cox2}+\text{Cox2}^{\text{W56R}}$). Las flechas indican la banda que corresponde a la proteína madura de la cepa silvestre (mCox2^{WT}), a la proteína precursora de la cepa complementada ($\text{pCox2}^{\text{W56R}}$) y a la proteína madura de la cepa complementada ($\text{mCox2}^{\text{W56R}}$). El panel A corresponde a las células crecidas en medio mínimo con glucosa (SG) y el panel B a las crecidas en rafinosa (SR). El rótulo de los carriles corresponde tanto al panel A como al panel B. Se cargaron 200 μg de proteína celular por carril, se utilizó el anticuerpo anti-Cox2 de levadura a una dilución 1:3,000 y se reveló por una hora.

Posteriormente se eligieron cuatro colonias de $\Delta\text{cox2}+\text{Cox2}^{\text{W56R}}$ (A, B, C y E). Se crecieron en lactato, un medio no fermentativo que induce la respiración de la célula, esperando obtener mayor acumulación de proteína Cox2 tanto precursora como procesada en estas condiciones. Se obtuvieron los extractos totales de las muestras correspondientes y se procesaron para llevar a cabo inmunorrélicas tipo Western con un anticuerpo anti-Cox2 de levadura. Se observó que en un sustrato respiratorio como el lactato se obtenían cantidades equivalentes de proteína precursora $\text{pCox2}^{\text{W56R}}$ y proteína editada $\text{mCox2}^{\text{W56R}}$ (figura 10).

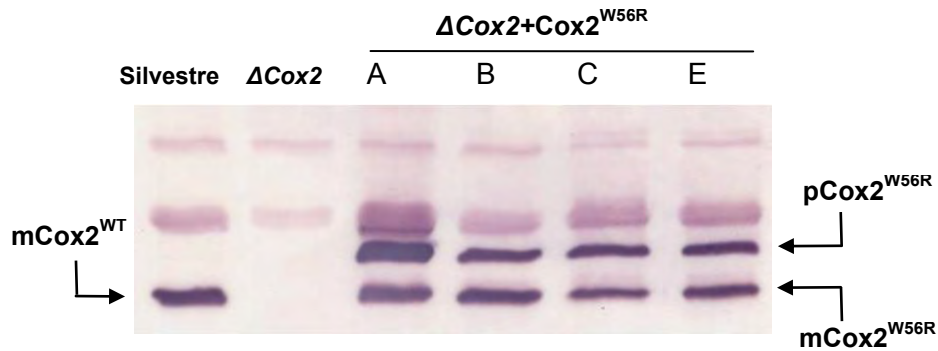


Figura 10. Presencia de la proteína Cox2^{W56R} alotópica en células crecidas en un medio con fuente de carbono no fermentativo. La figura muestra de izquierda a derecha la inmunorréplica tipo Western de los extractos totales de las diferentes cepas crecidas en un medio con lactato: la cepa silvestre, la mutante (Δ Cox2) y las colonias A, B, C y E de la cepa complementada (Δ Cox2+Cox2^{W56R}). Las flechas indican la banda que corresponde a la proteína madura de la cepa silvestre (mCox2^{WT}), a la proteína precursora de la cepa complementada (pCox2^{W56R}) y a la proteína madura de la cepa complementada (mCox2^{W56R}). Se cargaron al gel 200 μ g de proteína celular por carril. Se utilizó el anticuerpo anti-Cox2 de levadura a una dilución de 1:3,000 y se reveló por 1 hora.

Con la finalidad de tener una colonia con la cual hacer todos los experimentos, se decidió elegir a la cepa Cox2^{W56R} colonia "E". Esta colonia se creció en lactato y se observó su capacidad respiratoria cuantificando el consumo de oxígeno de las células completas (figura 11). Se observó que la cepa silvestre presentaba una velocidad de consumo de 16,080 ng atm O₂/min/mg y la cepa complementada de 7,680 ng atm O₂/min/mg, es decir únicamente el 47% con respecto a la silvestre. También se observó que la respiración de la mutante complementada Δ cox2+Cox2^{W56R} era completamente sensible a cianuro.

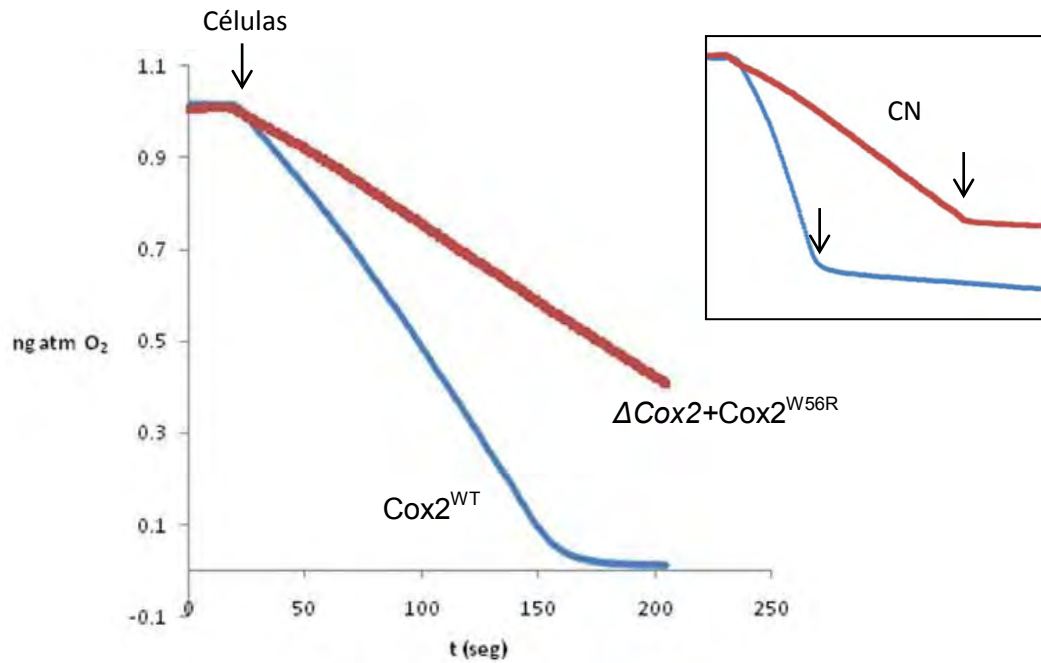


Figura 11. Consumo de oxígeno en células silvestres y en células complementadas con la proteína Cox2^{W56R}.

En la figura se muestra los trazos de consumo de oxígeno de la cepa silvestre Cox2^{WT} (línea azul) y de la cepa complementada (Δ Cox2+Cox2^{W56R}). Las células se crecieron en medio con lactato, se lavaron con agua y se colocaron en medio MES. Los datos se reportan en: ng atm O₂/min/mg. El recuadro de la derecha ilustra que los trazos obtenidos de consumo de oxígeno presentaron sensibilidad al cianuro (CN).

Hasta ese momento, los experimentos en célula completa mostraban que las levaduras complementadas respiraban, aunque menos que la cepa silvestre, y que las cantidades de proteína precursora y editada que se acumulaban eran diferentes cuando se crecían las células en diferentes fuentes de carbono. El siguiente paso fue evaluar si la proteína expresada se encontraba en el interior de la mitocondria. Con este fin, se aislaron mitocondrias y se llevaron a cabo inmunoréplicas tipo Western para identificar la presencia de la proteína Cox2^{W56R} utilizando un anticuerpo anti-Cox2 de levadura. Para este ensayo también se utilizaron anticuerpos anti-citrato-sintasa y anti-proteína hierro-azufre de Rieske como controles de carga (figura 12). Las mitocondrias utilizadas para este ensayo se crecieron en un medio mínimo con galactosa (SG), ya que este carbohidrato no inhibe la respiración en levadura como lo hace la glucosa y también nos permite crecer a la cepa mutante Δ cox2 para usarla como control. Como era de esperarse, en la cepa silvestre se observó la presencia de la subunidad Cox2 y la ausencia de esta en la cepa mutante Δ cox2 sin vector o transformada únicamente con el vector vacío. En las mitocondrias aisladas de la cepa

complementada se observó que la cantidad de proteína precursora se acumulaba en mayor cantidad que la proteína procesada. Además, los anticuerpos anti-citrato-sintasa y anti-Fe-S decoraron bandas con la misma intensidad en todas las muestras, indicando que se cargaron cantidades equivalentes de proteína mitocondrial en todos los carriles. Además, se realizó un análisis densitométrico de la membrana y se cuantificaron las bandas correspondientes a la proteína silvestre Cox2^{WT} y a la proteína alotópica Cox2^{W56R} en relación con la intensidad de banda de la citrato sintasa, encontrándose sólo un 44% de acumulación de la proteína complementada con respecto a la silvestre. El dato fue similar utilizando como referencia la intensidad de banda del complejo *bc*₁ que se marcó con el anti-Fe-S.

También se compararon los tiempos de duplicación de la cepa silvestre NB40 y de la cepa complementada Δ Cox2+Cox2^{W56R} (figura 13). Para este ensayo las células se crecieron en dos medios diferentes no fermentativos, etanol-glicerol y lactato. Para obtener los tiempos de duplicación se hicieron curvas de crecimiento siguiendo la densidad óptica del cultivo a una longitud de onda de 600 nm a través del tiempo (en horas). Los tiempos de duplicación de las cepas crecidas en etanol-glicerol fueron de 5.4 para la silvestre y 6.7 para la Δ Cox2+Cox2^{W56R} y en lactato de 5.0 y 6.1 para la silvestre y la Δ Cox2+Cox2^{W56R} respectivamente. Se observó que ambas cepas crecen de forma similar en ambos medios y que la cepa complementada presenta tiempos de duplicación ligeramente más grandes. Se concluyó que a pesar de que la cepa complementada parece tener menos Cox2 madura y presenta velocidades de consumo de oxígeno más bajas, su crecimiento no parece estar mayormente afectado.

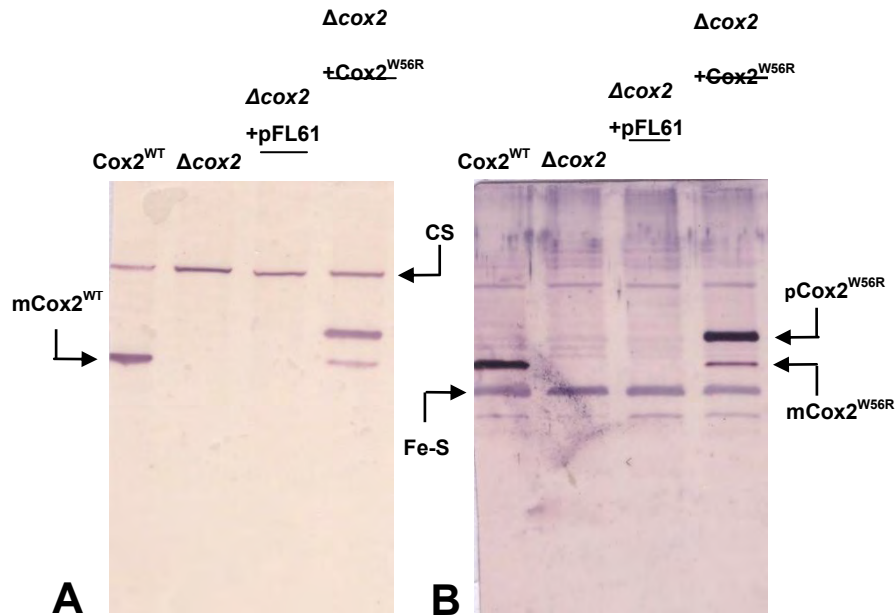


Figura 12. Presencia de la proteína $\text{Cox2}^{\text{W56R}}$ alotópica en mitocondrias aisladas de la cepa complementada.

En ambos paneles se muestra lo que corresponde a 100 μg de proteína mitocondrial por carril, de las cepas: silvestre Cox2^{WT} , mutante ΔCox2 , mutante con vector vacío $\Delta\text{Cox2} + \text{pFL61}$ y la cepa complementada $\Delta\text{Cox2} + \text{Cox2}^{\text{W56R}}$. Las membranas A y B se decoraron con el anticuerpo anti-Cox2 de levadura a una dilución 1:3,000. Las membranas se desnudaron con SDS y se decoraron de nuevo con un anticuerpo anti-citrato-sintasa (CS) de levadura a una dilución 1:1,000 (Panel A) y con un anticuerpo anti-proteína Fe-S (Fe-S) de bovino a una dilución 1:5,000 (Panel B). Las subunidades decoradas corresponden a la subunidad 2 silvestre (mCox2^{WT}), al precursor alotópico ($\text{pCox2}^{\text{W56R}}$) y a la subunidad mitocondrial alotópica ($\text{mCox2}^{\text{W56R}}$). Las células con que se obtuvieron estas mitocondrias se crecieron en medio de galactosa.

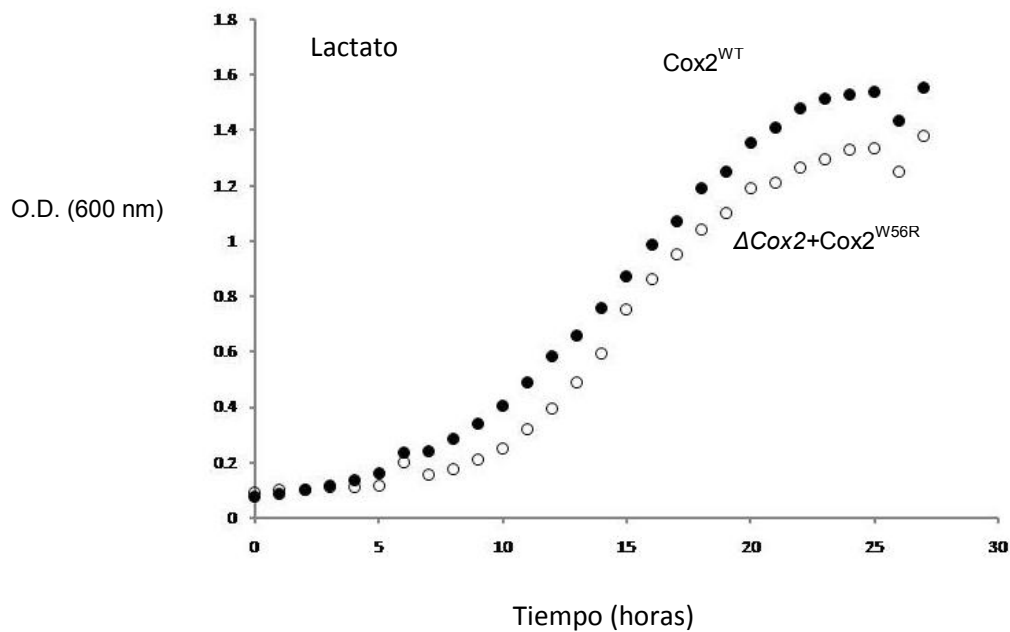
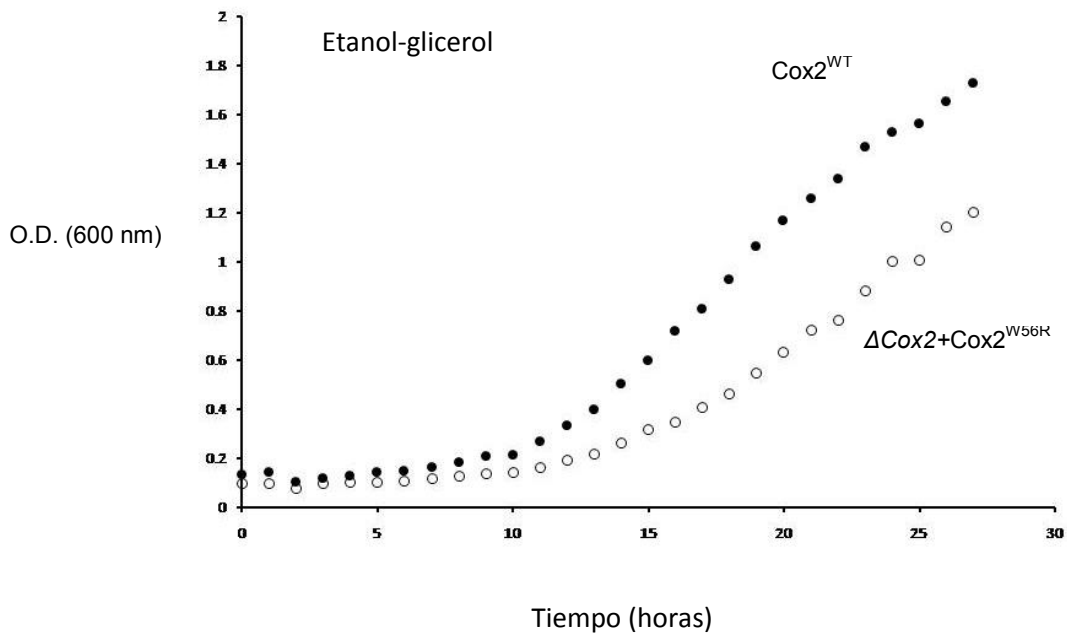


Figura 13. Curva de crecimiento de la cepa silvestre y de la cepa que expresa a la proteína $Cox2^{W56R}$ alotópica en medios respiratorios. La curva en puntos corresponde a la cepa silvestre $Cox2^{WT}$ y la curva con puntos vacíos corresponde a la cepa complementada $\Delta Cox2+Cox2^{W56R}$. La densidad óptica se determinó a una longitud de onda de 600 nm. Las mediciones sucesivas se llevaron a cabo durante 28 horas. Las levaduras se crecieron en medio con etanol-glicerol (panel superior) y en medio con lactato (panel inferior).

9.2-Actividad de la citocromo c oxidasa ensamblada con la subunidad Cox2^{W56R} expresada alotópicamente

Además de reconocer la presencia de la proteína expresada por técnicas inmunoquímicas y cuantificar la velocidad de consumo de oxígeno en célula completa, se procedió a hacer un ensayo de actividad de citocromo c oxidasa en geles nativos. Para este ensayo se utilizaron mitocondrias aisladas y solubilizadas. Estos geles nos permitieron hacer tinciones de actividad para la citocromo oxidasa y para la ATPasa (complejo V). Se observó que la actividad de la ATPasa en el gel, característica por la formación de un precipitado de color blanco, tenía la misma intensidad en las tres bandas del complejo V de las tres cepas: la silvestre, la mutante y la cepa complementada. Esto nos confirmaba que esta enzima no se encuentra afectada en nuestras cepas, e indica también que se cargaron en los geles cantidades equivalentes de proteína mitocondrial en cada carril. En cuanto a la actividad de oxidasa en gel, denotada por bandas de color rojo, se encontró una doble banda que corresponde a la forma monomérica de la enzima y una de masa molecular ligeramente menor que corresponde a una isoforma. Se observó que la intensidad de la banda de actividad de la oxidasa era solamente un 60% de aquella observada para la enzima silvestre. En el caso del carril en el cual se cargó la cepa Δcox2 , no se observó actividad de oxidasa, como era de esperarse (figura 14).

Además de evaluar la actividad de la citocromo c oxidasa, procedimos a cuantificar a los grupos hemo. Con este fin, se creció la cepa silvestre y la complementada en un medio con lactato para después aislar mitocondrias. Como control se utilizó a la cepa mutante Δcox2 . Como esta cepa es incapaz de crecer en un medio respiratorio, para poder aislar las mitocondrias se creció en un medio mínimo con galactosa. Las mitocondrias se solubilizaron con detergente y se centrifugaron. Posteriormente se analizaron los grupos hemos por espectrometría diferencial en un espectrofotómetro de doble rayo para determinar la relación entre las cantidades de citocromo c oxidasa (complejo IV) y de complejo bc_1 (complejo III). Para obtener los espectros correspondientes los grupos hemo fueron oxidados completamente con ferricianuro para registrar una línea base y posteriormente reducidos completamente en presencia de ditionita. Como se esperaba, la cepa mutante carecía del hemo tipo- aa_3 pero presentaba una concentración de complejo bc_1 de 160 pmoles de hemo b por mg de proteína. La cepa silvestre y complementada presentaron cantidades equivalentes de complejo bc_1 , 354 y 396 pmoles de hemo b por mg de proteína respectivamente. En

contraste, la cepa silvestre presentó una concentración de 266 pmoles de hemo aa_3 por mg de proteína, mientras que la complementada de 154 pmoles de hemo aa_3 por mg de proteína. La relación aa_3 /hemo b fue de 0.75 para la Silvestre y 0.38 para la complementada. Por lo tanto, ya que en la cepa complementada y en la silvestre la concentración de complejo bc1 era prácticamente idéntica, se corroboró con esta cuantificación espectroscópica que la cepa complementada tenía aproximadamente 40-50% menos de citocromo c oxidasa con respecto a la cepa silvestre (figura 15).

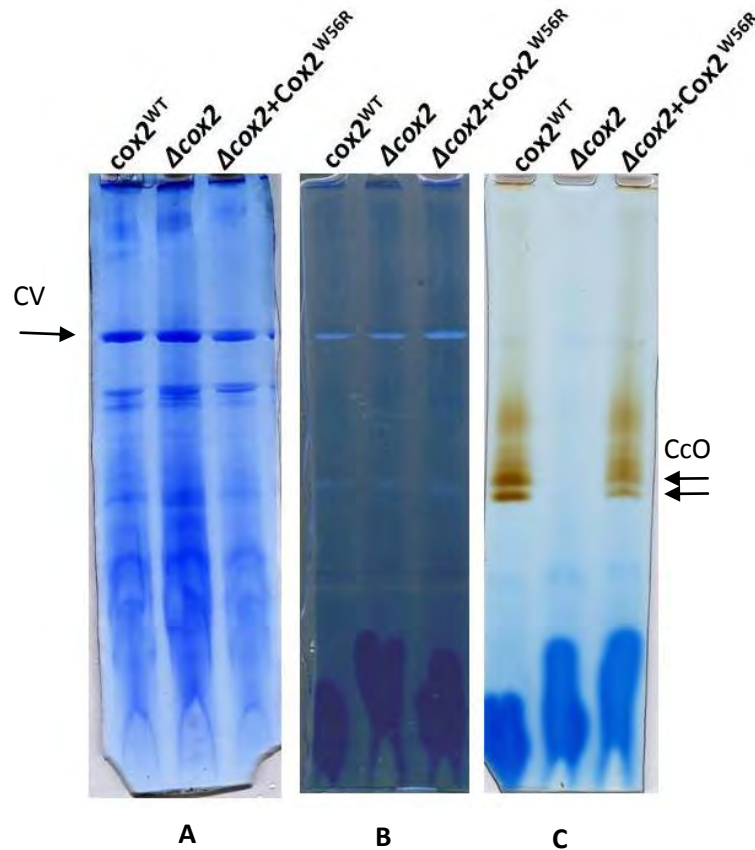


Figura 14. Actividad en gel de la citocromo c oxidasa nativa y de la enzima que contiene a la proteína $Cox2^{W56R}$ expresada alotópicamente. En los tres paneles se muestran geles nativos cargados con complejos respiratorios solubilizados con lauril maltósido. Las mitocondrias corresponden a la cepa silvestre $Cox2^{WT}$, a la cepa mutante $\Delta Cox2$ y a la cepa complementada $\Delta Cox2+Cox2^{W56R}$. En el panel A se muestra un gel teñido con azul de Coomassie. En el panel B un gel revelado para detectar actividad de ATPasa y en el panel C un gel revelado para detectar la actividad de oxidasa. Se denota a que altura del tamiz migra el complejo V (CV) y la citocromo c oxidasa (CcO). La actividad de ATPasa se denota por el color blanco y la de oxidasa por el color rojo. Las mitocondrias utilizadas en este ensayo se crecieron en un medio con lactato. El complejo V migra como una banda de aproximadamente 600 kDa como monómero (Schägger y cols. 2000).

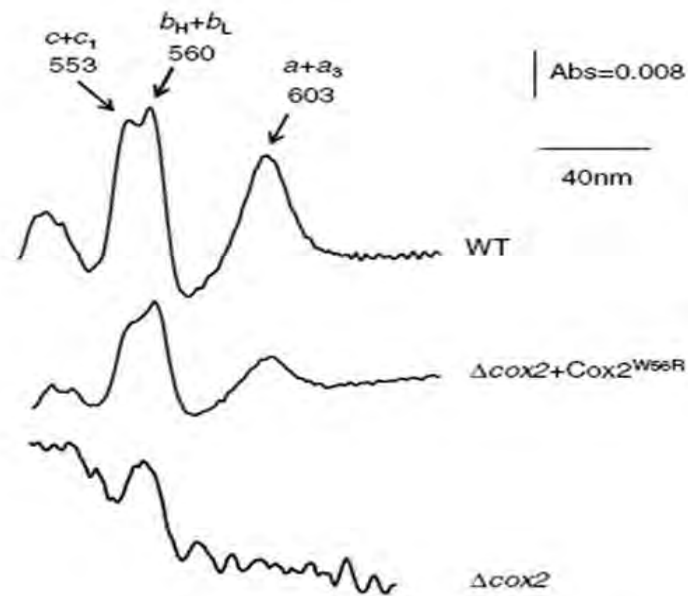


Figura 15. Espectro visible de las mitocondrias de levadura solubilizadas con detergente. Los espectros diferenciales (ditionita menos ferricianuro) se obtuvieron de los sobrenadantes obtenidos a partir de 400 μg de mitocondrias solubilizadas con lauril maltósido de las cepas silvestre Cox2^{WT} , mutante Δcox2 y complementada $\Delta\text{cox2}+\text{Cox2}^{\text{W56R}}$. Se cuantificaron solamente los sobrenadantes con las proteínas solubilizadas.

