



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR**

**FACTORES QUE AFECTAN LA EXPRESIÓN ALOTÓPICA DE LA  
SUBUNIDAD II DE LA CITOCLORO C OXIDASA (COX2) EN LEVADURA**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A:

**DIANA RUBALCAVA GRACIA MEDRANO**

DIRECTOR DE TESIS  
**DR. DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN**  
INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR

COMITÉ TUTOR  
**DRA. SOLEDAD FUNES ARGÜELLO**                   **DR. JUAN MIRANDA RÍOS**  
INSTITUTO DE FISIOLOGÍA                                 INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
CELULAR   BIOMÉDICAS

**CIUDAD DE MÉXICO, MARZO DE 2019**



**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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (Méjico).

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

# AGRADECIMIENTOS Y RECONOCIMIENTOS ACADÉMICOS

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Diego González Halphen en el laboratorio 324 Norte del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.

Se reconoce la participación y las valiosas contribuciones de mi comité tutor conformado por el Dr. Juan Miranda Ríos, la Dra. Soledad Funes Argüello y el Dr. Diego González Halphen.

La presente tesis constituye parte del proyecto de investigación apoyado por los donativos No. 239219y 279125 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), así como por el donativo No. IN 208917 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA, UNAM).

Diana Rubalcava Gracia Medrano fue alumna del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y fue apoyada por el CONACyT con una beca nacional.

Se reconoce a la Q.B.P. Miriam Vázquez Acevedo por la experta ayuda técnica a lo largo de toda la investigación realizada y por sus valiosas contribuciones a este proyecto.

Agradecemos la participación y las valiosas contribuciones del Dr. Patrice Hamel (The Ohio State University, EUA).

Se reconoce la colaboración de la Dra. Soledad Funes Argüello y a los miembros de su laboratorio por las valiosas contribuciones a este trabajo, así como a la M. en C. Ariann Elizabeth Mendoza Martínez por su asesoría técnica.

Se reconoce la colaboración de la Dra. Xochitl Pérez Martínez y a los miembros de su laboratorio, especialmente a la Dra. Yolanda Camacho Villasana, al Dr. Aldo García Guerrero y al Dr. Rodolfo García Villegas por su experta asesoría técnica en la técnica de transformación mitocondrial y obtención de mutantes.

Se reconoce la colaboración del Dr. Ruy Pérez Montfort y la valiosa ayuda técnica de la Biol. Nallely Cabrera González en la obtención de mutantes.

Se reconoce la participación del Dr. Antonio Peña Díaz y de su laboratorio, en especial a la Dra. Norma Silvia Sánchez Sánchez y a la Dra. Martha Calahorra Fuentes por su valiosa asesoría técnica.

Se reconoce la participación del Doctor Salvador Uribe Carvajal y la ayuda técnica de la Dra. Natalia Chiquete Félix.

La Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM contribuyó con su ayuda técnica en biología molecular. En especial, la Dra. Laura Ongay Larios, la M. en C. Minerva Mora Cabrera y la Biol. Guadalupe Codíz Huerta.

La Unidad de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular de UNAM apoyó en múltiples aspectos técnicos. Especialmente, se reconoce a Juan Manuel Barbosa Castillo e Ivette Rosas Arciniega por el apoyo técnico brindado.

Se reconoce el apoyo de Rosario Villaseñor Ávila y de Gabriela Valdés Silva de la Secretarías de Biología Celular y de Genética Molecular por toda su invaluable ayuda técnica.

Se reconoce a Sara Méndez Ibáñez de la Coordinación de Enseñanza por todo el apoyo administrativo brindado.

Se reconoce a los integrantes del jurado del presente trabajo, Dr. Ruy Pérez Montfort, Dr. Juan Miranda Ríos, Dr. Leonardo Peraza Reyes, Dra. Nuria Sánchez Puig y Dr. Diego Cortez Quezada por la revisión de esta tesis y por sus valiosas contribuciones y sugerencias al trabajo.

# Contenido

1.	RESUMEN SIN TÉRMINOS ESPECIALIZADOS.....	5
2.	RESUMEN.....	7
3.	ABSTRACT .....	8
4.	INTRODUCCIÓN .....	9
4.1	Breve Introducción al Origen de las Mitocondrias .....	9
4.2	Migración de Genes Mitocondriales al Núcleo.....	9
4.3	Restricciones que Mantienen a los Genomas Mitocondriales .....	12
4.4	Sistema de Importación de Proteínas Mitocondriales.....	13
4.5	Origen Genético Dual de los Complejos de la OXPHOS.....	15
4.6	Complejo IV (Citocromo c oxidasa).....	17
4.7	Subunidad II de la citocromo c oxidasa (Cox2) .....	19
4.8	Relocalización Experimental de Genes Mitocondriales al Núcleo/Expresión Alotópica .....	20
4.9	Expresión Alotópica de Cox2 .....	22
5.	OBJETIVOS .....	24
6.	RESULTADOS.....	25
6.1	Expresión mitocondrial <i>versus</i> nuclear (objetivos i y ii) .....	25
6.2	Otras modificaciones que impactan la expresión alotópica de Cox2 (objetivos iii a vi) .....	40
6.3	Degradoación de Cox2 por proteasas mitocondriales (objetivo vii) .....	68
7.	DISCUSIÓN.....	70
8.	CONCLUSIONES .....	74
9.	PERSPECTIVAS.....	75
10.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	76
10.1.	Biología Molecular .....	76
10.1.1.	Preparación de Células Competentes .....	76
10.1.2.	Transformación de Células Competentes.....	76
10.1.3.	Aislamiento de DNA Plasmídico .....	77
10.1.4.	Digestión con Enzimas de Restricción .....	78
10.1.5.	Geles de agarosa y preparación de muestras.....	79
10.1.6.	Clonación .....	79
10.1.7.	Mutagénesis Sitio Dirigida.....	80
10.1.8.	PCR.....	80
10.1.9.	Diseño de construcciones de COX2.....	81
10.2.	Levaduras .....	82
10.2.1.	Cultivo y mantenimiento .....	82

10.2.2.	Curvas de Crecimiento.....	82
10.2.3.	Diluciones por Goteo.....	82
10.2.4.	Mediciones de Consumo de Oxígeno .....	82
10.2.5.	Transformación de Levaduras .....	83
10.2.6.	Transformación Mitocondrial por Biolística.....	83
10.2.7.	Extracción de DNA Genómico o DNA mitocondrial .....	85
10.2.8.	Extracción de DNA Plasmídico.....	86
10.2.9.	Extracto Total de Proteínas .....	86
10.2.10.	Aislamiento de Mitocondrias.....	86
10.2.11.	Solubilización de Muestras para Electroforesis Nativa.....	88
10.2.12.	Ensayos de Degradación con Proteinasa K de Mitocondrias y Mitoplastos .....	89
10.2.13.	Extracción con Carbonato de Sodio de Proteínas Periféricas de Membrana .....	89
10.3.	Proteínas.....	90
10.3.1.	Cuantificación de Proteínas .....	90
10.3.2.	Espectrometría de Masas.....	90
10.4.	Electroforesis de Proteínas .....	90
10.4.1.	Geles Desnaturalizantes SDS-Tricina-PAGE (Von Jagow) .....	90
10.4.2.	Tinción con Azul de Coomassie.....	91
10.4.3.	Transferencia e inmunodetección .....	92
10.4.4.	Normalización de Bandas de Proteínas .....	93
10.4.5.	Desnudamiento de membranas para una posterior inmunodetección ...	93
10.4.6.	Electroforesis en Geles Azules Nativos (BN-PAGE) .....	93
10.5.	Análisis de Secuencias.....	95
11.	APÉNDICES .....	97
11.1.	Plásmidos utilizados.....	97
11.2.	Oligonucleótidos utilizados .....	98
11.3.	Secuencias de las construcciones utilizadas .....	100
11.4.	Medios de Cultivo de Levaduras .....	106
11.5.	Cepas de Levadura Utilizadas .....	108
11.6	Anticuerpos Utilizados .....	109
12.	REFERENCIAS .....	110

## 1. RESUMEN SIN TÉRMINOS ESPECIALIZADOS

La investigación que realicé durante mi doctorado la podemos contar como la historia de Cox2, un trabajador ejemplar y un elemento importantísimo para la fábrica donde trabaja. Todos los días, Cox2 se despertaba, se arreglaba y se dirigía en bicicleta a su trabajo en una fábrica, que quedaba en la misma zona que su casa. Era una zona residencial pequeña pero muy pintoresca. Le gustaba mucho su ruta porque tenía calles estrechas y pasaba por las casas de sus amigos. Cox2 disfrutaba mucho su trabajo; él y su equipo eran empleados indispensables del departamento de producción número 4. La vida de Cox2 cambió drásticamente después de sufrir un accidente y perder la visión: ahora ya no podía rodar su bicicleta ni completar su trabajo en la fábrica. La intención de mi investigación fue encontrar alternativas para que Cox2 siguiera haciendo lo que más le gusta y mejor sabe hacer.

Si imaginamos que cada una de nuestras células es una ciudad, pensariamos que cada tipo es muy diferente y que se caracteriza por tener una especialidad, por ejemplo, una célula de músculo es roja y experta en contraerse, una de cerebro es alargada y experta en transmitir señales eléctricas y una de riñón es cuadrada y experta en filtrar sangre. Pero también todas nuestras células tienen muchas cosas en común. Como en todas las ciudades, hay una biblioteca central, sistemas de transporte, hospitales, basureros, fábricas, etc. La biblioteca central sería el núcleo de la célula, donde están descritos los planos de la ciudad y la información para producir a los trabajadores que viven dentro. De hecho, todas nuestras células contienen los mismos libros, sólo que dependiendo cuáles se lean, se elegirá qué trabajadores se despiertan y ellos definen el tipo de ciudad que se forma. Como en todas las células hay fábricas, en todas existe un Cox2 que cumple con su trabajo. Específicamente, Cox2 y su equipo se encargan de usar el oxígeno que respiramos para generar energía. Las fábricas en las ciudades celulares se encuentran en la zona llamada mitocondria y producen la mayoría de la energía que alimenta a todos los ciudadanos. La prosperidad de cualquier ciudad se colapsaría si la provisión de alimentos parara debido a que alguno de los trabajadores de esta fábrica sufriera un accidente y dejara de cumplir su función, como fue el caso de Cox2.

Entonces, ¿cómo conseguir que Cox2 regrese a su vocación? En principio, para contestar esta pregunta se deben lograr tres objetivos: elegir con qué células trabajar, armar a una versión de Cox2 sana y lograr que encuentre su ruta hacia la fábrica para volver a trabajar. Lo primero que hicimos fue conseguir ciudades con las que podíamos experimentar y hacerles cambios para ver qué estrategia funcionaba mejor para que Cox2 llegara a su trabajo. Nos encontramos con que las levaduras son expertas en tres cosas: hacer pan, hacer cerveza y funcionar como células modelo. Decidimos hacer experimentos con células de levadura como representantes de una ciudad, de hecho, existen versiones de estas células donde su Cox2 es defectuoso, un panorama perfecto si lo que buscamos es representar al protagonista de nuestra historia: Cox2 después del accidente. Primera meta lograda, hasta con la ventaja de que nuestros resultados podrían ser válidos también en células de humano ya que su ciudadano Cox2 es muy parecido al Cox2 que tenemos en nuestras células.

Ahora, para obtener a un Cox2 con buena visión aprovechamos que en el laboratorio podemos armar a cualquier Cox2. Así como armamos legos de distintos tamaños, formas y colores, lo mismo aplica para construir a nuestro Cox2 sólo que con piezas microscópicas. Después de la construcción de Cox2 es donde nos topamos con el primer problema. En las células es prácticamente imposible que alguien nuevo se mude a la zona de mitocondria. No se sabe por qué, pero la mitocondria no vende casas a los extranjeros y son contadas las ciudades con mitocondrias que los recibe.

Existe una alternativa para Cox2. Que se mude al núcleo (zona de la biblioteca central) y que de ahí tome el transporte público para ir a trabajar a la fábrica. Esa zona tiene las ventajas de que es fácil rentar una casa y que tiene mejor servicio de mantenimiento. De hecho, muchos de los que antes vivían y trabajaban en las mitocondrias notaron que les convenía mudarse al núcleo y llevan años viviendo ahí y trasladándose todos los días a su trabajo mitocondrial. Cuando nuestro Cox2 de laboratorio se mudó al núcleo, se empezó a dar cuenta que todos los demás habitantes eran algo distintos a él, usaban combinaciones diferentes y caminaban raro. Cox2 desarrolló una fobia a viajar en transporte público, se quedaba inmóvil cuando lo usaba (en términos celulares lo llamamos hidrofobia) y nunca llegó a trabajar por lo que la fábrica seguía sin funcionar. Por suerte, un laboratorio en EUA encontró que con solo cambiarle la pieza 56 a Cox2 se le quitaba la fobia y ahora sí lograba llegar a su trabajo. Aunque no era lo mismo, Cox2 con este cambio de pieza (ahora llamado Cox2<sup>56</sup>) completaba solo el 60 % del trabajo que lograba Cox2 sano cuando vivía en la mitocondria. En esos experimentos, mandaron muchas copias de Cox2<sup>56</sup> al núcleo para asegurar que los suficientes lograran llegar a la fábrica, aunque algunos se perdieran en el camino.

Tomando en cuenta el problema en que se ve envuelto Cox2<sup>56</sup> para cumplir con su trabajo, resumimos las contribuciones de nuestra investigación en tres hallazgos principales: 1) todo indica que la ruta de transporte que sigue Cox2<sup>56</sup> desde el núcleo es el problema que le evita llegar al 100 % de eficiencia en su trabajo y que el cambio de la pieza 56 no tiene ningún defecto. Encontramos que la estrategia de enviar al núcleo muchas copias iguales de Cox2<sup>56</sup> es una mala idea porque todos salen a trabajar al mismo tiempo y saturan al sistema de transporte. De hecho, una sola copia de Cox2<sup>56</sup> llega eficientemente a la fábrica y cumple prácticamente con el 100 % de su trabajo. 2) existen algunos organismos (como la planta de la soya y algunas algas) donde Cox2 perdió su fobia y se mudó por si sola al núcleo. Decidimos examinar qué piezas cambiaron en estas versiones de Cox2 para eliminar su fobia, encontramos que la 49 y la 51. Cuando hicimos el experimento de cambiar estas piezas en nuestro Cox2 de levadura, nos llevamos la buena sorpresa de que Cox2<sup>49/51</sup> pierde la fobia, puede vivir en el núcleo y puede ir a trabajar a las mitocondrias todos los días. Aunque el trabajo de Cox2<sup>49/51</sup> no es del 100 %, tiene muy buen desempeño. 3) Generamos una célula con dos versiones de Cox2, una viviendo en la mitocondria y la otra en el núcleo. Encontramos que, en estos casos, las fábricas abren más plazas para que ambas puedan trabajar, resultando en más productividad.

En conclusión, resolvimos cuál era el problema que tenía Cox2<sup>56</sup>, al menos en células modelo de levadura. Con esto, obtuvimos muchas pistas de lo que podría funcionar en el caso de células de humanos. Nos interesa porque existen células de personas donde algún habitante mitocondrial sufrió un accidente (o una mutación) y requerimos de estrategias para que una copia sana de este habitante supla su función en la fábrica. Ahora contamos con pistas que nos ayudan a lograr esto, como usar pocas copias para no saturar al sistema de transporte y copiar los cambios de piezas que hicieron otros organismos naturalmente. Nuestro trabajo también nos habla del estilo de vida hidrofóbico que Cox2 siempre ha tenido y que esa es la razón que lo ha mantenido viviendo en las mitocondrias en la mayoría de los organismos. Los pocos organismos donde Cox2 reside en núcleo, es porque logró cambiar su estilo de vida por uno menos hidrofóbico.

## 2. RESUMEN

La relocalización experimental de genes mitocondriales al núcleo (expresión alotópica) ha demostrado ser una ardua tarea. En la mayoría de los casos, el factor que evita una expresión alotópica exitosa es la alta hidrofobicidad de las proteínas codificadas en el genoma mitocondrial. En este trabajo nos enfocamos en la subunidad II de la citocromo c oxidasa (Cox2) para estudiar las modificaciones que permiten o mejoran su expresión alotópica en levadura. Esta proteína puede ser importada a las mitocondrias desde el citosol en presencia de la sustitución W56R ( $c\text{Cox2}^{\text{W56R}}$ ), la cual disminuye la hidrofobicidad de la proteína y permite la recuperación parcial de la respiración en una cepa carente del gen mitocondrial *cox2*. Demostramos que la baja eficiencia en la translocación de Cox2 es el paso limitante para su expresión alotópica y que la sustitución W56R no tiene un efecto directo sobre la actividad de la citocromo c oxidasa (CcO). También, mostramos que la presencia de una carga positiva es favorable sobre otra sustitución que sólo reduce la hidrofobicidad. Al coexpresar a las versiones mitocondrial (*mtCox2*) y nuclear ( $c\text{Cox2}^{\text{W56R}}$ ), cada proteína se ensambla en su complejo resultando en una población heterogénea de CcOs, con la mayoría de los complejos conteniendo a la versión mitocondrial. Notablemente, la presencia de la versión mitocondrial promueve el ensamblaje de la versión alotópica. Exploramos otras sustituciones que permiten la expresión alotópica de esta subunidad en levadura. Al emular las sustituciones que sufrió la secuencia de *COX2* que migró naturalmente al núcleo en la leguminosa *Glycine max* (planta de la soya), encontramos que estas mismas sustituciones permiten que su contraparte en levadura pueda ser expresada alotópicamente. Nuestros resultados también indican que altas dosis de proteína dirigida a las mitocondrias son contraproducentes para el crecimiento respiratorio. En el presente trabajo validamos el concepto de que Cox2 expresada alotópicamente puede complementar un fenotipo dado por una mutación en el gen *COX2* mitocondrial. Nuestros hallazgos son relevantes para comprender por qué algunos genes se mantuvieron confinados en los genomas mitocondriales.

### 3. ABSTRACT

Experimentally relocating mitochondrial genes to the nucleus for functional expression (allotopic expression) is a challenging process. The high hydrophobicity of mitochondria-encoded proteins seems to be one of the main factors preventing this allotopic expression. We focused on subunit II of cytochrome c oxidase (Cox2) to study which modifications may enable or improve its allotopic expression in yeast. Cox2 can be imported from the cytosol into mitochondria in the presence of the W56R substitution ( $c\text{Cox2}^{\text{W56R}}$ ), which decreases the protein hydrophobicity and allows the partial respiratory rescue of a *cox2*-null strain. The efficiency of Cox2 biogenesis is the limiting step for successful allotopic expression and the W56R substitution does not have a direct effect on the activity of cytochrome c oxidase (CcO). Also, we show that the inclusion of a positive charge is more favorable over another substitution that only decreases the hydrophobicity. Upon coexpression of  $c\text{Cox2}^{\text{W56R}}$  and mtCox2, each protein assembled into CcO independently from its genetic origin, resulting in a mixed population of CcO with most complexes containing the mtCox2 version. Notably, the presence of the mtCox2 enhances  $c\text{Cox2}^{\text{W56R}}$  incorporation. We also searched for other determinants enabling allotopic expression in yeast by examining other organisms where the *COX2* gene was naturally transferred to the nucleus during evolution. We found that occurring variations at within-membrane residues in the legume *Glycine max* (soybean) Cox2 could enable *COX2* to be allotopically expressed in yeast. Our results also show that directing high doses of allotopically-synthesized Cox2 to mitochondria seems to be counterproductive for respiratory growth. We provide proof of principle that an allotopically expressed Cox2 may complement a phenotype due to a mutant mitochondrial *COX2* gene. Our findings are relevant for understanding why some genes were confined to mitochondrial genomes.

## 4. INTRODUCCIÓN

### 4.1 Breve Introducción al Origen de las Mitocondrias

Las mitocondrias son compartimentos de las células eucariontes conocidos por producir energía química en forma de ATP. Además de proveer a las células con la energía necesaria para cumplir sus funciones, estos organelos llevan a cabo muchos otros procesos bioquímicos que evidencian la contribución de las mitocondrias a la complejidad de los organismos eucariontes. Por ejemplo, metabolizan aminoácidos y nucleótidos<sup>1-3</sup>; catabolizan ácidos grasos<sup>4</sup>; sintetizan lípidos<sup>5</sup>, grupos hemo<sup>6</sup>, centros fierro-azufre<sup>7</sup> y esteroides<sup>8</sup>; participan en la muerte celular por apoptosis<sup>9</sup> y mantienen la homeostasis de iones intracelulares<sup>10</sup>.

El entendimiento sobre estos organelos ha avanzado continuamente, desde su funcionamiento bioquímico hasta las investigaciones acerca de su origen<sup>11</sup>. Las mitocondrias comparten muchas características con las bacterias: su forma y tamaño es similar, contienen DNA con algunos genes homólogos a los bacterianos y tienen una membrana externa que rodea a una membrana interna. Estas similitudes llevaron a la hipótesis de que el ancestro mitocondrial fue un endosimbionte bacteriano. La teoría endosimbiótica tomó tiempo en ser aceptada, -desde el primer reporte<sup>12</sup> de Ivan Wallin en 1926, retomado y popularizado por Lynn Margulis<sup>13</sup> en 1967- pero hoy en día es aceptada como el mejor modelo del origen de las mitocondrias<sup>14</sup>. Análisis comparativos de secuencias indican que las mitocondrias de todos los eucariontes comparten un ancestro en común, lo que sugiere que la endosimbiosis mitocondrial ocurrió una sola vez en la evolución. Este tipo de análisis propuso a un alfa-proteobacteria como candidato al ancestro mitocondrial, posiblemente de la familia de las Rickettsiales<sup>15</sup>. Análisis filogenómicos subsecuentes identificaron artificios en las comparaciones de secuencias iniciales e implicaron que el ancestro mitocondrial no perteneció al linaje de las alfa-proteobacterias. Actualmente, se sugiere que el ancestro mitocondrial divergió de las alfa-proteobacterias antes de la diversificación de los linajes de alfa-proteobacterias que conocemos hoy en día<sup>16</sup>. Aunque estos análisis descartan a posibles candidatos de los ancestros mitocondriales, la identidad del linaje que dio lugar a las mitocondrias sigue siendo una interrogante.

En las últimas décadas, múltiples grupos se han dedicado a buscar la identidad de la célula hospedera. Que las mitocondrias pertenezcan únicamente a organismos eucariontes y que no se conozcan eucariontes sin mitocondrias o sin remanentes de ellas, sugiere que la adquisición del ancestro mitocondrial fue concomitante al origen de los eucariontes. Por lo tanto, es muy posible que la célula hospedera haya sido procariote. Recientemente, se ha identificado al superfilo de las arqueas Asgard, las cuales posiblemente incluyen al candidato a la célula que hospedó al ancestro mitocondrial hace más de 1500 millones de años<sup>17,18</sup>.

### 4.2 Migración de Genes Mitocondriales al Núcleo

La transición de bacteria endosimbionte a organelo celular estuvo acompañada de una reestructuración genómica masiva a lo largo de la evolución. La mayoría de los genes del endosimbionte se perdieron, fueron sustituidos por genes nucleares de función similar, o bien, fueron transferidos al núcleo. Actualmente, las mitocondrias contienen entre 10 y 1000 veces menos genes que las alfa-proteobacterias<sup>19</sup>.

Usando a la levadura como modelo experimental, se observó que la migración de genes es principalmente unidireccional. Los genes mitocondriales se relocalizan

frecuentemente al núcleo, pero rara vez (~100,000 veces menos) esto sucede en sentido contrario<sup>20</sup>. Los genes que migraron al núcleo adquieren la ventaja de contar con mecanismos de reparación más eficientes y tienden a exhibir una tasa de mutación más baja (dependiendo del organismo, entre 2 y más de 20 veces más baja<sup>21</sup>), lo que resulta en una menor acumulación de mutaciones deletéreas<sup>22,23</sup>.

No se conoce el mecanismo de transferencia de genes mitocondriales al núcleo, pero existen evidencias contrastantes que implican a intermediarios de DNA o de RNA<sup>24</sup>. Una vez integrada la secuencia en el genoma nuclear ésta debe adaptarse para lograr su activación<sup>19</sup>: debe ajustar su código genético y el uso de codones, adquirir secuencias reguladoras para su transcripción y traducción, además de adquirir una secuencia que codifique para una presecuencia de localización mitocondrial (MTS, por sus siglas en inglés). Esta transferencia no es siempre exitosa y puede dar lugar a secuencias no activadas o pseudogenes.

Los genomas mitocondriales son muy heterogéneos en cuanto a tamaño y número de genes que codifican. En un extremo del espectro de densidad génica está *Plasmodium falciparum*<sup>25</sup> que contiene 5 genes. En el otro extremo, están *Reclinomonas americana*<sup>26</sup> y *Andalucia godoyi*<sup>27</sup> con 97 y 99 genes, respectivamente. No se conoce por qué hay tanta variabilidad en la tasa de migración de genes mitocondriales al núcleo entre organismos, pero lo que se ha observado es una convergencia en la pérdida de genes mitocondriales. Es decir, se ha observado una jerarquía en la frecuencia en la que los genes han migrado hacia el núcleo en las distintas especies<sup>28</sup>. Por ejemplo, los genes que codifican para proteínas ribosomales se encuentran comúnmente relocalizados al núcleo. Por otra parte, hay genes que están codificados en las mitocondrias en todos los organismos estudiados, como el citocromo *b* del complejo III o la subunidad Cox1 del complejo IV. En general, los genomas mitocondriales codifican para subunidades de los complejos respiratorios y RNAs ribosomales. En el genoma mitocondrial de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, 7 de los 8 genes que codifican para proteínas son para subunidades de los complejos respiratorios. En la siguiente sección se detallará sobre las restricciones que mantuvieron a los genomas mitocondriales confinados a su organelo.

La migración de genes mitocondriales al núcleo es un proceso que sigue ocurriendo. Por ejemplo, el gen *COX2*, que codifica para la subunidad II de la citocromo *c* oxidasa, migró naturalmente al núcleo en contados organismos<sup>29-31</sup>. Este gen, además de darnos un ilustrativo ejemplo de relocalización al núcleo, es el objeto de estudio de la presente tesis. *COX2* migró al núcleo en una rama del árbol filogenético de las leguminosas resultando en un organismo con ambas versiones de *COX2*, una mitocondrial y una nuclear. Hoy en día, estas leguminosas codifican a la subunidad Cox2 en el genoma nuclear o en el genoma mitocondrial o en ambos, dependiendo de la copia que se activó y/o inactivó<sup>29,32,33</sup>. Por ejemplo, *Eriosema* y *Erythrina* codifican al gen *COX2* en el genoma nuclear, *Pueraria* y *Teramus* lo codifican en el genoma mitocondrial, y *Lespedeza* y *Dumasia* codifican una versión de *COX2* en el genoma nuclear y otra en el mitocondrial (ver figura 1).

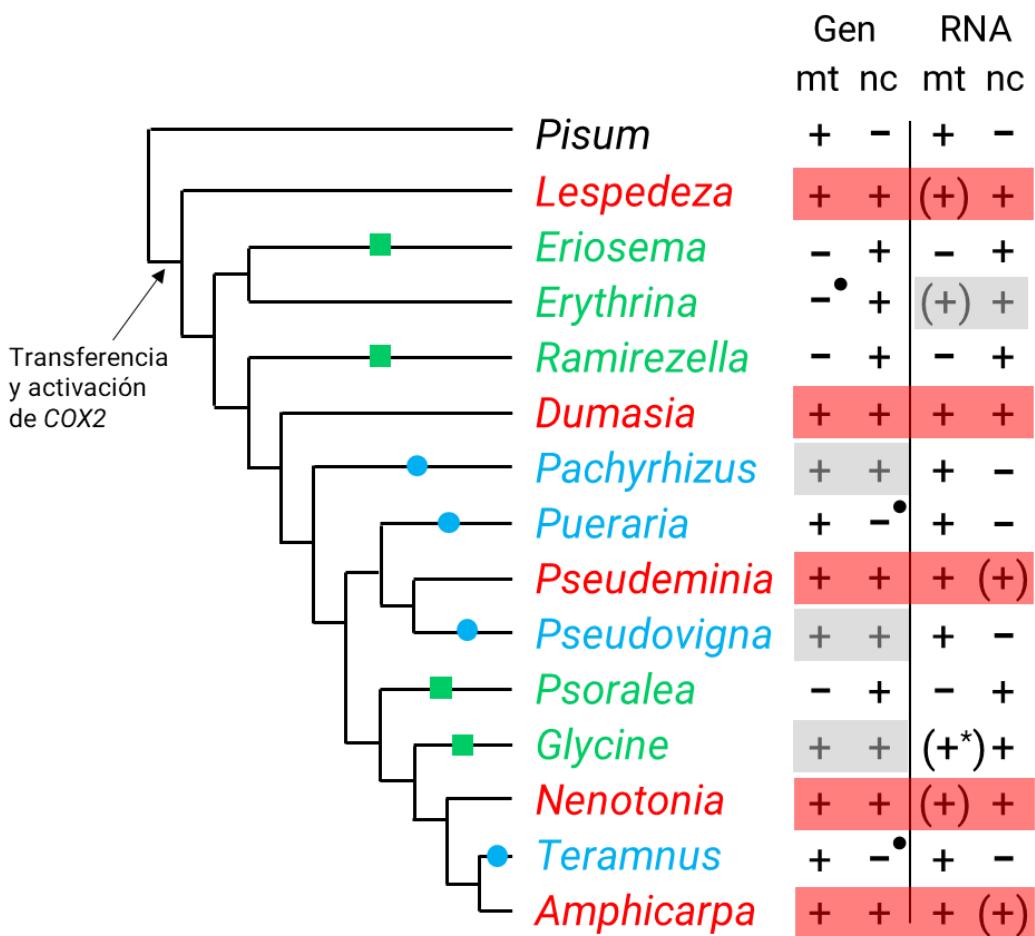


Figura 1. Distribución del gen *COX2* y de sus transcritos en un árbol filogenético en las leguminosas. Las columnas de la izquierda indican la presencia (+) o ausencia (-) del gen *COX2* en las mitocondrias o en el núcleo. Los puntos (•) indican inserciones o delecciones que afectan el marco de lectura de *COX2*. Las columnas de la derecha indican la presencia (+) o ausencia (-) de los transcritos de *COX2* de las hojas en las mitocondrias (mt) o en el núcleo (nc). Los paréntesis indican bajos niveles de los transcritos, los asteriscos indican transcritos que no se editan correctamente. Se resalta en color rojo a los casos de transcripción dual donde ambos transcritos se procesan correctamente. Se resalta en color gris a los casos donde ambas versiones de *COX2* están intactas o que ambas tienen una transcripción dual, pero no las dos cosas. Los rectángulos verdes indican la inactivación de la versión mitocondrial mientras que los círculos azules indican la inactivación del gen nuclear. (Figura modificada de Adams et al., 1999<sup>29</sup>).

El gen COX2 también migró al núcleo en las algas clorofitas<sup>30</sup> (como *Chlamydomonas reinhardtii*, *Polytomella parva* y *Volvox carteri*) y en los apicomplejos<sup>34</sup> (como *Plasmodium falciparum* y *Toxoplasma gondii*). En estas especies, COX2 se encuentra dividido en dos genes los cuales codifican para las subunidades Cox2a y Cox2b. Se piensa que este gen fue interrumpido por otra secuencia cuando aún estaba codificado en el genoma mitocondrial resultando en los genes fragmentados COX2A y COX2B y que posteriormente migraron individualmente al núcleo. En consistencia con este modelo, el alga *Scenedesmus obliquus* codifica a Cox2a en la mitocondria y a Cox2b en el núcleo, reflejando un paso evolutivo intermedio<sup>35</sup>.

Tomando en cuenta lo descrito anteriormente, la transferencia de genes mitocondriales al núcleo tuvo un papel principal en la evolución de las mitocondrias. Además, se conocen organismos con organelos especializados que se originaron a partir de mitocondrias (como los hidrogenosomas<sup>36</sup>), incluso, que ya no contienen un genoma<sup>37</sup>. Sin embargo, las mitocondrias de todos los eucariontes que llevan a cabo respiración celular cuentan con genoma mitocondrial.

#### 4.3 Restricciones que Mantienen a los Genomas Mitocondriales

Se han propuesto diversas explicaciones sobre la retención de los genomas mitocondriales, entre ellas: (i) la alta hidrofobicidad de las proteínas codificadas en el organelo, cuyo número de pases transmembranales dificultaría su importación desde el citosol hacia la membrana interna mitocondrial<sup>19,38,39</sup>, o bien, estas proteínas serían erróneamente localizadas a otras membranas celulares como la plasmática o la del retículo endoplásmico<sup>40,41</sup>; (ii) ya que codifican subunidades que componen a los núcleos catalíticos de los complejos respiratorios (“centralidad energética”), estos genes pudieron ser confinados a la mitocondria para regular su expresión dependiendo del estado redox o metabólico en las mitocondrias<sup>42–44</sup>; (iii) las diferencias entre el código genético mitocondrial y el nuclear imposibilitaron la traducción de las secuencias tras su transferencia al núcleo, o bien, las proteínas correspondientes no han adquirido aún una MTS apropiada para dirigirlas a las mitocondrias<sup>19,39</sup>.

Recientemente, se publicó un estudio tomando en cuenta a todos los genomas mitocondriales completamente secuenciados al 2015 (más de 2,000 genomas). Tras un análisis estadístico, se propusieron las presiones selectivas más probables para guiar la evolución de los genomas mitocondriales como los conocemos hoy en día. Los resultados sugieren que la combinación del alto contenido de GCs en los genes, la alta hidrofobicidad de las proteínas que codifica y la “centralidad energética” son las características que contribuyen a la retención de los genomas mitocondriales<sup>45</sup>.

Con lo anterior, podemos argumentar que los genomas mitocondriales se han mantenido para poder lidiar con proteínas altamente hidrofóbicas que juegan un papel central en la respiración. La maquinaria de inserción a la membrana interna y la maquinaria de ensamblaje de los complejos mitocondriales se encuentran en la membrana interna y en la matriz mitocondrial. Si la traducción de las proteínas hidrofóbicas se mantiene en el mismo compartimento que su inserción y ensamblaje, se evita su mal plegamiento, su localización membranal errónea y su ensamblaje defectuoso. Entonces, tomando en cuenta las hipótesis mencionadas arriba, todas influyen, aunque en diferentes grados, donde la alta hidrofobicidad pareciera ser la más

importante. Estas restricciones mantienen a contados genes codificados en los genomas mitocondriales mientras que el resto de las secuencias migraron al núcleo y deben importarse desde el citosol. En línea con lo anterior, en los organismos donde atípicamente se codifican proteínas hidrofóbicas en el genoma nuclear, éstas tienen una hidrofobicidad disminuida comparadas con sus contrapartes codificadas en el genoma mitocondrial<sup>33,46-48</sup>.

#### 4.4 Sistema de Importación de Proteínas Mitocondriales

Los genes transferidos deben de ser transcritos en el núcleo, los RNAs correspondientes traducidos por ribosomas citosólicos y las proteínas resultantes deben ser importadas a las mitocondrias para cumplir su función. Se estima que al menos 1000 proteínas distintas son dirigidas hacia las mitocondrias<sup>49</sup>. La migración de genes al núcleo estuvo acompañada de la adquisición de secuencias de localización mitocondrial para las proteínas, así como de maquinarias de importación en las membranas mitocondriales. La mayoría de estos componentes son translocasas sin homólogos bacterianos conocidos<sup>50,51</sup>. Entre las proteínas que sí cuentan con homólogos en bacterias se encuentra la subunidad central del complejo SAM (Sam50)<sup>52</sup>, proteasas del espacio intermembranal (Imp1/2)<sup>53</sup>, la translocasa Oxa1<sup>54</sup>, la proteína periférica de membrana Tim44<sup>55</sup> y la chaperona Hsp70 (que es un componente del motor PAM)<sup>56</sup>. Diversos grupos han caracterizado a la maquinaria de importación mitocondrial y sus avances han sido publicados en revisiones detalladas<sup>57-61</sup>. En esta sección se describirá de manera global a esta maquinaria.

La mayoría de las proteínas mitocondriales sintetizadas en el citosol contienen extensiones en el amino terminal llamadas secuencias de localización mitocondrial o MTS (por sus siglas en inglés). En general, estas presecuencias forman α-hélices anfifílicas (con un lado positivo y otro hidrofóbico) y son procesadas una vez que la proteína alcanza su destino. Otras proteínas contienen secuencias internas que las dirigen a sus subcompartimentos mitocondriales.

Las presecuencias interactúan con la superficie mitocondrial a través de un receptor que forma parte del complejo de la translocasa de la membrana externa (TOM, por sus siglas en inglés) (figura 2[1]). La gran mayoría de las proteínas mitocondriales provenientes del citosol ingresan a las mitocondrias a través de TOM. Posteriormente, las proteínas interactúan con distintos complejos, dependiendo de su destino final (figura 2[2]). Existen proteínas que no requieren de TOM para ingresar a las mitocondrias y lo hacen a través de otros translocadores de membrana externa, como Mim1 (figura 2[8]).

Las proteínas con presecuencia son reconocidas por el complejo de la translocasa de la membrana interna 23 (TIM23) y atraviesan hasta la matriz mitocondrial, ayudadas del motor asociado a la translocasa de presecuencias (PAM) (figura 2[3]). Este paso requiere de la hidrólisis de ATP, así como del gradiente electroquímico de la membrana interna. Una vez en la matriz mitocondrial, las presecuencias son procesadas por la peptidasa de procesamiento mitocondrial (MPP). Otras proteínas con presecuencia son liberadas de forma lateral hacia la membrana interna a través de TIM23 (figura 2[4]). Estas proteínas deben contener un segmento hidrofóbico para que TIM23 lo reconozca como señal de paro y transferencia o “stop-transfer”. El complejo TIM23 es el único

capaz de realizar ambas funciones: translocar proteínas a la matriz o liberarlas lateralmente a la membrana interna.

Las proteínas cuyo destino final es el espacio intermembranal son reconocidas por la maquinaria de ensamblaje del espacio intermembranal mitocondrial (MIA). MIA también promueve el plegamiento de las proteínas importadas al oxidar sus cisteínas formando enlaces disulfuro (figura 2[5]). También en el espacio intermembranal, reside el complejo de chaperonas Tim9-Tim10 el cual se une a las proteínas hidrofóbicas que llegan al espacio intermembranal y las dirige a la membrana donde deben ser insertadas. Para el caso de barriles beta de la membrana externa, el complejo SAM es el que las inserta (figura 2[6]). Para el caso de proteínas acarreadoras residentes de la membrana interna, el complejo TIM22 es el que las inserta (figura 2[7]).

Las pocas proteínas sintetizadas por ribosomas mitocondriales son insertadas en la membrana interna desde la matriz mitocondrial por la translocasa Oxa1 en una reacción de tipo exportación (figura 2[9]). Oxa1 se une a los ribosomas mitocondriales cerca del túnel de salida para facilitar la inserción co-traduccional de las proteínas. Además, esta translocasa también inserta a proteínas sintetizadas en el citosol e importadas a la matriz mitocondrial, por ejemplo, TIM23 y Oxa1 cooperan para la inserción de un transportador ABC en la membrana interna<sup>62</sup>. Oxa1 también transloca a los nuevos precursores de Oxa1 provenientes desde el citosol.

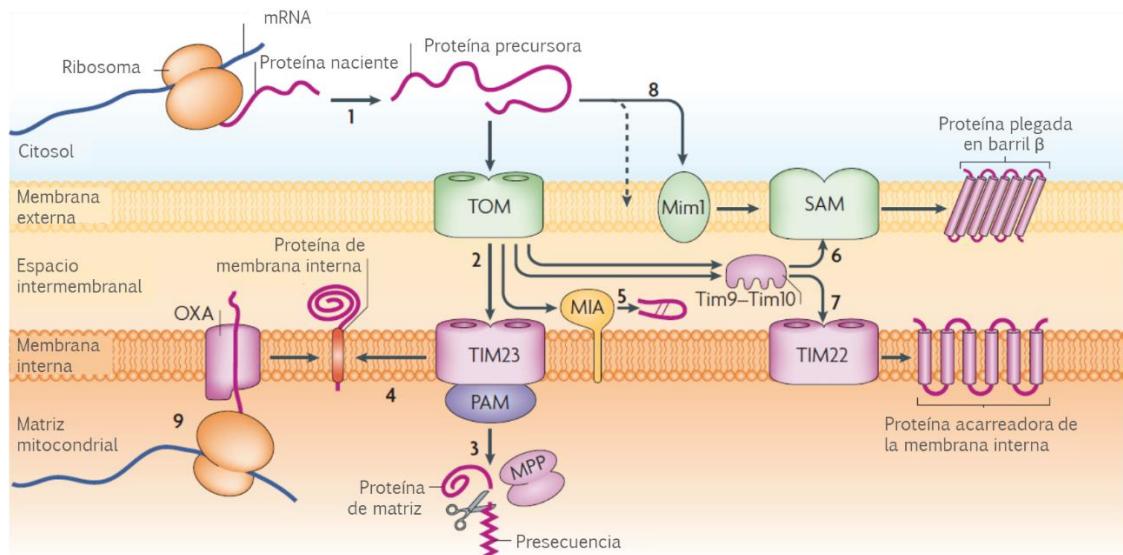


Figura 2. Maquinaria de importación de proteínas mitocondriales. En el texto se enumeran y describen las distintas rutas de biogénesis que siguen las proteínas mitocondriales. (Figura modificada de Schmidt *et al.*, 2010<sup>60</sup>).

## 4.5 Origen Genético Dual de los Complejos de la OXPHOS

Las mitocondrias llevan a cabo la respiración aeróbica y la síntesis de energía en forma de ATP mediante la acción de complejos proteicos embebidos en la membrana interna mitocondrial. Los complejos I, III y IV, así como, II, III y IV forman cadenas de relevos de electrones que desembocan en la reducción del  $O_2$  molecular para formar  $H_2O$ . Estas cadenas son alimentadas por electrones provenientes de la oxidación de sustratos en los complejos I (NADH) y II (succinato), que son aceptados por ubiquinonas membranales que se reducen a ubiqinol (coenzima Q). El ubiqinol difunde en la membrana y transfiere electrones al complejo III donde se reduce otra molécula de libre difusión, el citocromo c. Finalmente, el complejo IV o citocromo c oxidasa (CcO) transfiere los electrones del citocromo c al  $O_2$  (figura 3A).

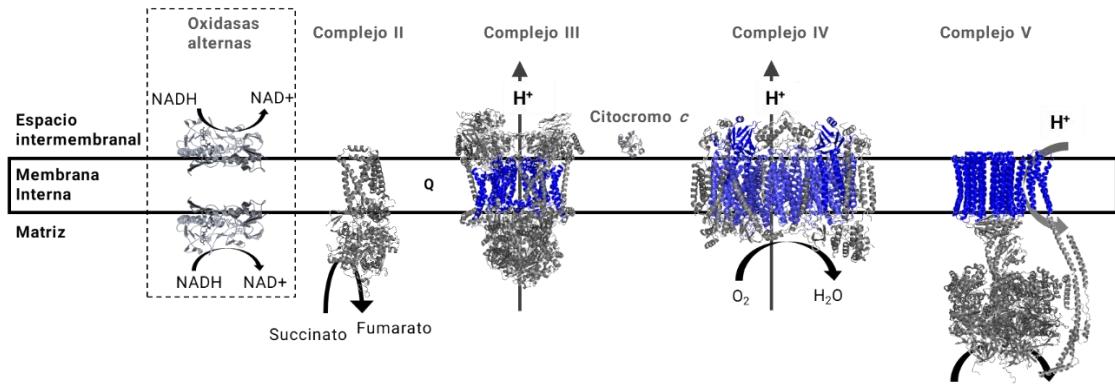
En los complejos I, III y IV, la transferencia de electrones está acoplado a la translocación de protones a través de la membrana interna, desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal. Este gradiente electroquímico es aprovechado como energía cinética por la ATP sintasa (o complejo V) para la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi (figura 3A). Tomando en cuenta que este sistema acopla la oxidación de sustratos con la fosforilación del ADP, estos complejos son nombrados complejos de la fosforilación oxidativa (o por sus siglas en inglés, OXPHOS).

Todos estos complejos se conforman de múltiples subunidades. La mayoría se codifican en genes que migraron al núcleo, sin embargo, algunas aún se codifican en el genoma mitocondrial. En línea con las restricciones que mantuvieron a los genomas mitocondriales, las subunidades codificadas en estos genomas generalmente son las más hidrofóbicas, tienen múltiples segmentos transmembranales y son componentes centrales en su respectivo complejo. Todo esto resulta en que las subunidades de un mismo complejo estén codificadas en distintos compartimentos celulares y bajo distintos sistemas de regulación de la expresión. Por ejemplo, en la levadura *S. cerevisiae* 7 de las 46 subunidades de los complejos respiratorios, están codificadas en el genoma mitocondrial y el resto en el nuclear (figura 3B).

El origen genético dual de los complejos representa un problema logístico para las células. Proteínas sintetizadas e insertadas desde caras opuestas de la membrana interna deben de ser ensambladas en el mismo complejo en cantidades estequiométricas. Además, si esta coordinación falla, podrían formarse intermediarios de ensamblaje que generen especies reactivas de oxígeno dañando a las proteínas y al DNA mitocondrial<sup>63</sup>.

Investigaciones recientes han comenzado a elucidar los mecanismos para una expresión coordinada de ambos genomas. Usando a la levadura como modelo, se encontró una regulación dinámica y sincronizada a nivel traduccional (y no así a nivel transcripcional). Además, es un mecanismo unidireccional donde la traducción citosólica coordina a la mitocondrial<sup>64</sup>. Actualmente, se están llevando a cabo múltiples investigaciones para identificar y caracterizar a los elementos que participan en esta coordinación de la expresión.

**A Respiración mitocondrial en *S. cerevisiae***



B

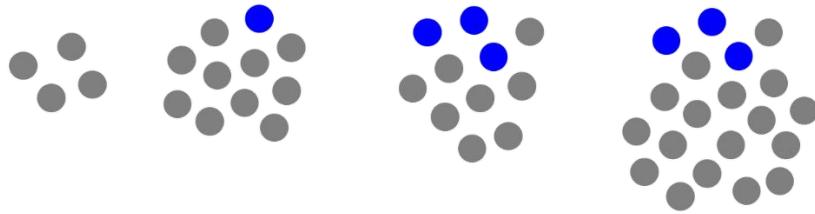


Figura 3. Origen genético dual de los complejos de la fosforilación oxidativa en *S. cerevisiae*. (A) Reconstrucción de los complejos a partir de estructuras cristalográficas. *S. cerevisiae* no tiene complejo I, en su lugar, cuenta con las oxidases alternas Nde1/2 (externas) y Nd1l (rectángulo punteado). Se muestran a los acarreadores de electrones ubiquinona o coenzima Q (Q) y citocromo *c*. (B) Las subunidades de los complejos OXPHOS se representan con círculos. Las subunidades codificadas en el núcleo se muestran en gris mientras que las subunidades codificadas en las mitocondrias se muestran en azul.

## 4.6 Complejo IV (Citocromo c oxidasa)

El presente trabajo de investigación se centra en la subunidad II de la CcO (Cox2), una de las subunidades indispensables para la catálisis que realiza este complejo (figura 4A). Las CcOs permiten la respiración celular en todos los eucariontes (y muchos procariontes) por lo que ha sido objeto de estudio por varias décadas. Múltiples publicaciones detallan su estructura<sup>65,66</sup>, mecanismo de acción<sup>67,68</sup>, biogénesis<sup>69–71</sup> y regulación de su ensamblaje<sup>72,73</sup>, a continuación, estos aspectos se describen de forma general. Las subunidades I, II y III conforman al núcleo catalítico de este complejo y generalmente se encuentran codificadas en el genoma mitocondrial. Otras subunidades accesorias complementan a las CcO y se encuentran normalmente codificadas en el núcleo, por ejemplo, la CcO de levadura cuenta con 9 subunidades accesorias y la de mamífero tiene 11<sup>74</sup>. Las subunidades I y II contienen a los cofactores para llevar a cabo la reacción enzimática del complejo, se piensa que la subunidad III participa en la canalización del O<sub>2</sub> hasta el sitio catalítico<sup>68</sup>.

La subunidad II cuenta con dos segmentos transmembranales, orienta ambos de sus extremos hacia el espacio intermembranal y contiene un dominio plegado en hojas β en su extremo carboxilo terminal donde coordina dos átomos de cobre para formar el sitio Cu<sub>A</sub><sup>66</sup>. En este mismo dominio se une el citocromo c reducido para donar electrones, uno por uno, al sitio Cu<sub>A</sub>. Estos electrones son recibidos por grupos prostéticos coordinados por la subunidad I. La subunidad I tiene doce segmentos transmembranales y coordina tres grupos prostéticos dentro de la membrana: el hemo a, el a<sub>3</sub> y el sitio de unión a un átomo de cobre, Cu<sub>B</sub>. Los electrones donados por el sitio Cu<sub>A</sub> son recibidos por el grupo hemo a y transferidos al centro binuclear hemo a<sub>3</sub>-Cu<sub>B</sub> para la reducción del O<sub>2</sub> para formar H<sub>2</sub>O. Los protones de esta reacción de reducción provienen desde la matriz mitocondrial, además, otros protones son translocados hacia el espacio transmembranal en esta reacción (figura 4B).

El ensamblaje de este complejo está altamente regulado y requiere de múltiples chaperonas. Defectos en este proceso pueden resultar en patologías como encefalopatías, cardiomielopatías y neurodegeneración<sup>75</sup>. El modelo actual indica que cada una de las subunidades centrales (Cox1, Cox2 y Cox3) forma un módulo de ensamblaje individual, una vez formado, se ensambla secuencialmente con los otros módulos<sup>71,76</sup>. En cada paso participan chaperonas específicas (a la fecha se han identificado más de 30) que estabilizan a las subunidades o que unen los cofactores necesarios (grupos hemo y átomos de cobre). Se han utilizado distintos organismos para estudiar este proceso, los cuales indican que el modelo de intermediarios preensamblados está conservado desde levaduras hasta humanos<sup>77</sup>.

Al menos en las levaduras, el ensamblaje de la CcO está acoplado a la síntesis de Cox1. La proteína Ms51 forma un ciclo de retroalimentación negativa para coordinar la traducción de Cox1 con su ensamblaje<sup>72</sup>. Ms51 es uno de los activadores traduccionales de Cox1, también, se une a la proteína recién sintetizada e insertada en la membrana interna. Mientras el módulo de Cox1 no se ensambla con el siguiente módulo que contiene a Cox2, Ms51 permanece unido a su módulo y es incapaz de activar la traducción de más subunidades Cox1. Para que Ms51 pueda volver a activar la traducción de Cox1, los demás módulos preensamblados deben de estar unidos a los módulos de Cox1. De esta forma se ajustan los niveles de síntesis de Cox1 con la cantidad que se ensambla correctamente.

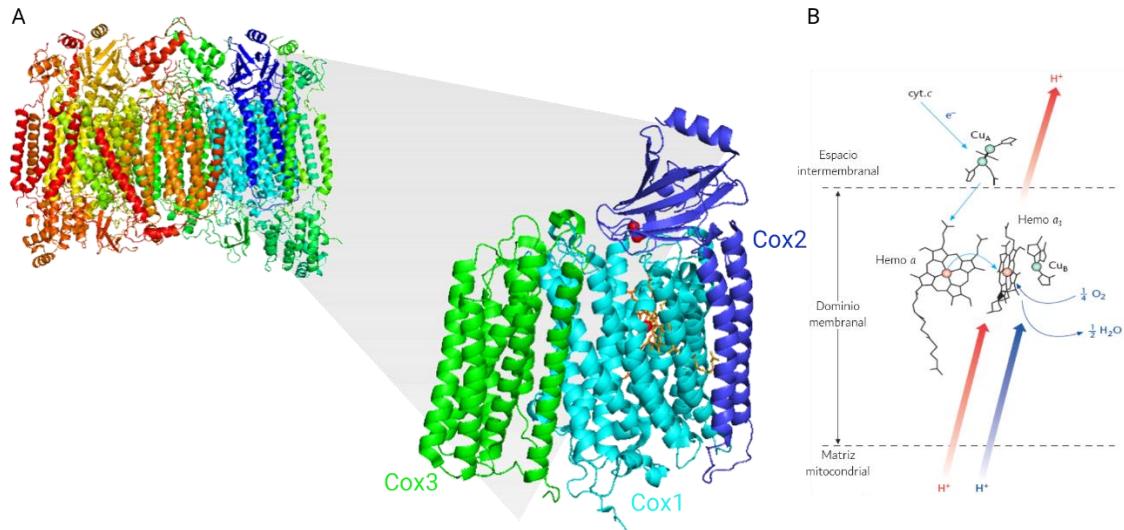


Figura 4. Estructura y mecanismo de la citocromo *c* oxidasa. (A) Modelo cristalográfico de la citocromo *c* oxidasa de *Bos taurus* (PDB 1oco). En el acercamiento se muestran las subunidades Cox1 (azul claro), Cox2 (azul oscuro) y Cox3 (verde). Se muestran los grupos funcionales de la subunidad Cox1 hemo *a* y *a*<sub>3</sub> (anaranjado). Los sitios de unión a cobre, Cu<sub>A</sub> y Cu<sub>B</sub>, se muestran en rojo. (B) Esquema del flujo de electrones y protones de los grupos prostéticos de la CcO. La transferencia de electrones se esquematiza en azul claro. Los protones consumidos en la reducción del O<sub>2</sub> a agua se muestran en azul y los translocados en rojo (imagen B modificada de Wikström, 2010<sup>68</sup>).