Se procedió a purificar a la citocromo c oxidasa de las distintas cepas para poder llevar a cabo experimentos adicionales. En uno de ellos se midió el consumo de oxígeno de las enzimas aisladas en presencia de ascorbato-TMPD y de citocromo c reducido de levadura (100 μM), el donador natural de electrones de la oxidasa. La actividad específica fue de 6.4 y 4.8 ngat O/nmol aa_3 /min para la enzima de la cepa silvestre y para la complementada, respectivamente. El mismo ensayo se realizó con 100 μM de citocromo c reducido de corazón de caballo y la actividad fue de 9.2 y 7.4 ngat O/nmol aa_3 /min para la cepa silvestre y la cepa complementada respectivamente. Concluimos que la cepa complementada tiene un 75-80% de actividad respecto a la silvestre. Este resultado sugiere fuertemente que la enzima que contiene a la subunidad Cox2 expresada alotópicamente tiene una actividad semejante al de la enzima silvestre y que, por lo tanto, la presencia de la mutación W56R no parece alterar sustancialmente la actividad del complejo. También sugirió que la menor capacidad respiratoria de la cepa complementada no se debe a que la enzima tenga una actividad disminuida, sino a que probablemente existen menos complejos de citocromo c oxidasa ensamblados.

También se analizó el perfil electroforético de las enzimas aisladas en geles desnaturizantes (SDS-tricina-PAGE). Ambos complejos (el nativo y el complementado con Cox2^{W56R}) mostraron tener una composición polipeptídica muy semejante. En inmunorréplicas tipo Western, se utilizaron anticuerpos específicos contra las subunidades Cox1, Cox2 y Cox3 para confirmar la presencia de estas tres subunidades y para poder identificar sin ambigüedades a la subunidad Cox2 (figura 16).

Uno de nuestros propósitos principales era el de identificar la presencia de la mutación puntual W56R en la enzima complementada con la proteína Cox2 alotópica, ya que consideramos que esta es una prueba irrefutable de su integración funcional al complejo de la citocromo oxidasa. Con este fin, se cortaron de un gel las bandas correspondientes a la Cox2 silvestre y a la Cox2^{W56R}, se tripsinizaron, y se sometieron a un análisis por espectrometría de masas. Como era de esperarse, una gran parte de los fragmentos tripticos identificados fueron idénticos en ambas proteínas. Sin embargo, se identificó el péptido MLYTIVMTY en la Cox2^{W56R}, el cual no se generó en la proteólisis de la Cox2 silvestre. Este resultado sugiere fuertemente la presencia del residuo R₅₆ en la proteína Cox2^{W56R}, el cual genera un nuevo sitio de corte para la tripsina. En contraste, la cepa silvestre, que contiene un triptófano en la misma posición, no permite que la tripsina genere el péptido MLYTIVMTY (figura 17). Consideramos que este resultado sugiere fuertemente que la proteína Cox2^{W56R} se encuentra integrada a la citocromo c oxidasa de la cepa complementada.

A pesar de que los polipéptidos de Cox2^{WT} y Cox2^{W56R} muestran masas moleculares muy semejantes a juzgar por sus moviidades electroforéticas en geles desnaturizantes, quisimos conocer con precisión si ambas presentan la misma secuencia amino terminal, con el fin de determinar si el procesamiento de ambas proteínas es semejante. Para ello, los polipéptidos fueron transferidos a una membrana de PVDF (difluoruro de polivinilo) para secuenciar la región N-terminal de la proteína por degradación de Edman. La secuencia N-terminal de la Cox2^{W56R} fue DVPTPYACYF y el de la proteína de la cepa silvestre DVPTPYACYFQD. Este resultado nos indica que tanto la subunidad Cox2 expresada alotópicamente como la Cox2 silvestre son procesadas de la misma manera, perdiendo ambas la misma presecuencia de 15 residuos. Cabe recordar aquí que el precursor de la Cox2 mitocondrial silvestre se sintetiza con una presecuencia de 15 residuos en el extremo N-terminal. Dicha presecuencia parece ser necesaria para la biogénesis de la proteína, ya que es procesada por una proteasa del espacio intermembranal, la cual elimina

dicha presecuencia una vez que el extremo amino terminal de Cox2 fue translocado a través de la membrana interna. Por su parte, la proteína Cox2^{W56R} sintetizada en el citosol cuenta tanto con la MTS de Oxa1 como con la presecuencia mitocondrial de 15 residuos. Probablemente, cuando la proteína ingresa a la matriz mitocondrial, se elimina la MTS, y una vez que se transloca el extremo N-terminal hacia el espacio intermembranal, se procesa la presecuencia de 15 residuos.

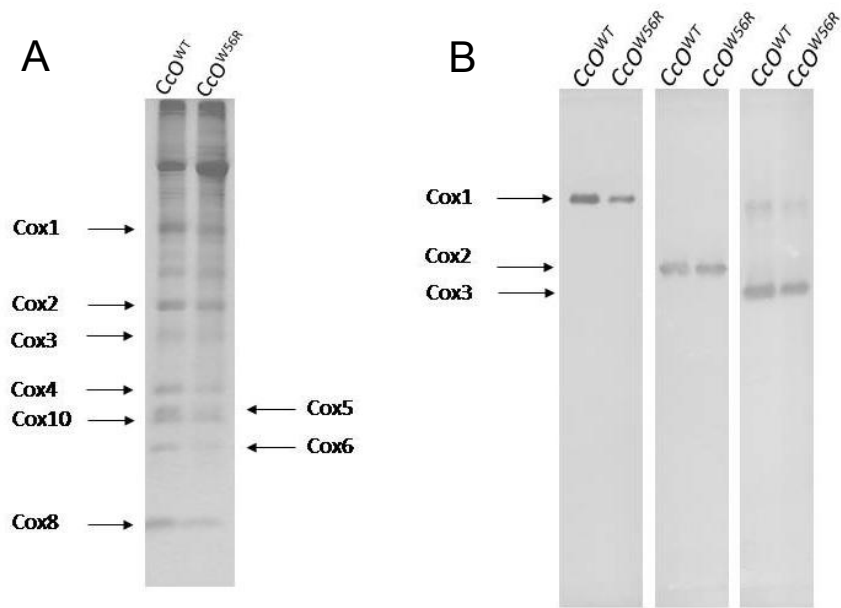


Figura 16. Identificación de la composición polipeptídica las enzimas puras (citocromo oxidasa silvestre y complementada con Cox2^{W56R}). En el panel A se muestra la composición similar de subunidades entre las enzimas CcO^{WT} y la CcO^{W56R} en un gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. En el panel B se muestra la inmunolocalización tipo Western de las subunidades Cox1, Cox2 y Cox3 en las dos enzimas, CcO^{WT} y CcO^{W56R}.

Secuencia de la COX2^{WT} digerida con tripsina

DVPTPYACYFQDSATPNQEGILELHDNIMFYLLVILGLVS **W**₅₆MLYTIVMTYSK↓NP
IAYK↓YIK↓HGQTIEVIWTIFPAVILLIIAFPSFILLYLCDEVISPAMTIK↓AIGYQWYW
K↓YEYSDFINDSGETVEFESYVIPDELLEEGQLR↓LLDTDTSMVVPVDTHIR↓FVVTA
ADVIHDEFAIPSLGIK↓VDATPGR↓LNQVSALIQR↓EGVFYGACSELCGTGHANMPIK↓I
EAVSLPK↓FLEWLNEQ

Secuencia de la COX2^{W56R} digerida con tripsina

DVPTPYACYFQDSATPNQEGILELHDNIMFYLLVILGLVS **R**₅₆MLYTIVMTYSK↓NP
IAYK↓YIK↓HGQTIEVIWTIFPAVILLIIAFPSFILLYLCDEVISPAMTIK↓AIGYQWYW↓
K↓YEYSDFINDSGETVEFESYVIPDELLEEGQLR↓LLD↓TD↓TSMVVPVD↓THIR↓FVVTA
ADVIHDEFAIPSLGIK↓VDATPGR↓LNQVSALIQR↓EGVFYGACSELCGTGHANMPIK↓I
EAVSLPK↓FLEWLNEQ

Figura 17. Presencia de la mutación W56R en la CcO alotópica. Composición de polipéptidos de la subunidad Cox2^{WT} y Cox2^{W56R} después de un tratamiento con tripsina y su análisis por espectrometría de masas. Las flechas indican los posibles sitios de corte de la tripsina. La doble línea subrayando indica los polipéptidos identificados. W56 y R56 son los residuos involucrados en la mutación puntual W56R. Los residuos sombreados en gris corresponden al polipéptido generado por tripsinólisis debido a la presencia del residuo R56 en la mutante Cox2^{W56R}.

9.3-Regulación de la biogénesis de la citocromo c oxidasa por la subunidad Cox1 en presencia de la subunidad Cox2 expresada alotópicamente.

En *S. cerevisiae*, como en la gran mayoría de las células eucariontes, la subunidad Cox1 se encuentra codificada en el genoma mitocondrial junto con Cox2 y Cox3, mientras que los genes de las ocho subunidades restantes se encuentran localizados en el genoma nuclear. Cox1, la subunidad de mayor tamaño y con mayor número de cruces transmembranales, actúa como el núcleo central en el ensamblaje del complejo y su síntesis depende de la disponibilidad de las otras subunidades (Herrmann y cols. 2005; Pierrel y cols. 2007; Shingú-Vázquez y cols. 2010; Mick y cols. 2011). Así, en una mutante Δcox2 , Cox1 regula su propia biogénesis, inhibiendo su propia síntesis. Para conocer el comportamiento de la subunidad Cox1 en presencia de la subunidad Cox2^{W56R} expresada alotópicamente, se hicieron experimentos de pulso y caza. Con este fin, se incubaron pequeños cultivos de levadura en presencia de cicloheximida para inhibir la síntesis de proteínas citosólicas (Schneider-Poetsch y cols. 2010). Posteriormente, los cultivos se incubaron con metionina marcada radioactivamente con el fin de poder identificar a los polipéptidos generados en el interior de la mitocondria, cuya síntesis no es afectada por la cicloheximida. Posteriormente, se aislaron mitocondrias en pequeña escala y las proteínas se analizaron por SDS-PAGE, el gel se expuso a una pantalla de fósforo que detecta la emisión de la marca radioactiva de los polipéptidos. El objetivo de este tipo de ensayos es ver solo la marca correspondiente a la síntesis de proteínas mitocondriales y seguir en el tiempo el destino de las proteínas marcadas (figura 18). Se observó que la subunidad Cox1 mitocondrial se sintetiza normalmente en una cepa silvestre. Por el contrario, en una cepa ΔCox2 la síntesis de Cox1 disminuye considerablemente, debido a la autorregulación de la biogénesis arriba descrita debida a la ausencia de Cox2. Finalmente, la cantidad de subunidad Cox2^{W56R} expresada alotópicamente que se acumuló en el interior de la mitocondria antes de colocar la cicloheximida, es suficiente para observar una acumulación normal de Cox1. Lo anterior indica que Cox1 se acumula en niveles normales cuando la subunidad Cox2 está presente, independientemente del origen de ésta última, es decir, independientemente de que la proteína se haya sintetizado en la mitocondria o en el citosol.

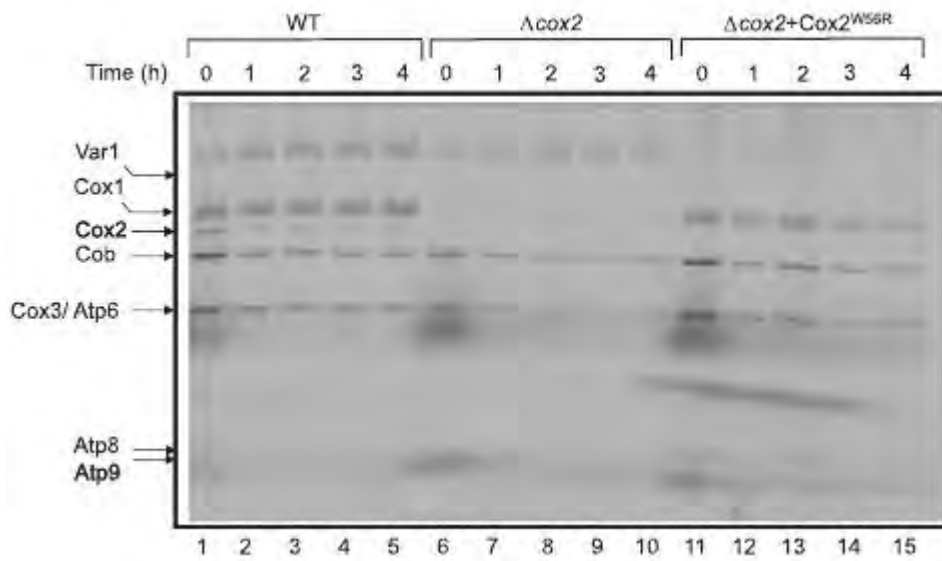


Figura 18. Síntesis normal de Cox1 en presencia de la Cox2^{W56R} alotópica. En la imagen se muestra la acumulación de las proteínas sintetizadas en la mitocondria de las cepas WT, Δcox2 y $\Delta\text{cox2}+\text{Cox2}^{\text{W56R}}$ (carriles 1-5, 6-10 y 11-15 respectivamente). Se indica la identidad de las diferentes proteínas mitocondriales. Se observa que la proteína Cox1 se acumula normalmente y es estable durante 4 horas tanto en la cepa silvestre como en la cepa complementada, mientras que está ausente en la mutante que contiene al vector vacío.

10-Discusión

En la mayoría de los organismos eucariontes el gen *COX2* se encuentra localizado en el ADN mitocondrial; solo en ciertas algas clorofíceas, en leguminosas como la soya y en parásitos apicomplejos se encuentra codificado en el genoma nuclear. Además, en las algas y los parásitos, el gen *COX2* se separó en dos genes, el *COX2A* y el *COX2B*. El gen *COX2* mitocondrial probablemente se fragmentó en dos secciones las cuales migraron independientemente al núcleo en estos organismos. Se cree que acompañando este fenómeno, hubo una disminución de la hidrofobicidad promedio de las proteínas, lo que facilitó la importación de los dos polipéptidos *Cox2a* y *Cox2b* a la mitocondria (Pérez-Martínez y cols. 2001; Funes y cols. 2002b; Jiménez-Suárez y cols. 2012). Otros ejemplos de genes mitocondriales que migraron al núcleo en algas son aquellos que codifican para las subunidades *Cox3*, *Atp6*, *Nad3* y *Nad4L* que son proteínas menos hidrofóbicas que sus homólogos mitocondriales (Pérez-Martínez y cols. 2000; Funes y cols. 2002a; Cardol y cols. 2006).

Diferentes grupos han intentado imitar la migración natural de genes mitocondriales al núcleo diseñando proteínas menos hidrofóbicas que se sintetizan en el citosol y se internalizan en la mitocondria. Tal es el caso de la síntesis *in vitro* de la proteína *Cox2* de soya, en donde se cambiaron artificialmente dos aminoácidos hidrofóbicos por otros más hidrofílicos en el primer cruce transmembranal. Este cambio, fue suficiente para disminuir la hidrofobicidad promedio del primer cruce, lo que a su vez permitió la importación de la proteína a la mitocondria *in vitro* (Braun y cols. 2009). Otro modelo han buscado llevar a cabo expresión alotópica *in vivo*. Por ejemplo, después del exitoso experimento pionero de expresión alotópica de la proteína madurasa de la matriz mitocondrial fusionada a la MTS de *atp9* de *N. crassa* del grupo de Banroques y colaboradores (Banroques y cols. 1986), el grupo de Nagley, utilizando la misma MTS, expresó alotópicamente el gen *atp8* de la ATP sintasa de manera exitosa en levadura, comprobando que la proteína se importaba hasta la matriz mitocondrial y se ensamblaba con el complejo de la ATP sintasa. Este fue el primer ejemplo de expresión alotópica de un gen que codifica para una proteína de membrana de un solo cruce transmembranal (Nagley y cols. 1988; Law y cols. 1990). Los trabajos de Nagley y la teoría propuesta originalmente por Popot y Vitry en 1990 sobre la importancia de la disminución de la hidrofobicidad promedio para que una proteína pueda ser importada a la mitocondria, han sido cruciales para el diseño de genes para expresarlos alotópicamente (Popot y cols. 1990; Nero y cols. 1990).

Otro ejemplo de intento de expresión alotópica fue el del gen *atp9* de levadura, donde la proteína resultante contiene dos cruces transmembranales. En este caso, no fue posible recuperar el fenotipo respiratorio, ni se encontró a la proteína ensamblada en el complejo V (Farrel y cols. 1998). Más recientemente, ha sido posible relocalizar al gen *ATP9* en levadura, al expresar heterológicamente el gen *ATP9* de *Podospora anserina* en *Saccharomyces cerevisiae*. Estos experimentos revelaron que las construcciones quiméricas con la proteína *Atp9* de *P. anserina* pueden internarse correctamente en la mitocondria gracias a la hidrofobicidad reducida del primer cruce transmembranal (Bietenhader y cols. 2012). Como ya se indicó a lo largo de este trabajo, el grupo de Supekova y colaboradores logró expresar alotópicamente el gen *COX2* de levadura con tan solo una mutación puntual que causó el cambio de un residuo en el primer cruce transmembranal de la proteína correspondiente (*W56R*). Esta mutación disminuyó la hidrofobicidad promedio del alfa-hélice, permitiendo la recuperación de la respiración en células mutantes de levadura carentes del gen *COX2* mitocondrial funcional (Supekova y cols. 2010). La hidrofobicidad promedio del primer cruce transmembranal de *Cox2^{WT}* comparada con la de la mutante *Cox2^{W56R}* y calculada con base a la escala de Kyte y Doolittle (1982) disminuye de 2.008 a 1.858. En contraste, el segundo cruce transmembranal de *Cox2^{WT}* presenta una hidrofobicidad promedio de 2.250. En este trabajo, a diferencia del de Supekova y colaboradores (2010), se utilizó una cepa Δ *cox2* y un vector diferente, aunque usamos el mismo gen *COX2W56R*. Obtuvimos los mismos resultados en cuanto a la complementación y recuperación del fenotipo respiratorio de la cepa complementada, indicando que este trabajo es reproducible. También fueron consistentes las cantidades de proteína en extractos totales de levadura crecidas en medio respiratorio, ya que las cantidades de proteína precursora (*pCox2^{W56R}*) y madura (*mCox2^{W56R}*) fueron similares a las reportadas por Supekova y colaboradores (2010). En los experimentos con galactosa, se observó que esta fuente de carbono promueve que la acumulación de la proteína precursora sea mucho mayor que el de la proteína madura. Esto podría deberse a que la galactosa es una fuente de carbono fermentable. En estas condiciones, parece haber una cantidad importante de proteína precursora en el citosol que se acumula y que no es importada (o procesada adecuadamente) en la mitocondria. En cuanto a los experimentos con mitocondrias aisladas obtenidas de cultivos en medio con lactato, la acumulación de la proteína madura *mCox2^{W56R}* en la mutante es casi la mitad de la acumulación de la proteína *mCox2^{WT}* en la cepa silvestre, similar a la que encontraron Supekova y colaboradores

(2010). Aunque solo una fracción del precursor se procesa a la forma madura mCox2^{W56R}, la cantidad es suficiente para ensamblar a la citocromo c oxidasa, recuperar el fenotipo respiratorio y permitir el crecimiento de la levadura. Esto podría explicar también el retraso en el tiempo de duplicación que tiene la cepa complementada con respecto a la cepa silvestre y el consumo de oxígeno más lento que presenta la cepa complementada con respecto a la silvestre. En cuanto a la presencia en gran cantidad de la proteína precursora en mitocondrias aisladas podría deberse a que parte de la proteína se queda atrapada en alguna de las membranas mitocondriales o bien que su procesamiento es muy lento. Desafortunadamente en el trabajo de Supekova y colaboradores (2010) no cuantificaron las relaciones precursor/proteína madura en sus preparaciones mitocondriales.

En todos los ensayos donde se intentó cuantificar a la citocromo c oxidasa, la actividad en gel y la estimación del contenido de hemos aa₃, se encontraron proporciones 40% menores de citocromo oxidasa en la cepa complementada al compararla con la silvestre. Dado que para estos ensayos las concentraciones de proteína utilizada fueron equivalentes, concluimos que en la cepa complementada hay menos citocromo oxidasa (CcOW56R) ensamblada. Observamos una acumulación alta de proteína Cox2 precursora en el citosol cuando se analizaron extractos crudos de levadura, pero también se observó una alta acumulación del precursor en mitocondrias aisladas. Esto sugiere que el precursor probablemente si se está internalizando en la mitocondria, pero que su translocación es un paso limitante en su biogénesis. Parecería que solamente una parte de la población de la proteína Cox2^{W56R} se vuelve accesible a la proteasa de matriz mitocondrial que procesa la MTS. Otra explicación puede ser que parte de la proteína Cox2^{W56R} sea degradada por proteasas mitocondriales antes de que madure y logre ensamblarse en el complejo. Pensamos que en todo caso, el ensamblaje de la proteína expresada alotópicamente es el paso limitante en todo el proceso de biogénesis de la subunidad Cox2 alotópica.

En los experimentos de velocidades de consumo de oxígeno con la enzima en presencia de citocromo c, la enzima CoCW56R presentó entre el 75 y el 80% de la actividad de la enzima silvestre. Esto indica que la mutación W56R, por sí sola, no parece alterar de manera importante la actividad enzimática del complejo. Es por esto que pensamos que la mutación afecta negativamente el ensamblaje del complejo. Así, la cepa complementada acumula solamente un 60% de citocromo c oxidasa en comparación a la cepa silvestre. Algo similar observó el equipo de Phillip Nagley

(1999) al cambiar dos aminoácidos hidrofóbicos por dos con carga negativa en la región central del cruce transmembranal de la Atp8. Observaron una disminución de la actividad de ATP sintasa, sugiriendo que al disminuir la hidrofobicidad promedio de la proteína se puede alterar la interacción con las demás subunidades del complejo, afectando la función de la enzima (Roucou y cols. 1999).

En el caso de la mutación W56R, ésta introduce una carga positiva en el primer cruce transmembranal de la proteína Cox2. Para observar la posición de esta carga en la citocromo oxidasa, construimos un modelo de la CcO de levadura basado en la estructura cristalográfica de la CcO de bovino. Encontramos que en la proteína nativa, el residuo W56 está expuesto hacia la leucina 24 de la subunidad Cox7a, la cual interactúa directamente con el primer cruce transmembranal de Cox2 (figura 7 del artículo del apéndice 3). La inclusión de una carga positiva con la sustitución W56R debe alterar esta interacción de una forma que no conocemos. La presencia de la arginina 56 posiblemente induce cambios conformacionales en el complejo que disminuyen su estabilidad. Esto podría explicar porque se acumula también 40% menos supercomplejo en la cepa que expresa alotópicamente a Cox2^{W56R}. Utilizando geles azules nativos en presencia del detergente digitonina, encontramos que se acumula menos supercomplejo III-IV₂, el cual se forma por la interacción entre CcO y el complejo bc1. Dado que se acumula menos CcO en la cepa complementada, probablemente se empiezan a formar supercomplejos una vez que se acumularon cantidades suficientes de Cco libre. Un experimento que nos podría permitir entender el papel de la mutación W56R en el ensamblaje, sería la cuantificación de CcO en un sistema que exprese a la proteína Cox2^{W56R} directamente en la mitocondria. Así, la proteína mutada se ensamblaría cotraduccionalmente en la membrana y no estaría expuesta a la hidrólisis por las proteasas mitocondriales que degradan a proteínas mal ensambladas o que tardan mucho en ensamblarse.