## 4.7 Subunidad II de la citocromo *c* oxidasa (Cox2)

Para lograr la topología correcta de Cox2 sintetizada desde la matriz mitocondrial, su ruta de biogénesis requiere exportar a ambos de sus extremos a través de la membrana interna. Además, el dominio carboxilo terminal de Cox2 es el más grande e hidrofílico en seguir esta ruta de exportación, por lo que el estudio de su inserción ha sido de particular interés. En el caso de la levadura *S. cerevisiae*, la traducción de Cox2 es promovida por su activador traduccional, Pet111<sup>78</sup>. Cox2 es sintetizada como un precursor (preCox2), con un péptido líder de 15 residuos en su amino terminal que permite la exportación cotraduccional del primer segmento transmembranal a través de la translocasa Oxa1<sup>79–81</sup>. Una vez que el extremo amino terminal alcanza el espacio intermembranal, la proteasa Imp1 procesa al péptido líder en presencia de la chaperona Cox20<sup>82–84</sup> (figura 5A).

Una vez sintetizada por completo, Cox2 exporta a su segundo segmento transmembranal a través de Cox18 (figura 5A), una translocasa especializada cuyo único sustrato es este extremo carboxilo terminal<sup>85,86</sup>, esto, en presencia de sus proteínas asociadas, Mss2 y Pnt1<sup>85</sup>. Cox18 es un parálogo de Oxa1<sup>87</sup>, aunque en ausencia de Cox18 la sobreexpresión de Oxa1 complementa parcialmente la inserción de Cox2, no se recupera la respiración en las cepas  $\Delta$ cox18<sup>88</sup>, lo que indica que Cox18 también tiene un papel en el ensamblaje subsecuente de Cox2.

Cox2 adquiere dos átomos de cobre en su sitio Cu<sub>A</sub> al interactuar con las proteínas Coa6 y Sco1/2. El modelo actual de relevo de átomos de cobre se reduce a dos posibilidades: Sco1/2 transfiere el cobre a Coa6 y Coa6 transfiere el cobre directamente a Cox2, o bien, Coa6 debe de estar unido a cobre para poder actuar como chaperona de Cox2 y permitir que reciba los átomos de cobre directamente de Sco1/2<sup>89</sup>.

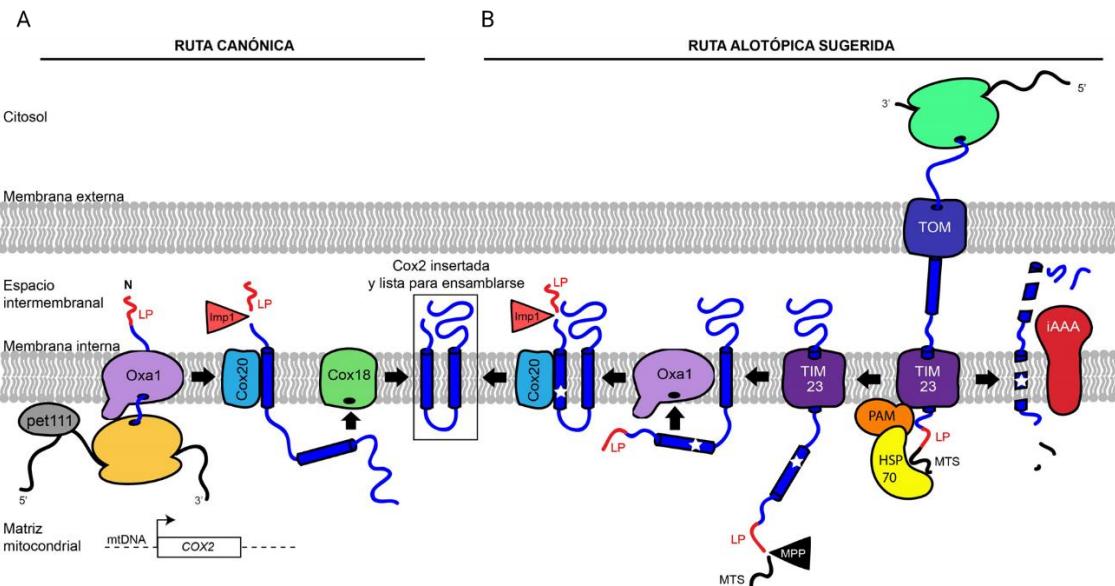


Figura 5. Rutas de biogénesis de Cox2. (A) Ruta clásica de biogénesis de Cox2 sintetizada en la matriz por ribosomas mitocondriales. (B) Ruta de biogénesis propuesta para Cox2 sintetizada en el citosol (ver descripción en el texto). La estrella blanca representa la presencia de la mutación W56R en el primer segmento transmembranal.

## 4.8 Relocalización Experimental de Genes Mitocondriales al Núcleo/Expresión Alotópica

Nuestro interés (y el de muchos otros grupos) por comprender por qué algunos genes se mantuvieron codificados en el genoma mitocondrial nos ha llevado a investigar su relocalización experimental al núcleo. Esta relocalización se conoce como expresión alotópica y también tiene implicaciones en el desarrollo de terapias genéticas para enfermedades mitocondriales. A la fecha no existen tratamientos efectivos para estas enfermedades y no se ha logrado modificar directamente al genoma mitocondrial humano, aunque sí existen métodos para transformar a las mitocondrias de organismos unicelulares como *S. cerevisiae* y *C. reinhardtii*<sup>90</sup>. Por esto se ha propuesto a la expresión alotópica como una alternativa viable<sup>91-93</sup>. En principio, una mutación en el genoma mitocondrial humano, que da lugar a una proteína defectuosa, podría compensarse al expresar la secuencia silvestre en el genoma nuclear y enviar a la proteína correspondiente a las mitocondrias para restaurar la función que perdió la mutante.

Hay dos modificaciones imprescindibles que se deben seguir para lograr la expresión alotópica de una proteína originalmente codificada en el genoma mitocondrial. Primero, recodificar la secuencia del gen para su expresión nuclear y segundo, fusionar a la proteína una secuencia de localización mitocondrial (MTS) que la dirija a las mitocondrias.

La mayoría de los reportes de expresión alotópica en células de mamífero son inconsistentes o controversiales. Por ejemplo, en un primer reporte de expresión alotópica de la subunidad ND4 del complejo I, se reportó que esta proteína se importa a las mitocondrias<sup>94</sup>. Los autores observaron por inmunocitoquímica que la ND4 colocalizaba con un marcador mitocondrial e interpretaron a este resultado como evidencia de importación. Un año más tarde otro grupo reportó que los resultados no eran reproducibles en su laboratorio, ND4 no colocalizaba con el marcador mitocondrial en sus experimentos de microscopía<sup>95</sup>. Otro ejemplo notable es el de la expresión alotópica de la subunidad ND6. El grupo de Enríquez observó que, al hacer las modificaciones necesarias a la proteína, ND6 colocalizaba parcialmente con las mitocondrias y obtuvieron clonas que recuperaban la actividad y el ensamblaje del complejo I. Sin embargo, al examinar con cuidado a las células transfectadas, encontraron que la proteína alotópica no se importaba a las mitocondrias y que las clonas seleccionadas eran revertantes en la mutación del gen *Nd6*<sup>96</sup>. Otras proteínas cuya expresión alotópica se ha reportado sin evidencias contundentes o en reportes contradictorios se incluyen ND1, ATP6, ATP8 y COX1<sup>94,95,105,97-104</sup>. Por todo lo anterior, es recomendable tener extrema precaución en la interpretación de los resultados y contar con los controles necesarios para demostrar inequívocamente la expresión alotópica de proteínas mitocondriales.

Como alternativa a las células de mamífero, se ha utilizado a la levadura *S. cerevisiae* como modelo experimental debido a su accesible manipulación, sobre todo del genoma mitocondrial. Al ser un organismo aerobio facultativo, nos permite eliminar o modificar genes esenciales para la respiración celular sin perder su viabilidad, ya que son capaces de crecer en condiciones fermentativas. Además, su biología mitocondrial está ampliamente caracterizada y comparte muchas de sus propiedades con organismos más complejos.

A la fecha, existen reportes de expresión alotópica de cuatro de las ocho proteínas codificadas en el genoma mitocondrial de *S. cerevisiae*<sup>48,106-109</sup>. Estas son Var1, una

subunidad ribosomal sin cruces transmembranales, Atp8, con un cruce y Atp9 y Cox2, con dos cruces. En línea con la hipótesis de que las proteínas más hidrofóbicas y con más cruces transmembranales se mantienen codificadas en los genomas mitocondriales, las proteínas que no se han logrado expresar alotópicamente en levadura cumplen con estas características (figura 6). Incluso, se ha observado que construcciones con distintas combinaciones de hasta cuatro de los ocho cruces transmembranales de la proteína apocitocromo *b* (codificada por el gen *COB*) son capaces de importarse en las mitocondrias de levadura, pero agregar uno o más cruces transmembranales evita esta importación<sup>39</sup>.

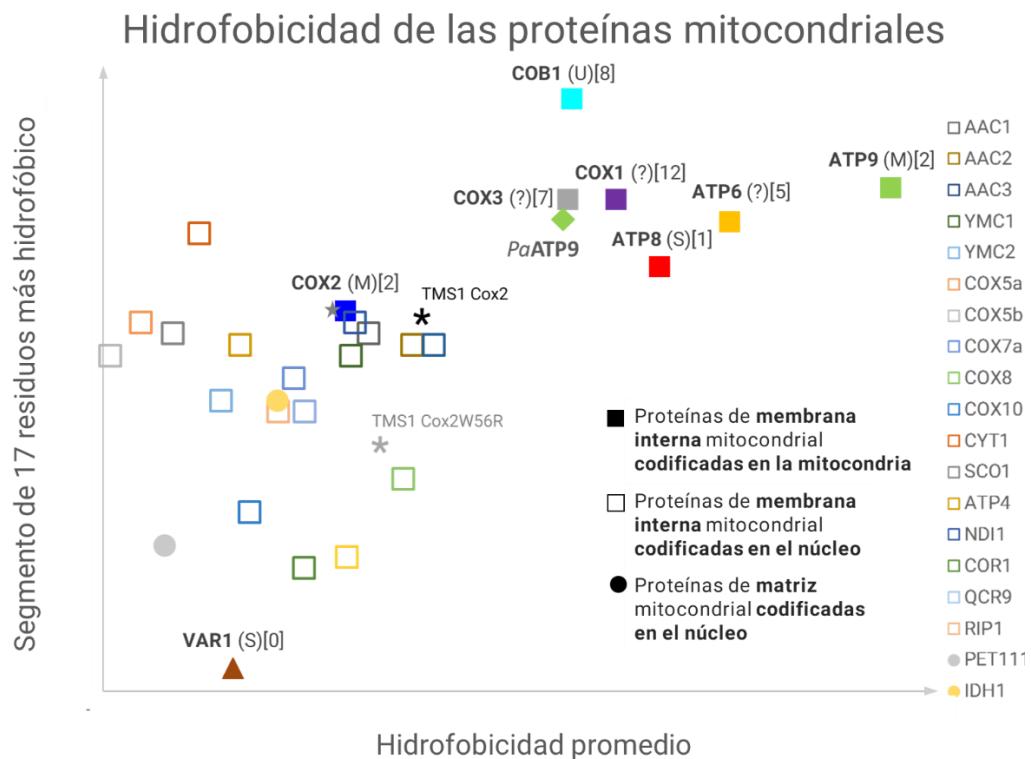


Figura 6. Las proteínas de membrana interna sintetizadas en las mitocondrias tienden a ser más hidrofóbicas que las que son sintetizadas en el núcleo: ejemplo en levadura. Se grafican dos valores de hidrofobicidad para cada proteína: el valor del segmento de 17 residuos más hidrofóbico dentro de la secuencia y la hidrofobicidad promedio de toda la secuencia<sup>39</sup> (se utilizaron las secuencias de las proteínas maduras). La escala de hidrofobicidad utilizada se obtuvo experimentalmente al medir la hidrofobicidad de cada residuo cuando está dentro del segmento transmembranal de una proteína modelo<sup>110</sup>. Se indica el nombre de cada una de las proteínas. Se muestra a las proteínas de membrana interna codificadas en las mitocondrias (cuadrados rellenos) y a algunas proteínas de membrana interna codificadas en el núcleo (cuadrados vacíos). También, se muestran dos proteínas de matriz mitocondrial codificadas en el núcleo (círculos rellenos) y a la proteína Var1, una proteína soluble ribosomal que en la levadura está codificada en el genoma mitocondrial (triángulo relleno). La proteína alotópica Cox2<sup>W56R</sup> se muestra con una estrella y los valores del primer segmento transmembranal de Cox2 mitocondrial (TMS1 Cox2) o alotópica (TMS1 Cox2W56R) se muestran con asteriscos. PaATP9 corresponde a la proteína Atp9 de *P. anserina* que permitió la expresión alotópica en *S. cerevisiae*. Los resultados obtenidos en la expresión alotópica se indican entre paréntesis (S, exitosa; U, no exitosa; M, exitosa con modificaciones; ?, no explorada). El número de segmentos transmembranales para cada proteína se indica en paréntesis cuadrados.

## 4.9 Expresión Alotópica de Cox2

De entre las proteínas mitocondriales de membrana, Cox2 es una de las menos hidrofóbicas (figura 6). Esto la hace un blanco atractivo para estudiar su relocalización al núcleo. Notablemente, no se ha reportado su expresión alotópica en mamíferos a pesar de que mutaciones en el gen *COX2* dan lugar a enfermedades mitocondriales<sup>111</sup>. En el 2011, el grupo de Schultz reportó por primera vez la expresión alotópica de esta subunidad usando a la levadura como modelo<sup>109</sup>. Tras una mutagénesis masiva y al azar de una construcción del gen *COX2* recodificada y conteniendo una secuencia que traduce para una MTS, los autores generaron 20,000 alelos que transformaron en levaduras carentes del gen mitocondrial *COX2*. De estas, 8 transformantes recuperaban la respiración y todas contenían a la sustitución W56R (*cCox2<sup>W56R</sup>*), algunas también contenían otras sustituciones en la MTS, sin embargo, la sustitución W56R era suficiente y necesaria para recuperar la respiración. En todos los casos, el crecimiento en condiciones respiratorias siempre fue menor que el de la cepa silvestre. En los ensayos de inmunodetección para observar los niveles basales de *cCox2<sup>W56R</sup>*, la mayoría de la proteína se observó en forma de precursor, es decir, aún fusionada a su MTS y sólo una fracción se observó en su forma madura.

En nuestro laboratorio se caracterizó bioquímicamente a esta cepa y se encontró que la expresión alotópica de *cCox2<sup>W56R</sup>* tiene una menor velocidad de crecimiento comparada con una cepa silvestre<sup>112</sup>. También, se determinó por espectrofotometría y mediciones de actividad en geles azules nativos que hay menos complejo CcO ensamblado, lo que resulta en una menor actividad neta comparada con la de la cepa silvestre. Se estimó que la subunidad *cCox2<sup>W65R</sup>* alotópica recupera alrededor de 60 % de la actividad de CcO.

La mutación W56R se encuentra en el primer segmento transmembranal de *cCox2<sup>W56R</sup>* y su cadena lateral se encuentra orientada hacia la subunidad Cox7a<sup>112</sup>. El primer cruce transmembranal (TMS1, por sus siglas en inglés) de Cox2 disminuye su hidrofobicidad con esta sustitución (figura 6, asteriscos). Proponemos que esto le permite atravesar ambas membranas mitocondriales. Esta disminución de hidrofobicidad del TMS1 también se observa en las secuencias de *COX2* de organismos que naturalmente expresan a este gen en el genoma nuclear<sup>33,113</sup>, lo que sugiere que esta disminución es necesaria para su importación desde el citosol.

Cox2 sigue rutas de biogénesis distintas dependiendo del compartimento en donde se sintetiza (figura 5). Experimentos con cepas mutantes en cada uno de los elementos que participan en la biogénesis de Cox2 indican que ni el activador traduccional Pet111 ni la translocasa Cox18 son requeridos en el ensamblaje cuando la proteína *cCox2<sup>W56R</sup>* proviene desde el citosol<sup>114</sup>. Proponemos que *cCox2<sup>W56R</sup>* atraviesa la membrana externa a través de TOM y que la hidrofobicidad disminuida de su TMS1 permite que atraviese la membrana interna, probablemente a través de TIM23. Una vez en la matriz, la MTS se puede editar por la proteasa MPP. El segundo segmento transmembranal (TMS2), el cual tiene una hidrofobicidad más alta que el primero, se retiene en TIM23 y es liberado lateralmente a la membrana en una reacción de paro y transferencia (*stop-transfer*). Finalmente, Oxa1 inserta al TMS1 para orientar al péptido líder hacia el espacio intermembranal donde es editado por la proteasa Imp1 en presencia de la chaperona Cox20 (figura 5B). Proponemos a TIM23 como la translocasa por la cual atraviesa el TMS1 de *cCox2<sup>W56R</sup>* y que después libera lateralmente el TMS2, ya que es la única translocasa con la dualidad funcional para translocar proteínas del espacio intermembranal a la matriz y de insertar proteínas en la membrana interna de forma lateral. No descartamos la posibilidad de que una fracción de la proteína *cCox2<sup>W56R</sup>* sea

liberada prematuramente por TIM23 en la membrana interna resultando en una topología incorrecta. El TMS1 de esta proteína también puede ser reconocido como una señal de paro y transferencia. Estas proteínas mal insertadas se degradan por proteasas de mantenimiento mitocondrial<sup>48,115</sup>.

En el presente trabajo nos interesamos en explorar múltiples aspectos de la importación de Cox2 desde el citosol, en particular, identificar aquellos factores que pueden hacer más eficiente la importación de cCox2 a la mitocondria.

## 5. OBJETIVOS

Nuestro objetivo principal se centró en identificar qué modificaciones en la secuencia de *COX2* promueven su expresión alotópica.

Para abordar nuestro objetivo general, nos planteamos los siguientes objetivos particulares:

- i. Identificar si la recuperación parcial de la respiración al expresar a cCox2<sup>W56R</sup> alotópicamente se debe a la mutación directamente, o bien, si se debe a algún paso limitante en la importación o biogénesis de esta proteína.
- ii. Explorar el ensamblaje de Cox2 en la CcO en una cepa que coexpresa a la versión mitocondrial y a su contraparte alotópica.
- iii. Probar si otros residuos con propiedades similares a la arginina pueden sustituir a la posición W56 de Cox2 y permitir su expresión alotópica.
- iv. Reproducir las sustituciones que ocurrieron naturalmente en el gen *COX2* nuclear de las leguminosas en la secuencia de *COX2* de levadura para su expresión alotópica.
- v. Evaluar si la fragmentación en Cox2A y Cox2B, como ocurrió naturalmente en algunas algas, aumenta la eficiencia de la expresión alotópica de Cox2 en levadura.
- vi. Integrar al gen *COX2* en el genoma nuclear para normalizar y disminuir los niveles de expresión de *COX2* y poder manipular la expresión de otras proteínas.
- vii. Eliminar a las proteasas mitocondriales que podrían estar degradando a Cox2<sup>W56R</sup> alotópica.

## 6. RESULTADOS

En esta sección se detallan los resultados dentro de los textos del artículo publicado y de un segundo artículo enviado a publicación. Previo a cada uno, se incluye un resumen de los resultados obtenidos. En un tercer resumen, se incluyen los resultados no publicados correspondientes al objetivo de eliminar a las proteasas mitocondriales.

### 6.1 Expresión mitocondrial *versus* nuclear (objetivos i y ii)

A pesar de que la sustitución W56R es necesaria para recuperar la respiración, sólo lo hace parcialmente (alrededor de un 60 %). Esto podría deberse a que la mutación *per se* afecta el ensamblaje, estabilidad o actividad de la CcO, o bien, a que existe un paso limitante en la ruta de biogénesis de cCox2<sup>W56R</sup> sintetizada en el citosol. Para distinguir entre estas dos posibilidades, en este trabajo generamos una cepa que expresa al gen COX2 mitocondrial contenido la mutación W56R, esto mediante transformación mitocondrial por biolística. La proteína resultante (mtCox2<sup>W56R</sup>) es sintetizada en la matriz mitocondrial, por lo que sigue una ruta de biogénesis canónica. De esta forma logramos evaluar la contribución directa de la sustitución W56R sin tomar en cuenta la ruta de biogénesis alternativa. Comparamos a esta cepa con una cepa silvestre y observamos que son indistinguibles entre ellas. Entre los parámetros evaluados se incluyen: el crecimiento respiratorio (Artículo 1, Figura 1A y B), niveles basales de Cox2 (Artículo 1, Figura 2A), la respiración celular (Artículo 1, Figura 2F), actividad en gel de la CcO (Artículo 1, Figura 2D) y la formación de supercomplejos (Artículo 1, Figura 2E). Además, por fraccionamientos celulares, observamos que la versión precursora de cCox2<sup>W56R</sup> es más abundante que la madura y que ambas se encuentran en la fracción mitocondrial (Artículo 1, Figura 2A), sin embargo, los precursores se degradan al agregar proteinasa K (Artículo 1, Figura 2B). Estos resultados sugieren que los precursores de cCox2<sup>W56R</sup> no se están internalizando por completo e indican que su inserción es el paso limitante en su biogénesis. Más aún, para discriminar que pasos subsecuentes a la inserción, como la adquisición de cobre, también podrían ser limitantes, observamos que la adición de cobre externo no promueve al crecimiento respiratorio (Artículo 1, Figura 2C). Nuestros datos indican que el paso limitante en la recuperación parcial de la respiración por cCox2<sup>W56R</sup> alotópica se debe únicamente a que su ruta de biogénesis es ineficiente.

Finalmente, nos preguntamos cómo es que compite cCox2<sup>W56R</sup> alotópica por el ensamblaje en la CcO en presencia de la versión mitocondrial de Cox2 (mtCox2). Para responder esta pregunta, introdujimos a cCox2<sup>W56R</sup> alotópica en una cepa que también expresa la versión mitocondrial mtCox2. Para poder distinguir entre ambas proteínas, la subunidad sintetizada en la matriz mitocondrial contiene una etiqueta de hemaglutinina (mtCox2-HA). La cepa que coexpresa a ambas versiones crece en medios respiratorios y consume oxígeno de manera similar a la cepa silvestre (Artículo 1, Figura 3A, 3B y 3C) y, por lo tanto, más que la cepa que sólo contiene a cCox2<sup>W56R</sup> alotópica. Estos resultados indican que la síntesis citóslica de cCox2<sup>W56R</sup> no afecta la respiración de una cepa silvestre. Para detectar el ensamblaje de las distintas versiones de Cox2 en el complejo CcO, realizamos geles de dos dimensiones y ensayos de inmunodetección con anticuerpos que reconocen específicamente a cCox2<sup>W56R</sup> o a mtCox2-HA (Artículo 1, Figura 4A y 4B). En la cepa que coexpresa ambas versiones, observamos que las dos variantes se ensamblan en las CcOs. Tomando en cuenta que la estequiometría de Cox2

con respecto a la CcO es de 1 a 1, concluimos que esta cepa contiene una población heterogénea de CcOs, con la mayoría de los complejos conteniendo a la versión mitocondrial. Mas aún, la presencia de la proteína mitocondrial favorece el ensamblaje de la variante alotópica (Artículo 1, Figura 5A-5F). Por lo tanto, el ensamblaje de ambas versiones resulta en un aumento en la cantidad neta de CcOs. Observamos un aumento en la actividad de CcO (Artículo 1, Figura 5G) así como una mayor cantidad del complejo ensamblado (Artículo 1, Figura 5H y 5I).

## Mitochondrial versus nuclear gene expression and membrane protein assembly: the case of subunit 2 of yeast cytochrome c oxidase

Diana Rubalcava-Gracia, Miriam Vázquez-Acevedo, Soledad Funes, Xochitl Pérez-Martínez, and Diego González-Halphen\*

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Ciudad México, D. F., Mexico

**ABSTRACT** Deletion of the yeast mitochondrial gene COX2, encoding subunit 2 (mtCox2) of cytochrome c oxidase (CcO), results in a respiratory-incompetent  $\Delta$ Cox2 strain. For a cytosol-synthesized Cox2 to restore respiratory growth, it must carry the W56R mutation (cCox2<sup>W56R</sup>). Nevertheless, only a fraction of cCox2<sup>W56R</sup> is matured in mitochondria, allowing ~60% steady-state accumulation of CcO. This can be attributed either to the point mutation or to an inefficient biogenesis of cCox2<sup>W56R</sup>. We generated a strain expressing the mutant protein mtCox2<sup>W56R</sup> inside mitochondria which should follow the canonical biogenesis of mitochondria-encoded Cox2. This strain exhibited growth rates, CcO steady-state levels, and CcO activity similar to those of the wild type; therefore, the efficiency of Cox2 biogenesis is the limiting step for successful allotopic expression. Upon coexpression of cCox2<sup>W56R</sup> and mtCox2, each protein assembled into CcO independently from its genetic origin, resulting in a mixed population of CcO with most complexes containing the mtCox2 version. Notably, the presence of the mtCox2 enhances cCox2<sup>W56R</sup> incorporation. We provide proof of principle that an allotopically expressed Cox2 may complement a phenotype due to a mutant mitochondrial COX2 gene. These results are relevant to developing a rational design of genes for allotopic expression intended to treat human mitochondrial diseases.

Monitoring Editor  
Benjamin S. Glick  
University of Chicago

Received: Sep 22, 2017  
Revised: Jan 12, 2018  
Accepted: Feb 1, 2018

### INTRODUCTION

The vast majority of eukaryotes contain a mitogenome. The evolutionary constraints that maintain this genetic material in mitochondria have been addressed previously (Adams and Palmer, 2003; Allen, 2015; Björkholm et al., 2015, 2017; Johnston and Williams, 2016). The hydrophobic nature of the proteins encoded in this genome plays a central role in gene retention (Claros et al., 1995;

Oca-Cossio et al., 2003; Johnston and Williams, 2016). In the interest of gaining knowledge on why gene retention occurs in mitogenomes and on designing eventual gene therapies for patients with mitochondrial diseases, several attempts to experimentally relocate a mitochondrial gene to the nucleus have been performed using mammalian cell lines, in some cases with moot results (Guy et al., 2002; Manfredi et al., 2002; Ojaimi et al., 2002; Oca-Cossio et al., 2003; Zullo et al., 2005; Bokori-Brown and Holt, 2006; Bonnet et al., 2007; Shimokata et al., 2007; Figueiroa-Martínez et al., 2011; Perales-Clemente et al., 2011; Cwerman-Thibault et al., 2015; Boominathan et al., 2016; Björkholm et al., 2017). This strategy, so-called allotopic expression, has also been studied using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Banroques et al., 1986; Gearing and Nagley, 1986; Nagley et al., 1988; Law et al., 1990; Sanchirico et al., 1995; Roucou et al., 1999; Šupeková et al., 2010; Biethenader et al., 2012). Allotopic expression of a mitochondrial protein (de Grey, 2000; Kyriakouli et al., 2008; Tischner and Wenz, 2015) aims to restore the oxidative phosphorylation (OXPHOS) defects of cells by expressing a precursor protein in the cytosol that may be imported into mitochondria, proteolytically matured by mitochondrial matrix

This article was published online ahead of print in MBioC in Press (<http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbe.E17-09-0560>) on February 7, 2018.

\*Address correspondence to: Diego González-Halphen (dhalphen@ifc.unam.mx). Abbreviations used: CcO, cytochrome c oxidase; cCox2<sup>W56R</sup>, cytosol-synthesized Cox2<sup>W56R</sup> subunit; IM, inner mitochondrial membrane; IMS, intermembrane space; LP, leader peptide; mtCox2, mitochondria-synthesized Cox2 subunit; MTS, mitochondrial targeting signal; OXPHOS, oxidative phosphorylation; TMS, trans-membrane segment.

© 2018 Rubalcava-Gracia et al. This article is distributed by The American Society for Cell Biology under license from the author(s). Two months after publication it is available to the public under an Attribution–Noncommercial–Share Alike 3.0 Unported Creative Commons License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

"ASCB®," "The American Society for Cell Biology®," and "Molecular Biology of the Cell®" are registered trademarks of The American Society for Cell Biology.

proteases, integrated into the inner mitochondrial membrane (IM) in a correct topological disposition, modified by the acquisition of prosthetic group(s), if any, and finally assembled into its corresponding OXPHOS complex.

Complex IV or cytochrome *c* oxidase (CcO) is an indispensable component of OXPHOS that reduces molecular oxygen ( $O_2$ ) to water, coupled to proton pumping (Wikström, 1977; Yoshikawa et al., 2011). In yeast, it is composed of 11 subunits, three of which are encoded and synthesized inside mitochondria (the core subunits Cox1, Cox2, and Cox3), while eight accessory subunits are nucleus-encoded and imported into the organelle (Mason et al., 1973; Poyton and Groot, 1975; Fontanesi et al., 2008; Stiburek and Zeman, 2010; Mick et al., 2011; Soto et al., 2011; Maréchal et al., 2012). The COX2 gene is generally encoded in the mitochondrial genome (with the exception of a few organisms) along with other genes such as the universally mitochondria-encoded genes COX1 and COB (cytochrome *b* of complex III; Adams and Palmer, 2003; Burger et al., 2003). In yeast, mitochondrial Cox2 exhibits a 15-amino acid leader peptide (LP), and thus it is synthesized as a preprotein that inserts its first transmembrane segment (TMS) cotranslationally into the inner mitochondrial membrane (Sevarino and Poyton, 1980; Pratje et al., 1983; Clarkson and Poyton, 1989; Torello et al., 1997) through the Oxa1 insertion machinery and with the help of the assembly factors Mba1 and Cox20 (Hell et al., 1997; Herrmann and Bonnefoy, 2004; Fiumera et al., 2007). Furthermore, the 15-residue LP is removed in the mitochondrial intermembrane space (IMS) by the Imp1 protease (Sevarino and Poyton, 1980; Torello et al., 1997). The second TMS is inserted posttranslationally into the IM through Cox18, a membrane-embedded protein known to be specialized in the C-tail translocation of Cox2, along with its associated partners Pnt1 and Mss2 (Saracco and Fox, 2002). Once inserted in the IM, Cox2 acquires two copper molecules as prosthetic groups from the Sco1/2 and Coa6 copper relay system and is assembled into CcO (Rigby et al., 2008; Pacheu-Grau et al., 2015; Ghosh et al., 2016).

Yeast strains lacking the COX2 gene ( $\Delta$ cox2 mutants) are unable to assemble a functional CcO and therefore fail to exhibit respiratory growth (Horan et al., 2005), although they can be maintained in fermentative media (Botstein and Fink, 1988). Several unsuccessful efforts have been made to restore respiratory growth of  $\Delta$ cox2 mutants by expressing a recoded mitochondrial COX2 gene from the nucleus after adding a sequence encoding a mitochondrial targeting signal (MTS) to the construct. A strategy involving massive random mutagenesis led to the identification of the point mutation W56R, which allows a cytosol-synthesized yeast Cox2 precursor (cCox2<sup>W56R</sup>) to complement a  $\Delta$ cox2 strain. This  $\Delta$ cox2+cCox2<sup>W56R</sup> strain grows in nonfermentable carbon sources and exhibits respiratory capacity, although at a lower rate than a wild-type strain (Supekova et al., 2010). Moreover, the strain carrying the allotypically expressed cCox2<sup>W56R</sup> subunit contains ~40% less CcO than the wild-type strain, as judged by in-gel activity of the enzyme and spectroscopic quantitation of cytochromes (Cruz-Torres et al., 2012). The point mutation W56R, located in the first transmembrane segment of the Cox2 protein, diminishes the mean hydrophobicity of the alpha helix, thus allowing the import of the precursor into mitochondria. The need to decrease the hydrophobicity of mitochondrial proteins to allow its allotypic expression has been discussed previously (Popot and de Vitry, 1990; Claros et al., 1995; Bietenhader et al., 2012). Even when the W56R mutation is necessary to allow the allotypic expression of Cox2, the presence of cCox2<sup>W56R</sup> only partially restores the steady state levels of CcO. This could be due either to the mutation per se having a direct effect on CcO assembly and stability, or to a limiting step in the biogenesis pathway of the

precursor protein cCox2<sup>W56R</sup>. In this work, we seek to pinpoint which of these two possibilities better explains the lower steady-state levels of CcO. First, we generated a yeast strain with a mitochondrial COX2 gene carrying the W56R substitution (mtCox2<sup>W56R</sup>) and compared its expression and function with those of a wild-type Cox2. We also addressed the question of how allotypically expressed, cytosol-synthesized cCox2<sup>W56R</sup> competes for assembly into CcO against its mitochondria-synthesized counterpart.

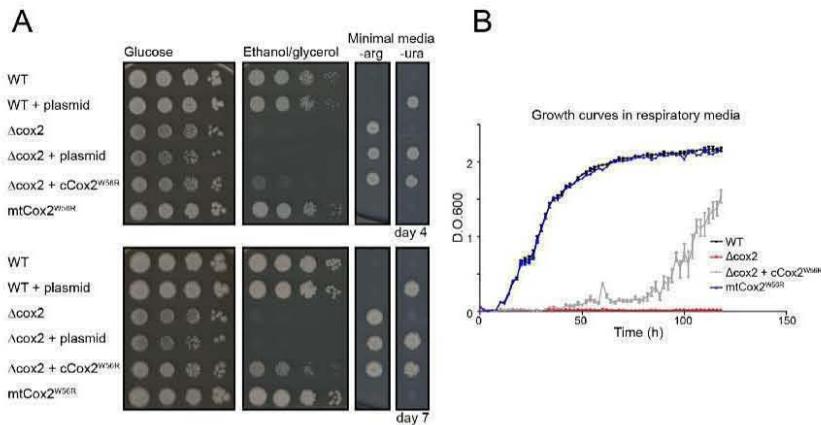
## RESULTS

### The W56R mutation does not affect the function and stability of Cox2 or the activity of the CcO when expressed from the mitochondrial genome

Yeast  $\Delta$ cox2 mutants are unable to grow on nonfermentable carbon sources (ethanol/glycerol) but grow similarly to a wild-type strain on glucose (Figure 1A). The  $\Delta$ cox2 mutant was transformed with a plasmid encoding Cox2 with the W56R mutation preceded by the MTS of Oxa1 (amino acids 1–47) and the natural 15-amino acid leader peptide of Cox2 (cCox2<sup>W56R</sup>) (Supekova et al., 2010). Allotypically expressed cCox2<sup>W56R</sup> follows a different biogenesis pathway than its mitochondrial counterpart mtCox2, since it is synthesized in the cytosol and its import is dependent on the TOM/TIM import machinery but independent of the Cox18 translocase (Elliott et al., 2012). As previously described, the complemented strain ( $\Delta$ cox2+cCox2<sup>W56R</sup>) recovered the ability to grow on ethanol/glycerol, although not to the levels of the wild-type strain (Figure 1A). The  $\Delta$ cox2+cCox2<sup>W56R</sup> transformant required more days of culture on solid media than a wild-type strain to exhibit clearly formed colonies (Figure 1A, bottom panels). Thus, the allotypically expressed cCox2<sup>W56R</sup> partially restores respiratory activity as previously documented (Supekova et al., 2010; Cruz-Torres et al., 2012; Elliott et al., 2012). To address the effect of the W56R substitution on CcO activity, a strain carrying the corresponding mutation in the mitochondrial gene was generated by biostatic transformation of the mitogenome (mtCox2<sup>W56R</sup> strain). Just as in the wild-type mtCox2, the mtCox2<sup>W56R</sup> protein is expected to be cotranslationally inserted into the inner mitochondrial membrane by mitoribosomes, the Oxa1 translocase, and other assembly factors.

The mtCox2<sup>W56R</sup> strain grew on nonfermentable media at rates comparable to those of the wild type, and thus, higher than those of the  $\Delta$ cox2+cCox2<sup>W56R</sup> transformant (Figure 1A). A similar result was obtained when growth was followed in liquid, nonfermentable media (Figure 1B). This suggested that the sole presence of the W56R mutation is not detrimental to yeast growth in respiratory media, and also, it reinforced the idea that the allotypically expressed cCox2<sup>W56R</sup> must find some impairment either during its import from the cytosol or during its insertion into the right topological position in the IM.

To assess the steady-state levels of the different versions of Cox2, the wild-type,  $\Delta$ cox2,  $\Delta$ cox2+cCox2<sup>W56R</sup>, and mtCox2<sup>W56R</sup> strains were grown in a medium containing galactose as a carbon source. Then a separation of the yeast extracts into cytosolic and mitochondrial fractions was carried out. There were similar levels of mature Cox2 polypeptides in mitochondria isolated from the wild-type strain and the mtCox2<sup>W56R</sup> mutant (Figure 2A), supporting the observation that the W56R mutation does not seem to interfere with the stability nor with the assembly of the mtCox2<sup>W56R</sup> protein when it is expressed in the mitochondrion. As expected, no Cox2 band could be detected in the  $\Delta$ cox2 mutant (Figure 2A). In contrast, relatively low levels of the mature cCox2<sup>W56R</sup> subunit were observed in the  $\Delta$ cox2+cCox2<sup>W56R</sup> transformant, and the majority of the Cox2 signal is observed as a high-molecular weight band, which must



**FIGURE 1:** The yeast strain carrying the W56R mutation in the mitochondria-synthesized Cox2 subunit grows as a wild-type strain. (A) Tenfold serial dilutions from yeast cultures were spotted on plates containing fermentative (glucose) or nonfermentative (ethanol/glycerol) media. Growth in minimal media lacking arginine (SD-arg) was included to confirm the presence of the ARG8<sup>8m</sup> cassette inserted in the mitochondrial cox2 locus; growth in minimal media lacking uracil (SD-ura) was included to confirm the presence of the pFL61 plasmid. Cells were incubated for 4 d (top panel) or 7 d (bottom panel) at 30°C. The strains were wild type (WT), wild type transformed with empty plasmid (WT + plasmid), the Δcox2 mutant (Δcox2), the Δcox2 mutant with empty plasmid (Δcox2 + plasmid), the allotopic Δcox2+cCox2<sup>W56R</sup> transformatant, and the mutant that gives rise to the mitochondrial mtCox2<sup>W56R</sup> subunit (mtCox2<sup>W56R</sup>). (B) Growth curves of the indicated yeast strains in liquid media containing as nonfermentable carbon source a mixture of ethanol plus glycerol. Optical density (O.D.<sub>600</sub>) was recorded every 2 h. The mean and the SD of triplicates are shown for each point.

correspond to the precursor form of the protein, that is, the form still carrying the MTS (Figure 2A). To confirm the mitochondrial location of the observed Cox2 proteins, mitochondrial and cytosolic fractions were analyzed with antibodies against cytosolic (Hog1) and mitochondrial (Atp2 and Oxa1) protein markers. All wild-type and mutant Cox2 subunits were associated with the mitochondrial fraction (Figure 2A). Surprisingly, that was also the case for the majority of the allotopically expressed cCox2<sup>W56R</sup> precursor, indicating that although this unprocessed form is mainly localized to mitochondria, it is not available for processing by the matrix proteases. To evaluate if the cCox2<sup>W56R</sup> precursor was located inside the organelle, mitochondrial fractions from all the strains were subjected to proteinase K (PK) treatment (Figure 2B). Only the cCox2<sup>W56R</sup> precursor was available for degradation by PK, indicating that at least its immunogenic segment, the C-terminal segment, was exposed to the outside of the outer mitochondrial membrane. This indicates that the cCox2<sup>W56R</sup> precursor is localized to mitochondria, but it is not completely internalized. As expected, the mature Cox2 bands from the wild-type, Δcox2+cCox2<sup>W56R</sup>, and mtCox2<sup>W56R</sup> strains were mostly protected from degradation inside mitochondria (Figure 2B).

To determine whether the interaction of allotopic cCox2<sup>W56R</sup> with its copper relaying partners is affected, resulting in impaired copper acquisition, we tested the interaction between cCox2<sup>W56R</sup> and Coa6. This protein interacts with Cox2 and participates in its copper binding; it is also needed to maintain Cox2 protein levels (Ghosh et al., 2014; Pacheu-Grau et al., 2015). Previous studies showed that copper supplementation rescues the respiratory growth of a Δcoa6 mutant (Ghosh et al., 2014). We inferred that if the cCox2<sup>W56R</sup> interaction with Coa6 is defective, then the supplementation of copper into the medium would bypass this interaction and increase the

respiratory growth of the allotopic strain. We did not observe any difference in the respiratory growth of the allotopic strain in the presence or absence of external copper (Figure 2C). We also observed that when cells were incubated at 37°C, the allotopic strain was not able to regain respiratory growth. As previously reported, copper supplementation, but not supplementation with other divalent metals, restores respiratory growth of a Δcoa6 strain. This effect is more clearly visible when cells are incubated at 37°C (Figure 2C). These results indicate that the interaction of cCox2<sup>W56R</sup> with Coa6 is not affected, suggesting that copper acquisition is not the limiting step that results in diminished assembly of Cox2 into CcO.

To compare the CcO content and activity between the wild-type, Δcox2, Δcox2+cCox2<sup>W56R</sup>, and mtCox2<sup>W56R</sup> strains, mitochondria were isolated from cultures grown using galactose as carbon source, solubilized with lauryl maltoside, and subjected to blue native gel electrophoresis (BN-PAGE). CcO activity staining revealed two close bands (IV and IV\*) that correspond to the complete CcO complex and to the CcO enzyme lacking subunit Cox6, respectively (Figure 2D, lanes 1, 3, and 4) (Horan et al., 2005; Cruz-Torres et al., 2012). Relatively low CcO activity was observed for the Δcox2+cCox2<sup>W56R</sup> transformatant (Figure 2D, lane 3). As expected, no in-gel CcO activity could be detected in the Δcox2 mutant (Figure 2D, lane 2). In contrast, the in-gel CcO activities of the wild-type strain and the mtCox2<sup>W56R</sup> mutant were equivalent, suggesting that the W56R mutation does not affect CcO steady-state levels nor impair its activity. In-gel ATPase activity was used as loading control and was roughly equivalent in the four strains (slightly diminished in the Δcox2 mutant; Figure 2D, lanes 5–8).

To explore the formation of supercomplexes in the different strains, isolated mitochondria were also solubilized with the mild

detergent digitonin and subjected to BN-PAGE (Figure 2E). In-gel staining for CcO activity showed the monomeric complex IV, the monomeric complex IV lacking Cox6 subunit (IV\*) (Horan *et al.*, 2005), and the  $\text{III}_2\text{IV}_1$  and  $\text{III}_2\text{IV}_2$  supercomplexes formed by the association of CcO with the  $b_{\text{Ct}}$  complex. The  $\Delta\text{cox}2+\text{Cox}2^{\text{W56R}}$  transformant exhibited reduced in-gel CcO activity associated with supercomplexes, while the mtCox2<sup>W56R</sup> mutant exhibited activity comparable to that of the wild-type strain (Figure 2E), indicating that the W56R mutation by itself does not seem to affect either CcO supercomplexes formation or their activity.

Rates of oxygen consumption were also estimated to compare the wild-type strain and the mtCox2<sup>W56R</sup> mutant (Figure 2F). The specific activities of oxygen uptake measured after the addition of ethanol as substrate were 18.25 and 18.75 nmol O<sub>2</sub>/min per  $3 \times 10^7$  cells for the wild type and the mtCox2<sup>W56R</sup> mutant, respectively. In contrast, the  $\Delta\text{cox}2+\text{Cox}2^{\text{W56R}}$  transformant had an oxygen consumption rate of 7.05 nmol O<sub>2</sub>/min per  $3 \times 10^7$  cells. In all cases, oxygen uptake was cyanide-sensitive.

Together, these results indicate that the presence of the W56R mutation in the mitochondria-encoded Cox2 does not seem to exert a detrimental effect on the stability and enzymatic activity of this complex. Also, neither protein import nor the acquisition of its prosthetic copper atoms is limiting for cCox2<sup>W56R</sup> allotypic expression. Therefore, the diminished CcO activity and steady-state levels observed when cCox2<sup>W56R</sup> is allotypically expressed are more likely due to the presence of obstacles in its biogenesis pathway.

#### The mitochondrial wild-type Cox2 protein and the allotypically expressed cCox2<sup>W56R</sup> assemble into CcO in a strain expressing both proteins

Cytosol-synthesized cCox2<sup>W56R</sup> faces obstacles during its biogenesis pathway that compromise its processing as well as its presence in functional CcO. If the biogenesis pathway is compromised, it might be that this protein is further affected if it is coexpressed with the endogenous mitochondrial Cox2 whose biogenesis occurs under optimal conditions. Such would be the case of allotypic expression if applied in gene therapy for mitochondrial diseases, where the endogenous, defective protein also assembles into CcO. Moreover, this would be the case in some legume species, where COX2 transcripts from both the nucleus and mitochondria are detected (Adams *et al.*, 1999). However, it remains unknown if the protein products from both genomes actually assemble into CcO. We therefore asked whether the allotypically expressed cCox2<sup>W56R</sup> protein competes with the natural Cox2 protein synthesized in yeast mitochondria. To address this question, mtCox2 and cCox2<sup>W56R</sup> were both expressed in a single strain. To distinguish the mitochondria- and nucleus-encoded Cox2 subunits, we used a strain where a hemagglutinin tag was fused to the C-terminal end of the mitochondria-encoded Cox2 (mtCox2-HA; Saracco, 2003). This strain coexpressed the cCox2<sup>W56R</sup> precursor from the nucleus. We also constructed a strain coexpressing the untagged mitochondrial Cox2 (mtCox2) and the cCox2<sup>W56R</sup> from the nucleus. The presence of the endogenous Cox2 subunits (either wild type or HA-tagged) or the allotypic subunit (carrying the W56R mutation) could then be followed by mass spectrometry and Western blot analysis. While the  $\Delta\text{cox}2+\text{Cox}2^{\text{W56R}}$  transformant grew poorly, the strains expressing both versions of Cox2 (mtCox2+cCox2<sup>W56R</sup> and mtCox2-HA+cCox2<sup>W56R</sup>) had growth rates comparable to those of the strains that contained only the mitochondrial versions, mtCox2 or mtCox2-HA (Figure 3, A and B). The oxygen consumption rates of the strains correlated with the growth phenotype: the wild-type strains (mtCox2 and mtCox2-HA) and the mtCox2-HA+cCox2<sup>W56R</sup>

strain behaved indistinguishably and exhibited higher growth rates than the strain expressing only allotypic cCox2<sup>W56R</sup> (Figure 3C).

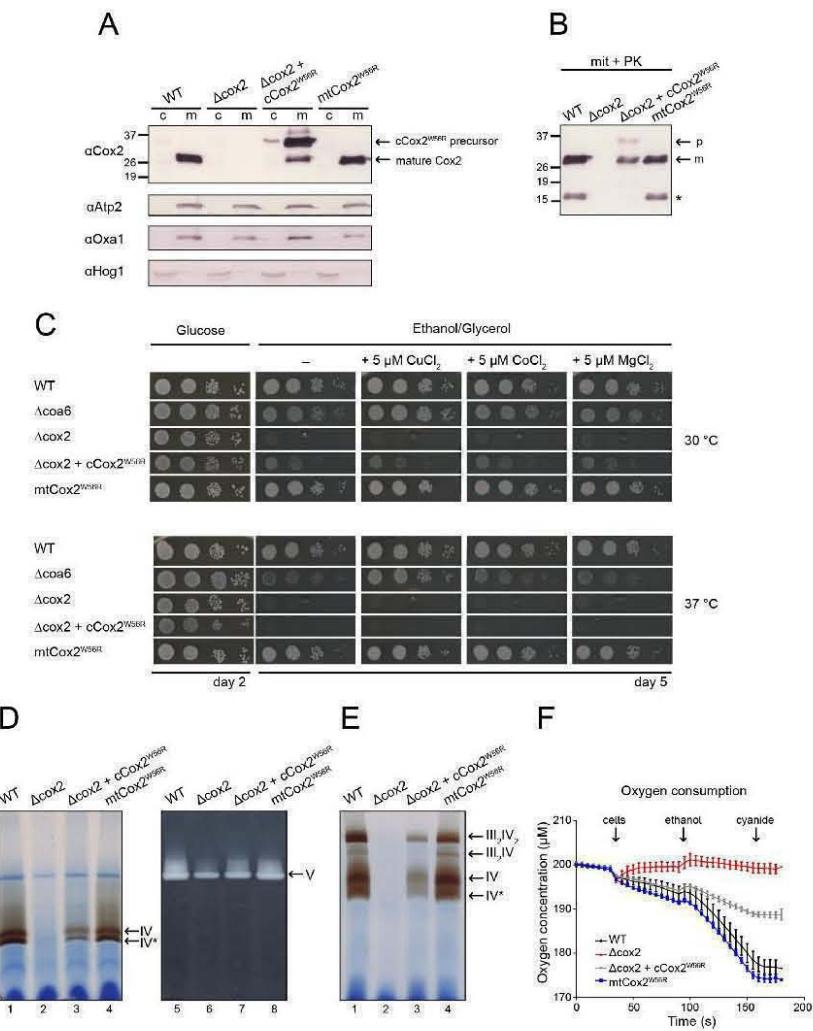
To characterize whether Cox2 from different genetic origins compete for assembly into CcO, we looked for these proteins in the assembled CcO complexes of the strain mtCox2-HA+cCox2<sup>W56R</sup>. Mitochondria were isolated, solubilized with lauryl maltoside, and resolved by BN-PAGE. The bands corresponding to CcO (bands IV and IV\*, identified by in-gel activity) were cut out, further resolved by SDS-Tricine-PAGE, and subjected to Western blot analysis using an anti-yeast Cox2 antibody or an antibody directed against the HA tag. After the membrane was blotted with one antibody, it was stripped and reblotted with the other in order to observe the presence of both Cox2 subunits in the same strain.

As expected, the wild-type strain (mtCox2) and the allotypic strain (Acox2+cCox2<sup>W56R</sup>) each revealed one band recognized by the anti-Cox2 antibody (Figure 4A, lanes 1 and 3). The two bands had the same molecular weight, indicating that only the mature version of cCox2<sup>W56R</sup> is assembled into CcO. The strain carrying mtCox2-HA was recognized by the anti-HA antibody as a band with a higher molecular weight than the untagged Cox2 (Figure 4A, lane 6). We observed that mtCox2-HA cannot be recognized by the anti-Cox2 antibody, probably because the Cox2 antigenic epitope is blocked by the HA tag (Figure 4A, lane 2). In the strain mtCox2-HA+cCox2<sup>W56R</sup>, Cox2 bands were recognized by the two antibodies (Figure 4A, lanes 4 and 8), indicating that each version can independently assemble into CcO, giving rise to a heterogeneous population of this complex. This was more clearly observed after the membranes were stripped and reblotted with the corresponding antibody (Figure 4B, lanes 4 and 8). Parallel to the immunoblot approach, we also unambiguously identified the two main bands as Cox2 subunits by mass spectrometry analysis with 30% coverage (unpublished data).

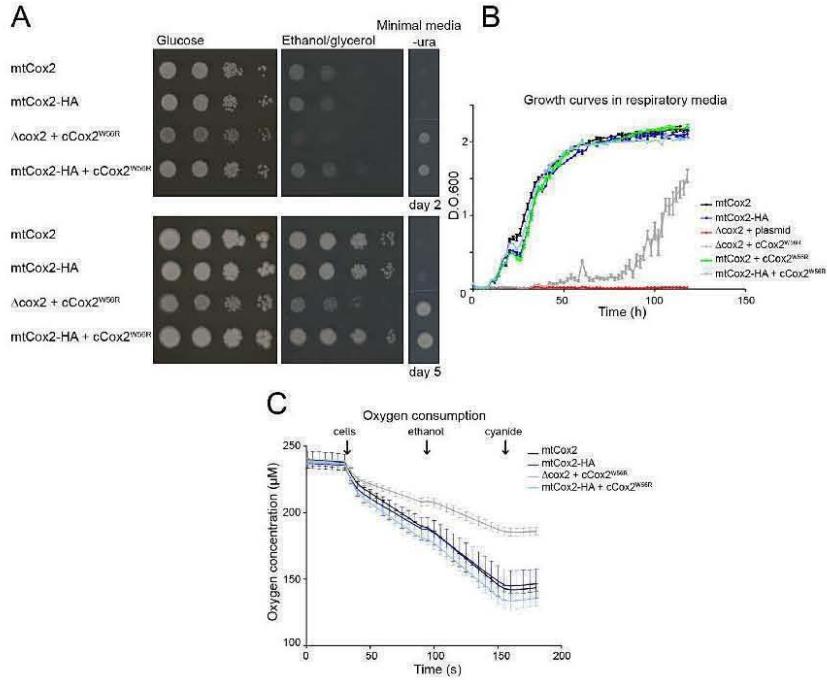
Overall, we observed that the levels of assembled mitochondria-encoded Cox2-HA were similar in strains where mtCox2 was expressed alone and where both Cox2 versions were expressed (Figure 4A, lanes 6 and 8). The two strains containing allotypic subunits exhibit lower Cox2 levels than the mitochondria-encoded Cox2 in a wild-type strain (Figure 4A, lanes 3 and 4 compared with lane 1); thus, the heterogeneous population of CcO contains more mtCox2 species than cCox2<sup>W56R</sup> species.