El ensamblaje de la citocromo c oxidasa es un proceso ordenado que se inicia con la subunidad Cox1 como núcleo del ensamblaje. Posteriormente se ensamblan en torno a Cox1 las demás subunidades y los cofactores correspondientes (Horan y cols. 2005; Nijtmans y cols. 1998). En cepas de levaduras mutantes donde se bloquea intencionalmente la biogénesis de la citocromo c oxidasa, la síntesis de la subunidad Cox1 se ve disminuida, lo que indica el papel autorregulatorio de esta subunidad en su propia biogénesis (Pérez-Martínez y cols. 2003; Barrientos y cols. 2004). En los experimentos de pulso y caza se observó la disminución en la expresión de la

subunidad Cox1 en la cepa Δ Cox2. Al no expresarse la proteína Cox2 no se ensambla el complejo, por lo que Cox1 autorregula su propia expresión, la cual disminuye drásticamente. Sin embargo, en la cepa Δ Cox2 complementada alotópicamente con el gen *COX2W56R*, la síntesis de Cox1 se restaura casi a niveles normales, lo cual indica que sin importar su origen (mitocondrial o citosólico), la sola presencia de la subunidad Cox2 es suficiente para que se sintetice Cox1 en niveles normales.

Posiblemente en la proteína Cox2^{W56R} el cambio de un triptófano por una arginina es suficiente para disminuir la hidrofobicidad promedio en el primer cruce transmembranal, lo que le permite a la proteína ser importada por el translocador de proteínas Tim23 (Qualmann y cols. 2003) a través de la membrana interna mitocondrial hasta la matriz mitocondrial. Es necesario hacer notar que no se requirió disminuir la hidrofobicidad promedio del segundo cruce transmembranal. Es posible que esto sea así debido al mecanismo a través del cual la proteína alotópica se inserta en la membrana. El primer cruce debe ser translocado completamente hasta la matriz mitocondrial, para de ahí ser redirigido a través de la membrana probablemente por la proteína Oxa1. El segundo cruce transmembranal, que es más hidrofóbico, puede ser retenido por el translocador y ser insertado directamente a la membrana de manera lateral.

Uno de los objetivos de la expresión alotópica es conocer los mecanismos de importación, procesamiento y ensamblaje de la proteína sintetizada. Parte de este conocimiento está dirigido al desarrollo de terapias génicas para enfermedades mitocondriales humanas. En este sentido, la levadura ha demostrado ser un modelo eficiente. Sin embargo, es necesario hacer notar que existen otro tipo de modelos, como el de Guy y colaboradores (2009), donde expresaron alotópicamente el gen *nd4* que codifica para la subunidad ND4 del complejo I mitocondrial. Ellos utilizaron un modelo de cíbridos (híbridos citoplasmáticos), los cuales se obtienen de la fusión de una célula enucleada (eliminando el núcleo con citocalasina B), con otra a la cual se le eliminó el ADN mitocondrial (después de tratamientos crónicos con bromuro de etidio) (King y cols. 1989). Normalmente se forman estos cíbridos con fibroblastos enucleados de un paciente que contienen el ADN mitocondrial mutado que son fusionados a una línea celular inmortalizada (por ejemplo, células HeLa). Los cíbridos utilizados contenían el gen *nad4* con una mutación que produce un cambio en la proteína de una arginina por una histidina, mutación relacionada con la enfermedad de LHON (del inglés, Neuropatía óptica hereditaria de Leber), en la cual los pacientes que la sufren pierden la visión. De esta forma por medio de microscopía confocal,

inmunolocalizaron a la proteína ND4 en la mitocondria concluyendo que ésta se importaba eficientemente (Guy y cols. 2009). Dada la importancia de la enfermedad de LHON por producir ceguera por daño a la retina, el grupo de Corral-Debrinski logró desarrollar un modelo en rata, donde introdujeron directamente por electroporación en el ojo el gen dañado *nd4* de humano fusionado con la secuencia nucleotídica de la MTS del gen *COX10*, logrando reproducir el daño a la retina y posteriormente contrarrestarlo al introducir el gen *nd4* sin la mutación. Sus evidencias fueron corroboradas con ensayos fisiológicos donde evaluaron la visión de los ratones y con experimentos de inmunolocalización por microscopía confocal. De esta manera, concluyeron que la proteína ND4 se encontraba efectivamente en el interior de las mitocondrias. Los autores remarcaron, a partir de este modelo *in vivo*, la necesidad de iniciar ensayos en humanos (Ellouze y cols. 2008). De un modo similar, el equipo de Guy y colaboradores (2009) reprodujo un modelo parecido de la enfermedad de LHON en ratón (Qi y cols. 2007; Guy y cols. 2009) y observaron que al expresar alotópicamente el gen *nd4* con la mutación, se producían los síntomas de LHON y que al expresar el gen sin la mutación se detenía el daño a la retina. Este mismo grupo reprodujo su experimento en macacos, inmunolocalizando a la proteína por microscopía confocal (Koilkonda y cols. 2009). En 2010 estos trabajos llevaron a Guy y colaboradores a proponer ensayos clínicos en humanos, identificando a los candidatos con enfermedad de LHON para tratarlos por medio de terapia génica introduciendo el gen *nd4* normal en las retinas de los pacientes. Hasta el momento sólo tienen a los candidatos pero aún no publican los resultados (Lam y cols. 2010). Nosotros interpretamos críticamente estos resultados, y consideramos que son necesarias un mayor número de pruebas bioquímicas que muestren fehacientemente que la proteína ND4, que contiene entre 10 y 15 cruces transmembranales, se haya ensamblado correctamente en el complejo I mitocondrial. Aunque ejemplos de expresión alotópica han sido ampliamente demostrados en levadura, la evidencia presentada con modelos celulares y animales es incompleta y dudosa (Perales-Clemente y cols. 2011). La mayoría de las evidencias mostradas son por la complementación del fenotipo, por inmunolocalización de la proteína en la mitocondria, o por pruebas de carácter fisiológico en el caso de los modelos de roedor. Sin embargo, en la mayoría de los casos, no se ha demostrado la presencia de la proteína en el complejo de interés. Consideramos que es riesgoso que, con estas evidencias poco robustas, algunos autores hayan ido tan lejos como para proponer iniciar ensayos clínicos en humanos.

Consideramos que este es el primer trabajo donde se caracteriza bioquímicamente la expresión alotópica de una proteína de dos cruces transmembranales. Además, experimentos como los de pulso y caza permiten corroborar que el efecto esperado de la expresión alotópica no se debe a otros mecanismos como el de una reversión de la mutación mitocondrial, es decir, descartamos que la mutante $\Delta Cox2$ hubiera reactivado la expresión de la proteína Cox2 mitocondrial por algún mecanismo desconocido. Muchos experimentos de expresión alotópica reportados en la literatura aportan únicamente evidencia circunstancial. En este trabajo, se caracterizó exhaustivamente a la proteína Cox2 expresada alotópicamente y se demostró sin ambigüedades que dicha proteína se ensambló de forma funcional en el complejo de la citocromo oxidasa.

11-Conclusiones

-El crecimiento de la cepa complementada (Cox2^{W56R}) no se ve afectado, independientemente del bajo consumo de oxígeno y la menor cantidad de proteína madura Cox2 ensamblada con respecto a la cepa silvestre.

-Al analizar los complejos respiratorios de la cepa silvestre y de la cepa complementada, la actividad y los niveles del complejo V y del complejo III no se alteran, pero la acumulación de la citocromo c oxidasa de la cepa complementada disminuye casi hasta la mitad de la silvestre. Sin embargo, la actividad de la enzima citocromo c oxidasa aislada de la cepa silvestre y de la complementada son semejantes; esto significa que la presencia de la mutación W56R no alterara la actividad del complejo y que la disminución en la capacidad respiratoria de la cepa complementada se debe a que hay menos complejos de citocromo c oxidasa ensamblados.

-La subunidad Cox2^{W56R} requiere de un péptido señal para ingresar a la mitocondria. Además, la subunidad Cox2^{W56R}, al translocarse a través de la membrana interna, pierde 15 aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal. Por lo tanto, la cepa de levadura NAB97 procesa a la subunidad Cox2^{W56R} de la misma forma en que lo hace la cepa silvestre, generando la misma forma madura (excepto por la presencia de la mutación W56R).

-Cuando se expresa la subunidad Cox2 alotópica (Cox2^{W56R}) los niveles de la subunidad Cox1 son similares a los de la cepa silvestre. Lo cual indica que Cox1 se acumula normalmente cuando Cox2 está presente, sin importar si la proteína se sintetizó en la mitocondria o en el citosol. Por lo tanto, la cepa mutante Cox2W56R permite la restauración completa de la síntesis de la subunidad Cox1.

-De manera general, la Cox2^{W56R} sintetizada puede tener un paso limitante en el proceso de importación, maduración o ensamblaje, que resulta en un bajo rendimiento en los niveles basales de citocromo c oxidasa. Aun así, la Cox2^{W56R} restaura la capacidad de la cepa para crecer en medios no fermentables, restablece la presencia y actividad de la citocromo c oxidasa y permite la síntesis mitocondrial de Cox1 a niveles normales.

12-Bibliografia

- Abramson J., Svensson-Ek M., Byrne B. and Iwata S. (2001) Structure of cytochrome c oxidase: a comparison of the bacterial and mitochondrial enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1544 1-9.
- Banroques J., Delahodde A. and Jacq C. (1986) A mitochondrial RNA maturase gene transferred to the yeast nucleus can control mitochondrial mRNA splicing. *Cell*. 46, 837-844.
- Barrientos A., Zambrano A. and Tzagoloff A. (2004) Mss51p and Cox14p jointly regulate mitochondrial Cox1p expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 23, 3472–3482.
- Bietenhader M., Martos A., Tetaud E., Aiyar R.S., Sellem C.H., Kucharczyk R., Clauder-Münster S., Giraud M.F., Godard F., Salin B., Sagot I., Gagneur J., Déquard-Chablat M., Contamine V., Hermann-Le Denmat S., Sainsard-Chanet A., Steinmetz L.M., and di Rago JP. (2012) Experimental relocation of the mitochondrial ATP9 gene to the nucleus reveals forces underlying mitochondrial genome evolution. *PLoS Genetics*, 8, 8, 1-15.
- Bonitz S.G., Berlani R., Coruzzi G., Li M., Macino G., Nobrega F.G., Nobrega M.P., Thalenfeld B.E. and Tzagoloff A. (1980) Codon recognition rules in yeast mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 77, 6, 3167-3170.
- Bradshaw P.C. and Pfeiffer D.R. (2006) Loss of NAD(H) from swollen yeast mitochondria. *BMC Biochemistry*. 7, 3, 1-11.
- Bratton M.R., Pressler M.A. and Hosler J.P. (1999) Suicide Inactivation of Cytochrome c Oxidase: Catalytic Turnover in the Absence of Subunit III Alters the Active Site. *Biochemistry*, 38, 16236-16245.
- Braun H.P., Sunderhaus S., Boekema E. J. and Kouril R. (2009) Chapter 10 Purification of the cytochrome c reductase/cytochrome c oxidase super complex of yeast mitochondria. *Methods Enzymol.* 456, 183–190.
- Cardol P., Lapaille M., Minet P., Franck F., Matagne R.F., and Remacle C. (2006) ND3 and ND4L subunits of mitochondrial complex I, both nucleus encoded in *Chlamydomonas reinhardtii*, are required for activity and assembly of the enzyme. *Eukaryot. Cell*. 5, 1460–1467.
- Carr H.S. and Winge D.R. (2003) Assembly of cytochrome c oxidase within the mitochondrion. *Acc. Chem. Res.* 36, 309-316.

- Claros M.G., Perea J., and Jacq C. (1996) Allotopic Expression of Yeast Mitochondrial Maturase to Study Mitochondrial Import of Hydrophobic Proteins. *Methods in Enzymology*. 264, 389-403
- Claros M.G., Perea J., Shu Y., Samatey F.A., Popot J.L. and Jacq C. (1995) Limitations to *in vivo* import of hydrophobic proteins into yeast mitochondria. The case of a cytoplasmically synthesized apocytochrome *b*. *Eur. J. Biochem.* 228,762-771.
- Cruz-Torres V., Vázquez-Acevedo M., García-Villegas R., Pérez-Martínez X., Mendoza-Hernández G. and González-Halphen D. (2012) The cytosol-synthesized subunit II (Cox2) precursor with the point mutation W56R is correctly processed in yeast mitochondria to rescue cytochrome oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1817, 2128–2139
- Degli E.M., Rotilio G. and Lenaz G. (1984) Effects of dibromothymoquinone on the structure and function of the mitochondrial bc₁ complex, *Biochim. Biophys. Acta*. 767, 10-20.
- Efremov R. G. and Sazanov L. A. (2011). Respiratory complex I: “steam engine” of the cell? *Current Opinion in Structural Biology*, 21:532-540.
- Ellouze S., Augustin S., Bouaita A., Bonnet C., Simonutti M., Forster V., Picaud S., Sahel J.A. and Corral-Debrinski M. (2008) Optimized allotopic expression of the human mitochondrial ND4 prevents blindness in a rat model of mitochondrial dysfunction, *Am. J. Hum. Genet.* 83, 373–387.
- Farrell L.B., Gearing D.P. and Nagley P. (1988) Reprogrammed expression of subunit 9 of the mitochondrial ATPase complex of *Saccharomyces cerevisiae*. Expression *in vitro* from a chemically synthesized gene and import into isolated mitochondria. *Eur J Biochem.* 173, 131-137.
- Fontanesi F., Soto I.S. and Barrientos A. (2008) Cytochrome c Oxidase Biogenesis: New levels of Regulation. *IUBMB Life*. 60, 9, 557–568.
- Foury F., Roganti T., Lecrenier N. and Purnelle B. (1998) The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*. 440, 325-331.
- Funes S., Davidson E., Claros M.G., van Lis R., Pérez-Martínez X., Vázquez-Acevedo., King M.P. and González-Halphen D. (2002a) The typically mitochondrial DNA encoded ATP6 subunit of the F₁F₀-ATPase is encoded by a nuclear gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* 277, 6051–6058.
- Funes S, Davidson E., Reyes-Prieto A., Magallón S., Herion P., King M.P. and González-Halphen D. (2002b) A Green Algal Apicoplast Ancestor. *Science*, 298, 2155.

- Galanis N., Devenish R.J. and Nagley P. (1991) Duplication of leader sequence for protein targeting to mitochondria leads to increased import efficiency. *FEBS*. 282, 2, 423-430.
- Gabriel K. and Pfanner N. (2007) The Mitochondrial Machinery for Import of Precursor Proteins. *Methods in Molecular Biology, Vol. 390: Protein Targeting Protocols: Second Edition*. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Gearing, D.P. and Nagley, P. (1986) Yeast mitochondrial ATPase subunit 8, normally a mitochondrial gene product, expressed in vitro and imported back into the organelle. *EMBO J.* 5, 13, 3651-3655.
- Gietz R.D. and Schiestl R.H. (2007) Quick and easy yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat. Protoc.* 2, 35–37.
- Gunnar von Heijne G. (1986) Why mitochondria need a genome. *FEBS*. 198, 1, 1-4.
- Guy J., Qi X., Koilkonda R.D., Arguello T., Chou T.H., Ruggeri M., Porciatti V., Lewin A.S. and Hauswirth W.W. (2009) Efficiency and Safety of AAV-Mediated Gene Delivery of the Human ND4 Complex I Subunit in the Mouse Visual System. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 50, 9, 4205–4214.
- Hawkes R., Niday E. and Gordon J. (1982) A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Analytical Biochemistry.* 119, 1, 142-147.
- Herrmann J.M., Fölsch H., Neupert W. and Stuart R.A., Isolation of yeast mitochondria and study of mitochondrial protein translation, in: J.E. Celis (Ed.), *Cell Biology A Laboratory Handbook*, vol. 1, Academic Press, San Diego, 1994. pp. 538–544.
- Herrmann J.M. and Funes S. (2005). Biogenesis of cytochrome oxidase—Sophisticated assembly lines in the mitochondrial inner membrane. *Gene* 354, 43– 52.
- Horan S., Bourges I., Taanman J.W. and Meunier B. (2005) Analysis of COX2 mutants reveals cytochrome oxidase subassemblies in yeast. *Biochem. J.* 390, 703–708.
- Hunte C., Palsdottir H., Bernard L. and Trumppower. (2003). Protonmotive pathways and mechanisms in the cytochrome *bc₁* complex. *FEBS Letters*, 545, 39-46.
- Jiménez-Suárez A., Vázquez-Acevedo M., Rojas-Hernández A., Funes S., Uribe-Carvajal S. and González-Halphen D. (2012) In *Polytomella* sp. mitochondria, biogenesis of the heterodimeric COX2 subunit of cytochrome c oxidase requires two different import pathways. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1817, 819–827.
- King M.P. and Attardi G. (1989) Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science.* 246, 4929. 500-503.
- Koilkonda, R.D., Hauswirth, W.W. and Guy, J. (2009) Efficient expression of self-complementary AAV in ganglion cells of the ex vivo primate retina. *Molecular Vision.* 15, 2796-2802.

- Kyte J. and Doolittle R.F. (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J.Mol Biol.* 157, 1, 105-132.
- Lam BL, Feuer WJ, Abukhalil F, Porciatti V, Hauswirth WW, Guy J. (2010) Leber hereditary optic neuropathy gene therapy clinical trial recruitment: year 1. *Arch Ophthalmol*, 128, 9, 1129-1135.
- Law R.H., Devenish R.J. and Nagley P. (1990) Assembly of imported subunit 8 into the ATP synthase complex of isolated yeast mitochondria. *Eur J Biochem.* 188, 2, 421-429.
- Liu J. M. and Liu D. R. (2007) Discovery of a mRNA mitochondrial localization element in *Saccharomyces cerevisiae* by nonhomologous random recombination and in vivo selection. *Nucleic Acids Research*, 35, 6750-6761.
- Lucas M.F., Rousseau D.L. and Guallar V. (2011) Electron transfer pathways in cytochrome c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1807, 10, 1305–1313.
- Mannella C.A. (2006). Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochimica et Biophysica Acta* 1763, 542-548.
- Mannella C.A., Lederer W.J. and Jafri M.S. (2013) The connection between inner membrane topology and mitochondrial function. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 62 51–57.
- Mick D.U., Fox T.D. and Rehling R. (2011) Inventory control: cytochrome c oxidase assembly regulates mitochondrial translation. *Nature Reviews Molecular cell Biology.* 12, 14-20.
- Nagley P. and Devenish R.J. (1989) Leading organellar proteins along new pathways: the relocation of mitochondrial and chloroplast genes to the nucleus. *Trends in Biochemical Sciences.* 14, 31-35.
- Nagley P., Farrell L.B., Gearing D.P., Nero D., Meltzer S. and Devenish R.J. (1988) Assembly of functional proton-translocating ATPase complex in yeast mitochondria with cytoplasmically synthesized subunit 8, a polypeptide normally encoded within the organelle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85, 2091-2095.
- Nelson D.L. and Cox M.M. *Lehninger, Principles of Biochemistry.* Fourth edition. Freeman and company, USA. 2005.
- Nero D., Ekkel S.M., Wang L.F., Grasso D.G. and Nagley P. (1990) Site directed mutagenesis of subunit 8 of yeast mitochondrial ATP synthase. Functional and import properties of a series of C-terminally truncated forms. *FEBS Lett.* 270, 62-66.
- 58-Nijtmans L.G., Taanman J.W. Muijsers A.O., Speijer D. and Van den Bogert C. (1998) Assembly of cytochrome-c oxidase in cultured human cells, *Eur. J. Biochem.* 254, 389–394.

- Peña A., Piña M.Z., Escamilla E. and Piña E. (1977) A novel method for the rapid preparation of coupled yeast mitochondria, *FEBS Lett.* 80, 209–213.
- Perales-Clemente E., Fernández-Silva P., Acín-Pérez R. Pérez-Martos A. and Enríquez J.A. (2011) Allotopic expression of mitochondrial-encoded genes in mammals: achieved goal, undemonstrated mechanism or impossible task? *Nucleic Acids Research.* 39, 1, 225–234.
- Pérez-Martínez X., Antaramian A., Vázquez-Acevedo M., Funes S., Tolkunova E., d'Alayer J., Claros M.G., Davidson E., King M.P. and González-Halphen D. (2001) Subunit II of Cytochrome c Oxidase in Chlamydomonad Algae Is a Heterodimer Encoded by Two Independent Nuclear Genes. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 11302–11309.
- Pérez-Martínez X., Broadley S.A. and Fox T.D. (2003) Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. *EMBO J.* 22, 5951–5961.
- Pérez-Martínez X., Vázquez-Acevedo M., Tolkunova E., Funes S., Claros M.G., Davidson E., King M.P. and González-Halphen D. (2000) Unusual location of a mitochondrial gene. Subunit III of cytochrome c oxidase is encoded in the nucleus of Chlamydomonad algae. *J. Biol. Chem.* 275, 30144–30152.
- Pierrel F., Bestwick M.L., Cobine P.A., Khalimonchuk O., Cricco J.A. and Winge D.R. (2007). Coa1 links the Mss51 post-translational function to Cox1 cofactor insertion in cytochrome c oxidase assembly. *The Embo Journal.* 26, 20, 4335-4346.
- Pineau B., Mathieu C., Gérard-Hirne C., De Paepe R. and Chétrit P. (2005) Targeting the NAD7 Subunit to Mitochondria Restores a Functional Complex I and a Wild Type Phenotype in the *Nicotiana sylvestris* CMS II Mutant Lacking *nad7*. *The Journal of Biological Chemistry.* 280, 28, 25994–26001.
- 22-Popot J.L. and Vitry C. (1990) On the microassembly of integral membrane proteins. *Annu Rev Biophys Biophys Chem.* 19, 369-403.
- Popović D.M. and Stuchebrukhov A.A. (2012) Coupled electron and proton transfer reactions during the O→E transition in bovine cytochrome c oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta.* 817, 506–517.
- Qi, X., Sun, L., Lewin, A.S., Hauswirth, W.W. & Guy, J. (2007) The Mutant Human ND4 Subunit of Complex I Induces Optic Neuropathy in the Mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48, 1, 1-10.
- Qualmann S.R., Daley D.O., Whelan J., and Pratje E. (2003) Import pathway of nuclear-encoded cytochrome c oxidase subunit 2 using yeast as a model. *Plant Biol.* 5, 481–490.

- Roucou X., Artika I.M., Devenish R.J. and Nagley P. (1999) Bioenergetic and structural consequences of allotropic expression of subunit 8 of yeast mitochondrial ATP synthase. The hydrophobic character of residues 23 and 24 is essential for maximal activity and structural stability of the enzyme complex. *Eur J Biochem.* 261, 444-451.
- Sánchez N.S., Calahorra M., González-Hernández J.C. and Peña A. (2006) Glycolytic sequence and respiration of *Debaryomyces hansenii* as compared to *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 23, 361–374.
- Schägger H. (2006) Tricine–SDS–PAGE. *Nature Protocols.* 1, 1, 16-21.
- Schägger H. and Pfeiffer K. (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *The EMBO Journal.* 19, 8, 1777-1783.
- Shingú-Vázquez M., Camacho-Villasana Y., Sandoval-Romero L., Butler C.A. and Fox T.D. and Pérez-Martínez X. (2010) The Carboxyl-terminal End of Cox1 Is Required for Feedback Assembly Regulation of Cox1 Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry.* 285, 45, 34382-34389.
- Schneider-Poetsch T., Ju J., Eyer D.E., Dang Y., Bhat S., Merrick W.C., Green R., Shen B. and Liu J.O. (2010) Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nature Chemical Biology.* 6, 209-217
- Shokolenko I.N., Alexeyev M.F., LeDoux S.P. and Wilson L.G. (2010) The Approaches for Manipulating Mitochondrial Proteome. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 51, 451-461.
- Stiburek L. and Zeman J. (2010). Assembly factors and ATP-dependent proteases in cytochrome c oxidase biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1797, 1149–1158.
- Sun F., Huo X., Zhai Y., Wang A., Xu J., Su D. and Bartlam M. (2005) Crystal Structure of Mitochondrial Respiratory Membrane Protein Complex II. *Cell.* 121, 1043–1057.
- Supekova L., Supek F., Greer J.E. and Schultz P.G. (2010) A single mutation in the first transmembrane domain of yeast COX2 enables its allotropic expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107, 5047-52.
- Towbin H., Staehelin T. and Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS.* 76, 9, 4350-4354.
- Tran U.C. and Clarke C.F. (2007) Endogenous Synthesis of Coenzyme Q in Eukaryotes. *Mitochondrion.* 7, S62–S71.
- W. de Vrij, W.N. (1987) Kinetics, Kinetic characterization of cytochrome c oxidase from *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.* 166, 581–587.

-Witting I. and Schägger H. (2005) Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics*. 5, 4338-4346.