To further explore whether the presence of mtCox2 affects the incorporation of cCox2<sup>W56R</sup>, or vice versa, we estimated by two-dimensional (2D)-PAGE and Western blot the accumulation of assembled Cox2 subunits with increasing amounts of mitochondrial protein (Figure 5). For the mitochondria-encoded Cox2-HA, the protein levels were similar regardless of the presence or absence of its nucleus-encoded counterpart (Figure 5, A and B). In contrast, the allotypically expressed cCox2<sup>W56R</sup> could be observed in 50 µg of mitochondria when expressed simultaneously with its mitochondrial counterpart, instead of the minimum of 100 µg when expressed alone (Figure 5, C and D). These levels never reached those of mitochondria-encoded Cox2. If each Cox2 version maintained or increased its accumulation in the presence of its counterpart, we would expect a moderate increase in the total Cox2 levels in a strain expressing both versions. We thus used a strain expressing both Cox2 versions without the HA tag in order to detect the two subunits with the same anti-Cox2 antibody and compared it with a strain only expressing the endogenous Cox2; a moderate increase in Cox2 levels was observed in the strain with both versions present, as determined by band densitometric analysis (Figure 5, E and F).

This observed increase in the levels of assembled cCox2<sup>W56R</sup> when coexpressed with mtCox2-HA would be expected to elevate



**FIGURE 2:** CcO complex activity remains unchanged when the mitochondria-encoded Cox2 subunit contains the W56R mutation. (A) Yeast cytosolic (c) and mitochondrial (m) fractions (100 and 50 µg of protein, respectively) of the indicated strains were separated by SDS-Tricine-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes for Western blot analysis with an anti-Cox2 antibody (top panel). Bands corresponding to the mature Cox2 subunits and the cCox2<sup>W56R</sup> precursor (still retaining the MTS of Oxa1) are indicated. Parallel Western blots with antibodies against cytosolic Hog1 and against the mitochondrial proteins Alp2 and Oxa1 served as loading and cell fractionation controls (bottom panels). (B) Mitochondrial fractions from A were treated with 100 µg/ml Proteinase K (PK). The asterisk indicates a partial degradation of Cox2, possibly due to imperfect preparation of the mitochondrial fractions. Bands corresponding to the mature Cox2 subunits are indicated (m), as well as that of the remaining precursor (p). (C) Tenfold serial dilutions from yeast cultures were spotted on fermentative (glucose) or on nonfermentative (ethanol/glycerol) plates in the presence and absence of 5 µM Cu, Co, and Mg bivalent salts at 30 and 37°C. A Δcoa6 strain was included as a positive control for growth rescue by copper supplementation. (D) Isolated mitochondria (250 µg) from the indicated strains were solubilized with lauryl maltoside and separated by BN-PAGE (4–15%). Lanes 1–4, CcO in gel activity; lanes 5–8, ATPase activity used as loading control. Bands corresponding to CcO (IV) and the F<sub>1</sub>-Fo-ATPase (V) are indicated. Band IV\* corresponds to CcO lacking the Cox6 subunit (Horan et al., 2005). (E) Mitochondria from D were solubilized with



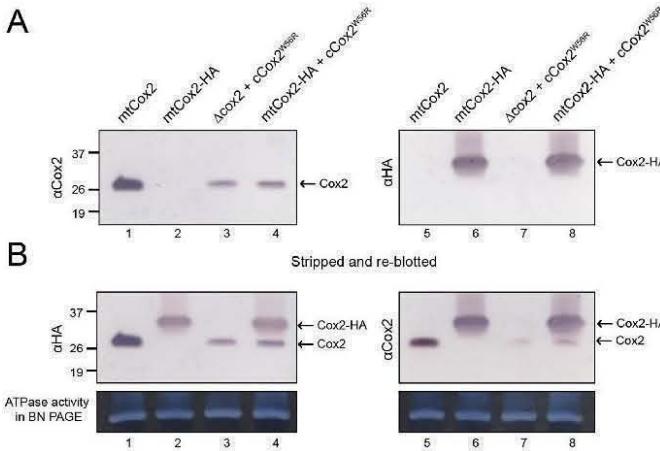
**FIGURE 3:** A strain expressing both the mitochondrial wild-type Cox2 protein (mtCox2) and the allotypic cCox2<sup>W56R</sup> precursor grows and exhibits oxygen consumption rates similar to those for a wild-type strain. (A) Tenfold serial dilutions from yeast cultures were spotted on plates containing fermentative (glucose) or nonfermentative (ethanol/glycerol) carbon sources. Growth in minimal media lacking uracil (-ura) was included to confirm the presence of the pFL61 plasmid. Cells were incubated for 2 d (top panel) or 5 d (bottom panel) at 30°C. The assayed strains were wild type (mtCox2), wild type with HA-tagged mitochondrial Cox2 (mtCox2-HA), the Δcox2+cCox2<sup>W56R</sup> transformant, and the strain containing both Cox2 versions (mtCox2-HA+cCox2<sup>W56R</sup>). (B) Growth curves in liquid media containing the nonfermentable carbon sources ethanol and glycerol of the yeast strains containing wild-type or tagged mitochondrial Cox2 (mtCox2 and mtCox2-HA), the Δcox2 strain, the Δcox2+cCox2<sup>W56R</sup> transformant, and the strains containing both the mtCox2 and the cCox2<sup>W56R</sup> precursor (mtCox2+cCox2<sup>W56R</sup> and mtCox2-HA+cCox2<sup>W56R</sup>). Optical density (O.D.<sub>600</sub>) was registered every 2 h. The mean and the SD of triplicates are shown for each point. (C) Oxygen consumption of yeast cells. Arrows indicate where  $3 \times 10^7$  cells were added to the oxygen-meter chamber, 50 mM ethanol was added as substrate, and 200 μM sodium cyanide was used to inhibit oxygen consumption. The final volume was 1 ml. The mean and the SD of triplicates are shown for each point.

the net CcO levels also. To test this, we compared the CcO in-gel activity of the different strains and observed an increase in the CcO activity for the strain coexpressing both Cox2 versions. In contrast, the ATPase Coomassie staining intensity and in-gel activity were similar in all the strains (Figure 5G). Additionally, we observed an increase of the protein content of the CcO subunits as judged by Coomassie Blue staining (Figure 5H) and by the immunodetection of assembled Cox1 and Cox3 subunits (Figure 5I, lane 4 compared with lane 2).

Taken together, we conclude that in a strain coexpressing the two Cox2 versions, each is synthesized and assembled independently from its genetic origin; cCox2<sup>W56R</sup> assembly is moderately increased in the presence of the endogenous mtCox2; and mtCox2 assembly is similar regardless of the presence or absence of its allotypic counterpart. This results in a slight increase in the overall levels of CcO complexes, which may contain either mtCox2 or cCox2<sup>W56R</sup> subunits, with most of the complexes containing the mitochondria-encoded version.

---

digitonin, separated by BN-PAGE (4–15%), and stained for CcO in gel activity. Bands corresponding to CcO and its supercomplexes are indicated. (F) Oxygen consumption of fasted yeast cells. Arrows indicate where  $3 \times 10^7$  cells were added to the oxygen-meter chamber, 50 mM ethanol was added as substrate, and oxygen uptake was inhibited with 200 μM sodium cyanide. The final volume was 1 ml. The mean and the SD of triplicates are shown for each point.



**FIGURE 4:** Both the nuclear and the mitochondrial Cox2 versions were found assembled into CcO. (A) Isolated mitochondria (250 µg) were solubilized with lauryl maltoside and separated by BN-PAGE. Bands corresponding to CcO were excised and further separated by SDS-PAGE. The gel was transferred into a nitrocellulose membrane, blocked, and blotted using an anti-Cox2 (lanes 1–4) or an anti-HA (lanes 5–8) antibody. (B) The membranes were stripped and reblotted using an anti-HA (lanes 1–4) or an anti-Cox2 (lanes 5–8) antibody. The stripped membranes do not lose the staining of the first antibody. Bands corresponding to the Cox2 subunits fused to a HA tag (mCox2-HA) and the wild-type Cox2 subunits (mtCox2) are indicated. ATPase in gel activities in the first dimension BN-PAGE were used as loading controls.

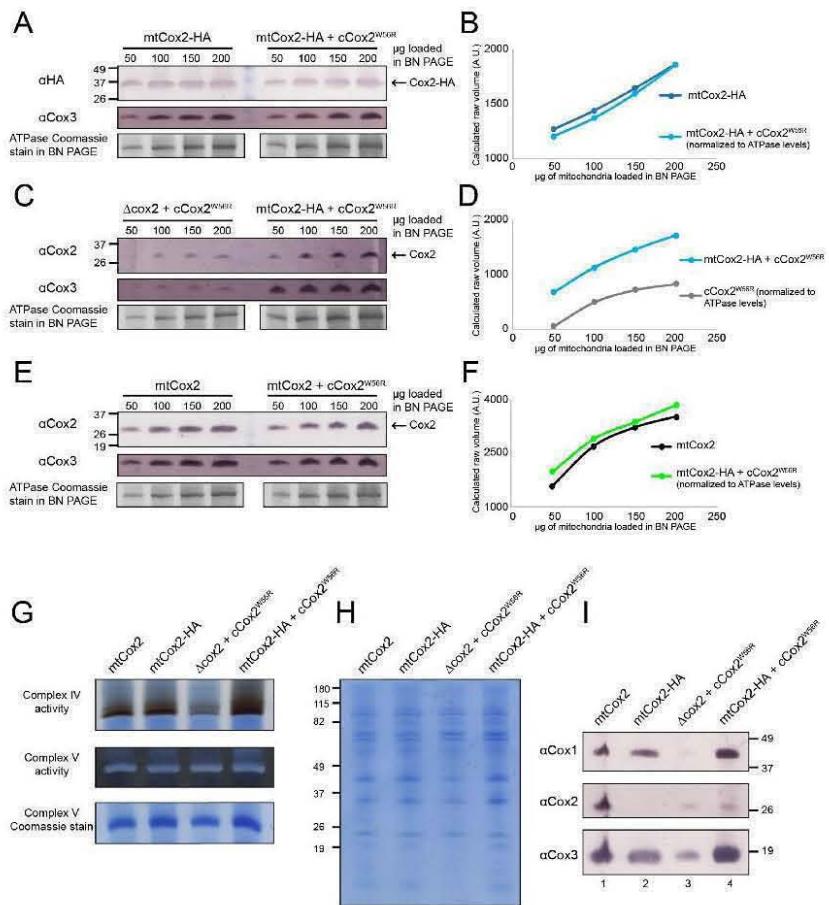
## DISCUSSION

Allotopic expression is one of the multiple approaches aimed towards the treatment of mitochondrial syndromes (DiMauro *et al.*, 2006; Kyriakouli *et al.*, 2008; Tischner and Wenz, 2015). Each mitochondria-encoded protein exhibits different characteristics, and the approach to their allotopic expression varies in each case; however, the hydrophobicity of the polypeptides is considered to be one of the limiting constraints for successful allotopic expression. With the notable exception of the ribosomal protein Var1, yeast mitochondria-encoded inner membrane proteins tend to be more hydrophobic than nucleus-encoded inner membrane proteins, indicating that genes encoding hydrophilic products migrate to, and functionally integrate into, the nucleus more favorably (Johnston and Williams, 2016). Thus, the high hydrophobicity profiles of some inner-membrane proteins impose an obstacle for the functional relocation of their corresponding mitochondrial genes to the nucleus, either by natural migration or by experimental design (Popot and de Vitré, 1990; Claros *et al.*, 1995; Claros and Vincens, 1996; Daley *et al.*, 2002b; Ojaime *et al.*, 2002; Adams and Palmer, 2003; Oca-Cossío *et al.*, 2003; González-Halphen *et al.*, 2004; Figueiroa-Martínez *et al.*, 2011; Björkholm *et al.*, 2015; Neupert, 2015; Johnston and Williams, 2016). Yeast has been widely used as a model organism to assay allotopic expression and has allowed the complementation of several strains carrying defects in mitochondrial genes. Successful attempts to express recoded mitochondrial genes from the nucleus with an added MTS and without any further modification are the bl4 maturase (Banroques *et al.*, 1986); the Var1 ribosomal protein (Sanchirico *et al.*, 1995); and the Atp8 subunit of mitochondrial ATP synthase (Gearing and Nagley, 1986; Nagley *et al.*, 1988; Law *et al.*, 1990; Roucou *et al.*, 1999). Atp9 and Cox2 required further modifications in their sequences to achieve allotopic expression

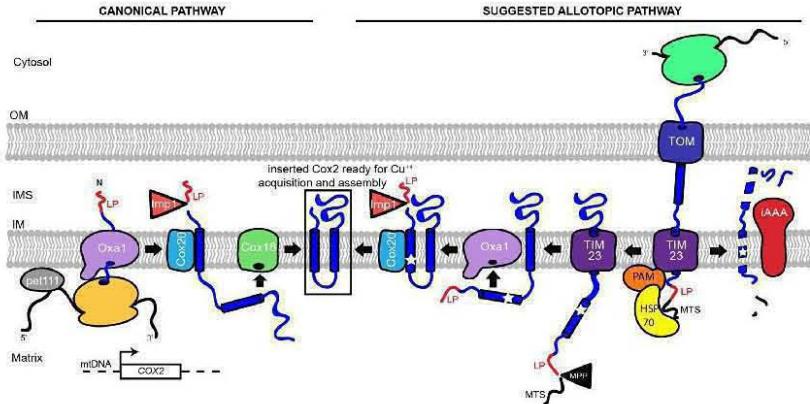
(Supekova *et al.*, 2010; Bietenhader *et al.*, 2012). For the case of Cox2, the W56R substitution diminished the hydrophobicity of the first transmembrane stretch (TMS1) of the protein, allowing its import into mitochondria (Supekova *et al.*, 2010; Cruz-Torres *et al.*, 2012; Elliott *et al.*, 2012). Inner-membrane protein products of genes that naturally migrated to the nucleus tend to be less hydrophobic than their mitochondria-encoded counterparts (Daley *et al.*, 2002b; Funes *et al.*, 2002; Pérez-Martínez *et al.*, 2000, 2001). All examples of natural, cytosol-expressed Cox2 subunits, that is, those of legumes, chlorophycean algae, and apicomplexan parasites, exhibit low hydrophobicity in their first TMS and slightly increased hydrophobicity in the second TMS, compared with the vast majority of mitochondria-encoded Cox2 subunits (Daley *et al.*, 2002b; Jiménez-Suárez *et al.*, 2012). Successful allotopic expression requires that the protein be internalized into mitochondria, and that it be inserted into the inner membrane in the same topology as the mitochondria-synthesized version, in order to allow it to then follow a normal assembly pathway. The yeast mitochondrial import machinery inserts the allotopic cCox2<sup>W56R</sup> in the same topology as the endogenous protein but uses a different set of translocases:

while it still requires the participation of Oxa1 and Cox20 in the biogenesis route, Cox18 was shown to be dispensable (Elliott *et al.*, 2012). We propose that the TIM23 translocon is involved in the allotopic cCox2<sup>W56R</sup> insertion, given its dual ability to distribute proteins using either one of two pathways: the conservative or the stop-transfer sorting (Bohnert *et al.*, 2010). Thus, the allotopic cCox2<sup>W56R</sup> that gets properly inserted must translocate its first TMS through TIM23 into the matrix (via the conservative pathway), while the more hydrophobic second TMS is retained within the same translocase and laterally inserted into the inner membrane (via the stop-transfer pathway), therefore allowing it to bypass Cox18 participation (Elliott *et al.*, 2012, Figure 6, right-hand side). Then the MTS is processed by the MPP protease in the matrix while still leaving the cCox2's 15-residue leader peptide (LP) at the N-terminal end; this sequence promotes the first TMS to be inserted into the inner membrane through Oxa1, allowing the N-terminus of the protein to be exposed to the IMS. The LP is then removed by the Imp1 protease that resides in the IMS (He and Fox, 1997; Hell *et al.*, 1998). This last processing step occurs very efficiently, since we cannot detect the LP-containing cCox2<sup>W56R</sup> preprotein in the immunoblots. In this way, the cCox2<sup>W56R</sup> subunit ends up exhibiting the same topology in the membrane as its conventional, mitochondria-synthesized Cox2 counterpart, with both N- and C-termini exposed toward the IMS (Figure 6).

Despite all the above, the biogenesis route followed by cCox2<sup>W56R</sup> seems to be somehow hindered. The majority of cCox2<sup>W56R</sup> was found associated to mitochondria although still exposed to the cytosol, as suggested by its degradation when external proteinase K was added. Nevertheless, not all the allotopically expressed cCox2<sup>W56R</sup> precursors are correctly processed and inserted in the inner mitochondrial membrane. In addition, copper



**FIGURE 5:** Assembled steady-state Cox2 levels in a strain where only one *COX2* gene version is expressed, either mitochondria- or nucleus-encoded, compared with a strain where both versions are present. For panels A–F, increasing amounts of mitochondrial proteins were loaded in the first dimension and total assembled Cox3 protein and ATPase Coomassie stains in the first dimension blue native electrophoresis (BN-PAGE) were used as loading controls. (A) Mitochondria-encoded mtCox2-HA detected using an anti-HA antibody in a strain where it is expressed alone (left-hand side) and in a strain where it is accompanied by the allotypic cCox2<sup>W56R</sup> (right-hand side). (B) Densitometry quantification for the raw volume of bands in A as normalized to the ATPase levels in the Coomassie stain of the first-dimension electrophoresis (BN-PAGE). (C) Allotypic cCox2<sup>W56R</sup> detected using an anti-Cox2 antibody in a strain where it is expressed alone (left-hand side) and in a strain where it is accompanied by its mitochondria-synthesized counterpart (right-hand side). (D) Densitometry quantification for the raw volume of bands in C as normalized to the ATPase levels in the Coomassie stain of the BN-PAGE. Mitochondria were separated by 2D-PAGE as in Figure 4. (G) Isolated mitochondria (250 μg) from the indicated strains were solubilized with lauryl maltoside, separated by BN-PAGE, and stained for CoQ in-gel activity. Complex V (ATPase) activity and Coomassie stain were used as loading controls. (H) Bands corresponding to the CcO complex were excised from a BN-PAGE gel and subjected to SDS-Tricine-PAGE. A resulting Coomassie blue-stained gel of the resolved CcO polypeptides is shown. (I) Western blot of a gel as in H shows the abundance of subunits Cox1, Cox2, and Cox3 as recognized by the corresponding antibodies. The membrane was stripped and reblotted in the order anti-Cox3, anti-Cox2, anti-Cox1. The Cox2 antibody recognizes Cox2 only without the HA-tag.



**FIGURE 6:** Proposed biogenesis routes for mitochondria-encoded Cox2 and for nucleus-encoded cCox2<sup>W56R</sup>. The left-hand side of the scheme shows the classical biogenesis route of Cox2 from the mitochondrial matrix. In this route, Pet111 translationally activates the yeast mitochondria-encoded Cox2 subunit's mRNA (Green-Willems et al., 2001). This subunit is synthesized by mitoribosomes as a precursor containing an N-terminal leader peptide (LP) of 15 residues (Sevarino and Poyton, 1980) that promotes its insertion into the membrane through the Oxa1 machinery (Torelli et al., 1997). The LP is processed by the intermembrane space (IMS) protease Imp1 following translocation of the first TMS of Cox2 into the mitochondrial inner membrane (IM) by Oxa1. Processing is assisted by the integral inner membrane protein Cox20 (Elliott et al., 2012). The C-terminal domain of Cox2, containing the second TMS, is exported posttranslationally by the Cox18 translocase (Saracco and Fox, 2002; Fumera et al., 2007; Bonnefoy et al., 2009). The mature Cox2 subunit that reached its final topology, with both the N- and C-termini facing the IMS (Yoshikawa et al., 1998), is depicted inside a box. The right-hand side of the scheme illustrates the suggested biogenesis pathway of the allotopic cCox2<sup>W56R</sup> subunit; the white star represents the W56R point mutation. On the allotopic route, the protein is synthesized in cytosolic ribosomes and, most probably, cotranslationally imported by the TOM import machinery. The W56R mutation will allow full translocation of the first TMS to the matrix through TIM23, albeit at a low rate. The MPP protease will process the experimentally added MTS of Oxa1, leaving the 15-residue leader peptide of yeast Cox2 intact. On one hand, the N-terminal part of the mature Cox2 would be translocated back through the IM in an exportlike reaction, probably mediated by the LP of cCox2<sup>W56R</sup> with the assistance of Oxa1 and Cox20. On the other hand, TIM23 may then recognize a stop transfer signal within the second TMS and will insert it laterally into the IM (Neupert and Herrmann, 2007). The allotopically expressed cCox2<sup>W56R</sup> subunit will thus achieve the same functional N-out, C-out topology typical of the Cox2<sup>WT</sup> subunit. This mature allotopically expressed cCox2<sup>W56R</sup> subunit is biochemically indistinguishable from its Cox2 counterpart except for the presence of the W56R point mutation (Cruz-Torres et al., 2012). The represented import mechanism of the allotopically expressed cCox2<sup>W56R</sup> subunit is similar to those proposed for the naturally nucleus-encoded Cox2 precursor of soybean (Daley et al., 2002a) and for the cytosol-synthesized Cox2A precursor of the colorless alga *Polytomella* sp. (Jiménez-Suárez et al., 2012). As the majority of the cCox2<sup>W56R</sup> proteins are found in the precursor form, we suggest that while their first TMS is retained in TIM23, their MTS is recognized by the PAM and Hsp70 machinery and is unavailable for processing by the MPP protease. A fraction of cCox2<sup>W56R</sup> may be prematurely released into the IM (extreme right-hand side of the scheme), since the first TMS of cCox2<sup>W56R</sup> is still hydrophobic enough to be laterally inserted into the IM by TIM23. This gives rise to an improperly inserted population of cCox2<sup>W56R</sup> with the topology N-terminus in, C-terminus out, which should be degraded readily by quality control mitochondrial proteases such as i-AAA (Bietenhader et al., 2012; Gerdes et al., 2012).

acquisition prior to assembly does not seem to be limiting in the allotopic strain. Thus, the limiting step resides in the correct insertion of cCox2<sup>W56R</sup> into the inner membrane. We consider a scenario where the cCox2<sup>W56R</sup> precursors that are not correctly inserted might be prematurely released into the inner membrane, most probably because their first TMS, although exhibiting a diminished hydrophobicity, is still hydrophobic enough to have difficulty in crossing the inner membrane freely through TIM23. Being in the limit between prohibitive and permissive hydrophobicity values, TIM23 may fully translocate the first TMS of some cCox2<sup>W56R</sup> precursors, but will also release some of these first TMS into the membrane laterally (Mokranjac and Neupert, 2010; Calado-Botelho

et al., 2011). Thus, a population of cCox2<sup>W56R</sup> precursors will end up with the incorrect topology N-terminus exposed to the mitochondrial matrix and the C-terminus facing the IMS or the cytosol. These improperly assembled cCox2<sup>W56R</sup> polypeptides should be recognized as abnormal by mitochondrial proteases such as i-AAA and readily degraded (Figure 6) (Bietenhader et al., 2012; Gerdes et al., 2012). On the other hand, when Cox2<sup>W56R</sup> is expressed in the mitochondrion, the W56R substitution behaves as a silent mutation, since it does not seem to affect growth curves, respiration rates, or CcO accumulation. We thus suggest that the allotopic expression of cCox2<sup>W56R</sup> is limited not because the W56R mutation affects the assembly of cCox2<sup>W56R</sup> into CcO, nor because the

substitution has a detrimental effect on CcO activity or stability, but because the translocation of the first TMS (most probably through TIM23) is a process that occurs inefficiently and at a low rate. This explains the observed high accumulation of the cCox2<sup>W56R</sup> precursor in the mitochondrial fraction and the lower overall accumulation of CcO<sup>W56R</sup> in yeast mitochondria.

One could conclude from the above that allotypic expression of the Cox2 subunit could be resolved simply by further diminishing the hydrophobicity of the first TMS by the inclusion of more polar residues, allowing TIM23 to fully and efficiently translocate the first TMS of cCox2<sup>W56R</sup>. However, these new changes could start affecting the assembly, activity, and stability of the whole CcO complex. A delicate balance between a low hydrophobicity that allows the effective translocation of the first TMS through TIM23, and a high enough hydrophobicity to be recognized as a TMS by the membrane insertion machinery (Oxa1), and therefore to be introduced with the right topology into the inner mitochondrial membrane, is required. This also explains why, of all the possible mutations that could be obtained by a massive, random mutagenesis, only the W56R mutation allowed substantial respiratory growth of a Δcox2 mutant (Supekova et al., 2010). We find it an interesting challenge to establish which other mutation or combination of mutations would be required to successfully reach the balance between readily inserting the allotypic Cox2 protein into the inner membrane and still allowing full activity of the CcO complex.

Legumes provide an illustrative example of a recent transfer of the COX2 gene to the nucleus; it possibly occurred once in the Phaseolae lineage and resulted in different intermediate stages of the transfer process. Some legumes display intact copies of both nuclear and mitochondrial COX2, and their transcripts could be detected for both versions (Adams et al., 1999). However, the translation of the Cox2 proteins and their assembly into CcO complexes were not explored. We predict, on the basis of the results obtained here, that in some legume species there will be a heterogeneous CcO population, with some complexes containing the cytosol-synthesized Cox2 subunit and the majority the mitochondrial version.

In some cases, the approach of using allotypic expression as a genetic therapy for mitochondrial diseases also implies having two versions of the same protein assembled into an OXPHOS complex population: the cytosol-synthesized version and the mitochondria-expressed version carrying the deleterious mutation (or a wild-type version, given the heteroplasmy in mammalian mitochondria). In this work, when both Cox2 protein versions were coexpressed, the final steady state levels of Cox2 in the CcO populations were mostly of mitochondrial origin and only a fraction of cytosolic origin. This suggests that even in the face of successful allotypic expression, the mitochondrial synthesis and assembly of proteins is much more efficient and contributes primarily to the final accumulation levels of a given OXPHOS complex. Therefore, in a best-case scenario, the allotypic protein will contribute, alleviating the activity of the OXPHOS complex in a relatively modest proportion, but most probably it could still attain the minimum requirements to significantly improve the respiratory activity. To our knowledge, in the known cases of allotypic expression reported in the literature, no efforts were made to analyze the extent to which the two protein versions competed for assembly. Our data provide proof of concept that the allotypic expression of an engineered gene may successfully complement a phenotype due to a mutation in the mitogenome.