-Yu C.A. and Yu L. Structural role of phospholipids in ubiquinol-cytochrome c reductase. (1980) *Biochemistry*. 19, 5715–5720

13-Apéndices

13.1-Expresión alotópica de los genes fragmentados COX2A y COX2B en levadura

Planteamiento del problema

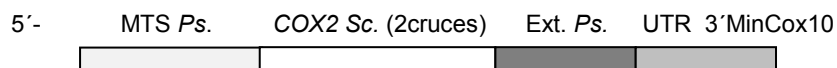
Como se mencionó en la introducción, en el caso de las algas clorofíceas como *Polytomella sp.* y *C. reinhardtii* y en los parásitos apicomplejos como *T. gondii* y *P. falciparum*, la subunidad COX2 se encuentra codificada en el núcleo y además el gen original se escindió en dos segmentos denominados COX2A y COX2B (Pérez-Martínez y cols. 2001; Funes y cols. 2002b). Sus productos correspondientes son las proteínas Cox2a y Cox2b, es decir, la porción N-terminal y la porción C-terminal respectivamente de una subunidad ortodoxa. Cox2a contiene dos cruces transmembranales, mientras que Cox2b corresponde a la porción soluble. Ambas subunidades contienen extensiones con aminoácidos cargados que podrían estabilizar el heterodímero Cox2a/Cox2b (Jiménez-Suárez y cols. 2012). Uno de los objetivos de este trabajo era el de expresar alotópicamente los genes quiméricos COX2A y COX2B en un modelo de levadura, tratando de emular lo que de manera natural sucedió en las algas clorofíceas. También se deseaba aportar evidencia de cómo estas proteínas se importan en la mitocondria. Con este fin, se diseñaron genes quiméricos de COX2A y COX2B (con MTS de levadura) y se expresaron en una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* que carecía del gen COX2 mitocondrial.

El primer objetivo de este trabajo era demostrar la recuperación del fenotipo respiratorio en mutantes de levadura Δ COX2 después de ser complementadas con los genes quiméricos COX2A y COX2B expresados alotópicamente. Si esto hubiera dado resultados positivos, el siguiente objetivo hubiera sido caracterizar a la citocromo c oxidasa quimérica resultante y demostrar la presencia en el complejo enzimático de las subunidades Cox2A y Cox2B correspondientes.

Resultados

El primer paso fue diseñar los genes quiméricos COX2A y COX2B. El gen COX2A es esencialmente la secuencia de los dos cruces transmembranales del gen COX2 de *S. cerevisiae* (correspondientes a Cox2a de algas) a la cual se le agregó una secuencia nucleotídica en el extremo 5' que codifica para la MTS de la proteína Cox2a de *Polytomella sp.* También se le agregó en el extremo 3' una secuencia nucleotídica que codifica la extensión de la subunidad Cox2a de *Polytomella sp.* El gen COX2B se diseñó esencialmente con la secuencia del gen COX2 de *S. cerevisiae*, agregando en el extremo 5' una secuencia nucleotídica que codifica la extensión natural de la subunidad Cox2b de *Polytomella sp.* Asimismo, al gen COX2A se le colocó la región UTR del gen COX10 de levadura (secuencia Min) en el extremo 3' y al gen COX2B se le añadió una región UTR en el extremo 3' conocida como Min2 (Liu y cols. 2007) (figura 19). Las secuencias 3'-UTR (del inglés untranslated region) son regiones que se han relacionado con la importación cotraduccional de proteínas mitocondriales sintetizadas en el citosol y que podrían facilitar este proceso. A ambos genes se les colocaron distintos sitios de restricción para tener opciones de insertar el gen en diferentes vectores y poder eliminar las secuencias 3'-UTR si así se deseaba (Apéndice 2). Los genes se sintetizaron en la compañía GenScript y fueron insertados en el vector pUC57. Posteriormente los genes se cortaron del vector pUC57 y se insertaron por medio del sitio de restricción NotI en los vectores pNB210 y pFL61. Los dos son vectores de bajo número de copias que se expresan en levadura, que contienen el promotor de la fosfoglicerato cinasa (PGK) y que contienen un gen que confiere resistencia a la ampicilina. El vector pNB210 tiene además un marcador para auxotrofia de histidina (His), mientras que el vector pFL61 tiene un marcador para auxotrofia de uracilo (URA). Es decir, una célula transformada con estos vectores puede crecer en medios mínimos carentes de histidina (medio -HIS) y uracilo (medio -URA) respectivamente. Los genes quiméricos quedaron insertados en los vectores de expresión de la siguiente forma: pNB210_COX2A y pFL61_COX2B.

Gen COX2A



Gen COX2B

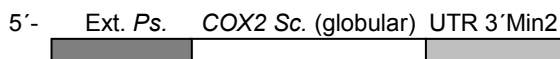


Figura 19. Esquema del diseño de los genes quiméricos. El gen COX2A consta de una región que codifica para la presecuencia mitocondrial de *Polytomella sp.* (Ps), los dos cruces transmembranales del gen COX2 de *S. cerevisiae* (Sc), la extensión de *Polytomella sp.* y la región UTR 3' MinCox10. El gen COX2B contiene la extensión de *Polytomella sp.*, la parte hidrofílica del gen COX2 de *S. cerevisiae* y la región UTR 3' Min2.

Los genes quiméricos COX2A y COX2B se transformaron en la cepa mutante de *Saccharomyces cerevisiae* HMD22 (genotipo: MAT α , ura3-52, leu2-3, lys2, his3-deltaHinDIII, arg8::hisG, rho+, cox2::ARG8m, D273-10B) que tiene una sustitución del gen COX2 mitocondrial por el gen ARG8 y que es incapaz de respirar, pero puede crecer en condiciones fermentativas. Como comparativo para estos experimentos se utilizó la cepa silvestre de *Saccharomyces cerevisiae* NB40-36A (genotipo: MAT α , lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, rho+). Ambas cepas fueron donadas por el Doctor Thomas Fox de la Universidad de Cornell en EEUU.

Después de que se transformaron las células, éstas se crecieron en medio mínimo con glucosa. Posteriormente las levaduras se crecieron en medios respiratorios con etanol-glicerol o lactato como fuentes de carbono. Las células co-transformadas con los genes quiméricos COX2A y COX2B crecieron en medio mínimo con glucosa indicando la recuperación de la auxotrofia con ambos vectores. Sin embargo, al retar a las células en medios respiratorios como lactato y etanol-glicerol las células fueron incapaces de crecer (figura 20).

Debido a que las células co-transformadas no recuperaron el fenotipo respiratorio, quisimos conocer si las proteínas quiméricas correspondientes, Cox2A y Cox2B, se estaban expresando. Con este fin, se obtuvieron extractos totales de levadura a partir de cultivos de 10 ml para hacer inmunoréplicas tipo Western y poder detectar a la proteína Cox2B con un anticuerpo anti-Cox2 de *S. cerevisiae*. Al realizar los ensayos se observó, como era de esperarse, la presencia de la proteína Cox2 tanto en

extractos totales de la cepa silvestre como en mitocondrias aisladas de la misma. Como era también de esperarse, no se observó la presencia de la proteína Cox2B en los extractos totales de las cepas Δ COX2 transformadas con los vectores vacíos pNB210 y pFL61 ya sea juntos o por separado. Las células transformadas con la construcción pNB210_COX2A tampoco mostraron la presencia de la proteína Cox2B. En el caso de las células co-transformadas con pNB210_COX2A y pFL61_COX2B y transformadas solo con pFL61_COX2B si se observó una banda, cuya masa molecular aparente corresponde a la proteína Cox2B (figura 21).

Con estos resultados se concluyó que al co-transformar la cepa Δ COX2 con los genes quiméricos pNB210_COX2A y pFL61_COX2B no era posible recuperar el fenotipo respiratorio en las células, a pesar de que la subunidad Cox2b quimérica se estaba sintetizando y acumulando en las levaduras. La falta de un anticuerpo que reconociera a la proteína Cox2a nos impidió seguir la acumulación de esta otra proteína.

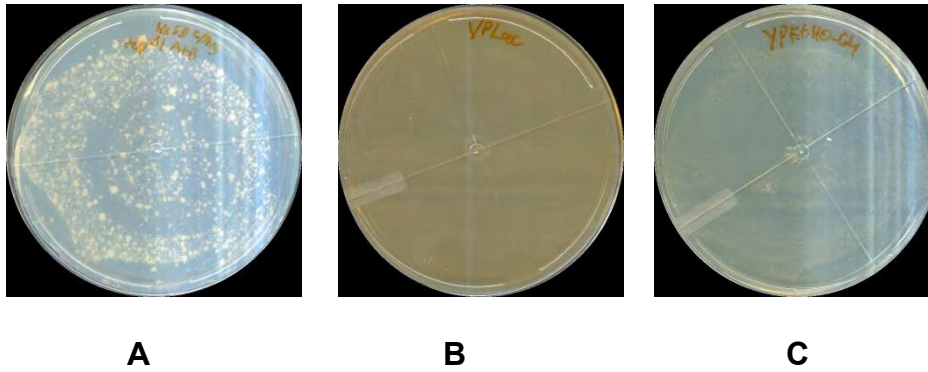


Figura 20. Crecimiento de de las células cotransformadas. Células cotransformadas con los genes quiméricos pNB210_COX2A y pFL61_COX2B en medio mínimo con glucosa (A), medio con lactato (B) y medio con etanol-glicerol (C).

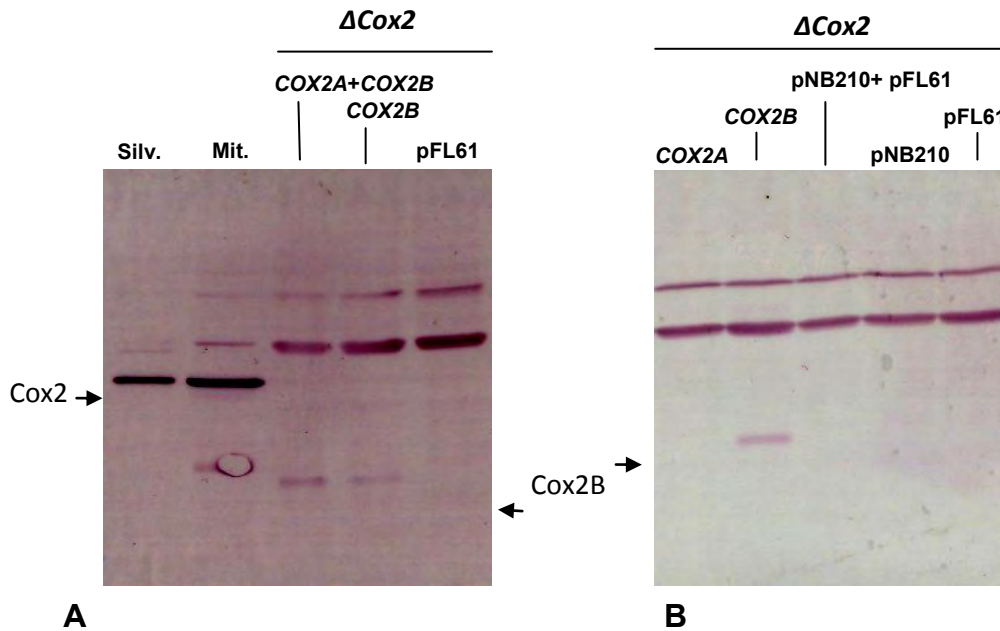
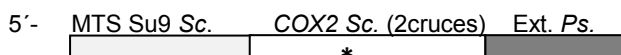


Figura 21. Presencia de la proteína Cox2B en las células de levadura. La figura muestra dos paneles (A y B) de inmunorrélicas tipo western de extractos totales de levadura de la cepa silvestre (NB40) y de la cepa mutante transformada (Δ Cox2) con la construcción y con vector vacío, decoradas con el anticuerpo anti-Cox2 de *S. cerevisiae*. En el panel A se muestra de izquierda a derecha el extracto total de la cepa silvestre, mitocondrias de la cepa silvestre, los extractos totales de la cepa Δ Cox2 transformada con las construcciones pNB210_COX2A+pFL61_COX2B, pFL61_COX2B y con el vector vacío pFL61. En el panel B de izquierda a derecha se muestran los extractos totales de la cepa Δ Cox2 transformada con las construcciones pNB210_COX2A y pFL61_COX2B, células cotransformadas con ambos vectores, células transformadas únicamente con pNB210 y únicamente con pFL61. Con las flechas se indican las bandas de la inmunolocalización tipo Western de la proteína Cox2 silvestre y de la proteína Cox2B expresada alotópicamente.

Después de obtener estos resultados preliminares y con la aparición en la literatura de la expresión alotópica del gen *COX2* expresando la mutación puntual W56R en levadura (Supekova y cols. 2010), se decidió explorar una estrategia experimental alternativa.

Para esta nueva estrategia se diseñaron nuevos genes quiméricos. Consideramos que tal vez los genes quiméricos fragmentados *COX2A* y *COX2B* no complementaban el fenotipo respiratorio porque las proteínas correspondientes no se estaban importando en la mitocondria. Posiblemente, los translocadores de proteínas de la mitocondria de levadura no reconocían adecuadamente a la MTS natural del alga *Polytomella*. Por lo tanto, en el nuevo diseño se eliminó la MTS de *Polytomella sp.* y se agregaron MTS de precursores de levadura, con la intención de asegurar que la proteína Cox2A se importara hasta la matriz mitocondrial y Cox2B hasta el espacio intermembranal. Además, al gen quimérico *COX2A* se le adicionó la mutación puntual W56R, para asegurar que el primer cruce transmembranal fuese internalizado hasta la matriz mitocondrial. El gen *COX2A* quimérico se diseñó para que codificara a la MTS de la subunidad 9 (Su9) de la ATPasa de *S. cerevisiae*, la secuencia de los dos cruces transmembranales de *S. cerevisiae* con la mutación puntual W56R y la extensión de *Polytomella sp.* La MTS de Su9 debía dirigir a la proteína hasta la matriz mitocondrial. Para el gen *COX2B*, en un orden de 5' a 3', se utilizaron secuencias que codificaban a la MTS del citocromo b2 (Citb2) de *S. cerevisiae*, la extensión de *Polytomella sp.* y la parte hidrofílica de la proteína Cox2 de *S. cerevisiae* (figura 22). La MTS del Citb2 debía dirigir a la proteína hasta el espacio intermembranal. Una vez más, el gen *COX2A* se sintetizó en la compañía GenScript y se insertó en el vector pUC57. Posteriormente, el gen se insertó con el sitio de restricción NotI en el vector pMK (pMK_*Su9COX2A*^{W56R}). Este vector de expresión para levadura es semejante a pFL61, con la diferencia que contiene el marcador de auxotrofia para leucina (Leu) por lo que una célula transformada con este vector puede crecer en un medio mínimo carente de leucina (medio -Leu). Por su parte, el gen *COX2B* se construyó en el laboratorio y se insertó en el vector pNB210 (pNB210_*Citb2COX2B*). Para estos experimentos se utilizó la cepa mutante de levadura NAB97, la cual tiene interrumpido el gen mitocondrial *COX2*, por lo que es incapaz de crecer en medios respiratorios.

Gen COX2A



Gen COX2B



Figura 22. Esquema del diseño de los genes quiméricos. El gen COX2A consta de secuencias que codifican sucesivamente a la presecuencia mitocondrial (MTS) de la subunidad 9 de la ATPasa de *S. cerevisiae* (Sc.), los dos cruces transmembranales de *S. cerevisiae* (Sc) y la extensión de Cox2a de *Polytomella sp.* El gen COX2B contiene secuencias que codifican a la MTS del gen del citocromo b2 de *S. cerevisiae*, la extensión de *Polytomella sp.* y la parte hidrofílica del gen COX2 de *S. cerevisiae*. El asterisco en el gen COX2A indica la mutación puntual W56R.

Las células transformadas y crecidas en medio mínimo con glucosa se retaron en medio con etanol-glicerol. Como era de esperarse, las células cotransformadas con los genes quiméricos COX2A^{W56R} y COX2B y con los vectores vacíos crecieron en medio mínimo con glucosa. Sin embargo, al replicarlas en el medio con etanol-glicerol las células transformadas con las subunidades fragmentadas no recuperaron el fenotipo respiratorio (figura 23).

Al no obtener resultados positivos, intentamos crecer cultivos para obtener extractos totales de levadura y hacer ensayos de inmunorreplicas tipo Western decorándolas con el anticuerpo anti-Cox2 de levadura. En la cepa Δ Cox2 co-transformada con pMK_COX2^{AW56R} + pNB210_COX2B se encontraron cuatro bandas. La banda de mayor peso molecular podría corresponder a la proteína Cox2b con la MTS Citb2 (pCox2b). Alguno de los otros tres intermediarios podría corresponder a la proteína Cox2b madura. Como era de esperarse en la cepa co-transformada con los vectores vacíos no se detectó ninguna banda (figura 24). A pesar de que la célula no recupera el fenotipo respiratorio probablemente Cox2b se esté expresando en el citosol y cabe la posibilidad que este entrando al espacio intermembranal de la mitocondria y se esté editando la MTS. Dado el proceso que observamos con Cox2b, podría ser que Cox2a se esté expresando e incluso que este entrando a la mitocondria, pero es difícil asegurarlo porque aún no tenemos la forma de detectar a Cox2a, ya que carecemos de un anticuerpo específico contra este segmento de la proteína Cox2.

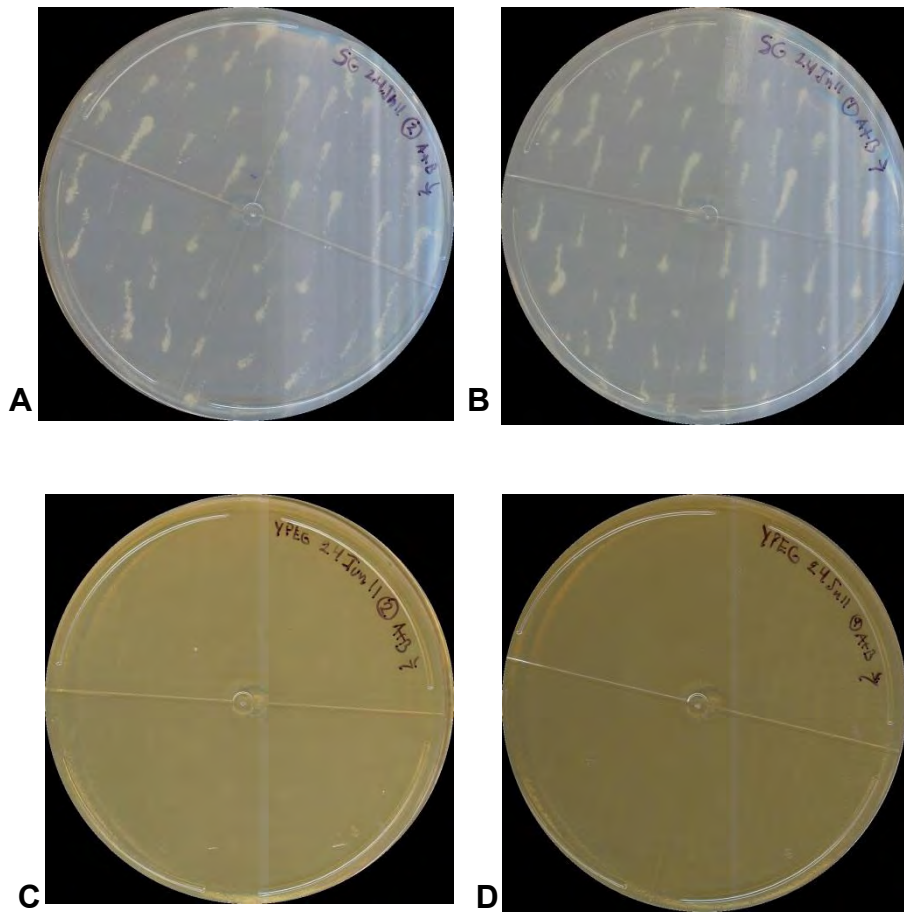


Figura 23. Réplicas de las células transformadas con los genes quiméricos fragmentados. Panel A: vectores vacíos pMK+pNB210 en medio mínimo con glucosa y medio de etanol-glicerol (panel C). Panel B: pMK_COX2A^{W56R} + pNB210_COX2B en medio mínimo con glucosa y medio de etanol glicerol (panel D).

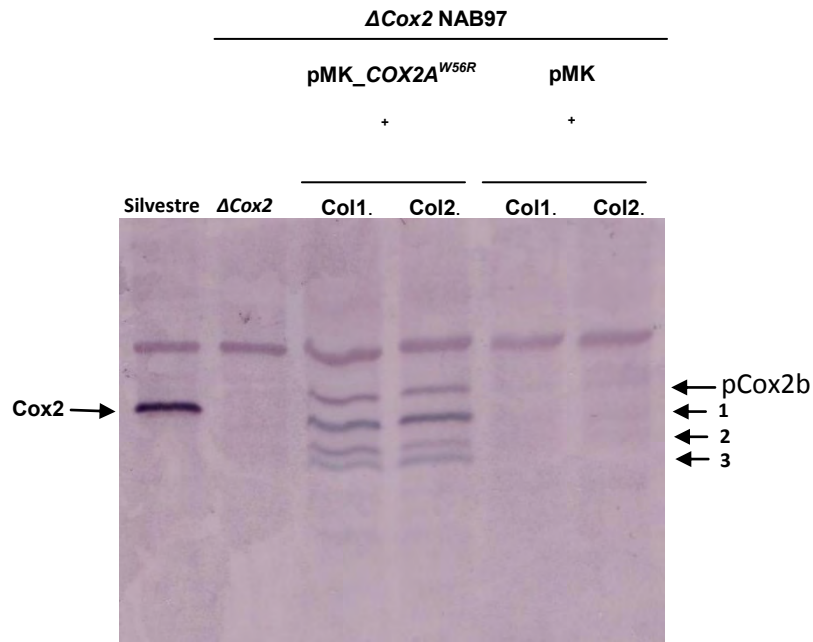


Figura 24. Presencia de proteínas expresadas alotópicamente. La figura muestra la inmunoréplica tipo Western de extractos totales de levadura de la cepa silvestre (NB40) y de la cepa mutante (Δ Cox2) vacía, la cepa Δ Cox2 NAB97 co-transformada con pMK_COX2A^{W56R} + pNB210_COX2B y con los vectores vacíos pMK y pNB210. Col1 y Col2 indican 2 diferentes colonias. Las proteínas están inmunolocalizadas con el anticuerpo anti-Cox2 de *S. cerevisiae*. Las flechas indican la inmunolocalización de la proteína Cox2 silvestre, la posible proteína precursora Cox2b con la MTS (pCox2b) y tres bandas (1, 2, 3) que podrían corresponder a la proteína Cox2b madura.

Conclusión

Con los datos obtenidos concluimos que con los diferentes diseños de las proteínas Cox2a y Cox2b no pudo obtenerse una recuperación del fenotipo respiratorio en las células de levadura. Sabemos que la proteína Cox2b se está expresando, pero no sabemos en cual parte de la célula se localiza. Podría ser que los niveles de expresión de las proteínas Cox2a y Cox2b son suficientes, pero no tenemos la certeza de que ambas proteínas se están importando. En un futuro, se podrían seguir explorando nuevos diseños de genes, incluso construcciones que contengan o no las extensiones de las proteínas del alga. Uno de los requerimientos para estos estudios es la de contar con un buen anticuerpo dirigido contra la subunidad Cox2a, para poder seguir el destino de esta proteína.