Notably, we observed a moderate increase in the levels of the assembled cCox2<sup>W56R</sup> allotypic protein when coexpressed with the endogenous mtCox2 than when expressed alone. We hypothesize

that the presence of mtCox2 allows the newly inserted cCox2<sup>W56R</sup> to efficiently enter the assembly pipeline of the CcO complex. CcO biogenesis is complex and highly regulated and each mitochondria-encoded subunit is proposed to form modules with different cytosolic subunits (McStay et al., 2013). The Cox1 subunit plays a central role in determining the CcO accumulation levels, since its synthesis is required for the overall progress of the CcO assembly line. This subunit is autoregulated by following a retro-feedback loop: after its cotranslational insertion, the Cox1 subunit sequesters Ms51, its translational activator, thus preventing it from activating the synthesis of more Cox1 subunits. For Ms51 to be liberated, Cox1 needs to acquire its cofactors and continue to assemble into a functional CcO (Ott and Herrmann, 2010; Mick et al., 2011). Furthermore, stalled assembly of the CcO complex results in selective degradation of the Cox1 subunit (Khalimonchuk et al., 2012). These regulatory mechanisms adjust the level of Cox1 synthesis to the amounts that can be successfully assembled. The Cox2 and Cox3 modules then assemble with the Cox1 module.

We propose that when the allotypic cCox2<sup>W56R</sup> is the only version present in the cell, it has low-efficiency assembly, leading to lower levels of the Cox1 module (Figure 7). Indeed, in this context, synthesis of Cox1 and steady state levels are decreased (Cruz-Torres et al., 2012). When the mitochondria-encoded Cox2 is coexpressed, and since this protein is naturally assembled with high efficiency, this leads to higher accumulation of the Cox1 module, and therefore the assembly of cCox2<sup>W56R</sup> is enhanced (Figure 7).

We consider the observations here described relevant to the understanding of CcO biogenesis, of the conditions imposed for a functional transfer of mitochondrial genes to the nucleus, and of the requirements for a rational design of genes for allotypic expression intended for the development of gene therapies for human mitochondrial diseases.

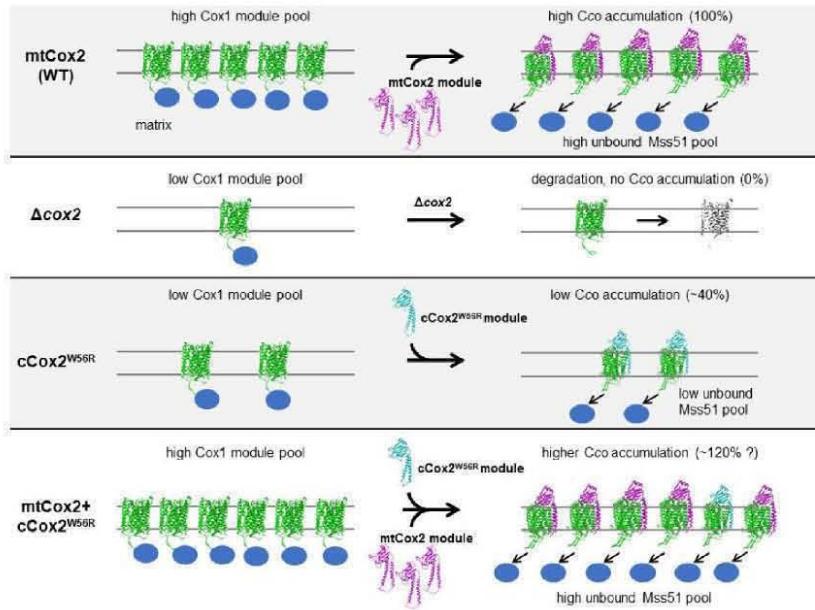
## MATERIALS AND METHODS

### Strains, gene constructs, and culture conditions

All *S. cerevisiae* strains used in this study are listed in Table 1. Cells were grown on fermentable media, YPD or YPGal (1% yeast extract, 2% bactopeptone, and 2% dextrose or galactose). The nonfermentable medium was YPEG (1% yeast extract, 2% bactopeptone, 3% ethanol, and 3% [vol/vol] glycerol). Minimal media were SD or SGal (0.17% yeast nitrogen base [without amino acids and (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>], 0.5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and 2% dextrose or galactose supplemented with specific amino acids and nucleotides). All strains were grown at 30°C in liquid (with shaking) or solid media (containing 1.75% agar). Absorbance at 600 nm was measured every 2 h in a Bioscreen C spectrophotometer (Growth Curves, USA). For metal supplementation experiments, growth media contained 5 μM final concentration of CuCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, or MgCl<sub>2</sub>.

The *S. cerevisiae* COX2 gene encoding a cytosol-synthesized precursor protein with the W56R point mutation (cCox2<sup>W56R</sup>) was recorded for expression from the nucleus. A region encoding the Oxa1 MTS was added at the 5' end, as previously described (Supekova et al., 2010). The construct was chemically synthesized (GeneScript, Piscataway, NJ) and cloned in the pFL61 vector, which contains a phosphoglycerate kinase promoter, a kind gift from Patrice Hamel (Ohio University, Columbus, OH). Yeast cells were transformed in the presence of lithium acetate and salmon sperm DNA as described (Gietz and Schiestl, 2007).

The COX2 mitochondrial gene expressing the protein with the W56R mutation (mtCox2<sup>W56R</sup>) was constructed using site-directed mutagenesis (QuikChange II site-directed mutagenesis kit, Agilent Technologies) on the pJM2 plasmid (Mulero and Fox, 1993). This plasmid



**FIGURE 7:** Cox1 synthesis is regulated and determines its further assembly into CcO. For canonical CcO assembly in a wild-type strain, the synthesized Cox2 (mtCox2) is incorporated into the Cox1 module (McStay et al., 2013), promoting the release of MSS51 (blue circles), the translational activator of Cox1, and thus enabling more Cox1 synthesis (Perez-Martinez et al., 2009). In a  $\Delta$ cox2 strain, unassembled Cox1 module is readily degraded (Khalimonchuk et al., 2012), resulting in no CcO accumulation taking place. In the allotopic strain, the mature cCox2<sup>W56R</sup> levels are limiting. This would result in low incorporation of the cCox2<sup>W56R</sup> assembly module with the Cox1 module, a decreased release of MSS51, and relatively low CcO levels. In a strain where both Cox2 versions are expressed, the total Cox2 protein levels are increased. The presence of mitochondria-encoded Cox2 allows more efficient Cox1 synthesis, enhancing the assembly of more cCox2<sup>W56R</sup> modules into Cox1 modules. This would result in a higher accumulation of CcO.

was transformed by high-velocity micro projectile bombardment into the p<sup>D</sup> strain DFS160 (Bonnefoy and Fox, 2007). Transformants were selected by their ability to rescue respiratory growth when mated with the strain SCS188 carrying a partial deletion of cox2. Transformants with the mtCox2<sup>W56R</sup> plasmid were mated with the EHW154 strain and cytoductants were selected for their ability to grow in YPEG as

haploids. Correct integration of the mtCox2<sup>W56R</sup> construct into mtDNA was confirmed by PCR and DNA sequencing.

#### Isolation of yeast mitochondria

Mitochondria were isolated from 100–200 ml of liquid SGal cultures as previously reported (Herrmann et al., 1994). Briefly, cells were

Strain	Genotype	Source/reference
NB40-36A	D273-10B; MAT $\alpha$ , lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, [rho+]	Thomas D. Fox, Cornell University
EHW154	D273-10B; MAT $\alpha$ , lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, his3- $\Delta$ HindIII, [rho+] cox2-208::ARG8m	Thomas D. Fox, Cornell University
DFS160	D273-10B; MAT $\alpha$ , arg8 $\Delta$ ::ura3, ura3-52, leu2 $\Delta$ , ade2-101, kar1-1, [rho $^0$ ]	Thomas D. Fox, Cornell University
SCS188A	D273-10B; MAT $\alpha$ , ade2-101, ura3-52, kar1-1, [rho+] cox2-75c	Thomas D. Fox, Cornell University
SCS101	D273-10B; MAT $\alpha$ , ura3-52, leu2-3, 112, lys2, his3- $\Delta$ HindIII, arg8 $\Delta$ ::hisG, [rho+] COX2::3xHA	Saracco, 2003
DRG101	D273-10B; MAT $\alpha$ , lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, his3- $\Delta$ HindIII, [rho+] COX2W56R	This study
YMR245W	BY4741; MAT $\alpha$ , his3 $\Delta$ 1, leu2 $\Delta$ 0, met15 $\Delta$ 0, ura3 $\Delta$ 0, coa6- $\Delta$ 51-315	Winzeler et al., 1999

TABLE 1: Strains used in this work.

harvested in the logarithmic growth phase ( $O.D_{600}$  1.2–1.5), washed with  $H_2O$  at 4500 rpm (2500  $\times g$ ) for 5 min, resuspended in TD buffer (100 mM Tris, 10 mM  $\beta$ -dithiothreitol), and centrifuged at 4500 rpm (2500  $\times g$ ) for 5 min. The cells were resuspended in 10 ml of zymolase buffer (1.2 mM sorbitol, 20 mM  $KH_2PO_4$  [pH 7.4], 3–5 mg zymolase/g of wet weight), incubated for 1 h in a shaker at 30°C, and centrifuged at 4500 rpm (2500  $\times g$ ) for 5 min at 4°C. The pellet was resuspended in 1 ml of Dounce buffer (0.6 M sorbitol, 10 mM Tris [pH 7.4], 1 mM EDTA, 0.2% bovine serum albumin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) using a homogenizer and pestle (30 strokes). Samples were transferred to 1.5-ml tubes and centrifuged at 4500 rpm (2000  $\times g$ ) for 5 min at 4°C. The supernatants were transferred to new tubes and centrifuged at 12,000 rpm (13,500  $\times g$ ) for 10 min at 4°C. The supernatant (cytosolic fraction) was collected in new tubes and the pellet (mitochondrial fraction) was resuspended in 100  $\mu l$  of SH buffer (0.6 M sorbitol, 20 mM HEPES, pH 7.4). Protein concentration was determined by a modified Lowry method (Markwell et al., 1978). Mitochondria and cytosolic fractions were shock frozen in liquid  $N_2$  and stored at -70 °C until further use.

#### Oxygen uptake measurements

The rate of oxygen consumption was measured in whole cells using an oxygen meter, Model 782 (Warner/Strathkelvin Instruments), with a Clark-type electrode in a 1-ml water-jacketed chamber at 30°C (Estabrook, 1967), and data were analyzed using the 782 Oxygen System software (Warner/Strathkelvin Instruments). The assay contained 20 mM MES pH 6.0 (triethanolamine) and 50 mM ethanol as substrate. Where indicated, 200  $\mu M$  NaCN was added to inhibit CcO activity. The cells were washed once with  $H_2O$  prior to the measurements or, where indicated, were washed and fasted overnight in  $H_2O$ . The samples were normalized by the number of cells.

#### Gel electrophoresis and in-gel enzymatic activities

Denaturing gel electrophoresis was carried out in a SDS-tricine-PAGE system (Schägger, 1994a). Sample preparation and blue native PAGE (BN-PAGE) were carried out as described (Schägger, 1994b). Briefly, mitochondria were washed in 250 mM sorbitol and 50 mM Bis-Tris (pH 7.0) and centrifuged at 12,000 rpm (13,500  $\times g$ ) for 10 min at 4°C. The pellet was resuspended in sample buffer (750 mM aminocaproic acid, 50 mM Bis-Tris, pH 7.0), solubilized with 2 g of lauryl maltoside per g of protein for 30 min with gentle stirring, and centrifuged at 13,200 rpm (16,400  $\times g$ ) at 4°C for 12 min. The supernatants were loaded on 5–15% polyacrylamide gradient gels. The stacking gel contained 4% (wt/vol) polyacrylamide. In-gel activities were carried out following established procedures for CcO activity (Wittig and Schägger, 2007; Wittig et al., 2007) and ATPase activity (Zerbetto et al., 1997; Wittig and Schägger, 2005). Further electrophoretic separation of the CcO complex was performed by excising the band corresponding to this complex (identified by in-gel activity of a parallel lane) and loading it into SDS-tricine-PAGE. Gels were stained with Coomassie solution (50% ethanol, 10% acetic acid, 0.1% Coomassie Brilliant Blue G) or transferred and then subjected to immunodetection.

#### Immunoassays

From SDS-tricine-PAGE, proteins were electrotransferred onto a nitrocellulose Trans-Blot membrane (Bio-Rad) for immune detection. Membranes were washed, blocked, and independently incubated for 8 h with the following antibodies: anti-Cox1 antibody at a 1:3300 dilution (MitoSciences), anti-Cox2 antibody at a 1:7500 dilution (In-vitrogen; Molecular Probes), anti-Cox3 antibody at a 1:15,000 dilution (Molecular Probes), anti-Oxa1 antibody at a 1:1000 dilution,

anti-Hog1 antibody at a 1:2000 dilution (Santa Cruz Biotechnology), anti-HA antibody at a 1:15,000 dilution (Sigma Aldrich), and anti-Atp2 antibody at a 1:50,000 dilution. Alkaline phosphatase (ALP)-conjugated immunoglobulin Gs (1:15,000 for 2 h) were used as secondary antibodies. Insoluble black-purple precipitates on bands were formed upon addition of nitro blue tetrazolium chloride and 5-bromo-4-chloro-3'-indolyl phosphate p-toluidine salt. Images of the immune-decorated polypeptide bands were captured in a HP Scanjet G4050. To carry out a second Western blot reaction with a different primary antibody, membranes were stripped by incubation for 45 min at 50°C in the presence of 2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, and 100 mM  $\beta$ -mercaptoethanol. Band intensity was measured by densitometric analysis using the GelAnalyzer 2010a freeware.

#### Tandem mass spectrometry

After SDS-tricine PAGE and Coomassie staining, bands of interest were sent for mass spectroscopy identification (LC/ESI-MS/MS) at the Protein Biochemistry Laboratory at Texas A&M University.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Thomas D. Fox (Cornell University) for most of the strains used in this project and Johannes M. Herrmann (University of Kaiserslautern) for the kind gift of the Oxa1 antibody. We are also grateful to Rodolfo García-Villegas and Yolanda Camacho-Villasana for their expert assistance in the mitochondrial transformation technique. We also thank Larry Dangott (Protein Biochemistry Laboratory at Texas A&M University) for carrying out the mass spectrometry analysis. This work was partially supported by Grants 239219 and 279125 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, Mexico) and IN 208917 from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM, Mexico) to D.G.-H.; CONACyT-CB 237344 and DGAPA-UNAM IN202715 to S.F.; and DGAPA-UNAM IN208711-3 to X.P.-M. CONACyT also supported with a fellowship the studies of D.R.-G. in the Biomedical Sciences Ph.D. program (Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México).

#### REFERENCES

- Adams K, Palmer JD (2003). Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. *Mol Phylogenet Evol* 29, 380–395.
- Adams KL, Song K, Roessler PG, Nugent JM, Doyle JL, Doyle JJ, Palmer JD (1999). Intracellular gene transfer in action: dual transcription and multiple silencings of nuclear and mitochondrial cox2 genes in legumes. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 13863–13868.
- Allen JF (2015). Why chloroplasts and mitochondria retain their own genomes and genetic systems: colocation for redox regulation of gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 112, 10231–10238.
- Banroques J, Delahodde A, Jacq C (1986). A mitochondrial RNA maturase gene transferred to the yeast nucleus can control mitochondrial mRNA splicing. *Cell* 46, 837–844.
- Bietenhader M, Martos A, Tetaud E, Aiyar RS, Sellem CH, Kucharczyk R, Clauerd-Munster S, Giraud M-F, Godard F, Salin B, et al. (2012). Experimental relocation of the mitochondrial ATP9 gene to the nucleus reveals forces underlying mitochondrial genome evolution. *PLoS Genet* 8, e1002876.
- Björkholm P, Ernst AM, Hagström E, Andersson SGE (2017). Why mitochondria need a genome revisited. *FEBS Lett* 591, 65–75.
- Björkholm P, Harish A, Hagström E, Ernst AM, Andersson SGE (2015). Mitochondrial genomes are retained by selective constraints on protein targeting. *Proc Natl Acad Sci USA* 112, 10154–10161.
- Bohnert M, Rehling P, Guillard B, Herrmann JM, Pfanner N, van der Laan M (2010). Cooperation of stop-transfer and conservative sorting mechanisms in mitochondrial protein transport. *Curr Biol* 20, 1227–1232.
- Bokori-Brown M, Holt IJ (2006). 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, 455–469.

- Bonnefoy N, Fiumera HL, Dujardin G, Fox TD (2009). Roles of Oxa1-related inner-membrane translocases in assembly of respiratory chain complexes. *Biochim Biophys Acta* 1793, 60–70.
- Bonnefoy N, Fox TD (2007). Directed alteration of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial DNA by biolistic transformation and homologous recombination. *Methods Mol Biol* 372, 153–166.
- Bonnet C, Kaltmacher B, Ellouze S, Augustin S, Bénit P, Forster V, Rustin P, Sahel JA, Corral-Debrinski M (2007). 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, 127–144.
- Boominathan A, Vanhooser S, Basisty N, Powers K, Crampton AL, Wang X, Friedricks N, Schilling B, Brand MD, O'Connor MS (2016). Stable nuclear expression of ATP8 and ATP6 genes rescues a mtDNA Complex V null mutant. *Nucleic Acids Res* 44, 9342–9357.
- Botstein D, Fink GR (1988). Yeast: an experimental organism for modern biology. *Science* 240, 1439–1443.
- Burger G, Gray MW, Lang BF (2003). Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends Genet* 19, 709–716.
- Calado-Botelho S, Osterberg M, Reichert AS, Yamano K, Björkholm P, Endo T, von Heijne G, Kim H (2011). TIM23-mediated insertion of transmembrane  $\alpha$ -helices into the mitochondrial inner membrane. *EMBO J* 30, 1003–1011.
- Clarkson GH, Poyton RO (1989). A role for membrane potential in the biogenesis of cytochrome c oxidase subunit 11, a mitochondrial gene product. *J Biol Chem* 264, 10114–10118.
- Claros MG, Perea J, Shu Y, Samatey FA, Popot JL, Jacq C (1995). Limitations to *in vivo* import of hydrophobic protein into yeast mitochondria. The case of a cytoplasmically synthesized apocytochrome b. *Eur J Biochem* 271, 762–771.
- Claros MG, Vincens P (1996). Computational method to predict mitochondrial imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem* 241, 779–786.
- Cruz-Torres V, Vázquez-Acevedo M, García-Villegas R, Pérez-Martínez X, Mendoza-Hernández G, 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. *Biochim Biophys Acta* 1817, 2128–2139.
- Cwerman-Thibault H, Augustin S, Lechaume C, Ayache J, Ellouze S, Sahel J-A, Corral-Debrinski M (2015). Nuclear expression of mitochondrial ND4 leads to the protein assembling in complex I and prevents optic atrophy and visual loss. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2, 15003.
- Daley DO, Adams KL, Clifton R, Qualmann S, Millar AH, Palmer JD, Pratje E, Whelan J (2002a). Gene transfer from mitochondrion to nucleus: novel mechanisms for gene activation from Cox2. *Plant J* 30, 11–21.
- Daley DO, Clifton R, Whelan J (2002b). Intracellular gene transfer: reduced hydrophobicity facilitates gene transfer for subunit 2 of cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 10510–10515.
- de Grey AD (2000). Mitochondrial gene therapy: an arena for the biomedical use of iRNA. *Trends Biotechnol* 18, 394–399.
- DiMauro S, Hirano M, Schon EA (2006). Approaches to the treatment of mitochondrial diseases. *Muscle Nerve* 34, 265–283.
- Elliott LE, Saracco SA, Fox TD (2012). Multiple roles of the Cox2 chaperone in assembly of *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome c oxidase. *Genetics* 190, 559–567.
- Estabrook RW (1967). Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP: O ratios. *Methods Enzymol* 10, 41–47.
- Figueroa-Martínez F, Vázquez-Acevedo M, Cortés-Hernández P, García-Trejo JJ, Davidson E, King MP, González-Halphen D (2011). What limits the allotopic expression of nucleus-encoded mitochondrial genes? The case of the chimeric Cox3 and Atp6 genes. *Mitochondrion* 11, 147–154.
- Fiumera HL, Broadley SA, Fox TD (2007). Translocation of mitochondrialy synthesized Cox2 domains from the matrix to the intermembrane space. *Mol Cell Biol* 27, 4664–4673.
- Fontanesi F, Soto IC, Barrientos A (2008). Cytochrome c oxidase biogenesis: new levels of regulation. *IUBMB Life* 60, 557–568.
- Funes S, Davidson E, Claros MG, van Lis R, Pérez-Martínez X, Vázquez-Acevedo M, King MP, González-Halphen D (2002). The typically mitochondrial DNA-encoded ATP6 subunit of the F1FO-ATPase is encoded by a nuclear gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* 277, 6051–6058.
- Gearing DP, 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, 3651–3655.
- Gerdes F, Tatsuta T, Langer T (2012). Mitochondrial AAA proteases—towards a molecular understanding of membrane-bound proteolytic machines. *Biochim Biophys Acta* 1823, 49–55.
- Ghosh A, Pratt AT, Soma S, Theriault SG, Griffin AT, Trivedi PP, Gohil VM (2016). Mitochondrial disease genes COA6, COX6B and SCO2 have overlapping roles in COX2 biogenesis. *Hum Mol Genet* 25, 660–671.
- Ghosh A, Trivedi PP, Timbalia SA, Griffin AT, Rahn JJ, Chan SSL, Gohil VM (2014). Copper supplementation restores cytochrome c oxidase assembly defect in a mitochondrial disease model of COA6 deficiency. *Hum Mol Genet* 23, 3596–3606.
- Gietz RD, Schiestl RH (2007). Quick and easy yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc* 2, 35–37.
- González-Halphen D, Funes S, Pérez-Martínez X, Reyes-Prieto A, Claros MG, Davidson E, King MP (2004). Genetic correction of mitochondrial diseases. *Ann NY Acad Sci* 1019, 232–239.
- Green-Wilms NS, Butler CA, Dunstan HM, Fox TD (2001). Pet111p, an inner membrane-bound translational activator that limits expression of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial gene COX2. *J Biol Chem* 276, 6392–6397.
- Guy J, Qi X, Pallotti F, Schon EA, Manfredi G, Carelli V, Martinuzzi A, Hauswirth WW, Lewin AS (2002). Rescue of a mitochondrial deficiency causing Leber hereditary optic neuropathy. *Ann Neurol* 52, 534–542.
- He S, Fox TD (1997). Membrane translocation of mitochondrialy coded Cox2p: distinct requirements for export of N and C termini and dependence on the conserved protein Oxa1p. *Mol Biol Cell* 8, 1449–1460.
- Hell K, Herrmann J, Pratje E, Neupert W, Stuart RA (1997). Oxa1p mediates the export of the N- and C-termini of pCoxII from the mitochondrial matrix to the intermembrane space. *FEBS Lett* 418, 367–370.
- Hell K, Herrmann JM, Pratje E, Neupert W, Stuart RA (1998). Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 2250–2255.
- Herrmann JM, Bonnefoy N (2004). Protein export across the inner membrane of mitochondria: the nature of translocated domains determines the dependence on the oxa1 translocase. *J Biol Chem* 279, 2507–2512.
- Herrmann JM, Fölsch H, Neupert W, Stuart RA (1994). Isolation of yeast mitochondria and study of mitochondrial protein translation. In: *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, Vol. 1, San Diego: Academic Press, 538–544.
- Horan S, Bourges I, Taanman J-W, Meunier B (2005). Analysis of COX2 mutants reveals cytochrome oxidase subassemblies in yeast. *Biochem J* 390(Pt 3), 703–708.
- Jiménez-Suárez A, Vázquez-Acevedo M, Rojas-Hernández A, Funes S, Uribe-Carvajal S, González-Halphen D (2012). In *Polytomella* sp., mitochondria, biogenesis of the heterodimeric COX2 subunit of cytochrome c oxidase requires two different import pathways. *Biochim Biophys Acta* 1817, 819–827.
- Johnston IG, Williams BP (2016). Evolutionary inference across eukaryotes identifies specific pressures favoring mitochondrial gene retention. *Cell Systems* 2, 101–111.
- Khalimonchuk O, Jeong M-Y, Watts I, Ferris E, Winge DR (2012). Selective Oma1 protease-mediated proteolysis of Cox1 subunit of cytochrome oxidase in assembly mutants. *J Biol Chem* 287, 7289–7300.
- Kyriakouli DS, Boesch P, Taylor RW, Lightowers RN (2008). Progress and prospects: gene therapy for mitochondrial DNA disease. *Gene Ther* 15, 1017–1023.
- Law RH, Devenish RJ, Nagley P (1990). Assembly of imported subunit 8 into the ATP synthase complex of isolated yeast mitochondria. *Eur J Biochem* 188, 421–429.
- Manfredi G, Fu J, Ojaimi J, Sadlock JE, Kwong JQ, Guy J, Schon EA (2002). Rescue of a deficiency in ATP synthesis by transfer of MTATP6, a mitochondrial DNA-encoded gene, to the nucleus. *Nat Genet* 30, 394–399.
- Maréchal A, Meunier B, Lee D, Orengo C, Rich PR (2012). Yeast cytochrome c oxidase: a model system to study mitochondrial forms of the haem-copper oxidase superfamily. *Biochim Biophys Acta* 1817, 620–628.
- Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 87, 206–210.
- Mason TL, Poyton RO, Wharton DC, Schatz G (1973). Cytochrome c oxidase from bakers' yeast I. Isolation and properties. *J Biol Chem* 248, 1346–1354.
- McStay GP, Su CH, Tzagoloff A (2013). Modular assembly of yeast cytochrome oxidase. *Mol Biol Cell* 24, 440–452.
- Mick DU, Fox TD, Rehling P (2011). Inventory control: cytochrome c oxidase assembly regulates mitochondrial translation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 14–20.