13.2-Secuencias utilizadas

Gen COX2A quimérico (MTS-Ps_COX2A-Sc_Ext-Ps_UTR3'MinCox10)

>ScCox2Aq

```
gcggccgcgatccctcgagctgcagatgttggtcaaagaattctctggaattcttgcaatgtggtaaatatatgtgga
atgctgctcaaatgggtctaaaaatattgctactgtttctgaaactgttcaagcttctactgctgctccaaaagttggtgctca
atcttctttaagaagcttctgctatggcttctaaaaaacaatgttgggttctggttcttcttgctctagacaaacttttc
tggcttcttctgcttctgctccatctggctgtagagctattgctactcaagctgaagctaaagctcaaactgaaacttctctat
taaaaaattattaaagctgctgctgctgttggctgcttgggttggactgctggtactgcttctgctgatgtccaactccatat
gcttgtattttcaagattctgctactccaaatcaagaaggattttggaattgcatgataatattatgtttattgttggtattttgg
gtttggttcttgatgtgtatactattgtatgacttattctaaaaatccaattgcttataaataattaaacatggtcaaactattg
aagttattggactattttccagctgttattttgtgattattgctttccatctttattttgtgtatttggatgaagttatttccag
ctatgactattaaagctattggtatcaatggtattggaaatatgaatattctgattttattaatgattctggtgaaactgttgaatt
gcaacataaattgttgatgctgatagattggttgcattgctgaaaaactattactaaataacttaagcccggggcatgc
cggccggggatatactgattaaaaaatcacactagagaatcaatataaaaatagagtgcatacacttggtacatgag
ctcgccggccgctagc
```

Gen COX2B (Ext-Ps_COX2B-Sc_UTR3'Min2)

>ScCox2Bq

```
gcggccgcgatccctcgagctgcagatgtctgatgctaaagatcaattgaaagaacaattgaaagcttctccatcttta
gagctgaattgaaagataaattgaaagctgcttgttctaaagttccagcttctcaaccaattcaatataattttgaatcttat
gttattccagatgaattgttgaagaaggcaattgagattgttgatactgatacttctatggttgtccagttgatactcatatt
agattgttgttactgctgctgatgttattcatgattttgctattccatcttgggtattaaagttgatgctactccaggtagattgat
caagtttctgcttattcaagagaagggtttttatgggtgcttctgaattgtgtggtactggtcatgctaatatgccaatta
aaattgaagctgttcttgcctaaatgttgaatggttgaatgaacaataacttaagcccggggcatgccggccgattttct
atatatacactaagatgtaagatattaaagaagaatgaatagagctcgccggccgctagc
```

Gen COX2W56R (MTS-Oxa1-Sc_COX2W56R-Sc)

>COX2W56R

```
gcggccgcgatccatgttcaaaactcacctctcgactcgtcacgtcaagtttctgctcctcttccagactggccaccgctcg
aaccatagtattgccccggccccatccgtcatggatctctttcaggccaaaagatttaattcgacggggccagtcgacttg
gattgtgagattgcaattgactactttattatgaatgatgtccaactccatgcttattttcaagattctgctactccaaat
caagaaggattttggaattgcatgataatattatgtttattgttggtattttgggttgggttctagaatgtgtatactattgttat
```


gacttattctaaaaatccaattgcttataaatatattaacatggcacaactattgaagtatttggactatccccagctgttatt
tgttgattattgctttccatcttttatttgggtatttgggtgatgaagtatttctccagctatgactattaaagctattggtatcaatg
gtattggaaatagaatattctgattttattaatgattctgggtgaaactgttgaatttgaatcttatgttattccagatgaattgttg
aagaaggcaattgagattgttgatactgatacttctatgggtgtccaggtgatactcatattagatttgttactgctgctga
tgttattcatgattttgctattccatcttgggtattaaagtgatgctactccaggtagattgaatcaagttctgcttggattcaa
gagaagggtttttatgggtgctgttctgaattgtgtggtactggcatgctaataatgccaattaaaattgaagctgttcttggc
aaaattttggaatggttgaatgaacaataagcggccgc

Gen COX2A (MTS-Su9-Sc_COX2AW56R-Sc)

>COX2AW56R

gcgccgcgatccatggcctccactcgtgtcctcgcctctcgcctggcctccagatggctgctccgccaagggtgccc
gccctgctgctccgctgtcaggcagcaagcgaccatccagactggctccccctccagaccctcaagcgcacca
gatgacctccatcgcaacgccaccaccgcccaggcttccagaagcgcgcctactctccgagatcgtcgacttggattt
gttgagattgcaattgactacttttattatgaatgatgtccaactccatagcttggtttttcaagattctgctactccaaatcaa
gaaggattttggaattgcatgataatattatgtttatttgggtatttgggttctagaatgtgtatactattgttatgact
tattctaaaaatccaattgcttataaatatattaacatggcacaactattgaagtatttggactatccccagctgttatttgg
attattgctttccatcttttatttgggtatttgggtgatgaagtatttctccagctatgactattaaagctattggtatcaatggatt
ggaaatagaatattctgattttattaatgattctgggtgaaactgttgaattgcaacataaattgttggatgctgatagattggtg
ctattgctgaaaaaactattactaaataagcggccgc

Gen COX2B (MTS-Cyt2b-Sc_Ext-Ps_COX2B-Sc)

>COX2B

atgctaaaatacaaaccttactaaaaatctgaagaactgtgaggctgctatcctcagagcgtctaagactagattgaac
acaatccgcgctacgggttaccgttccaaaatccaagctgttgaacaagactcaagaaaacgcacacagctatgg
actgccttgagagtcgggtgcaattctagccgctactagttccgtggcgtatctaaactggcataatggccaaatagacaac
gagccgaaactggatataataaaacaaaagctcgagctgcagatgtctgatgctaaagatcaattgaaagaacaattg
aaagcttccatcttttagagctgaattgaaagataaattgaaagctgcttgtgtctaaagtccagcttcaaccaattc
aatataatttgaatcttatgttattccagatgaattgttgaagaaggcaattgagattgttgatactgatacttctatgggtg
tccagttgatactcatattagatttgttactgctgctgatgttattcatgatttggctattccatcttgggtattaaagttgatct
actccaggtagattgaatcaagttctgcttggattcaaagagaagggtttttatgggtgctgttctgaattgtgtggtactgct
atgctaataatgccaattaaaattgaagctgttcttggcaaaaattttggaatggttgaatgaacaataa

13.3- Artículo publicado

Cruz-Torres V., Vázquez-Acevedo M., García-Villegas R., Pérez-Martínez X., Mendoza-Hernández G. and González-Halphen D. The cytosol-synthesized subunit II (Cox2) precursor with the point mutation W56R is correctly processed in yeast mitochondria to rescue cytochrome oxidase. (2012)

Biochimica et Biophysica Acta, 1817, 2128–2139



The cytosol-synthesized subunit II (Cox2) precursor with the point mutation W56R is correctly processed in yeast mitochondria to rescue cytochrome oxidase

Valentín Cruz-Torres^{a,1}, Miriam Vázquez-Acevedo^{a,1}, Rodolfo García-Villegas^a, Xochitl Pérez-Martínez^a, Guillermo Mendoza-Hernández^b, Diego González-Halphen^{a,*}

^a Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., Mexico

^b Depto. Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 May 2012

Received in revised form 1 September 2012

Accepted 7 September 2012

Available online 15 September 2012

Keywords:

Allotopic expression

Mitochondrial targeting signals

Subunit 2 of cytochrome c oxidase

Cytochrome c oxidase biogenesis

ABSTRACT

Deletion of the yeast mitochondrial gene *COX2* encoding subunit 2 (Cox2) of cytochrome c oxidase (CcO) results in loss of respiration (Δcox2 strain). Supekova et al. (2010) [1] transformed a Δcox2 strain with a vector expressing Cox2 with a mitochondrial targeting sequence (MTS) and the point mutation W56R (Cox2^{W56R}), restoring respiratory growth. Here, the CcO carrying the allotopically-expressed Cox2^{W56R} was characterized. Yeast mitochondria from the wild-type (WT) and the Δcox2 + Cox2^{W56R} strains were subjected to Blue Native electrophoresis. In-gel activity of CcO and spectroscopic quantitation of cytochromes revealed that only 60% of CcO is present in the complemented strain, and that less CcO is found associated in supercomplexes as compared to WT. CcOs from the WT and the mutant exhibited similar subunit composition, although activity was 20–25% lower in the enzyme containing Cox2^{W56R} than in the one with Cox2^{WT}. Tandem mass spectrometry confirmed that W₅₆ was substituted by R₅₆ in Cox2^{W56R}. In addition, Cox2^{W56R} exhibited the same N-terminus than Cox2^{WT}, indicating that the MTS of Oxa1 and the leader sequence of 15 residues were removed from Cox2^{W56R} during maturation. Thus, Cox2^{W56R} is identical to Cox2^{WT} except for the point mutation W56R. Mitochondrial Cox1 synthesis is strongly reduced in Δcox2 mutants, but the Cox2^{W56R} complemented strain led to full restoration of Cox1 synthesis. We conclude that the cytosol-synthesized Cox2^{W56R} follows a rate-limiting process of import, maturation or assembly that yields lower steady-state levels of CcO. Still, the allotopically-expressed Cox2^{W56R} restores CcO activity and allows mitochondrial Cox1 synthesis to advance at WT levels.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cytochrome c oxidase (complex IV or CcO), is the main final acceptor of the electron transfer chain in mitochondria, catalyzing oxygen reduction coupled to proton pumping [2]. It is composed of 10–13 subunits and its biogenesis involves both mitochondrion- and nucleus-encoded polypeptides [3–6]. In yeast, as in the vast majority of eukaryotes, the three larger subunits of CcO are encoded in the mitochondrial genes *COX1*, *COX2* and *COX3* and the corresponding CcO subunits are synthesized in the organelle [7], while the eight additional subunits are nucleus-encoded and therefore synthesized in the cytosol [8]. Normally, Cox2 is synthesized as a precursor in the mitochondrial matrix with a 15 amino acid leader sequence [9–11] and co-translationally inserted in the inner mitochondrial membrane [12] in a process mediated by the Oxa1 translocase [13–15]. As a final step of

Cox2 biogenesis, the leader sequence of 15 residues is removed by a protease located in the mitochondrial inter-membrane space (IMS) [9,11] giving rise to the mature subunit with both N- and C-termini exposed to the IMS.

Allotopic expression refers to the expression from the nucleus of a gene that normally resides in the mitochondrion [16]; it is considered the basis for the eventual development of gene therapies to treat human mitochondrial diseases [17,18]. Allotopic expression requires targeting of the cytosol-synthesized protein to the mitochondrion, internalization into the organelle, proteolytic maturation, and functional assembly into the corresponding OXPHOS complex. Yeast is an outstanding model for allotopic expression since the tools for genetic manipulation in this organism are very accessible [19]. The original contribution of Banroques et al. [20] used the cytosol-synthesized soluble yeast b14 maturase to complement the activity of its defective, mitochondrion intron-encoded counterpart. Other studies pioneered the allotopic expression of membrane-bound mitochondrial proteins exhibiting one transmembrane stretch (TMS). A yeast strain with deleterious mutations in the mitochondrial *ATP8* gene (encoding subunit Atp8 or A6L of mitochondrial ATP synthase) was complemented with an *ATP8* gene recoded to allow its expression from the nucleus

* Corresponding author at: Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-243, México 04510, D.F., Mexico. Tel.: +52 55 5622 5620; fax: +52 55 5622 5611.

E-mail address: dhalphen@ifc.unam.mx (D. González-Halphen).

¹ Both authors contributed equally to this work.

[21,22]. The mitochondrial targeting sequence (MTS) of subunit Atp9 from *Neurospora crassa* allowed the yeast Atp8 protein to be targeted to mitochondria, internalized into the organelle, and functionally integrated into complex V (F₁F₀-ATP synthase). The allotopically-expressed Atp8 subunit restored ATP synthesis to levels similar to those observed in the wild-type (WT) strain and its association to the mature ATP synthase complex was unequivocally demonstrated [23,24].

Recently, Cox2 was allotopically-expressed in a yeast mutant containing a non-functional COX2 mitochondrial gene (Δ cox2 mutant) [1]. Two requirements were fulfilled in order to complement a Δ cox2 strain with a cytosol-synthesized Cox2: the addition of the MTS of either the inner mitochondrial membrane proteins Atp9 or Oxa1, and the substitution of tryptophan 56 by arginine (W56R mutation) in the Cox2 sequence (Cox2^{W56R}). This single point mutation, identified after a round of random mutagenesis, was enough to diminish the mean hydrophobicity of the first TMS of COX2^{W56R} to such a degree that allowed the cytosol-synthesized protein to be imported into mitochondria. Transformation of the respiratory-deficient mutant with a vector expressing Cox2^{W56R} allowed the growth of the resulting Δ cox2 + Cox2^{W56R} complemented strain in non-fermentable carbon sources, although only 30–40% of the respiratory capacity of the WT strain was recovered [1]. This report prompted us to explore whether the partial recovery of respiratory rate was due to a diminished activity of CcO carrying the allotopically-expressed Cox2^{W56R} subunit or whether it could be attributed to lower steady-state accumulation levels of complex IV. Here, we provide a biochemical characterization of CcO containing the allotopically-expressed Cox2^{W56R} subunit and show that this mutant subunit was correctly processed in mitochondria and was able to restore the mitochondrial synthesis of Cox1 to levels comparable to the ones found in the WT strain.

2. Materials and methods

2.1. Gene constructs

The gene encoding COX2 of *Saccharomyces cerevisiae*, containing the point mutation W56R, was recoded for expression from the nucleus and a region encoding the MTS of OXA1 was added in the 5' end, as previously described [1]. The construct was chemically synthesized (GeneScript, Piscataway, NJ, USA) and cloned in the pFL61 vector that contains a phosphoglycerate kinase promoter, a kind gift from Dr. Patrice Hamel (Ohio University, Columbus, USA). Yeast cells were transformed in the presence of lithium acetate and salmon sperm DNA as described [25].

2.2. Strains, culture conditions, and isolation of yeast mitochondria

S. cerevisiae strains used in this study were NB40-36A (MAT α , *lys2*, *arg8::hisG*, *ura3-52*, *leu2-3*, 112, [rho +]) and NAB97 (MAT α , *lys2*, *arg8::hisG*, *ura3-52*, *leu2-3*, 112, *his3-deltaHindIII*, *ydr494wHA*, *cox2-22*, [rho +]). The strains were a kind gift from Prof. Thomas Fox, Cornell University (USA). Cells were grown in fermentable medium YPD (1% yeast extract, 2% bacto-peptone, and 2% glucose). Non-fermentable media were lactate medium (3 g yeast extract, 1 g KH₂PO₄, 1 g NH₄Cl, 0.5 g CaCl₂·H₂O, 0.5 g NaCl, and 1.1 g MgSO₄·7H₂O, 0.3 ml of a 1% FeCl₃ solution and 22 ml 90% lactate) [26] and YPEG (1% yeast extract, 2% bacto-peptone, 3% ethanol and 3% glycerol). Minimal medium (0.17% yeast nitrogen base without amino acids) was supplemented with 2% glucose, raffinose or galactose and specific amino acids. All cells were grown at 160 rpm in a New Brunswick shaker in a constant temperature room at 30 °C for 15 h and were harvested at the logarithmic growth phase. Cells were washed with water and resuspended in extraction buffer (0.6 M mannitol, 10 mM maleic acid and 0.1% BSA, pH 6.8 adjusted with triethanolamine) and disrupted using a Bead

Beater cell homogenizer (Biospec Products) with 0.45 mm glass beads (3 × 20 second pulses separated by 40 second resting periods). To isolate mitochondria, the homogenate was differentially centrifuged as described [27] and protein concentration was determined by biuret [28]. Mitochondria were frozen and stored at –70 °C for further use.

2.3. Isolation of CcO and enzymatic activities in chromatography eluates

CcO was isolated following a protocol previously described for the algal enzyme [29]. Briefly, yeast mitochondria were solubilized with 2 g of n-dodecyl-beta-D-maltoside (LM) per g of protein at a protein concentration of 10 mg/ml in 1 mM MgSO₄, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 50 mM Tris, pH 8.0, plus 50 μ g of N-alpha-tosyl-L-lysyl-chloromethyl-ketone (TLCK) mL⁻¹. The extract was centrifuged at 100,000 ×g for 30 min and layered on top of a DEAE-Biogel A column. The column was washed with 3 volumes of 50 mM Tris, 1 mM MgSO₄ and proteins were eluted with a 0–200 mM NaCl gradient (two column volumes) and washed with 200 mM NaCl (1 column volume). In this wash a fraction enriched in CcO was recovered. In addition, a crude fraction of bc₁ complex was also recovered after eluting the column with 400 mM NaCl in the same buffer. Fractions (2.5 ml) were collected and the protein content of each fraction was estimated spectrophotometrically at 280 nm. Twenty microliters of each fraction were collected in a well of a 96-well plate and CcO activity in the fractions was assayed in the presence of 50 mM phosphate buffer (sodium) pH 7.4, 2.5 mg·mL⁻¹ horse-heart cytochrome c, and 1 mg·mL⁻¹ diaminobenzidine [30]. Absorbance at 490 nm was quantitated in a multimodal micro plate reader Synergy Mix (Biotek). The fractions enriched in CcO were recovered and concentrated by ultrafiltration in a YM100 membrane (Amicon). After adding glycerol to a final concentration of 10%, the sample was loaded onto 15 to 40% glycerol gradients in 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM sodium EDTA, and 0.1 mg/ml of LM. The gradients were centrifuged at 40,000 ×g for 17 h in a swing out rotor. Protein concentrations were determined as previously described [31].

2.4. Cytochrome measurements using differential spectrophotometry

Mitochondria were solubilized with LM (2 mg of detergent per mg of protein) and centrifuged at 100,000 ×g for 30 min. Absorbance spectra were recorded from 500 to 680 nm in a DW2000 Aminco spectrophotometer in the presence of ferricyanide to obtain the oxidized spectra, which was assigned as baseline. Then, the reduced spectrum was recorded after addition of sodium dithionite to the sample cuvette. Differential absorption coefficients (reduced minus oxidized) were: for both horse heart and yeast soluble cytochrome c (550–540 nm) 19.5 mM⁻¹ cm⁻¹ [32], for cytochrome b (560–575 nm) 25.0 mM⁻¹ cm⁻¹ [32], for cytochromes aa₃ (603–630 nm) 16.5 mM⁻¹ cm⁻¹ [33], and for cytochrome c₁ (553–541 nm) 17.5 mM⁻¹ cm⁻¹ [34].

2.5. Oxygen uptake measurements

The rate of oxygen consumption was measured in an oxygen meter model 782 (Warner/Strathkelvin Instruments) with a Clark type electrode in a 0.1 mL water-jacketed chamber at 30 °C [35] and data were analyzed using the 782 Oxygen System software (Warner/Strathkelvin Instruments). The assay contained 50 mM Hepes pH 7.4, 0.1% LM, 10 mM ascorbate, 200 μ M tetramethylpara-phenylenediamine (TMPD), 50 nM CcO and 50 μ M horse heart cytochrome c or yeast cytochrome c as indicated. When needed, 100 μ M KCN was added to inhibit CcO activity.

2.6. Gel electrophoresis and in-gel enzymatic activities

Denaturing gel electrophoresis was carried in a SDS-tricine-PAGE system [36], or when indicated, in a SDS-glycine-PAGE system [37].

Sample preparation and Blue Native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) were carried out as described [38]. Briefly, mitochondria were washed in 250 mM sorbitol, 50 mM Bis-Tris (pH 7.0), and centrifuged at 12,000 \times g for 10 min at 4 °C. The pellet was resuspended in sample buffer [750 mM aminocaproic acid, 50 mM Bis-Tris (pH 7.0)] and solubilized with 2.0 g LM per g of protein (1% LM) for 30 min and centrifuged at 100,000 \times g at 4 °C for 30 min. When indicated, mitochondria were solubilized in the same sample buffer but in the presence of 4.0 g digitonin per g of protein (2% digitonin). The supernatants (1 mg protein) were loaded on 5–15% polyacrylamide gradient gels. The stacking gel contained 4% (w/v) polyacrylamide. In-gel CcO activity was determined using 3, 3'-diaminobenzidine and cytochrome *c* as described [39,40]. In-gel ATPase activity was visualized after BN-PAGE [41,42]. The gels were incubated for 3 h in a buffer containing 270 mM glycine and 35 mM Tris-HCl (pH 8.4). Then, the following additions were made: 8 mM ATP, 14 mM MgSO₄, and 0.2% Pb(NO₃)₂. Once the white precipitates of lead phosphate became visible, the reaction was stopped with 50% methanol.

2.7. Immunoassays

From BN- or SDS-tricine-PAGE, proteins were electro-transferred onto a nitrocellulose Trans-Blot membrane (BioRad) for immune-detection [43]. Membranes were washed, blocked, and incubated with the following monoclonal antibodies (Invitrogen; Molecular Probes) anti-human Cox1 (1:3000 for 8–12 h), anti-yeast Cox2 (1:3000 for 8 h), or anti-yeast Cox3 (1:3000 for 8–12 h) using an alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse IgG (1:3000 for 2 h) as secondary antibody. When Western blots were carried out with anti-citrate synthase (1:1000 for 1 h) or anti-bovine Rieske iron-sulfur protein (1:5000 for 8 h), the secondary antibody used was an alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG (1:3000 for 2 h). Before carrying a second Western blot reaction with a different primary antibody, the membrane was incubated for 30 min at 60 °C in the presence of 2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8 and 100 mM β -mercapto-ethanol. The anti-citrate synthase antibody was a kind gift from Prof. Thomas Fox, Cornell University (USA).

2.8. Analysis of mitochondrial protein synthesis

In vivo pulse-chase labeling of cells with [³⁵S] methionine in the presence of cycloheximide was performed as described [44], except that cells were grown initially in minimal medium with 2% raffinose, and previous to labeling, cells were transferred to a medium lacking methionine for 30 min. Then, cells were labeled with 15 μ Ci of [³⁵S] methionine for 15 min, were washed with a buffer containing 0.6 M sorbitol and 20 mM Hepes pH 7.4, and then chased with cold 10 mM methionine for 1 to 4 h at 30 °C. After labeling, cells were incubated in ice and disrupted with glass beads in order to isolate mitochondria [45]. The radiolabeled mitochondrion-synthesized polypeptides were subjected to SDS-glycine-PAGE on a 16% polyacrylamide gel [37]. The gel was dried and analyzed in a Typhoon 8600 Phosphorimager (GE Healthcare).

2.9. N-terminal sequencing

The isolation of polypeptides for N-terminal sequencing was carried out as previously described [46]. The polypeptides of CcO were resolved by SDS-tricine-PAGE, transferred to a PVDF membrane, stained with Coomassie Brilliant Blue and the bands that corresponded to Cox2 were carefully excised from the membrane. N-terminal sequencing by automated Edman degradation of Cox2 was carried out by Dr. J. d'Alayer on an Applied Biosystems Sequencer at the Laboratoire de Microséquence des Protéines, Institut Pasteur, Paris (France).

2.10. Tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS)

2.10.1. Sample preparation

After SDS-tricine-PAGE, the protein bands were excised from the Coomassie stained gel and destained with 50% (v/v) methanol 5% (v/v) acetic acid for 12 h. The destained gels were washed with deionized water, soaked for 10 min in 100 mM ammonium bicarbonate, cut into small pieces, dehydrated with 100% acetonitrile and vacuum-dried. Proteins were reduced with 10 mM DTT and S-alkylated cysteine with 100 mM iodoacetamide in 100 mM ammonium bicarbonate. In gel digestion was performed by adding 30 μ L of modified porcine trypsin solution (20 ng/ μ L) in 50 mM ammonium bicarbonate followed by overnight incubation at room temperature. Peptides were extracted with 50% (v/v) acetonitrile 5% (v/v) formic acid twice for 30 min each time with sonication. The extracts were dried down under vacuum and resuspended in 20 μ L of 0.1% formic acid.

2.10.2. LC/MS/MS

HPLC/MS/MS analysis of peptides was carried out using an integrated nano-LC_ESI_MS/MS system. A NanoAcquity ultraperformance liquid chromatograph (UPLC) (Waters Corporation) coupled to a Q-ToF Synapt G2 high definition mass spectrometer (Waters Corporation) equipped with a NanoLockSpray ion source. The mass spectrometer was calibrated with a NaCl solution (mass range: 50 to 2000 Da) and operated in ESI positive V-mode at a resolution of 10,000 full width at half height (fwhh). Spectra were acquired in automated mode using data-dependent acquisition (DDA). [Glu 1] fibrinopeptide B solution (100 fmol/ μ L) was infused through the reference sprayer of the NanoLockSpray source at a flow rate of 0.5 μ L/min and was sampled at 30 s intervals during the acquisition. MS survey scans of 1 s over the m/z range 300 to 1600 were used for peptide detection followed by two MS/MS scans of 2 s each (m/z 50 to 2000) of detected precursors. Collision energies were automatically adjusted based upon the ion charge state and the mass. The five most intensive precursor ions of charge 2+, 3+ or 4+ were interrogated per MS/MS switching event. Dynamic exclusion for 60 s was used to minimize multiple MS/MS events for the same precursor. The data were postacquisition lock mass corrected using the doubly protonated monoisotopic ion of [Glu 1] fibrinopeptide.

2.10.3. Data processing and protein identification

DDA raw data files were processed and searched using the ProteinLynx Global Server version 2.4 (PLGS) software (Waters Corporation). The default parameter settings included: Perform lockspray calibration with a lockmass tolerance of 0.1 Da. Background subtract type, adaptative. Deisotoping type, medium. The processed DDA was queried against the *S. cerevisiae* database (<http://www.Uniprot.org/>) appended with the Cox2^{W56R} sequence. Trypsin was set as the digest reagent and one missed cleavage site was allowed. Mass tolerances of 30 ppm and 0.05 Da were used for precursor and product ions, respectively. Carbamidomethyl-cysteine was the fixed modification. Met oxidation and Gln-Asn deamidation were set as variable modifications.

2.11. In silico protein analysis

The sequences of yeast CcO subunits were modeled with SwissModel (<http://swissmodel.expasy.org/>) [47–49] using as template bovine heart cytochrome *c* oxidase at the fully oxidized state (PDB ID: 2OCC) [50]. Models were made in Automated Mode, except for the one of Cox7a, which was done in Alignment Mode. The following yeast sequences were modeled upon their corresponding templates: Cox1 encoded by COX1 (NCBI accession number NP_009305) on PDB ID: 2occa; Cox2 encoded by COX2 (NP_009326) on PDB ID: 2occb; Cox3 encoded by COX3 (NP_009328) on PDB ID: 2occc; Cox4 encoded by COX4 (NP_011328) on PDB ID: 2occf; Cox5 encoded by COX5

(NP_014346) on PDB ID: 2occD; Cox6 encoded by COX6 (NP_011918) on PDB ID: 2occE; Cox7 encoded by COX7 (NP_013983) on PDB ID: 2occJ; Cox8 encoded by COX8 (NP_013499) on PDB ID: 2occL; Cox7a encoded by COX9 (NP_010216) on PDB ID: 2occI; Cox9 encoded by COX12 (NP_013139) on PDB ID: 2occH; and Cox13 encoded by COX13 (NP_011324) on PDB ID: 2occG. Models were visualized with Swiss-PdbViewer 4.0.4. The nomenclature of yeast CcO subunits is in accordance with Barrientos et al. [51].

3. Results

3.1. Complementation of a respiratory mutant defective in the gene COX2 by an allotopically expressed Cox2^{W56R}

Yeast mutants carrying a defective mitochondrial COX2 gene (Δcox2) are unable to grow in non-fermentable carbon sources [52]. The Δcox2 yeast mutant used in this work grew in fermentable carbon sources including glucose, galactose and raffinose (Fig. 1A, upper panels), but as expected, failed to grow in the presence of non-fermentable carbon sources like lactate or a mixture of ethanol-glycerol (Fig. 1A, lower panels). In contrast, the WT strain grew in both fermentable and non-fermentable carbon sources, (Fig. 1A, all panels). The yeast mitochondrial COX2 gene was recoded and cloned into an expression vector, giving rise to the Cox2^{W56R} precursor containing the MTS of Oxa1, the natural 15 amino acid leader sequence of Cox2 and the W56R mutation described earlier [1]. The Δcox2 mutant was transformed with this construct, and the resulting transformants were challenged to grow on non-fermentable carbon sources. In solid media, the complemented strain ($\Delta\text{cox2} + \text{Cox2}^{\text{W56R}}$ transformant) grew faster in

lactate than in ethanol and glycerol, albeit in both cases, at lower rates as compared to the WT strain (Fig. 1A, lower panels). The growth of the $\Delta\text{cox2} + \text{Cox2}^{\text{W56R}}$ transformant was also slower than that of the WT strain in liquid media containing ethanol and glycerol (Fig. 1B). Estimated generation times were 5.4 for WT and 6.7 for $\Delta\text{cox2} + \text{Cox2}^{\text{W56R}}$ in ethanol-glycerol; and 5.0 for WT and 6.1 for $\Delta\text{cox2} + \text{Cox2}^{\text{W56R}}$ in lactate medium.

To identify the presence of Cox2 in the different strains, yeast was grown in a galactose medium and whole cell protein extracts were loaded onto gels to perform SDS-tricine-PAGE. Then, Western blot analysis was carried out using specific anti-yeast Cox2 antibodies. Fig. 2A shows the presence of mature Cox2 in whole cell protein extracts from the WT strain (mCox2^{WT}; Fig. 2A lane 1), from the $\Delta\text{cox2} + \text{Cox2}^{\text{W56R}}$ transformant (mCox2^{W56R}; Fig. 2A lane 4), from isolated mitochondria from the WT strain (Fig. 2A, lane 5), and from a crude fraction of isolated bc_1 complex (Fig. 2A, lane 6). In contrast, in the Δcox2 mutant (Fig. 2A, lane 2) and the Δcox2 mutant transformed with an empty vector (Fig. 2A, lane 3) no Cox2 band was observed. A second band with a higher molecular mass, representing the Cox2^{W56R} precursor protein (pCox2^{W56R}), was present only in the whole cell protein extract of the $\Delta\text{cox2} + \text{Cox2}^{\text{W56R}}$ transformant (Fig. 2A, lane 4). The nylon membrane was stripped and re-decorated with an anti-Rieske iron sulfur protein antibody (anti-FeS). Both the WT strain and the $\Delta\text{cox2} + \text{Cox2}^{\text{W56R}}$ transformant exhibited equivalent amounts of the bc_1 complex subunit.

In order to isolate mitochondria, colonies from the WT strain and the $\Delta\text{cox2} + \text{Cox2}^{\text{W56R}}$ transformant were selected and grown in a medium containing galactose as carbon source. To search for the presence of Cox2^{W56R} subunits, mitochondria were isolated, solubilized, and subjected to SDS-tricine-PAGE and Western blot analysis. Fig. 2B shows

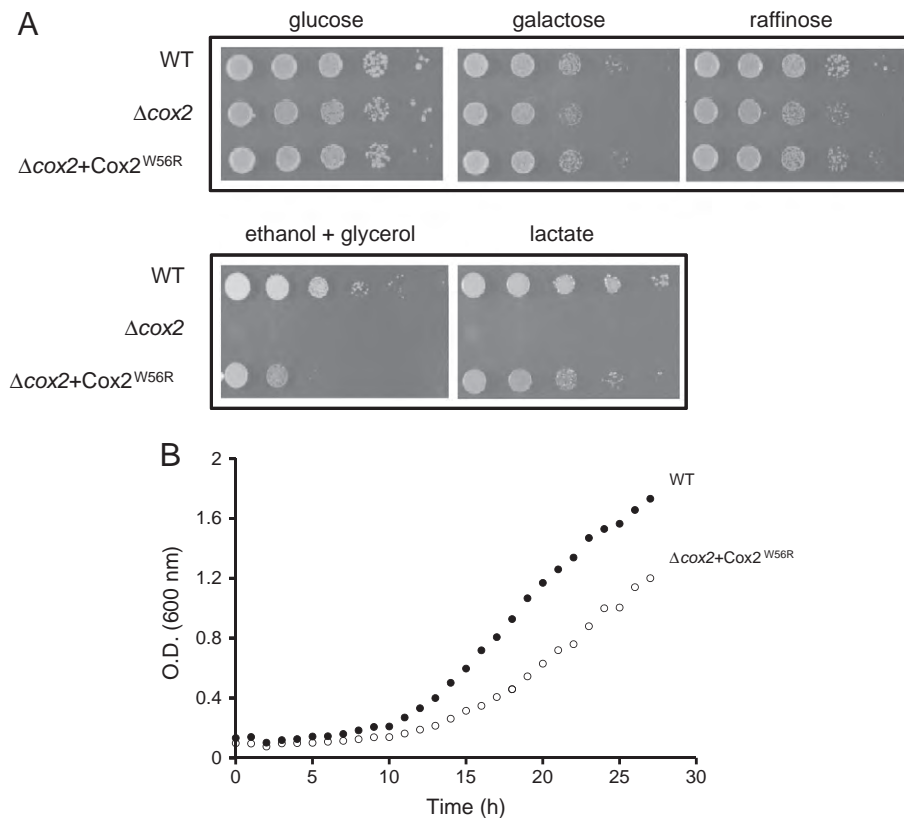


Fig. 1. Cells carrying the allotopically-expressed Cox2^{W56R} subunit grow in non-fermentable carbon sources. A) Growth of the yeast strains on solid media containing different carbon sources. Wild-type (WT), the Δcox2 mutant (Δcox2) and the $\Delta\text{cox2} + \text{Cox2}^{\text{W56R}}$ transformant were serially diluted and spotted on solid media containing the fermentable carbon sources glucose, galactose, or raffinose (upper panels) and the non-fermentable carbon sources ethanol plus glycerol or lactate (lower panels). Cells were grown for 3 days at 30 °C, except for the panel of ethanol plus glycerol that corresponds to 4 days of growth. B) Growth of the yeast strains in liquid media containing ethanol and glycerol as carbon sources. Optical density at 600 nm was measured at the indicated times for the WT strain (black circles) and the $\Delta\text{cox2} + \text{Cox2}^{\text{W56R}}$ transformant (open circles).

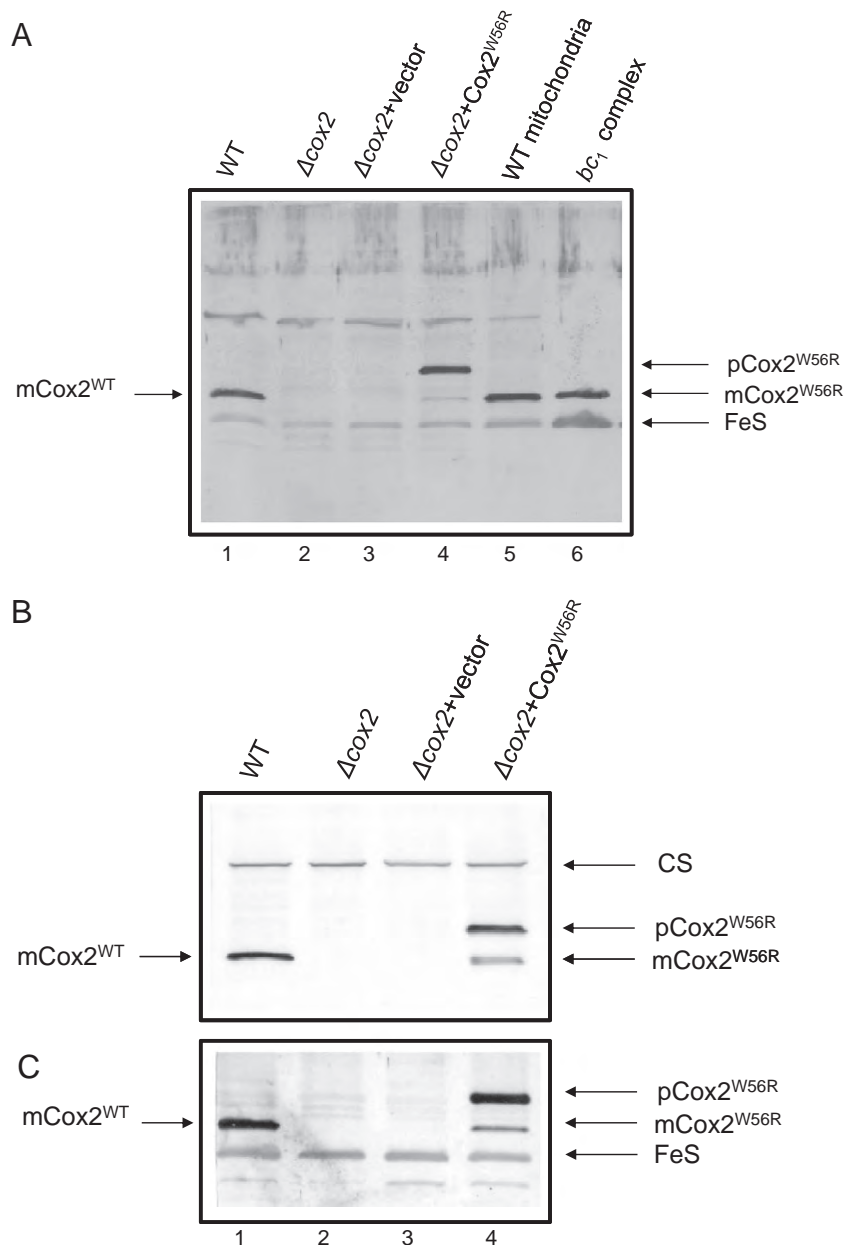


Fig. 2. The mature Cox2^{W56R} is present in whole cell protein extracts and in mitochondria, albeit at lower levels than Cox2^{WT}. **A)** Western blot of whole yeast protein extracts showing the presence or absence of the Cox2 subunit in the WT strain (lane 1), in the Δ cox2 mutant (Δ cox2, lane 2), in a Δ cox2 mutant transformed with empty-plasmid (Δ cox2 + vector, lane 3), in the Δ cox2 + Cox2^{W56R} transformant (lane 4), in isolated mitochondria from WT (lane 5), and in a crude preparation of isolated *bc*₁ complex (lane 6). The resulting mature proteins are marked as mCox2^{WT} and mCox2^{W56R}, while the allotopically-expressed precursor containing the MTS and the 15-residue leader sequence is denoted by pCox2^{W56R}. **B)** Western blot analysis of yeast mitochondria isolated from the WT strain (lane 1), the Δ cox2 mutant (Δ cox2, lane 2), the Δ cox2 mutant transformed with empty-plasmid (Δ cox2 + vector, lane 3), and the Δ cox2 + Cox2^{W56R} transformant (lane 4). The blot was decorated with an anti-Cox2 antibody. For loading controls the membrane was reblotted with an antibody directed against citrate synthase (CS). **C)** A Western blot similar to the one shown in panel B was decorated with anti-Cox2 antibodies and reblotted with antibodies raised against the bovine Rieske-type iron sulfur protein of the *bc*₁ complex (FeS).

the presence of the mature Cox2 in mitochondria isolated both from the WT strain (mCox2^{WT}; Fig. 2B lane 1) and from the Δ cox2 + Cox2^{W56R} transformant (mCox2^{W56R}; Fig. 2B lane 4). No Cox2 band was observed in the Δ cox2 mutant (Fig. 2B, lane 2) or in the Δ cox2 mutant transformed with an empty vector (Fig. 2B, lane 3). The Cox2^{W56R} precursor protein (pCox2^{W56R}), was present only in mitochondria of the Δ cox2 + Cox2^{W56R} transformant (Fig. 2B, lane 4), suggesting that a fraction of this precursor may have been internalized into the organelle. To ensure that equivalent amounts of mitochondrial protein were loaded in the blot, the nylon membrane was re-blotted with antibodies raised against citrate synthase (CS). As judged by the immunochemical reaction, equivalent amounts of CS seem to be present in all the analyzed mitochondrial fractions (Fig. 2B,

lanes 1–4). The ratio of mCox2^{WT} to CS, as judged by densitometry was 3.65 (Fig. 2B, lane 1), while the ratio of mCox2^{W56R} to CS was 1.60 (Fig. 2B, lane 4), indicating that the mature form of the cytosol-synthesized Cox2^{W56R} was only a fraction of the mitochondrion-synthesized Cox2^{WT}. A parallel blot, decorated with antibodies against the Cox2 subunits and against the bovine Rieske iron sulfur protein of the *bc*₁ complex revealed similar results (Fig. 2C, lanes 1–4).

3.2. Resolution of complex IV by Blue-Native gel electrophoresis

BN-PAGE allows to separate and to visualize membrane complexes under native conditions [53] and has been a powerful tool to

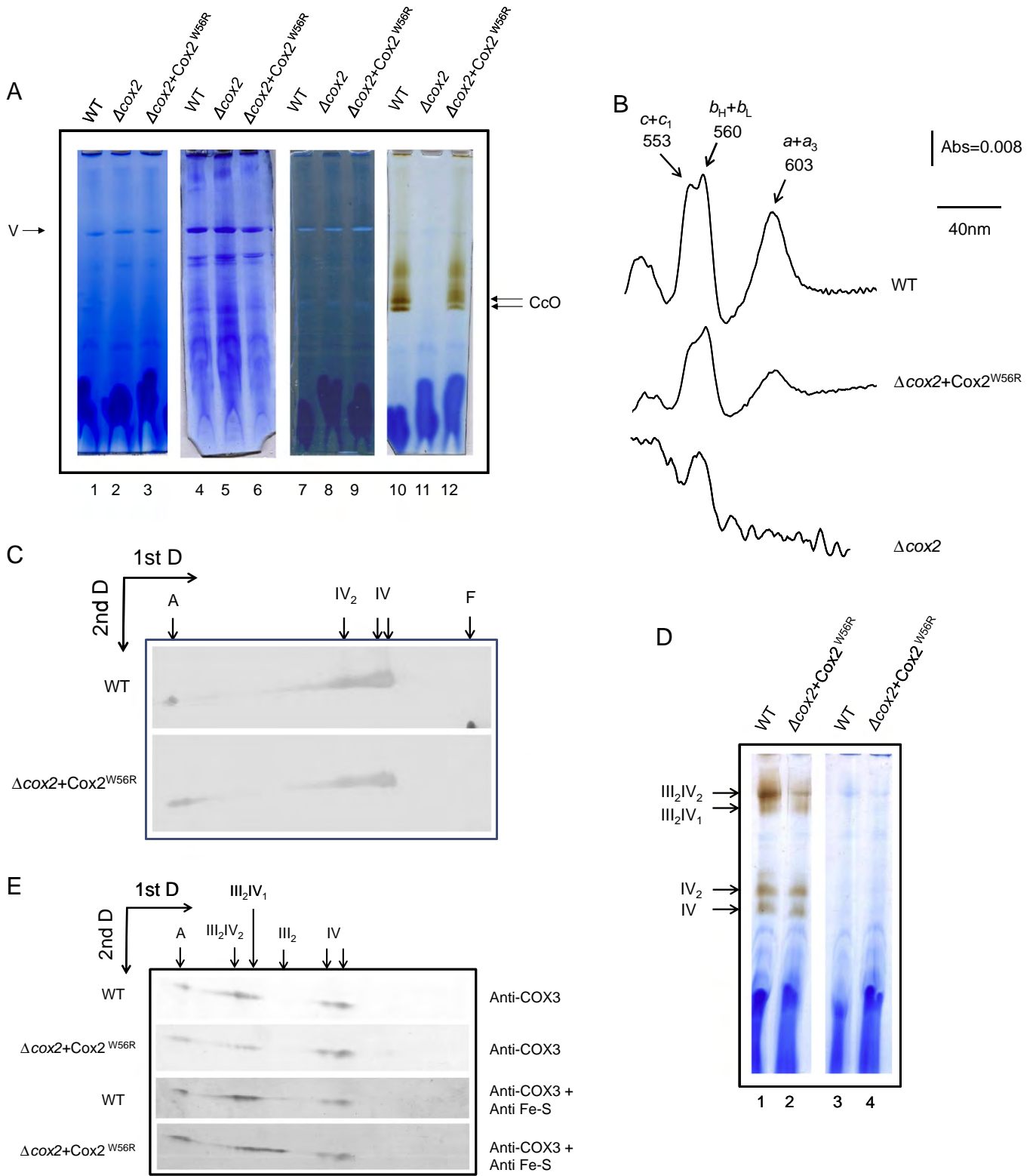


Fig. 3. Cells carrying the allotypic $\text{Cox}2^{\text{W56R}}$ show less in-gel activity after BN-PAGE and lower heme a/heme b ratios as compared to WT. A) Mitochondria obtained from the WT strain, the $\Delta\text{cox}2$ mutant and the $\Delta\text{cox}2 + \text{Cox}2^{\text{W56R}}$ transformant were solubilized with LM and separated by BN-PAGE. Lanes 1–3, BN gel, as obtained; lanes 4–6 Coomassie Blue stain; lanes 7–9, in-gel ATPase activity staining; lanes 10–12 in-gel CcO activity. Arrows denote the in-gel activity stained bands of the $\text{F}_1\text{Fo-ATPase}$ (V), and CcO. B) Visible spectra of mitochondria obtained from the WT strain, the $\Delta\text{cox}2$ mutant and the $\Delta\text{cox}2 + \text{Cox}2^{\text{W56R}}$ transformant. 400 μg of mitochondrial protein solubilized with LM from each strain were used to obtain the dithionite-reduced minus ferricyanide-oxidized spectra. The identities of the corresponding heme groups are indicated. C) Western blot analysis of LM-solubilized mitochondria from the WT strain and the $\Delta\text{cox}2 + \text{Cox}2^{\text{W56R}}$ transformant subjected to BN-PAGE followed by 2D-SDS-PAGE. Blots were decorated with an anti-Cox3 antibody. Aggregates not entering the gel are denoted as A, dimeric CcO as IV_2 , the two forms of monomeric CcO as IV, and the gel front as F. No sub-complex containing Cox3 exhibiting a higher mobility than complex IV could be observed. D) Mitochondria obtained from the WT strain and the $\Delta\text{cox}2 + \text{Cox}2^{\text{W56R}}$ transformant were solubilized with 2% digitonin, separated by BN-PAGE and stained for in-gel CcO activity in the absence (lanes 1 and 2) or presence of KCN (lanes 3 and 4). Arrows denote the in-gel activity stained bands of monomeric CcO (IV), dimeric CcO (IV_2), and of CcO associated to supercomplexes (III_2IV_1 and III_2IV_2). E) Western blot analysis of digitonin-solubilized mitochondria from the WT strain and the $\Delta\text{cox}2 + \text{Cox}2^{\text{W56R}}$ transformant subjected to BN-PAGE followed by 2D-SDS-PAGE. Blots were decorated with an anti-Cox3 antibody (two upper panels), stripped and re-decorated with an anti-FeS antibody (two lower panels). Aggregates at the start of the gel are denoted as A, and the identity of the observed complexes and supercomplexes are indicated. The presence of free, dimeric bc_1 complex (III_2) is clearly visible in the bottom panel.

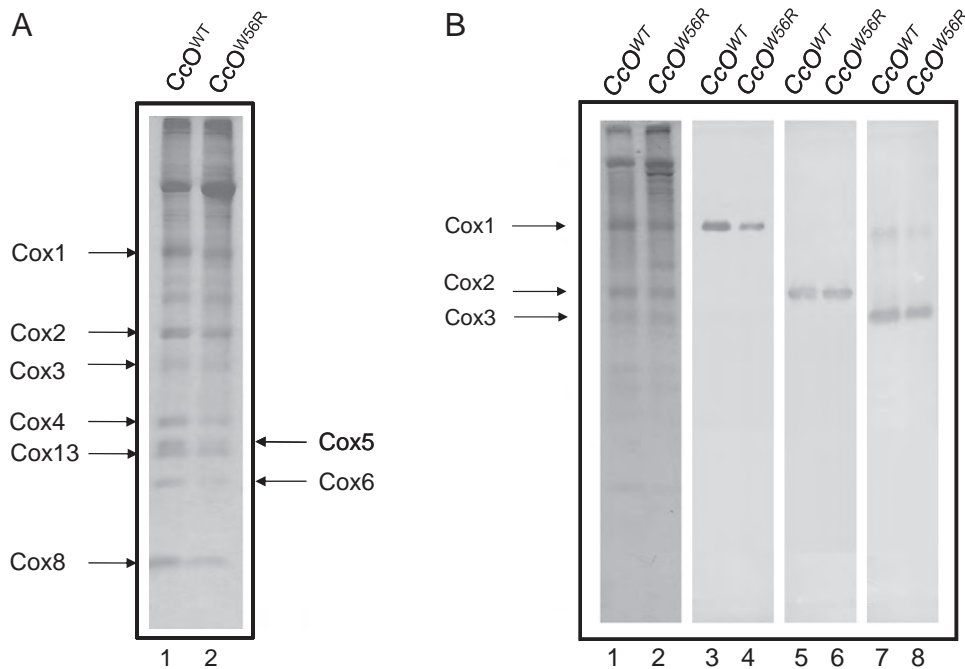


Fig. 4. Wild-type CcO and the enzyme carrying Cox2^{W56R} show similar subunit composition. Comparison of the polypeptide patterns of CcO preparations from the WT strain and the Δ cox2 + Cox2^{W56R} transformant. A) Electrophoretic patterns and polypeptide composition of CcO preparations from WT (CcO^{WT}) and the mutant strain (CcO^{W56R}). The main subunits are labeled. Each lane was loaded with 50 μ g of protein. B) Electrophoretic patterns and Western blot analysis of CcO^{WT} and CcO^{W56R}. Lanes 1 and 2, Coomassie Blue stained gel, lanes 3 and 4, Western blot decorated with an anti-Cox1 antibody, lanes 5 and 6, Western blot decorated with an anti-Cox2 antibody, and lanes 7 and 8, Western blot decorated with an anti-Cox3 antibody. Each lane was loaded with 25 μ g of protein.

study the OXPHOS complexes of yeast [54]. In order to compare CcO contents among the WT, the Δ cox2 mutant and the Δ cox2 + Cox2^{W56R} transformant, the strains were grown in a raffinose-containing medium. Mitochondria were isolated, solubilized with LM and subjected to BN-PAGE. Fig. 3A shows the polypeptide pattern of the mitochondrial complexes as obtained after BN-PAGE (Fig. 3A, lanes 1–3), and after fixing and staining with Coomassie Brilliant Blue (Fig. 3A, lanes 4–6). In-gel activity staining was carried out in order to identify some of the main mitochondrial complexes. To localize the active yeast F₁F₀-ATPase (complex V) on BN-PAGE, duplicate lanes were incubated in the presence of ATP and Pb(NO₃)₂. A band of 540 kDa was able to hydrolyze ATP, as indicated by the formation of a lead phosphate precipitate (Fig. 3A, lanes 7–9). All mitochondria, including the Δ cox2 mutant, exhibited equivalent amounts of complex V as judged by Coomassie Blue staining (Fig. 3A, lanes 4–6), and in-gel activities (Fig. 3A, lanes 7–9). When in-gel staining was carried out for CcO activity, two close bands revealed activity in the WT and in the Δ cox2 + Cox2^{W56R} strains (Fig. 3A, lanes 10 and 12), while no in-gel activity could be detected in the Δ cox2 mutant, as expected (Fig. 3A, lane 11). Two close bands exhibiting CcO activity after BN-PAGE have been previously described in yeast mitochondria. The upper band probably corresponds to the monomeric holoenzyme CcO complex, while the lower one represents a CcO lacking subunit Cox6 (equivalent to bovine subunit Cox6a) that may partially dissociate during BN-PAGE [52]. The Δ cox2 + Cox2^{W56R} transformant exhibited in-gel CcO activity, albeit with 40% lower intensity than the one observed for the WT, as judged by densitometry. The lower activity of CcO could be attributed either to a lower enzymatic activity or to lower steady-state accumulation levels of complex IV.