- Mokranjac D, Neupert W (2010). The many faces of the mitochondrial TIM23 complex. *Biochim Biophys Acta* 1797, 1045–1054.
- Mulero JJ, Fox TD (1993). Alteration of the *Saccharomyces cerevisiae* COX2 mRNA 5'-untranslated leader by mitochondrial gene replacement and functional interaction with the translational activator protein PET111. *Mol Biol Cell* 4, 1327–1335.
- Nagley P, Farrell LB, Gearing DP, Nero D, Meltzer S, Devenish RJ (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 USA* 85, 2091–2095.
- Neupert W (2015). A perspective on transport of proteins into mitochondria: a myriad of open questions. *J Mol Biol* 427, 1135–1158.
- Neupert W, Herrmann JM (2007). Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76, 723–749.
- Oca-Cossío J, Kenyon L, Hao H, Moraes CT (2003). Limitations of allotypic expression of mitochondrial genes in mammalian cells. *Genetics* 165, 707–720.
- Ojaimi J, Pan J, Santra S, Snell WJ, Schon EA (2002). An algal nucleus-encoded subunit of mitochondrial ATP synthase rescues a defect in the analogous human mitochondrial-encoded subunit. *Mol Biol Cell* 13, 3836–3844.
- Ott M, Herrmann JM (2010). Co-translational membrane insertion of mitochondrial encoded proteins. *Biochim Biophys Acta* 1803, 767–775.
- Pache-Grau D, Bareth B, Dudek J, Juris L, Vögtle FN, Wissel M, Leary SC, Dennerlein S, Rehling P, Deckers M (2015). Cooperation between COA6 and SCO2 in COX2 maturation during cytochrome c oxidase assembly links two mitochondrial cardiomyopathies. *Cell Metab* 21, 823–833.
- Perales-Clemente E, Fernández-Silva P, Acín-Pérez R, Pérez-Martos A, Enriquez JA (2011). Allotypic expression of mitochondrial-encoded genes in mammals: achieved goal, undemonstrated mechanism or impossible task? *Nucleic Acids Res* 39, 225–234.
- Pérez-Martínez X, Antamarian A, Vázquez-Acevedo M, Funes S, Tolunkova E, d'Alayer J, Claros MG, Davidson E, King MP, González-Halphen D (2001). Subunit II of cytochrome c oxidase in Chlamydomonad algae is a heterodimer encoded by two independent nuclear genes. *J Biol Chem* 276, 11302–11309.
- Pérez-Martínez X, Butler CA, Shingu-Vazquez M, Fox TD (2009). Dual functions of Ms51 couple synthesis of Cox1 to assembly of cytochrome c oxidase in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Mol Biol Cell* 20, 4371–4380.
- Pérez-Martínez X, Vázquez-Acevedo M, Tolunkova E, Funes S, Claros MG, Davidson E, King MP, 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.
- Popot JL, de Vity CR (1990). On the microassembly of integral membrane proteins. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 19, 369–403.
- Poyton RO, Groot GSP (1975). Biosynthesis of polypeptides of cytochrome c oxidase by isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 72, 172–176.
- Pratje E, Mannhaupt G, Michaelis G, Beyreuther K (1983). A nuclear mutation prevents processing of a mitochondrial encoded membrane protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 2, 1049–1054.
- Rigby K, Cobina PA, Khalimonchuk O, Winge DR (2008). Mapping the functional interaction of Sco1 and Cox2 in cytochrome oxidase biogenesis. *J Biol Chem* 283, 15015–15022.
- Roucou X, Artka IM, Devenish RJ, Nagley P (1999). Bioenergetic and structural consequences of allotypic 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.
- Sanchirico M, Tzellas A, Fox TD, Conrad-Webb H, Periman PS, Mason TL (1995). Relocation of the unusual VAR1 gene from the mitochondrion to the nucleus. *Biochem Cell Biol* 73, 987–995.
- Saracco SA (2003). Analysis of the Export of *Saccharomyces cerevisiae* Cox2 from the Mitochondrial Matrix. PhD Thesis. Ithaca, NY: Cornell University.
- Saracco SA, Fox TD (2002). Cox18p Is required for export of the mitochondrial encoded *Saccharomyces cerevisiae* Cox2p C-tail and interacts with Pnt1p and Ms2p in the inner membrane. *Mol Biol Cell* 13, 1122–1131.
- Schägger H (1994a). Denaturing electrophoretic techniques. In: *A Practical Guide to Membrane Protein Purification*, San Diego: Academic Press, 55–79.
- Schägger H (1994b). Native gel electrophoresis. In: *A Practical Guide to Membrane Protein Purification*, San Diego: Academic Press, 81–104.
- Sevarino KA, Poyton RO (1980). Mitochondrial membrane biogenesis: identification of a precursor to yeast cytochrome c oxidase subunit II, an integral polypeptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 142–146.
- Shimokata K, Katayama Y, Murayama H, Suematsu M, Tsukihara T, Muramoto K, Aoyama H, Yoshikawa S, Shimada H (2007). The proton pumping pathway of bovine heart cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 4200–4205.
- Soto IC, Fontanesi F, Liu J, Barrientos A (2011). Biogenesis and assembly of eukaryotic cytochrome c oxidase catalytic core. *Biochim Biophys Acta* 1817, 883–897.
- Stiburek L, Zeman J (2010). Assembly factors and ATP-dependent proteases in cytochrome c oxidase biogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1797, 1149–1158.
- Supekova L, Supék F, Greer JE, Schultz PG (2010). A single mutation in the first transmembrane domain of yeast COX2 enables its allotypic expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 5047–5052.
- Tischner C, Wenz T (2015). Keep the fire burning: current avenues in the quest of treating mitochondrial disorders. *Mitochondria* 24, 32–49.
- Torello AT, Overholtzer MH, Cameron VL, Bonnefoy N, Fox TD (1997). Deletion of the leader peptide of the mitochondrial encoded precursor of *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome c oxidase subunit II. *Genetics* 145, 903–910.
- Wikström M (1977). Proton pump coupled to cytochrome c oxidase in mitochondria. *Nature* 266, 271–273.
- Winzeler EA, Shoemaker DD, Astromoff A, Liang H, Anderson K, Andre B, Bangham R, Benito R, Boone JD, Bussey H, et al. (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* 285, 901–906.
- Wittig I, Karas M, Schägger H (2007). High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Mol Cell Proteomics* 6, 1215–1225.
- Wittig I, Schägger H (2005). Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics* 5, 4338–4346.
- Wittig I, Schägger H (2007). Electrophoretic methods to isolate protein complexes from mitochondria. *Methods Cell Biol* 80, 723–741.
- Yoshikawa S, Muramoto K, Shinzawa-Itoh K (2011). The O<sub>2</sub> reduction and proton pumping gate mechanism of bovine heart cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1807, 1279–1286.
- Yoshikawa S, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R, Yamashita E, Inoue N, Yao M, Fei MJ, Libeu CR, Mizushima T, et al. (1998). Redox-coupled crystal structural changes in bovine heart cytochrome c oxidase. *Science* 280, 1723–1729.
- Zerbetto E, Vergani L, Dabbeni-Sala F (1997). Quantification of muscle mitochondrial oxidative phosphorylation enzymes via histochemical staining of blue native polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 18, 2059–2064.
- Zullo SJ, Parks WT, Chloupkova M, Wei B, Weiner H, Fenton WA, Eisenstadt JM, Merrill CR (2005). Stable transformation of CHO Cells and human NARP cybrids confers oligomycin resistance (olif(r)) following transfer of a mitochondrial DNA-encoded olif(r) ATPase6 gene to the nuclear genome: a model system for mtDNA gene therapy. *Rejuvenation Res* 8, 18–28.

## 6.2 Otras modificaciones que impactan la expresión alotópica de Cox2 (objetivos iii a vi)

Como primera aproximación, decidimos probar si otras sustituciones en la posición 56 de Cox2, aparte del triptófano por la arginina, logran recuperar el crecimiento respiratorio de una cepa carente del gen mitocondrial COX2. Sustituimos a esta posición por residuos con propiedades fisicoquímicas similares a la arginina, como la lisina (W56K), que también está cargada positivamente, o la glutamina (W56Q), que tiene el valor de hidrofobicidad más cercano al de la arginina<sup>110</sup>. Estas variantes de Cox2 también recuperan el crecimiento respiratorio de una cepa carente del gen mitocondrial COX2. La recuperación de la cepa que contiene la sustitución W56K es comparable con el de la cepa que contiene a W56R mientras que la recuperación de la cepa que contiene a W56Q es significativamente menor (Artículo 2, Figura 1A). Como control negativo incluimos a una cepa que expresa al gen COX2 alotópicamente sin ninguna mutación (Cox2<sup>WT</sup>). Como era esperado, ni la cepa transformada con esta variante ni la cepa transformada con un plásmido vacío, pudieron recuperar el crecimiento respiratorio (Artículo 2, Figura 1A). Realizamos fraccionamientos celulares para ubicar la localización de nuestras construcciones. Detectamos a todas las variantes de Cox2 en la fracción mitocondrial. En todas las cepas, observamos a la mayoría de Cox2 en forma de precursores (es decir, aún fusionadas a su MTS); en las variantes con sustituciones en la posición 56, observamos que una fracción de Cox2 se procesaba a su forma madura (Artículo 2, Figura 1B). Acorde al crecimiento respiratorio observado, las cepas que contienen a las variantes W56R y W56K se procesan más que la cepa contenido a W56Q. En conjunto, estos resultados demuestran que otros residuos en la posición 56 también permiten la expresión alotópica de Cox2 y que la incorporación de una carga positiva en el TMS1 es más favorable que una sustitución que sólo disminuye la hidrofobicidad de Cox2.

Después, buscamos identificar otras sustituciones que permitieran la expresión alotópica de COX2. Nos enfocamos en los organismos que naturalmente relocalizaron este gen al núcleo, ya que en sus secuencias podrían contener modificaciones determinantes para su expresión nuclear. La leguminosa *Glycine max* (planta de la soya) expresa a COX2 tanto en el genoma mitocondrial como en el nuclear<sup>29</sup>. Trabajos previos demostraron que una doble sustitución dentro del TMS1 de Cox2 es determinante para que la versión mitocondrial pueda ser importada a mitocondrias aisladas<sup>33</sup>. Para probar si esta doble sustitución permite la expresión alotópica de Cox2 en levadura, introdujimos las sustituciones de *Glycine max* en las posiciones correspondientes dentro de la secuencia de levadura. Para esto, alineamos ambas secuencias de Cox2 de la leguminosa con la secuencia de levadura e identificamos que los residuos a modificar corresponden a la posición 49 y 51 de levadura (Artículo 2, Figura 2A). Generamos las variantes que contienen a las sustituciones individuales (Cox2<sup>V49Q</sup> y Cox2<sup>L51G</sup>) y a la doble sustitución (Cox2<sup>V49Q/L51G</sup>). Observamos que la variante Cox2<sup>V49Q/L51G</sup> recupera la respiración de una cepa carente del gen mitocondrial COX2, mientras que las variantes con las sustituciones sencillas no la recuperan (Artículo 2, Figura 2B). La recuperación de la variante Cox2<sup>V49Q/L51G</sup> es menor que la de la variante que contiene a la mutación W56R. Para probar si es el cambio de hidrofobicidad del TMS1 lo que permite que Cox2 recupere la respiración, sustituimos a otras posiciones con residuos alifáticos dentro de la misma región para dar lugar a la construcción Cox2<sup>L47Q/V49G</sup>. Para observar algún efecto aditivo, generamos una mutante triple que contiene a la sustitución W56R además de las dos anteriores dando lugar a la variante Cox2<sup>L47Q/V49G/W56R</sup>. Estas dos variantes adicionales de Cox2 también recuperan la respiración de una cepa carente del

gen mitocondrial COX2, aunque en menor medida que la variante Cox2<sup>V49Q/L51G</sup> (Artículo 2, Figura 2B). Además, Cox2<sup>L47Q/V49G/W56R</sup> no logró un efecto aditivo, incluso tiene una menor recuperación de la respiración que Cox2<sup>L47Q/V49G</sup>. Por ensayos de actividad en geles nativos verificamos que la actividad de CcO correlaciona con el crecimiento respiratorio observado. Como control, la actividad de ATPasa, otro complejo de la OXPHOS, es comparable entre todas las cepas (Artículo 2, Figura 2C).

Realizamos fraccionamientos celulares para determinar la localización de nuestras construcciones. En línea con nuestras observaciones anteriores, sólo las variantes que recuperan la respiración muestran una fracción de Cox2 procesada a su forma madura (Artículo 2, Figura 3A). Detectamos tanto a las versiones precursoras como a las maduras de Cox2 en la fracción mitocondrial, pero observamos que las versiones maduras están protegidas de la degradación por proteinasa K mientras que los precursores son degradados en su mayoría (Artículo 2, Figura 3A y 3B). Este resultado puede ser interpretado de dos maneras: que los precursores están asociados externamente a las mitocondrias, o bien, que los precursores se encuentran en tránsito a través de las membranas mitocondriales y exponen a su extremo carboxilo hacia la superficie externa mitocondrial (nuestro anticuerpo sólo reconoce al carboxilo terminal de Cox2). Hicimos ensayos de extracción de proteínas periféricas de membrana con carbonato de sodio y observamos que los precursores son resistentes a la extracción indicando que se encuentran asociados a las membranas mitocondriales. Estos resultados sugieren que los precursores están en tránsito a través de las translocasas TOM y TIM23 y que exponen su carboxilo terminal hacia el citosol. En conjunto, nuestros resultados muestran que otras sustituciones aparte de la posición W56 permiten la expresión alotópica de Cox2 en levadura.

En las algas verdes y los apicomplejos, el gen COX2 se encuentra fragmentado, dando lugar a los genes COX2A y COX2B<sup>30,34</sup>. Estos genes codifican para proteínas que corresponden al dominio de dos segmentos transmembranales (Cox2a) y al dominio soluble intermembranal (Cox2b). Decidimos fragmentar a la subunidad Cox2<sup>W56R</sup> alotópica de levadura para probar si esta modificación aumenta la eficiencia de la respiración de una cepa carente del gen mitocondrial COX2. Diseñamos la fragmentación correspondiente sobre la secuencia de Cox2 de levadura y a cada fragmento le agregamos una MTS que las dirigiera a su compartimento (Artículo 2, Figura 4A y 4B). Además, agregamos extensiones al carboxilo terminal de Cox2a y al amino terminal de Cox2b (Artículo 2, Figura 4C). Estas extensiones están presentes en Cox2a y Cox2b del alga verde *Polytomella parva* y podrían estabilizar al heterodímero Cox2a/Cox2b (aunque en el alga no son estrictamente requeridas<sup>116</sup>).

Al cotransformar ambas construcciones en cepas de levadura carentes del gen mitocondrial COX2, no logramos que recuperaran la respiración (Artículo 2, Figura 4D). Para verificar que las subunidades se importaran a las mitocondrias, buscamos la presencia de Cox2b (con y sin extensión) en mitocondrias aisladas. Aunque nuestros anticuerpos anti-Cox2 no reconocen a Cox2a, logramos localizar a Cox2b a la fracción mitocondrial (Artículo 2, Figura 4F). Nuestros resultados muestran que, aunque no logramos re establecer la respiración al fragmentar a Cox2, sí logramos dirigir a la subunidad Cox2b hacia las mitocondrias.

Finalmente, nos preguntamos si al reducir los niveles de expresión del gen COX2 alotópico podríamos reducir proporcionalmente la recuperación de la respiración. Para esto, integramos a la construcción de COX2<sup>W56R</sup> en el genoma nuclear (bajo el mismo

promotor y terminador del plásmido multicopia original). Para nuestra sorpresa, observamos un aumento significativo en la recuperación de la respiración en las cepas conteniendo a  $\text{Cox2}^{\text{W56R}}$  o a  $\text{Cox2}^{\text{V49Q/L51G}}$  integradas en el genoma nuclear comparada con la respiración de cepas conteniendo las mismas variantes de Cox2, pero en plásmidos multicopia (Artículo 2, Figura 5A). Incluso, el crecimiento de la cepa que contiene a  $\text{Cox2}^{\text{W56R}}$  integrada en el genoma nuclear crece en medios respiratorios en niveles comparables con la cepa silvestre. Además, a bajas dosis, sólo observamos las formas maduras de  $\text{Cox2}^{\text{W56R}}$  y  $\text{Cox2}^{\text{V49Q/L51G}}$  por ensayos de inmunodetección (Artículo 2, Figura 5B), contrario a las cepas expresando a estas variantes desde un plásmido multicopia donde la mayoría de Cox2 se observa en forma de precursor.

Nuestros datos sugieren que, aunque la sobreexpresión de nuestras variantes de Cox2 alotópica permiten la recuperación de la respiración de cepas carentes del gen mitocondrial *COX2*, dirigir altas dosis de estas proteínas hacia las mitocondrias también es contraproducente. Dado que el paso limitante en la expresión alotópica de Cox2 es su ruta de inserción desde el citosol, la baja expresión parece tener una mayor recuperación del crecimiento respiratorio.

**Key within-membrane residues and precursor dosage impact the allotypic expression of yeast subunit II of cytochrome c oxidase**

Diana Rubalcava-Gracia<sup>\*1</sup>, Juan García-Rincón<sup>1</sup>, Ruy Pérez-Montfort<sup>1</sup>, Patrice Paul Hamel<sup>2</sup>, and Diego González-Halphen<sup>1</sup>.

1. Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, Mexico
2. Department of Molecular Genetics, Department of Biological Chemistry and Pharmacology, The Ohio State University, Columbus OH, United States.

\* Corresponding author. Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-243, México 04510, D.F. (Mexico) Tel: (+5255) 5622-5620; FAX: (+5255) 5622-5611. E-mail: [drubalcava@email.ifc.unam.mx](mailto:drubalcava@email.ifc.unam.mx)

**ABSTRACT**

Experimentally relocating mitochondrial genes to the nucleus for functional expression (allotypic expression) is a challenging process. The high hydrophobicity of mitochondria-encoded proteins seems to be one of the main factors preventing this allotypic expression. We focused on subunit II of cytochrome *c* oxidase (Cox2) to study which modifications may enable or improve its allotypic expression in yeast. Cox2 can be imported from the cytosol into mitochondria in the presence of the W56R substitution, which decreases the protein hydrophobicity and allows the partial respiratory rescue of a cox2-null strain. Here, we show that the inclusion of a positive charge is more favorable over another substitution that only decreases the hydrophobicity. We also searched for other determinants enabling allotypic expression in yeast by examining the COX2 gene in organisms where it was transferred to the nucleus during evolution. We found that naturally occurring variations at within-membrane residues in the legume *Glycine max* Cox2 could enable COX2 to be allotypically expressed, while splitting the COX2 gene into COX2A and COX2B, as in chlorophycean algae, was not successful. Our results also show that directing high doses of allotypically-synthesized Cox2 to mitochondria seems to be counterproductive for respiratory growth. Our findings are relevant for the development of genetic therapies intended to treat mitochondrial diseases and warrant further experimental exploration in organisms that naturally and atypically encode hydrophobic mitochondrial proteins in their nuclear genome.

## INTRODUCTION

Migration of mitochondrial genes to the nucleus occurs widely in nature<sup>1–3</sup>. Most mitochondrial proteins are encoded in the nuclear genome, translated by cytosolic ribosomes, and directed to mitochondria. These relocalized nucleotide sequences acquire a more complex regulation and tend to exhibit lower mutation rates<sup>4</sup>. Mitochondrial genomes mainly encode for subunits of oxidative phosphorylation (OXPHOS) complexes. In general, these proteins are embedded in membranes and are highly hydrophobic, a feature which is considered to be one of the main driving forces for the retention of a genome in mitochondria<sup>5</sup>.

Experimentally relocating mitochondrial genes to the nucleus holds promise for the development of treatments for mitochondrial diseases<sup>6–8</sup>. A mutation in the mitochondrial genome, yielding a defective protein, could be overcome in principle by the import of a nucleus-encoded, native, and functional version of the protein. Multiple efforts have been devoted to express mitochondria-encoded genes allotypically using yeast or mammalian model systems, but conflicting and inconsistent results call for careful interpretation of results and further experimental testing<sup>9,10</sup>.

The *COX2* gene, encoding subunit 2 (Cox2) of cytochrome *c* oxidase (CcO), provides an example of natural migration of a mitochondrial gene to the nucleus. This gene is generally mitochondria-encoded but in very few organisms it is found in the nuclear genome<sup>11–13</sup>. For example, *COX2* was transferred to the nucleus in some members of the legume lineage resulting in mitochondrial and nuclear versions of *COX2*. The representative species of this lineage either encode Cox2 in the nuclear DNA, in the mitochondrial DNA, or in both genomes, depending on which copy was activated and/or inactivated<sup>11,14,15</sup>. Also, the *COX2* gene has been experimentally relocalized to the yeast nucleus<sup>16</sup>, and subsequent studies have provided genetic and biochemical supporting evidence for successful allotypic expression<sup>17–19</sup>. The substitution of a tryptophan for an arginine in position 56 ( $\text{Cox2}^{\text{W56R}}$ ), within the first transmembrane segment (TMS) of Cox2, decreases its hydrophobicity and allows the partial respiratory rescue of a *cox2*-null yeast strain, with an estimated ~60% recovery of CcO levels when compared to the wild-type strain<sup>17</sup>. The decrease in hydrophobicity of the first TMS in Cox2 also occurred during the natural relocation of the *COX2* gene to the nucleus in legumes<sup>15</sup>. Other necessary modifications for successful allotypic expression include: recoding the mitochondrial gene to the nuclear genetic code and

fusing a sequence encoding a mitochondrial targeting sequence (MTS) to the ORF. Given that the W56R substitution was found in a random mutagenesis screen of 20,000 alleles<sup>16</sup>, the position of W56 would seem to be the only permissible site to tolerate a change that still maintains CcO functionality. This underscores the power of such an approach to uncover mutations allowing the allotypic production of other mitochondria-encoded proteins.

Here, we further explored the W56 position in Cox2 by testing if other residues with similar properties to arginine could confer allotypic expression. We also tested if naturally occurring changes in the legume *Glycine max* Cox2 or splitting of the *COX2* gene into *COX2A* and *COX2B*, as in chlorophycean green algae, enable yeast Cox2 to be imported from the cytosol into mitochondria and assembled into a functional CcO. Finally, we explored how dosage of the cytosolically-synthesized Cox2 precursor affects the outcome of allotypic expression.

## RESULTS

### *Other substitutions at residue 56 enable the allotypic expression of COX2*

First, we tested if other change at position 56, other than the tryptophan to arginine substitution (W56R), might restore the respiratory growth of a *cox2*-null strain expressing an allotypic version of *COX2*. We substituted W56 for two residues sharing at least one physicochemical property with arginine: lysine (W56K), which also has a positive charge, and glutamine (W56Q), which has the closest hydrophobicity score to arginine<sup>20</sup>. Upon introduction of the allotypic constructs encoding Cox2<sup>W56K</sup> or Cox2<sup>W56Q</sup> into a *cox2*-null strain, we observed a restoration of the respiratory growth. Respiratory growth of the strain with the W56K substitution was comparable, although less robust to that of the strain carrying the W56R substitution, while the recovery of the respiratory competence by Cox2<sup>W56Q</sup> was significantly less (figure 1A). Hence, the growth behaviour of yeast carrying these constructs was Cox2<sup>W56R</sup>>Cox2<sup>W56K</sup>>Cox2<sup>W56Q</sup>. As a negative control, we included a strain expressing an allotypic wild-type *COX2* gene (producing the Cox2<sup>WT</sup> subunit). As expected, neither this Cox2<sup>WT</sup> producing construct, nor the empty plasmid, were able to restore respiratory growth to the *cox2*-null strain (figure 1A).

Previous work evidenced that most of the allotypically synthesized Cox2<sup>W56R</sup> protein accumulates as an unprocessed precursor (*i.e.* still carrying its MTS) detected in the mitochondrial fraction<sup>16,17,19</sup>. We thus performed cellular fractionations to test the cytosolic versus mitochondrial distribution of Cox2<sup>WT</sup>, Cox2<sup>W56K</sup> and Cox2<sup>W56Q</sup>. Most of

the Cox2 precursors were found associated to mitochondria (figure 1B), indicating that, similar to Cox2<sup>W56R</sup>, the limiting step resides before their processing into mature forms in the mitochondrial matrix. Moreover, considering that Cox2<sup>W56K</sup> and Cox2<sup>W56R</sup> accumulate at similar levels in the mitochondria, we deduced that the difference in their ability to rescue the respiratory defect is not due to a difference in import but can be attributed to the fact that the lysine residue at this position is more deleterious than the arginine with respect to the activity of the enzyme.

Our results show that other residues at position 56 allow alltopic expression of COX2, and that the inclusion of a positive charge in the first TMS is favourable over a substitution that only diminishes hydrophobicity (i.e., the Cox2<sup>W56Q</sup> producing construct).

*Mutations that allow the nuclear expression of COX2 in legumes also confer alltopic expression in yeast*

Next, we sought to identify other changes in Cox2 that might enable its alltopic expression in the yeast system. We reasoned that in organisms which naturally encode COX2 in the nucleus, the protein sequence must carry determinants for import into the mitochondria and subsequent assembly into a functional holoenzyme. For example, the legume *Glycine max* expresses the COX2 gene from both nuclear and mitochondrial genomes<sup>11</sup>. Previous research showed that a two-residue substitution within the first transmembrane segment of Cox2 is necessary and sufficient for the mitochondrial version of Cox2 to be imported into isolated mitochondria. Accordingly, the nucleus-encoded Cox2 protein could no longer be imported into the organelle when the residues at these two positions correspond to the ones present in the mitochondria-encoded Cox2<sup>15</sup>. The conclusion from this study is that this two-residue substitution was determinant in facilitating the import of Cox2 from the cytosol to the mitochondria.

To test if this two-residue substitution could confer alltopic expression in the yeast system, we sought to reproduce the legume COX2 mutations into the yeast COX2 sequence. We generated an alignment of the two legume Cox2 subunits with the one from yeast and identified that the key residues correspond to positions 49 and 51 in the yeast sequence (figure 2A). We therefore engineered the mutations corresponding to the single and double V49Q and L51G substitutions in the yeast COX2. We observed that only the Cox2<sup>V49Q/L51G</sup> variant was able to restore respiratory growth in a cox2-null strain, while the Cox2<sup>V49Q</sup> and Cox2<sup>L51G</sup> variant could not (figure 2B),

demonstrating that both changes are required for successful allotropic expression of COX2. However, the respiratory growth of the Cox2<sup>V49Q/L51G</sup> strain was slower than that of the Cox2<sup>W56R</sup> strain. To test if the overall decrease in hydrophobicity within the first TMS of Cox2 is sufficient for restoring respiratory growth, we substituted other aliphatic residues at other positions, resulting in the Cox2<sup>L47Q/V49G</sup> construct (L47Q/V49G). To explore any additive effect, a triple COX2 mutant corresponding to W56R combined with a double substitution (L47Q/V49G/W56R) was also generated. All these constructs could restore the respiratory growth of a cox2-null strain, although to a lower extent than the Cox2<sup>V49Q/L51G</sup> producing construct. We also could not observe any additive effect in the strain producing the Cox2<sup>V49Q/L51G/W56R</sup> variant. Using *in-gel* activity staining, we verified that CcO activity correlated with the observation that the Cox2<sup>W56R</sup> variant exhibits an increased respiratory growth compared to the variants containing two-residue substitutions (figure 2C). In contrast, other OXPHOS complexes, such as the ATPase, exhibited comparable activity for all strains.