In order to estimate the ratio of CcO to cytochrome *bc*₁ complex in the WT strain and in the Δ cox2 + Cox2^{W56R} transformant, the content of *aa*₃-type hemes and *b*-type hemes were determined from reduced minus oxidized difference spectra (Fig. 3B). For this purpose, mitochondria from WT and the Δ cox2 + Cox2^{W56R} transformant grown in a lactate liquid medium and mitochondria from the Δ cox2 mutant grown

in galactose were solubilized with LM, centrifuged, and difference spectra of the supernatants were recorded (dithionite-reduced minus ferricyanide-oxidized). As expected, mitochondria from the Δ cox2 mutant exhibited undetectable levels of type *aa*₃ hemes and it also exhibited diminished levels of *bc*₁ complex (160 pmoles of heme *b* per mg of protein). In contrast, the WT strain exhibited 266 pmoles of heme *aa*₃ per mg of protein, and the Δ cox2 + Cox2^{W56R} transformant 154 pmoles of heme *aa*₃ per mg of protein. The heme *aa*₃/heme *b* ratios obtained were 0.75 for the WT strain and 0.30 for the Δ cox2 + Cox2^{W56R} transformant. Since both yeast strains contained similar amounts of *bc*₁ complex (354 and 396 pmoles of *b* heme per mg of protein, respectively), these data further supports the observation that there is approximately 40% less steady-state accumulation levels of CcO in the allotopically-transformed strain as compared to the WT strain.

We asked whether partially-assembled CcO sub-complexes were present in the Δ cox2 + Cox2^{W56R} transformant. For this purpose, mitochondria were isolated, solubilized with LM, subjected to BN-PAGE followed by second-dimension denaturing SDS-tricine-PAGE, transferred to a PVDF membrane and assayed by Western blotting using an anti-Cox3 antibody. No CcO sub-complex, at least no one containing Cox3, could be detected (Fig. 3C).

Since only 60% of assembled CcO is present in the Δ cox2 + Cox2^{W56R} transformant as compared to the WT strain, we thought of interest to explore the amount of supercomplexes present in both strains. For this purpose, mitochondria solubilized with 2% digitonin were subjected to BN-PAGE. Fig. 3D shows the polypeptide pattern of the mitochondrial supercomplexes as obtained after BN-PAGE and in-gel staining for CcO activity (Fig. 3D, lanes 1–4). Four main bands exhibited in-gel CcO activity that were attributed to monomeric complex IV, dimeric complex IV (IV₂), and to two supercomplexes formed by the association of CcO and *bc*₁ complex (III₂IV₁ and III₂IV₂) (Fig. 3D, lanes 1 and 2). The in-gel CcO activity after digitonin solubilization was considerably higher than the one observed after LM solubilization (Fig. 3A, lanes 10 and 12), but was completely sensitive to cyanide (Fig. 3D, lanes 3 and 4). Nevertheless, in-gel-staining of CcO activity of the Δ cox2 + Cox2^{W56R} transformant was

Coverage map of COX2^{WT} digested with trypsin

DVPTPYACYFQDSATPNQEGILELHDNIMFYLLVILGLVSW₅₆MLYTIVMTYSK[↓]NP
 IAYK[↓]YIK[↓]HGQTIEVIWTFIPAVILLIIAFPSFILLYLCEVISPAMTIK[↓]AIGYQWYW
 K[↓]YEYSDFINDSGETVEFESYVIPDELLEEGQLR[↓]LLD[↓]TD[↓]TS[↓]MV[↓]VP[↓]VD[↓]THIR[↓]FVVTA
 ADVIHDFAI[↓]PSLGIK[↓]VDATPGR[↓]LNOVSALIQR[↓]EGVFGACSEL[↓]CGTGHANMPIK[↓]I
 EAVSLPK[↓]FLEWLNEQ

Coverage map of COX2^{W56R} digested with trypsin

DVPTPYACYFQDSATPNQEGILELHDNIMFYLLVILGLVSR₅₆MLYTIVMTYSK[↓]NP
 IAYK[↓]YIK[↓]HGQTIEVIWTFIPAVILLIIAFPSFILLYLCEVISPAMTIK[↓]AIGYQWYW[↓]
 K[↓]YEYSDFINDSGETVEFESYVIPDELLEEGQLR[↓]LLD[↓]TD[↓]TS[↓]MV[↓]VP[↓]VD[↓]THIR[↓]FVVTA
 ADVIHDFAI[↓]PSLGIK[↓]VDATPGR[↓]LNOVSALIQR[↓]EGVFGACSEL[↓]CGTGHANMPIK[↓]I
 EAVSLPK[↓]FLEWLNEQ

Fig. 5. The W56R mutation in Cox2 is present in the assembled CcO carrying the allotypically-expressed Cox2^{W56R}. Coverage maps showing the polypeptides derived from mature Cox2^{WT} and Cox2^{W56R} identified by MS/MS after trypsin degradation. Arrows indicate possible trypsin cleavage sites, double underlined sequences indicate the polypeptides identified by MS/MS, W₅₆ and R₅₆ denote the residues involved in the W56R point mutation. These residues are actually located in position 41 of the sequence of the mature Cox2 subunit starting DVTPPY. The gray box indicates the polypeptide generated by the presence of R₅₆ in the mutant Cox2.

only 65% of the one observed in the WT strain, as judged by densitometric analysis. Decrease of the in-gel CcO activity in the $\Delta\text{cox2} + \text{Cox2}^{\text{W56R}}$ transformant was especially notable in the III₂IV₁ and III₂IV₂ supercomplexes, indicating a lower accumulation of supercomplexes when the amounts of CcO are limiting. In order to ascertain the presence of less supercomplexes in the $\Delta\text{cox2} + \text{Cox2}^{\text{W56R}}$ transformant, equivalent lanes of digitonin-solubilized mitochondria were subjected to BN-PAGE

followed by denaturing 2D-SDS-PAGE and Western blotting using anti-Cox3 and anti-FeS antibodies. Less Cox3 antibody staining was found associated to the III₂IV₁ and III₂IV₂ supercomplexes in the $\Delta\text{cox2} + \text{Cox2}^{\text{W56R}}$ transformant as compared to the WT strain. In addition, while all the bc₁ complex of the WT strain was found associated to CcO in the III₂IV₁ and III₂IV₂ supercomplexes, the presence of free, monomeric bc₁ complex (III₂) could be detected only in the $\Delta\text{cox2} + \text{Cox2}^{\text{W56R}}$ strain

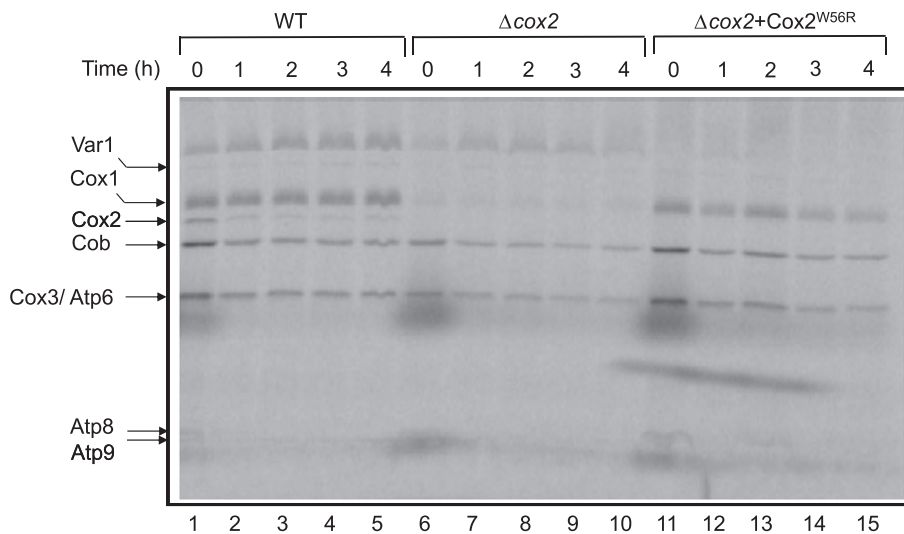


Fig. 6. Synthesis of Cox1 has normal levels in the Cox2^{W56R} strain and is stable for at least 4 h. Mitochondrial translation products of the WT strain (lanes 1–5), the Δcox2 mutant (with empty vector; lanes 6–10) and the $\Delta\text{cox2} + \text{Cox2}^{\text{W56R}}$ transformant (lanes 11–15) were labeled with [³⁵S] methionine in the presence of cycloheximide, and proteins were analyzed as described under Materials and methods. The identity of each polypeptide is labeled. The different strains were pulsed with [³⁵S] methionine for 15 min and chased for 0, 1, 2, 3 and 4 h as indicated. Labeled translation products are indicated as follows: cytochrome c oxidase subunit 1, Cox1; subunit 2, Cox2; subunit 3, Cox3; cytochrome b, Cob; subunit 6 of ATPase, Atp6; subunit 8, Atp8; subunit 9, Atp9; and the ribosomal protein, Var1. For unknown reasons, in this particular experiment the upper band corresponding to the neo-formed c-ring (Atp9 oligomer) was observed with less intensity in the $\Delta\text{cox2} + \text{Cox2}^{\text{W56R}}$ transformant.

(Fig. 3E). All together, these data strongly suggest that less supercomplexes containing CcO are accumulated in the $\Delta\text{cox2} + \text{Cox2}^{\text{W56R}}$ transformant.

3.3. Isolation and partial characterization of CcO from WT and the $\Delta\text{cox2} + \text{Cox2}^{\text{W56R}}$ yeast strains

Complex IV was purified from both the WT (CcO^{WT}) and the mutant (CcO^{W56R}) mitochondria. The isolated complexes catalyzed electron transfer from yeast cytochrome *c* to oxygen in a fully cyanide-sensitive reaction. The specific activities of oxygen uptake measured in the presence of 100 μM reduced yeast cytochrome *c* were 6.4 and 4.8 ngat O/nmol *aa*₃/min for the CcO^{WT} and the CcO^{W56R} respectively. Higher rates of oxygen uptake were observed in the presence of 100 μM reduced horse heart cytochrome *c*, 9.2 and 7.4 ngat O/nmol *aa*₃/min for the CcO^{WT} and the CcO^{W56R} respectively. This data indicate that the CcO^{W56R} exhibits 75 to 80% of the activity of the CcO^{WT} enzyme. Fig. 4A (lanes 1 and 2) shows the polypeptide pattern after SDS-tricine-PAGE of the isolated enzymes. Both CcO exhibited similar polypeptide compositions. To confirm the identity of the three main polypeptides, Cox1, Cox2 and Cox3, Western blot analysis using specific antibodies against these subunits was carried out (Fig. 4B, lanes 3–8). The antibodies recognized all three subunits both in the CcO^{WT} (Fig. 4B, lanes 3, 5 and 7) and in the CcO^{W56R} (Fig. 4B, lanes 4, 6 and 8). Thus, the bands corresponding to Cox2^{WT} and Cox2^{W56R} were unambiguously identified and used in further analyses.

To confirm the presence of the substitution of residue W₅₆ by R₅₆ in the sequence of the Cox2^{W56R} subunit, both the Cox2^{WT} and the Cox2^{W56R} polypeptides were excised from the gel and subjected to trypsin digestion, and thereafter analyzed by tandem mass spectrometry (MS/MS). The identified peptides are shown in the coverage maps of Fig. 5. The polypeptide MLYTIVMTY was present in the trypsin digestion pattern of Cox2^{W56R}, while it was absent in the digestion pattern of Cox2^{WT}, strongly suggesting the presence of residue R₅₆ in the Cox2^{W56R} subunit. The presence of R₅₆ generates a new cleavage site for trypsin in Cox2^{W56R} that gives rise to the abovementioned polypeptide. Thus, unequivocal evidence is provided that the cytosol-synthesized Cox2^{W56R} was found as a subunit assembled into CcO.

The mitochondrion-encoded Cox2 of *S. cerevisiae* is normally synthesized inside the organelle as a precursor containing an N-terminal

leader sequence of 15 residues [9,11]. The allotopically-expressed Cox2^{W56R} precursor, besides the MTS of Oxa1, also contains this natural leader sequence of 15-residues. Since the Cox2^{W56R} that was imported into mitochondria and assembled into CcO exhibited an apparent molecular mass identical to Cox2^{WT}, it was expected that both protein precursors eventually gave rise to the same mature protein. Both Cox2^{WT} and Cox2^{W56R} polypeptides were transferred onto a PVDF membrane and subjected to N-terminal sequencing by Edman degradation. The first ten residues of the N-terminal sequence obtained for Cox2^{W56R} (DVPTPYACYF) were identical to the ones obtained for the Cox2^{WT} (DVPTPYACYFQD). Therefore, mitochondrion-synthesized Cox2^{WT} is proteolitically processed once by removal of its 15-residues leader sequence, while the allotopically-expressed Cox2^{W56R} precursor must be proteolitically processed twice, first by the removal of the MTS from Oxa1, then by the removal of the 15-residue leader sequence. Most probably, removal of the MTS occurs in the mitochondrial matrix, while the processing of the leader sequence should take place in the mitochondrial inter-membrane space [11,55]. These data led us to conclude that Cox2^{W56R} is structurally identical to Cox2^{WT}. Since the W56R mutation seems to only slightly impair CcO activity, it can also be concluded that the lower respiratory activity of the $\Delta\text{cox2} + \text{Cox2}^{\text{W56R}}$ transformant is mainly due to the presence of lower steady-state levels of assembled complex IV. Therefore, the import, maturation, or assembly of the allotopically-expressed Cox2^{W56R} must be the limiting step of complex IV biogenesis in the $\Delta\text{cox2} + \text{Cox2}^{\text{W56R}}$ transformant.

3.4. Regulation of Cox1 biogenesis by the presence of an allotopically-expressed Cox2^{W56R}

In vivo or *in-organello* pulse labeling of Cox1 with [³⁵S] methionine is strongly reduced in the presence of mutations that block CcO assembly. This reduced labeling of Cox1 is due to a decrease in Cox1 synthesis [6]. Thus, absence of mitochondrial Cox2 synthesis is one of the multiple factors that down-regulates Cox1 biogenesis. We asked whether the allotopically-expressed Cox2^{W56R} would restore mitochondrial Cox1 synthesis; thus indicating a normal CcO assembly. *In vivo* pulse labeling of yeast with [³⁵S] methionine in the presence of cycloheximide was performed, followed by SDS-glycine-PAGE and analysis of the radioactive label. The synthesis of Cox1 was severely diminished in the Δcox2 mutant as compared to the WT strain (Fig. 6, lanes 1 and 6). As expected, no band that would indicate Cox2^{WT} synthesis was observed in the Δcox2 mutant (Fig. 6,

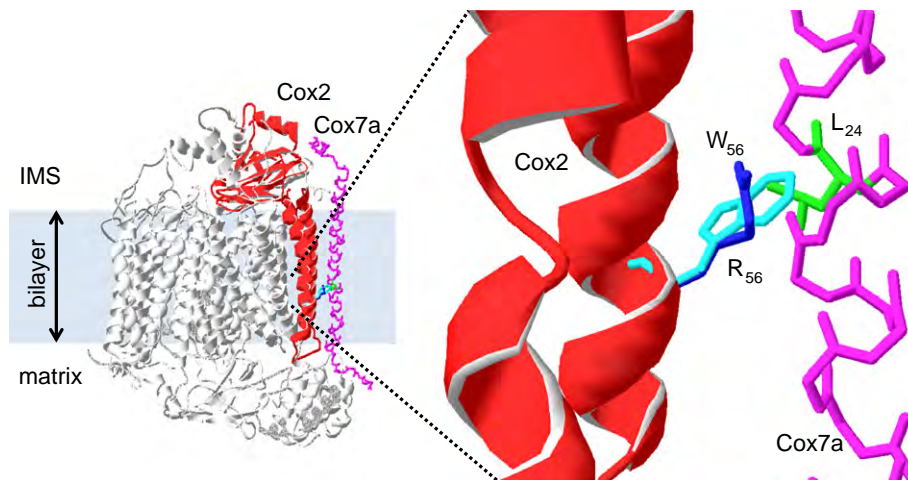


Fig. 7. Yeast CcO subunits modeled on the bovine CcO crystallographic structure. A) Model showing the position of residues W₅₆ (cyan) and R₅₆ (blue) in Cox2 (red) and its close proximity to L₂₄ (green) of Cox7a (magenta). The rest of the subunits are depicted in light gray.

lane 6). The polypeptide pattern of mitochondria-synthesized proteins in the $\Delta\text{cox2} + \text{Cox2}^{\text{W56R}}$ transformant also exhibited the absence of a mitochondrion-synthesized Cox2^{WT} band as expected (Fig. 6, lane 11). Nevertheless, Cox1 synthesis in the $\Delta\text{cox2} + \text{Cox2}^{\text{W56R}}$ transformant was equivalent to the one observed in the WT strain (Fig. 6, lanes 1 and 11). Thus, the presence of the allotopically-expressed $\text{Cox2}^{\text{W56R}}$ protein in mitochondria, allows Cox1 biosynthesis to be restored to levels equivalent to those found in the WT strain. Furthermore, a pulse-chase experiment showed that both the Cox1 subunit synthesized by the WT and by the $\Delta\text{cox2} + \text{Cox2}^{\text{W56R}}$ transformant were stable for as long as 4 h (Fig. 6, lanes 2–5 and 12–15 respectively), suggesting that Cox1 is being incorporated correctly into CcO in both strains.

4. Discussion

In yeast, as in the vast majority of eukaryotes, Cox2 is encoded in the mitochondrial genome. However, in some species the mitochondrial gene *COX2* has naturally migrated to the nucleus, either as an intact gene (as in legumes) [56] or as split genes (as in green algae and apicomplexan parasites) [57–59]. Efforts have been made to emulate the natural migration of mitochondrial genes to the nucleus by engineering the corresponding mitochondrial *COX2* gene to allow its expression from the nucleus, the so called allotopic expression. Daley et al. [60] were able to internalize *in vitro* synthesized soybean Cox2 carrying two point mutations into isolated soybean mitochondria. More recently Supekova et al. [1] expressed a $\text{Cox2}^{\text{W56R}}$ precursor *in vivo*, successfully restoring respiration in a Δcox2 yeast mutant. Several modifications must be made on the original mitochondrial genes to allow its allotopic expression. The mitochondrial gene sequence must be recoded in accordance with the nuclear genetic code and with its codon usage bias, and a nucleotide sequence encoding an appropriate MTS must be added, in order to ensure correct delivery of the cytosol-synthesized protein to mitochondria. Diminished hydrophobicity seems also to be a key feature to allow import of mitochondrial membrane proteins whose genes naturally migrated to the nucleus or that they were engineered to be synthesized in the cytosol [60–66]. For example, the nucleus-encoded subunits Cox2A, Cox2B, Cox3, Atp6, Nad3 and Nad4L of chlorophycean algae exhibit reduced hydrophobicity compared to their mtDNA-encoded counterparts [29,57,58,67]. For algal Cox3 and Atp6, the decrease of mean hydrophobicity occurs mostly in those TMS that are not crucial for function or that are not involved in subunit-subunit interactions [29,58,68]. A similar observation was made with the mitochondrial *sdh3* gene, encoding a succinate dehydrogenase (complex II) subunit, relocated to the nucleus in angiosperms; its protein product also exhibits a diminished hydrophobicity when compared to its mitochondrial counterparts [69]. Also, in leguminous species that express both mitochondrial and nuclear *COX2* genes, the nucleus-encoded Cox2 proteins exhibit a lower hydrophobicity than their mitochondrion-encoded counterparts. It was clearly demonstrated that two amino acid changes in the first TMS of soybean Cox2 that introduced less hydrophobic residues, were necessary to allow the *in vitro* import of the protein by isolated mitochondria [60]. Also, the W56R mutation, that diminishes the hydrophobicity of the first TMS of yeast Cox2, was required to achieve functional import of this subunit into mitochondria *in vivo* [1]. The W56R mutation was originally numbered according to the Cox2 precursor that contained the 15-residue leader sequence, so it actually corresponds to W41R in the sequence of the mature Cox2. The mutation is located in a region of the TMS close to the face of the inner mitochondrial membrane exposed to the mitochondrial matrix and in close proximity to Cox7a (Fig. 7). All cytosol-expressed Cox2 subunits that are imported into mitochondria exhibit, in average, diminished hydrophobicity of the first TMS and a slightly increased hydrophobicity in the second TMS [70]. The lower average hydrophobicity of the first TMS would allow its full translocation to the mitochondrial matrix through the Tim23

translocon, while the second TMS would be retained by Tim23 and laterally inserted into the inner mitochondrial membrane [55]. These changes in the average hydrophobicity of the two TMS of a cytosol-synthesized Cox2 ensures the proper insertion of this subunit in the inner mitochondrial membrane in order to reach its characteristic topology, with both the N- and C-termini exposed towards the IMS.

Mutations that diminish hydrophobicity in a TMS may allow import of the corresponding protein into mitochondria, but at the same time, they may affect the assembly of the subunit, or its stability, or even abolish the function of the whole complex. In the case of the allotopically-expressed $\text{Cox2}^{\text{W56R}}$, the oxygen uptake of CcO^{W56R} in the presence of cytochrome *c* is not severely impaired, since only 20–25% of the oxygen-uptake activity was lost. The CcO^{W56R} contains an arginine with a positive charge that substitutes a tryptophan that is exposed towards Leucine 24 in Cox7a, according to a model built with the yeast CcO subunits based on the bovine CcO crystallographic structure (Fig. 7). Since a charged residue is not expected to interact in an hydrophobic milieu, the presence of R₅₆ may induce some conformational changes that may diminish the activity of the enzyme. More importantly, 40% lower accumulation levels of CcO^{W56R} were observed in the $\Delta\text{cox2} + \text{Cox2}^{\text{W56R}}$ transformant. We suggest that the import, maturation or assembly of CcO^{W56R} into CcO is a rate-limiting process, and/or that a fraction of the allotopically-expressed $\text{Cox2}^{\text{W56R}}$ precursor that reaches the inner mitochondrial membrane may be degraded by mitochondrial proteases before it is matured or before it gets functionally assembled into CcO. Notwithstanding the reduced levels of CcO^{W56R} , these are enough to sustain growth rates of the $\Delta\text{cox2} + \text{Cox2}^{\text{W56R}}$ transformant in liquid media containing non-fermentable carbon sources, albeit at slightly lower rates than those of the WT strain.

CcO assembly is a linear process, the first assembly intermediate is the Cox1 subunit, and the rest of the subunits and cofactors are thought to be added in a sequential order [52,71]. In mutants where CcO assembly is blocked, most of the subunits are rapidly degraded, but also the synthesis of Cox1 is down-regulated, and this process depends on the Cox1 carboxyl-terminal end [72–74]. The regulation of the Cox1 synthesis prevents the formation of a pro-oxidant intermediates containing unassembled heme *a*₃ [75]. As expected, Cox1 synthesis was decreased in the Δcox2 mutant as compared to the WT strain. Nevertheless, in the presence of the allotopically-expressed $\text{Cox2}^{\text{W56R}}$, mitochondrial Cox1 synthesis was restored to normal levels. This indicates that the presence of Cox2 in the inner mitochondrial membrane, independently of its origin (mitochondrion- or cytosol-synthesized), allows for a normal Cox1 synthesis in the organelle. In addition, pulse-chase experiments suggest that the newly synthesized Cox1 subunit in the complemented strain is stable for several hours, indicating that Cox1 is being incorporated correctly into the inner mitochondrial membrane when adequate steady-state levels of the allotopically-expressed $\text{Cox2}^{\text{W56R}}$ are present. This observation strongly supports that the W56R mutation present in Cox2 does not impair the CcO biogenesis, however we cannot rule out a possible interference of the W56R mutation in the assembly of Cox2 to the enzyme.

Two supercomplexes involving CcO (III₂IV₂ and III₂IV₁) have been previously identified and characterized in yeast [76–80]. Two additional protein components, Rcf1 and Rcf2, that seem to be critical in maintaining the interaction between CcO and the *bc*₁ complex in these supercomplexes, were recently described [81–83]. Here, carrying BN-PAGE in the presence of digitonin, we obtained data that suggest that less supercomplexes containing CcO are accumulated in the $\Delta\text{cox2} + \text{Cox2}^{\text{W56R}}$ transformant as compared to the WT strain. Since CcO seems to be accumulating 40% less efficiently in the $\Delta\text{cox2} + \text{Cox2}^{\text{W56R}}$ transformant, this mutant may also tend to assemble less supercomplexes. Alternatively, the W56R mutation may somehow destabilize the CcO-*bc*₁ interactions in the supercomplexes and favor its dissociation in the presence of digitonin.

Pulse-labeling of mitochondrial proteins *in vivo* with [³⁵S] methionine also indicated the absence of a mitochondrion-synthesized Cox2^{WS6R}. This observation discards the possibility of a highly improbable reversion that would restore the integrity of the interrupted mitochondrial COX2 gene and therefore reactivate Cox2^{WT} synthesis inside mitochondria. Among others, this kind of experiments, are indispensable to assess a successful allotropic expression [84]. False positives may arise due to reversions of the original mutations in the mitochondrial genes, especially when single-point mutations are involved, as in the case of several mitochondrial mutations described in human patients (<http://www.mitomap.org/MITOMAP>).

As mentioned above, allotropic expression is an experimental strategy upon which gene therapies against human mitochondrial diseases may be developed, and it may be based on either the import of cytosol-synthesized proteins [65,85] or as recently demonstrated, on the import of its corresponding RNAs [86]. However, the field of allotropic expression of human mitochondrial genes is debatable [18]. While several groups have provided promising evidence for the allotropic expression of several integral membrane proteins [87–92], others have failed to observe functional integration of cytosol-synthesized membrane-embedded proteins [64,66,84,93]. Here, using yeast as a model system, we have provided unambiguous biochemical evidence for the functional assembly of a cytosol-synthesized Cox2 subunit into CcO, and provided information on the maturation process that the corresponding precursor underwent during its import into mitochondria. To our knowledge, this is the first biochemical characterization of a mitochondrial OXPHOS complex carrying an allotopically-expressed subunit with two TMS.

Acknowledgements

We dedicate this work as a memorial to Dr. Guillermo Mendoza-Hernández, excellent friend and colleague, coauthor of this paper, who suddenly passed away on July 31, 2012. We thank Prof. Salvador Uribe-Carvajal (IFC–UNAM) for critical comments to the manuscript. We thank the help provided by Alejandra Jiménez-Suárez and Héctor Miranda-Astudillo on some experiments. We thank Laura Ongay Larios, Minerva Mora Cabrera and Guadalupe Códiz Huerta of the Molecular Biology Unit, IFC, UNAM for primer synthesis and sequencing. This work was partially supported by grants Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, Mexico) 128110 and Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA–UNAM, Mexico) IN203311-3 to D.G.-H.; and DGAPA-UNAM IN208711-3 to X.P.-M. CONACyT also supported with fellowships the Ph.D. studies of V.C.-T. (Biological Sciences Program at UNAM (169058)) and R.G.-V. of the Biomedical Sciences Ph.D. Program (250726), both at UNAM.

References

- [1] L. Supekova, F. Supek, J.E. Greer, P.G. Schultz, A single mutation in the first transmembrane domain of yeast COX2 enables its allotropic expression, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 5047–5052.
- [2] S. Yoshikawa, K. Muramoto, K. Shinzawa-Itoh, The O(2) reduction and proton pumping gate mechanism of bovine heart cytochrome c oxidase, *Biochim. Biophys. Acta* 1807 (2011) 1279–1286.
- [3] T.L. Mason, R.O. Poyton, D.C. Wharton, G. Schatz, Cytochrome c oxidase from bakers' yeast. I. Isolation and properties, *J. Biol. Chem.* 248 (1973) 1346–1354.
- [4] F. Fontanesi, I.C. Soto, A. Barrientos, Cytochrome c oxidase biogenesis: new levels of regulation, *IUBMB Life* 60 (2008) 557–568.
- [5] L. Stiburek, J. Zeman, Assembly factors and ATP-dependent proteases in cytochrome c oxidase biogenesis, *Biochim. Biophys. Acta* 1797 (2010) 1149–1158.
- [6] D.U. Mick, T.D. Fox, P. Rehling, Inventory control: cytochrome c oxidase assembly regulates mitochondrial translation, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12 (2011) 14–20.
- [7] M.W. Gray, G. Burger, B.F. Lang, Mitochondrial evolution, *Science* 283 (1999) 1476–1481.
- [8] R.O. Poyton, G.S. Groot, Biosynthesis of polypeptides of cytochrome c oxidase by isolated mitochondria, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72 (1975) 172–176.
- [9] K.A. Sevarino, R.O. Poyton, Mitochondrial membrane biogenesis: identification of a precursor to yeast cytochrome c oxidase subunit II, an integral polypeptide, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77 (1980) 142–146.
- [10] E. Pratje, G. Mannhaupt, G. Michaelis, K. Beyreuther, A nuclear mutation prevents processing of a mitochondrially encoded membrane protein in *Saccharomyces cerevisiae*, *EMBO J.* 2 (1983) 1049–1054.
- [11] A.T. Torello, M.H. Overholtzer, V.L. Cameron, N. Bonnefoy, T.D. Fox, Deletion of the leader peptide of the mitochondrially encoded precursor of *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome c oxidase subunit II, *Genetics* 145 (1997) 903–910.
- [12] G.H. Clarkon, R.O. Poyton, A role for membrane potential in the biogenesis of cytochrome c oxidase subunit II, a mitochondrial gene product, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 10114–10118.
- [13] K. Hell, J.M. Herrmann, E. Pratje, W. Neupert, R.A. Stuart, Oxa1p mediates the export of the N- and C-termini of pCoxII from the mitochondrial matrix to the intermembrane space, *FEBS Lett.* 418 (1997) 367–370.
- [14] J.M. Herrmann, N. Bonnefoy, Protein export across the inner membrane of mitochondria: the nature of translocated domains determines the dependence on the Oxa1 translocase, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 2507–2512.
- [15] H.L. Fiumera, S.A. Broadley, T.D. Fox, Translocation of mitochondrially synthesized Cox2 domains from the matrix to the intermembrane space, *Mol. Cell. Biol.* 27 (2007) 4664–4673.
- [16] A.D. de Grey, Mitochondrial gene therapy: an arena for the biomedical use of inteins, *Trends Biotechnol.* 18 (2000) 394–399.
- [17] S. DiMauro, M. Hirano, E.A. Schon, Approaches to the treatment of mitochondrial diseases, *Muscle Nerve* 34 (2006) 265–283.
- [18] D.S. Kyriakouli, P. Boesch, R.W. Taylor, R.N. Lightowers, Progress and prospects: gene therapy for mitochondrial DNA disease, *Gene Ther.* 15 (2008) 1017–1023.
- [19] P. Nagley, R.J. Devenish, Leading organellar proteins along new pathways: the relocation of mitochondrial and chloroplast genes to the nucleus, *TIBS* 14 (1989) 31–35.
- [20] J. Banroques, A. Delahodde, C. Jacq, A mitochondrial RNA maturase gene transferred to the yeast nucleus can control mitochondrial mRNA splicing, *Cell* 46 (1986) 837–844.
- [21] D.P. Gearing, P. Nagley, Yeast mitochondrial ATPase subunit 8, normally a mitochondrial gene product, expressed *in vitro* and imported back into the organelle, *EMBO J.* 5 (1986) 3651–3655.
- [22] P. Nagley, L.B. Farrell, D.P. Gearing, D. Nero, S. Meltzer, R.J. Devenish, Assembly of functional proton-translocating ATPase complex in yeast mitochondria with cytoplasmically synthesized subunit 8, a polypeptide normally encoded within the organelle, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85 (1988) 2091–2095.
- [23] R.H. Law, R.J. Devenish, P. Nagley, Assembly of imported subunit 8 into the ATP synthase complex of isolated yeast mitochondria, *Eur. J. Biochem.* 188 (1990) 421–429.
- [24] X. Roucou, I.M. Artika, R.J. Devenish, P. Nagley, Bioenergetic and structural consequences of allotropic expression of subunit 8 of yeast mitochondrial ATP synthase. The hydrophobic character of residues 23 and 24 is essential for maximal activity and structural stability of the enzyme complex, *Eur. J. Biochem.* 261 (1999) 444–451.
- [25] R.D. Gietz, R.H. Schiestl, Quick and easy yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method, *Nat. Protoc.* 2 (2007) 35–37.
- [26] J.M. Herrmann, H. Fölsch, W. Neupert, R.A. Stuart, Isolation of yeast mitochondria and study of mitochondrial protein translation, in: J.E. Celis (Ed.), *Cell Biology A Laboratory Handbook*, vol. 1, Academic Press, San Diego, 1994, pp. 538–544.
- [27] A. Peña, M.Z. Piña, E. Escamilla, E. Piña, A novel method for the rapid preparation of coupled yeast mitochondria, *FEBS Lett.* 80 (1977) 209–213.
- [28] A.G. Gornall, C.J. Bardawill, M.M. David, Determination of serum proteins by means of the biuret reaction, *J. Biol. Chem.* 177 (1949) 751–766.
- [29] X. Pérez-Martínez, M. Vázquez-Acevedo, E. Tolkunova, S. Funes, M.G. Claros, E. Davidson, M.P. King, D. González-Halphen, Unusual location of a mitochondrial gene. Subunit III of cytochrome c oxidase is encoded in the nucleus of Chlamydomonas algae, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 30144–30152.
- [30] S. Guerrero-Castillo, M. Vázquez-Acevedo, D. González-Halphen, S. Uribe-Carvajal, In *Yarrowia lipolytica* mitochondria, the alternative NADH dehydrogenase interacts specifically with the cytochrome complexes of the classic respiratory pathway, *Biochim. Biophys. Acta* 1787 (2009) 75–85.
- [31] M.A.K. Markwell, S.M. Hass, L.L. Biber, N.E. Tolbert, A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples, *Anal. Biochem.* 87 (1978) 206–210.
- [32] M. Degli Esposti, G. Rotilio, G. Lenaz, Effects of dibromothymoquinone on the structure and function of the mitochondrial bc₁ complex, *Biochim. Biophys. Acta* 767 (1984) 10–20.
- [33] W. de Vrij, W.N. Konings, Kinetic characterization of cytochrome c oxidase from *Bacillus subtilis*, *Eur. J. Biochem.* 166 (1987) 581–587.
- [34] C.A. Yu, L. Yu, Structural role of phospholipids in ubiquinol-cytochrome c reductase, *Biochemistry* 19 (1980) 5715–5720.
- [35] R.W. Estabrook, Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios, *Methods Enzymol.* 10 (1967) 41–47.
- [36] H. Schägger, Denaturing electrophoretic techniques, in: G. von Jagow, H. Schägger (Eds.), *A Practical Guide to Membrane Protein Purification*, Academic Press, San Diego, 1994, pp. 55–79.
- [37] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [38] H. Schägger, Native gel electrophoresis, in: G. von Jagow, H. Schägger (Eds.), *A Practical Guide to Membrane Protein Purification*, Academic Press, San Diego, 1994, pp. 81–104.
- [39] I. Wittig, H. Schägger, Electrophoretic methods to isolate protein complexes from mitochondria, *Methods Cell Biol.* 80 (2007) 723–741.

- [40] I. Wittig, M. Karas, H. Schägger, High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes, *Mol. Cell. Proteomics* 6 (2007) 1215–1225.
- [41] E. Zerbetto, L. Vergani, F. Dabbeni-Sala, Quantification of muscle mitochondrial oxidative phosphorylation enzymes via histochemical staining of blue native polyacrylamide gels, *Electrophoresis* 18 (1997) 2059–2064.
- [42] I. Wittig, H. Schägger, Advantages and limitations of clear-native PAGE, *Proteomics* 5 (2005) 4338–4346.
- [43] D. González-Halphen, M.A. Lindorfer, R.A. Capaldi, Subunit arrangement in beef heart complex III, *Biochemistry* 27 (1988) 7021–7031.
- [44] N. Bonnefoy, N. Bsat, T.D. Fox, Mitochondrial translation of *Saccharomyces cerevisiae* Cox2 mRNA is controlled by the nucleotide sequence specifying the pre-Cox2p leader peptide, *Mol. Cell. Biol.* 21 (2001) 2359–2372.
- [45] K. Diekert, A.I. de Kroon, G. Kispal, R. Lill, Isolation and subfractionation of mitochondria from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Methods Cell Biol.* 65 (2001) 37–51.
- [46] A. Attea, G. Dreyfus, D. González-Halphen, Characterization of the alpha and beta-subunits of the FOF1-ATPase from the alga *Polytomella* spp., a colorless relative of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biochim. Biophys. Acta* 1320 (1997) 275–284.
- [47] M.C. Peitsch, Protein modeling by E-mail, *Bio/Technology* 13 (1995) 658–660.
- [48] K. Arnold, L. Bordoli, J. Kopp, T. Schwede, The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling, *Bioinformatics* 22 (2006) 195–201.
- [49] F. Kiefer, K. Arnold, M. Künzli, L. Bordoli, T. Schwede, The SWISS-MODEL repository and associated resources, *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) D387–D392.
- [50] S. Yoshikawa, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, E. Yamashita, N. Inoue, M. Yao, M.J. Fei, C.P. Libeu, T. Mizushima, H. Yamaguchi, T. Tomizaki, T. Tsukihara, Redox-coupled crystal structural changes in bovine heart cytochrome c oxidase, *Science* 280 (1998) 1723–1729.
- [51] A. Barrientos, K. Gouget, D. Horn, I.C. Soto, F. Fontanesi, Suppression mechanisms of COX assembly defects in yeast and human: insights into the COX assembly process, *Biochim. Biophys. Acta* 1793 (2009) 97–107.
- [52] S. Horan, I. Bourges, J.W. Taanman, B. Meunier, Analysis of COX2 mutants reveals cytochrome oxidase subassemblies in yeast, *Biochem. J.* 390 (2005) 703–708.
- [53] H. Schägger, G. von Jagow, Native electrophoresis for isolation of mitochondrial oxidative phosphorylation protein complexes, *Methods Enzymol.* 260 (1995) 190–203.
- [54] I. Arnold, K. Pfeiffer, W. Neupert, R.A. Stuart, H. Schägger, Yeast mitochondrial F1FO-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits, *EMBO J.* 17 (1998) 7170–7178.
- [55] S.R. Qualmann, D.O. Daley, J. Whelan, E. Pratje, Import pathway of nuclear-encoded cytochrome c oxidase subunit 2 using yeast as a model, *Plant Biol.* 5 (2003) 481–490.
- [56] K.L. Adams, K. Song, P.G. Roessler, J.M. Nugent, J.L. Doyle, J.J. Doyle, D.D. Palmer, Intracellular gene transfer in action: dual transcription and multiple silencings of nuclear and mitochondrial *cox2* genes in legumes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 13863–13868.
- [57] X. Pérez-Martínez, A. Antaramian, M. Vázquez-Acevedo, S. Funes, E. Tolkunova, J. d'Alayer, M.G. Claros, E. Davidson, M.P. King, D. González-Halphen, Subunit II of cytochrome c oxidase in *Chlamydomonas* algae is a heterodimer encoded by two independent nuclear genes, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 11302–11309.
- [58] S. Funes, E. Davidson, M.G. Claros, R. van Lis, X. Pérez-Martínez, M. Vázquez-Acevedo, M.P. King, D. González-Halphen, The typically mitochondrial DNA-encoded ATP6 subunit of the F1FO-ATPase is encoded by a nuclear gene in *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 6051–6058.
- [59] R.F. Waller, P.J. Keeling, Alveolate and chlorophyte mitochondrial *cox2* genes split twice independently, *Gene* 383 (2006) 33–37.
- [60] D.O. Daley, R. Clifton, J. Whelan, Intracellular gene transfer: reduced hydrophobicity facilitates gene transfer for subunit 2 of cytochrome c oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 10510–10515.
- [61] J.L. Popot, C. de Vitry, On the microassembly of integral membrane proteins, *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 19 (1990) 369–403.
- [62] M.G. Claros, J. Perea, Y. Shu, F.A. Samatey, J.L. Popot, C. Jacq, Limitations to *in vivo* import of hydrophobic proteins into yeast mitochondria. The case of a cytoplasmically synthesized apocytochrome b, *Eur. J. Biochem.* 228 (1995) 762–771.
- [63] M.G. Claros, P. Vincens, Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their transit peptides, *Eur. J. Biochem.* 241 (1996) 779–786.
- [64] J. Oca-Cossio, L. Kenyon, H. Hao, C.T. Moraes, Limitations of allotopic expression of mitochondrial genes in mammalian cells, *Genetics* 165 (2003) 707–720.
- [65] D. González-Halphen, S. Funes, X. Pérez-Martínez, A. Reyes-Prieto, M.G. Claros, E. Davidson, M.P. King, Genetic correction of mitochondrial diseases: using the natural migration of mitochondrial genes to the nucleus in chlorophyte algae as a model system, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1019 (2004) 232–239.
- [66] F. Figueroa-Martínez, M. Vázquez-Acevedo, P. Cortés-Hernández, J.J. García-Trejo, E. Davidson, M.P. King, D. González-Halphen, What limits the allotopic expression of nucleus-encoded mitochondrial genes? The case of the chimeric Cox3 and Atp6 genes, *Mitochondrion* 11 (2011) 147–154.
- [67] P. Cardol, M. Lapaille, P. Minet, F. Franck, R.F. Matagne, C. Remacle, ND3 and ND4L subunits of mitochondrial complex I, both nucleus encoded in *Chlamydomonas reinhardtii*, are required for activity and assembly of the enzyme, *Eukaryot. Cell* 5 (2006) 1460–1467.
- [68] J. Ojaimi, J. Pan, S. Santra, W.J. Snell, E.A. Schon, An algal nucleus-encoded subunit of mitochondrial ATP synthase rescues a defect in the analogous human mitochondrial-encoded subunit, *Mol. Biol. Cell* 13 (2002) 3836–3844.
- [69] K.L. Adams, M. Rosenblueth, Y.-L. Qiu, J.D. Palmer, Multiple losses and transfers to the nucleus of two mitochondrial succinate dehydrogenase genes during angiosperm evolution, *Genetics* 158 (2001) 1289–1300.
- [70] A. Jiménez-Suárez, M. Vázquez-Acevedo, A. Rojas-Hernández, S. Funes, S. Uribe-Carvajal, D. González-Halphen, In *Polytomella* sp. mitochondria, biogenesis of the heterodimeric COX2 subunit of cytochrome c oxidase requires two different import pathways, *Biochim. Biophys. Acta* 1817 (2012) 819–827.
- [71] L.G. Nijtmans, J.W. Taanman, A.O. Muijsers, D. Speijer, C. Van den Bogert, Assembly of cytochrome c oxidase in cultured human cells, *Eur. J. Biochem.* 254 (1998) 389–394.
- [72] X. Pérez-Martínez, S.A. Broadley, T.D. Fox, Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p, *EMBO J.* 22 (2003) 5951–5961.
- [73] A. Barrientos, A. Zambrano, A. Tzagoloff, Mss51p and Cox14p jointly regulate mitochondrial Cox1p expression in *Saccharomyces cerevisiae*, *EMBO J.* 23 (2004) 3472–3482.
- [74] M. Shingú-Vázquez, Y. Camacho-Villasana, L. Sandoval-Romero, C.A. Butler, T.D. Fox, X. Pérez-Martínez, The carboxyl-terminal end of Cox1 is required for feed-back assembly regulation of Cox1 synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 34382–34389.
- [75] O. Khalimonchuk, A. Bird, D.R. Winge, Evidence for a pro-oxidant intermediate in the assembly of cytochrome oxidase, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 17442–17449.
- [76] H. Schägger, K. Pfeiffer, Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria, *EMBO J.* 19 (2000) 1777–1783.
- [77] R.A. Stuart, Supercomplex organization of the oxidative phosphorylation enzymes in yeast mitochondria, *J. Bioenerg. Biomembr.* 40 (2008) 411–417.
- [78] H.P. Braun, S. Sunderhaus, E.J. Boekema, R. Kouril, Chapter 10 Purification of the cytochrome c reductase/cytochrome c oxidase super complex of yeast mitochondria, *Methods Enzymol.* 456 (2009) 183–190.
- [79] J. Heinemeyer, H.P. Braun, E.J. Boekema, R. Kouril, A structural model of the cytochrome c reductase/oxidase supercomplex from yeast mitochondria, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 12240–12248.
- [80] E. Mileykovskaya, P.A. Penczek, J. Fang, V.K. Mallampalli, G.C. Sparagna, W. Dowhan, Arrangement of the respiratory chain complexes in *Saccharomyces cerevisiae* supercomplex III₂IV₂ revealed by single particle cryo-electron microscopy, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 23095–23103.
- [81] V. Strogolova, A. Furness, M. Robb-McGrath, J. Garlich, R.A. Stuart, Rcf1 and Rcf2, members of the hypoxia-induced gene 1 protein family, are critical components of the mitochondrial cytochrome bc₁-cytochrome c oxidase supercomplex, *Mol. Cell. Biol.* 32 (2012) 1363–1373.
- [82] M. Vukotic, S. Oeljeklaus, S. Wiese, F.N. Vögtle, C. Meisinger, H.E. Meyer, A. Ziesenis, D.M. Katschinski, D.C. Jans, S. Jakobs, B. Warscheid, P. Rehling, M. Deckers, Rcf1 mediates cytochrome oxidase assembly and respirasome formation, revealing heterogeneity of the enzyme complex, *Cell Metab.* 15 (2012) 336–347.
- [83] Y.C. Chen, E.B. Taylor, N. Dephore, J.M. Heo, A. Tonhato, I. Papandreou, N. Nath, N.C. Denko, S.P. Gygi, J. Rutter, Identification of a protein mediating respiratory supercomplex stability, *Cell Metab.* 15 (2012) 348–360.
- [84] E. Perales-Clemente, P. Fernández-Silva, R. Acín-Pérez, A. Pérez-Martos, J.A. Enríquez, Allotopic expression of mitochondrial-encoded genes in mammals: achieved goal, undemonstrated mechanism or impossible task? *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) 225–234.
- [85] S.J. Zullo, Gene therapy of mitochondrial DNA mutations: a brief, biased history of allotopic expression in mammalian cells, *Semin. Neurol.* 21 (2001) 327–335.
- [86] G. Wang, E. Shimada, J. Zhang, J.S. Hong, G.M. Smith, M.A. Teitell, C.M. Koehler, Correcting human mitochondrial mutations with targeted RNA import, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 4840–4845.
- [87] G. Manfredi, J. Fu, J. Ojaimi, J.E. Sadlock, J.Q. Kwong, J. Guy, E.A. Schon, Rescue of a deficiency in ATP synthesis by transfer of MTATP6, a mitochondrial DNA-encoded gene, to the nucleus, *Nat. Genet.* 30 (2002) 394–399.
- [88] J. Guy, X. Qi, F. Pallotti, E.A. Schon, G. Manfredi, V. Carelli, A. Martinuzzi, W.W. Hauswirth, A.S. Lewin, Rescue of a mitochondrial deficiency causing Leber hereditary optic neuropathy, *Ann. Neurol.* 52 (2002) 534–542.
- [89] S.J. Zullo, W.T. Parks, M. Chloupkova, B. Wei, H. Weiner, W.A. Fenton, J.M. Eisenstadt, C.R. Merrill, Stable transformation of CHO Cells and human NARP cybrids confers oligomycin resistance (oli(r)) following transfer of a mitochondrial DNA-encoded oli(r) ATPase6 gene to the nuclear genome: a model system for mtDNA gene therapy, *Rejuvenation Res.* 8 (2005) 18–28.
- [90] C. Bonnet, V. Kaltimbacher, S. Ellouze, S. Augustin, P. Bénéit, V. Forster, P. Rustin, J.A. Sahel, M. Corral-Debrinski, Allotopic mRNA localization to the mitochondrial surface rescues respiratory chain defects in fibroblasts harboring mitochondrial DNA mutations affecting complex I or V subunits, *Rejuvenation Res.* 10 (2007) 127–144.
- [91] C. Bonnet, S. Augustin, S. Ellouze, P. Bénéit, A. Bouaita, P. Rustin, J.A. Sahel, M. Corral-Debrinski, The optimized allotopic expression of ND1 or ND4 genes restores respiratory chain complex I activity in fibroblasts harboring mutations in these genes, *Biochim. Biophys. Acta* 1783 (2008) 1707–1717.
- [92] S. Ellouze, S. Augustin, A. Bouaita, C. Bonnet, M. Simonutti, V. Forster, S. Picaud, J.A. Sahel, M. Corral-Debrinski, Optimized allotopic expression of the human mitochondrial ND4 prevents blindness in a rat model of mitochondrial dysfunction, *Am. J. Hum. Genet.* 83 (2008) 373–387.
- [93] M. Bokori-Brown, I.J. Holt, Expression of algal nuclear ATP synthase subunit 6 in human cells results in protein targeting to mitochondria but no assembly into ATP synthase, *Rejuvenation Res.* 9 (2006) 455–469.