Next, we questioned if Cox2<sup>V49Q/L51G</sup> follows the same biogenesis pathway as that of allotypically-produced Cox2<sup>W56R</sup>. At contrast to the orthodox Cox2, synthesized in mitochondria, the allotypically-synthesized Cox2<sup>W56R</sup> does not require the Cox18 translocase for the correct insertion of its second TMS into the inner membrane<sup>18</sup>, which was postulated to be laterally released into this membrane by the TIM23 complex<sup>19</sup>. We observed that, similar to the Cox2<sup>W56R</sup> strain, the Cox2<sup>V49Q/L51G</sup> mutant is able to restore respiration when expressed in a cox18-null strain (figure 2D), indicating that the Cox18 translocase is completely dispensable. This suggests that the second TMS of Cox2<sup>V49Q/L51G</sup> is probably laterally released into the inner mitochondrial membrane by the TIM23 translocator.

We observed that while the mature forms of Cox2 were protected from degradation upon incubation of mitochondria-enriched fractions with proteinase K (PK), a result indicative of a mitochondrial localization, all the Cox2 precursors were mostly degraded by the protease (figures 3A and 3B). These results may be interpreted in two ways: either the precursors are loosely attached to the external face of the outer mitochondrial membrane or they are retained while in transit through the TOM and TIM23 complexes with their C-termini still exposed to the cytosol (note that our anti-Cox2 antibody recognizes the C-terminus of Cox2). To distinguish between these two possibilities, we performed a carbonate extraction of the mitochondrial fraction and found that the precursors are mostly associated to the membrane based on their resistance to carbonate treatment (figure 3C). These observations suggest that the

precursors are in transit through the TOM and TIM23 complexes, still exposing their C-termini to the external mitochondrial surface.

Taken together, our data show that substitutions at a different position than W56, enable the successful allotypic expression of *COX2*.

*A split yeast COX2 fails to emulate the behaviour of the COX2a and COX2b subunits naturally occurring in chlorophycean algae.*

In some lineages, including green algae, apicomplexan parasites and scolids, the Cox2-encoding gene is split into genes encoding the Cox2a and Cox2b moieties, which correspond to the membrane and soluble domains of the subunit, respectively<sup>12,13,21</sup>. In some instances, the split genes have remained in the mitochondrial genome (e.g. in scolids) or migrated to the nucleus (e.g. in algae). To test if splitting of Cox2 increases the efficiency of *COX2* allotypic expression in yeast, we designed the corresponding separation in the Cox2 sequence of yeast (figure 4A). The Cox2a subunit corresponds to the two transmembrane segments of orthodox Cox2, while Cox2b is the equivalent of the Cox2 soluble domain exposed to the intermembrane space (figure 4B).

Each moiety contains a MTS (figure 4C), the Cox2a domain containing the W56R substitution was fused to the widely-used Su9 presequence from *Neurospora crassa*<sup>22</sup>, while Cox2b was independently directed to the mitochondrial intermembrane space by fusing the sequence termed MISS/ITS (mitochondrial intermembrane space sorting signal/intermembrane space targeting sequence) which targets proteins to the intermembrane space via the Mia40 pathway<sup>23,24</sup>. Additionally, we added an extension to the C-terminal of Cox2a and to the N-terminal of Cox2b (figure 4C). These extensions are present in the corresponding Cox2a and Cox2b subunits from the green algae *Polytomella parva*, and, although we have shown they are not strictly required for the interaction of both Cox2 moieties, they may act by stabilizing the Cox2a/Cox2b heterodimer<sup>25</sup>. Two versions of Cox2b, with and without extensions were tested.

We co-introduced the *COX2A* and *COX2B* gene constructs into the *cox2*-null mutant and could not observe restoration of the respiratory growth (figure 4D). To test if the resulting protein products were imported into mitochondria, we followed the presence of Cox2b (with and without the extension) in the mitochondrial fraction (figure 4E). Although we could not detect the Cox2a fragment with our anti-Cox2 antibodies, we

nevertheless found that Cox2b localized to the intermembrane space based on its accessibility to proteinase K treatment in mitoplasts (figure 4F). Our results show that although we could not achieve a successful allotypic expression by splitting the Cox2 protein in yeast, we could localize the Cox2b moiety to the intermembrane space, where it normally resides.

*Lowering the dose of allotypic COX2 expression enhances Cox2 import and assembly in CcO*

While the use of a multicopy plasmid for allotypic expression of *COX2* seemed justified to ensure successful complementation<sup>16</sup>, we wondered if reducing allotypic expression of *COX2* would also proportionally decrease the rescue of the respiratory defect. For this purpose, we opted to test allotypic expression in a condition where the same *COX2* construct from the multicopy plasmid is used as a single copy. To achieve this, we integrated the *COX2* expressing construct (under the same phosphoglycerate kinase promoter and terminator present in the multicopy plasmid) in the nuclear genome. Surprisingly, we observed a notable increase in respiratory growth in the strains expressing the nuclear-integrated constructs producing Cox2<sup>W56R</sup> and Cox2<sup>V49Q/L51G</sup> compared to the strains producing the same Cox2 variants from a multicopy plasmid (figure 5A). Growth of the yeast containing the single-copy *COX2<sup>W56R</sup>* construct was even comparable to a wild-type strain, and the strain containing the single-copy *COX2<sup>V49Q/L51G</sup>* exhibited a more robust respiratory growth than the one with the high-copy *COX2<sup>W56R</sup>* producing construct. The strain producing Cox2<sup>WT</sup> did not display any growth in respiratory medium, even at low doses. Cox2 immunodetection in mitochondria-enriched fractions of these strains showed that, at low dosage, Cox2<sup>W56R</sup> and Cox2<sup>V49Q/L51G</sup> only accumulated in their mature forms (figure 5B). As previously observed, at high dosage, Cox2<sup>W56R</sup> and Cox2<sup>V49Q/L51G</sup> were mainly observed as precursors with only a fraction converted to the mature form. In line with the absence of respiratory growth of the strains carrying the *COX2<sup>WT</sup>* construct, the Cox2<sup>WT</sup> protein was only observed as a precursor and, at low dosage, its steady-state level was extremely low or undetectable (Figure 5B). We observed the same behaviour, *i.e.* lower accumulation of precursors and higher levels of mature forms of Cox2, when the same constructs were expressed in low copies from a centromeric plasmid (data not shown).

The aforementioned results suggest that, although overexpression of allotypic *COX2* constructs is able to restore respiration to *cox2*-null strains, directing high doses of

these proteins to mitochondria at the same time seems to be counterproductive. Since the limiting step resides in the insertion pathway of allotypic Cox2, low-dose expression seems to have a better outcome in terms of recovery of the respiratory growth.

## DISCUSSION

The experimental relocation of mitochondrial genes to the nucleus has paved the way for the development of therapies intended to treat syndromes caused by mutations in the mitochondrial genome<sup>8,26–29</sup>. Ongoing research has unveiled several constraining factors that limit allotypic expression<sup>9,30–32</sup>. Since most proteins encoded in the mitogenome are integral to the membrane, the high hydrophobicity and the number of TMS in these proteins seems to be a major limiting factor for their import when synthesized in the cytosol<sup>5,30</sup>. We turned our attention to the Cox2 subunit to examine the importance of the residues enabling its allotypic production. Previous work demonstrated that substituting a tryptophan for an arginine decreases the hydrophobicity of the first TMS of Cox2 by adding a positive charge. In this study, a substitution for a lysine and glutamine in the same position also allowed recovery of the respiratory growth but, residues containing a positive charge (arginine and lysine) yield better rescue than a residue reducing the hydrophobicity (glutamine). It is possible that Cox2<sup>W56Q</sup> is poorly inserted in the inner membrane because the key determinant for importability is the presence of a positive charge (R<sup>+</sup> or K<sup>+</sup>) and not a reduction of the hydrophobicity (Q) at this position<sup>33,34</sup>. This view is supported by the fact that while a similar amount of Cox2 variant precursors accumulate in the mitochondria, the mature form of Cox2<sup>W56Q</sup> is significantly less abundant than Cox2<sup>W56R</sup> and Cox2<sup>W56K</sup> (Figure 1B). This indicates that Cox2<sup>W56Q</sup> is probably limited in its insertion in the inner membrane. That mature Cox2<sup>W56K</sup> and Cox2<sup>W56R</sup> accumulate at the same level reinforce the view that a positive charge at this position is the key determinant for Cox2 insertion in the membrane when originating from the cytosol.

Here, we designed allotypic Cox2 mutants by reproducing in yeast, naturally occurring mutations in COX2 from legumes. Notably, we observed that the double-substitution reported as key for nuclear expression of Cox2 in *Glycine max* also allowed the allotypically-expressed yeast COX2 to restore respiration of a cox2-null mutant. Similar to what was observed in *in vitro* import assays in legumes<sup>15</sup>, the single independent substitutions V49Q or L51G were insufficient to restore respiration. In line with the cytosolically-synthesized Cox2 biogenesis model<sup>14,19,35</sup>, the first TMS (TMS1) of Cox2 is transferred to the matrix through the TIM23 translocase while the second TMS is

laterally released into the inner membrane by TIM23. As a final step, TMS1 is inserted from the matrix in the inner membrane by Oxa1, positioning Cox2 in its correct topology (figure 5C, left). We assume that in the presence of either substitution (V49Q or L51G), the proteins are inserted incorrectly in the inner membrane because they are too hydrophobic to reach the matrix are released prematurely into the inner membrane by TIM23 (figure 5C, right). Accordingly, only the double substitution, which diminishes the overall hydrophobicity of the TMS1 of Cox2 allows for its correct insertion into the inner membrane.

It should be mentioned that the legume Cox2 substitutions (V49Q L51G) are less efficient in conferring respiratory growth than the W56R which was identified through random mutagenesis<sup>16</sup>. Indeed, the W56R substitution meets Goldilocks conditions: besides maintaining CcO activity intact<sup>19</sup>, it balances the need for diminishing the hydrophobicity of Cox2 TMS1 while keeping it recognisable as a transmembrane domain by the inner membrane translocator Oxa1. Moreover, our finding that low dosage is preferable to overexpression, allows the *COX2<sup>W56R</sup>* construct to almost reach wild-type-like respiration. Notably, in the mitochondrial Cox2 sequence from *Glycine max*, the residue corresponding to position 56 contains an arginine, indicating that a positive charge in the first TMS of Cox2 is permissible, at least in some organisms. Production of low levels of Cox2<sup>V49Q/L51G</sup> results in the accumulation of mature Cox2 at similar level as that of Cox2<sup>W56R</sup>, suggesting that insertion in the inner membrane occurs to the same extent for both Cox2 variants (figure 5B). However, the fact that the rescue with Cox2<sup>V49Q/L51G</sup> is significantly less efficient indicates that the V49Q/L51G modifications impact the activity of the yeast enzyme. Furthermore, we observed that the combination of the W56R substitution with the V49Q and L51G changes did not improve respiratory growth, resulting in a neutral behaviour of W56R (or even a lower CcO activity as observed in figure 2C). We assume that despite the fact these mutations enable respiratory growth; they may also start to affect CcO activity. Another possibility is that the hydrophobicity of the first TMS of the Cox2<sup>L47Q/V49G/W56R</sup> subunit is lowered to such an extent that it is not promptly recognized as a transmembrane domain and it is therefore not routed for insertion into the inner membrane by the Oxa1 translocator.

Our experiments indicate that allotypically expressed proteins face the limiting step in their biogenesis when passing through the TOM and TIM23 translocases, since Cox2 protein levels and mitochondrial import clearly seem not to be constraining factors. When we lowered the *COX2* expression levels by integrating the *COX2* gene in the

nuclear genome, we observed a notable increase in the rescue of the *cox2*-null strain, which correlated with lower levels of precursor and corresponding enhanced levels of mature Cox2. It is conceivable that excess of cytosolically-synthesized Cox2 saturates the mitochondrial translocases, limiting the import of allotypic Cox2 and also affecting the import of other mitochondria-targeted proteins (figure 5D). All reports of allotypic expression in either yeast or cell cultures use high level expression plasmids, in order to ensure a high accumulation of the desired protein products inside mitochondria<sup>31,36-42</sup>. Here, we found that a high-level expression of the allotypically-expressed Cox2 protein may be detrimental to the mitochondrial import system. Accordingly, while exploring the allotypic expression of the gene encoding subunit a (Atp6) of ATP synthase in mammalian systems, Bokori-Brown and Holt reported that high-level production of this protein was associated with low membrane potential<sup>39</sup>, presumably due to saturation of mitochondrial protein import leading to disturbances to the mitochondrial inner membrane.

In summary, we provide here proof of principle that mimicking the modifications found in an organism that naturally transferred its mitochondrial gene to the nucleus can result in successful allotypic expression. This strategy includes expressing a single copy of the gene to ensure precise quantities for mitochondrial import, combined with mutations conferring allotypic expression. Our results underscore a previously unexplored important parameter for achieving allotypic expression in mammals, especially in human cell lines, where its relevance may increase exponentially since it still represents an important strategy for developing treatments for patients with mitochondrial diseases. Our data also stress the relevance in studying organisms that naturally and atypically encode hydrophobic mitochondrial OXPHOS proteins in the nuclear genome.

## MATERIALS AND METHODS

### ***Strains, gene constructs and culture conditions***

The *S. cerevisiae* strains used in this study were derived from the D273-10B parental strain. We used NB40-36A as the wild-type strain (*MATa, arg8::hisG, leu2-3, 112, lys2, ura3-52, [rho+]*), EHW154 as the  $\Delta$ *cox2* strain (*MATa, arg8::hisG, his3-ΔHindIII, leu2-3, 112, lys2, ura3-52, [rho+] cox2-208::ARG8m*) and CAB116 as the  $\Delta$ *cox18* strain (*MATa, arg8::hisG, his3-ΔHindIII, leu2-3, 112, lys2, ura3-53, cox18Δ::KanMX4 [rho+]*). Cells were grown on YPD as fermentable medium (1% yeast extract, 2% bactopeptone, and 2% dextrose or galactose) or YPEG as non-fermentable medium

(1% yeast extract, 2% bactopeptone, 3% ethanol and 3% v/v glycerol). Minimal medium was SD or SGal (0.17% yeast nitrogen base [without amino acids and  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ], 0.5%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2% glucose or galactose supplemented with specific amino acids and nucleotides). All strains were grown at 30 °C in liquid (with shaking) or solid medium (containing 1.75% agar). We calculated duplication times by measuring the absorbance of cultures with an initial O.D.<sub>600</sub> of 0.01 every 2 h in a Bioscreen C spectrophotometer (Growth Curves, USA). Dilution series were performed by diluting 10-fold a culture of 0.5 O.D.<sub>600</sub> and plating 3 µL on petri dishes with the indicated media.

The yeast alltopic *COX2<sup>W56R</sup>* gene was recoded for expression from the nucleus and a sequence encoding the MTS of Oxa1 was added at the 5' end, as previously described<sup>16</sup>. The construct was chemically synthesized (GeneScript, Piscataway, NJ, USA) and cloned at the *NotI* site in the pFL61 vector which contains a phosphoglycerate kinase (*PGK*) promoter and terminator<sup>43</sup>.

Additional *COX2* mutations (WT, W56K, W56Q, V49Q, L51G, V49Q/L51G, L47Q/V49G, L47Q/V49G/W56R) were constructed on the pFL61 plasmid containing the *COX2<sup>W56R</sup>* insert using site-directed mutagenesis, according to the manufacturer's instructions (QuikChange II site-directed mutagenesis kit, Agilent Technologies). The presence of the site-directed mutations was confirmed by DNA sequencing. The splitting of Cox2 into Cox2a<sup>W56R</sup>-ext and ext-Cox2b was designed based on sequence alignments with its counterparts in *Polytomella parva* (see text). Nuclear localization was achieved by integrative transformation of the pRS306H<sup>44</sup> plasmid into the *URA3* nuclear locus, followed by hygromycin B selection. The fragments containing the *COX2* constructs flanked by the *PGK* promoter and terminator were cloned from pFL61 into pRS306H upon digestion with *HindIII* and *SmaI* restriction enzymes.

Yeast cells were transformed in the presence of lithium acetate and salmon sperm DNA as described<sup>45</sup>. At least twelve transformed individual colonies were grown in petri dishes containing fresh SD medium and then were replica-plated into YPEG to ensure that the selected colonies had a similar respiratory growth to the rest of the transformants.

#### ***Isolation of yeast mitochondria***

Mitochondria were isolated from 100–200 mL of liquid SGal cultures as previously reported<sup>46</sup>. Briefly, cells were harvested at logarithmic growth phase (O.D.<sub>600</sub> 0.8–1.0), washed with H<sub>2</sub>O at 4,500 rpm in a Beckman Coulter JA-25.5 rotor (2500 × g) for 5 min, resuspended in TD buffer (100 mM Tris, 10 mM DTT) and centrifuged at 4,500 rpm (2500 × g) for 5 min. The cells were resuspended in 10 mL of zymoliase buffer

(1.2 mM sorbitol, 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [pH 7.4], 3-5 mg zymoliase/g of wet weight), incubated for 1 h in a shaker at 30 °C and centrifuged at 4,500 rpm (2500 x g) for 5 min at 4 °C. The pellet was resuspended in 1 mL of Dounce buffer (0.6 M sorbitol, 10 mM Tris [pH 7.4], 1 mM EDTA, 0.2 % BSA, 1 mM PMSF) using a homogenizer and pestle (30 strokes). Samples were transferred to 1.5 mL tubes and centrifuged at 4,500 rpm in a microcentrifuge (2000 x g) for 5 min at 4 °C. The supernatants were transferred to new tubes and centrifuged at 12,000 rpm (13500 x g) for 10 min at 4 °C. The supernatant (cytosolic fraction) was collected in new tubes and the pellet (mitochondrial fraction) was resuspended in 100 µL of SH buffer (0.6 M sorbitol, 20 mM Hepes, pH 7.4). Protein concentration was determined by a modified Lowry method<sup>47</sup>. Mitochondria and cytosolic fractions were frozen and stored at -70 °C until use.

#### ***Proteinase K protection assays***

For protease treatment of mitochondria, 50 µg of mitochondria were gently resuspended in 100 µL of SH buffer and incubated at 20 °C for 30 min in the presence of 100 µg/mL Proteinase K, parallel reactions were made in the presence of 1% Triton X-100. Four mM PMSF was added to all suspensions, which were then incubated on ice for 10 min and centrifuged at 14,000 rpm (18400 x g) for 10 min. Most of the supernatant in each tube was discarded; the pellet was resuspended with 4 µL of 6x loading buffer (375 mM Tris-HCl [pH 6.8], 6% SDS, 48% glycerol, 9% β-mercaptoethanol) +4 mM PMSF and incubated for 1 min in boiling water before loading onto 12% SDS-tricine-PAGE gels.

#### ***Sodium carbonate extraction***

Integral membrane proteins were separated from peripheral or soluble proteins by carbonate extraction. Briefly, 50 µg of mitochondria were incubated with 100 µL of cold 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 11.0) for 30 min on ice. The samples were centrifuged at 90,000 x g in a TLA 55 rotor for 30 min at 4 °C. Supernatants and pellets were incubated with 500 µL of 12.5% TCA for 15 min on ice, followed by centrifugation for 15 min at 14,000 rpm (18400 x g) at 4 °C. Samples were washed by adding 500 µL of cold 100% acetone, centrifuged for 10 min at 14,000 rpm (18400 x g) at 4 °C and dried for ~10 min at room temperature. The dried pellets were resuspended in 15 µL of 1x loading buffer and incubated for 1 min in boiling water before loading onto 12% SDS-tricine-PAGE gels.

#### ***Gel electrophoresis and in-gel enzymatic activities***

Denaturing gel electrophoresis was carried out via SDS-tricine-polyacrylamide gels at 12% acrylamide<sup>48</sup>. Sample preparation and Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (BN-PAGE) were carried out as described<sup>49</sup>. Briefly, mitochondria were washed twice in 250 mM sorbitol, 50 mM Bis-Tris (pH 7.0), and centrifuged at 12,000 rpm (13500 x 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 g of lauryl maltoside per g of protein for 30 min with gentle stirring and centrifuged at 13,200 rpm (16400 x g) at 4 °C for 12 min. The supernatants were loaded on 5-15% polyacrylamide gradient gels. The stacking gel contained 4% (w/v) polyacrylamide. In-gel activities were carried out following established procedures for CcO activity<sup>50,51</sup> and ATPase activity<sup>52,53</sup>. Gels were stained with Coomassie solution (50% ethanol, 10% acetic acid, 0.1% Coomassie Brilliant Blue G) or otherwise transferred and then subjected to immunodetection.

#### **Immunodetection**

From SDS-tricine-PAGE, proteins were electro-transferred onto a nitrocellulose Trans-Blot membrane (Bio-Rad) for immunodetection. Membranes were washed, blocked, and independently incubated for 8 h with the following antibodies: anti-Cox2 antibody at a 1:9000 dilution (Invitrogen; Molecular Probes), anti-Oxa1 antibody at a 1:1000 dilution, anti-Hog1 antibody at a 1:2000 dilution (Santa Cruz Biotechnology), and anti-Atp2 antibody at a 1:50000 dilution. Alkaline phosphatase-conjugated IgGs (1:15000 for 2 h) were used as secondary antibodies. Insoluble black-purple precipitates on bands were formed upon addition of nitro-blue tetrazolium chloride and 5-bromo-4-chloro-3'-indolyl phosphate p-toluidine salt. Images of the immunodecorated polypeptide bands were captured in a HP Scanjet G4050. For immunodetection on previously probed membranes using a different primary antibody, membranes were stripped by incubation for 45 min at 50 °C in the presence of 2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8 and 100 mM β-mercaptoethanol.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

We are grateful to Miriam Vázquez-Acevedo and Nallely Cabrera (IFC, UNAM) for their expert technical assistance in making some of the constructs used in the present study. We thank Thomas D. Fox (Cornell University) for the gift of most of the strains used in this project, Soledad Funes (UNAM) for the kind gift of the Hog1 antibody and the *Δcox18* strain, and Johannes M. Herrmann (Technische Universität Kaiserslautern) for the kind gift of the Oxa1 antibody. We also acknowledge Soledad Funes and Juan Miranda Ríos for all the insightful comments throughout this project.

This work was partially supported by grants 239219 and 279125 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, Mexico) and IN 208917 from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM, Mexico) to D.G.-H. CONACyT also supported with a fellowship the graduate studies of D.R.-G. The two summer research stays of P.P.H. in Mexico during 2015 and 2016 were supported by the program PREI from DGAPA-UNAM. This manuscript partially fulfills the requirements of D.R.-G. to obtain a Ph.D. degree from the Biomedical Sciences Ph.D. program (Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México).

#### REFERENCES

1. Adams K, Palmer JD. Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. *Mol Phylogenet Evol.* 2003;29(3):380-395. doi:10.1016/S1055-7903(03)00194-5.
2. Burger G, Gray MW, Lang BF. Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends Genet.* 2003;19(12):709-716. doi:10.1016/j.tig.2003.10.012.
3. Timmis JN, Ayliffe M a, Huang CY, Martin W. Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat Rev Genet.* 2004;5(2):123-135. doi:10.1038/nrg1271.
4. Martin W, Herrmann RG. Update on Gene Transfer from Organelles to the Nucleus. *Gene Transfer from Organelles to the Nucleus : How Much , What Happens , and Why ? Plant Physiol.* 1998;118:9-17.
5. Johnston IG, Williams BP. Evolutionary inference across eukaryotes identifies specific pressures favoring mitochondrial gene retention. *Cell Syst.* 2016;2(2):101-111. doi:10.1016/j.cels.2016.01.013.
6. de Grey AD. Mitochondrial gene therapy: an arena for the biomedical use of inteins. *Trends Biotechnol.* 2000;18(9):394-399. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10942964>. Accessed June 30, 2017.
7. DiMauro S, Hirano M, Schon EA. Approaches to the treatment of mitochondrial diseases. *Muscle Nerve.* 2006;34(3):265-283. doi:10.1002/mus.20598.
8. Kyriakouli DS, Boesch P, Taylor RW, Lightowers RN. Progress and prospects: gene therapy for mitochondrial DNA disease. *Gene Ther.* 2008;15(14):1017-1023. doi:10.1038/gt.2008.91.
9. Oca-Cossio J, Kenyon L, Hao H, Moraes CT. Limitations of Allotopic Expression of Mitochondrial Genes in Mammalian Cells. *Genetics.* 2003;165(October):707-720.
10. Perales-Clemente E, Fernández-Silva P, Acín-Pérez R, Pérez-Martos A, Enríquez JA. Allotopic expression of mitochondrial-encoded genes in mammals: achieved goal, undemonstrated mechanism or impossible task? *Nucleic Acids Res.* 2011;39(1):225-234. doi:10.1093/nar/gkq769.
11. Adams KL, Song K, Roessler PG, et al. 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. 1999;96(24):13863-13868.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC13863/>
12. Pérez-Martínez X, Antaramian a, Vazquez-Acevedo M, et al. Subunit II of cytochrome c oxidase in Chlamydomonad algae is a heterodimer encoded by two independent nuclear genes. *J Biol Chem.* 2001;276(14):11302-11309. doi:10.1074/jbc.M010244200.
13. Szafranski P. Evolutionarily recent, insertional fission of mitochondrial cox2 into complementary genes in bilaterian Metazoa. *BMC Genomics.* 2017;18(1):269. doi:10.1186/s12864-017-3626-5.
14. Daley DO, Adams KL, Clifton R, et al. Gene transfer from mitochondrion to nucleus: novel mechanisms for gene activation from Cox2. *Plant J.* 2002;30(1):11-21.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC11967089/>
15. Daley DO, Clifton R, Whelan J. Intracellular gene transfer: reduced hydrophobicity facilitates gene transfer for subunit 2 of cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(16):10510-10515. doi:10.1073/pnas.122354399.
16. Supekova L, Supek F, Greer JE, Schultz PG. A single mutation in the first transmembrane domain of yeast COX2 enables its allotypic expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(11):5047-5052. doi:10.1073/pnas.1000735107.
17. Cruz-Torres V, Vázquez-Acevedo M, García-Villegas R, Pérez-Martínez X, Mendoza-Hernández G, 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. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg.* 2012;1817(12). doi:10.1016/j.bbabi.2012.09.006.
18. Elliott LE, Saracco SA, Fox TD. Multiple roles of the Cox20 chaperone in assembly of *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome c oxidase. *Genetics.* 2012;190(2):559-567. doi:10.1534/genetics.111.135665.
19. Rubalcava-Gracia D, Vázquez-Acevedo M, Funes S, Pérez-Martínez X, González-Halphen D. Mitochondrial versus nuclear gene expression and membrane protein assembly: The case of subunit 2 of yeast cytochrome c oxidase. *Mol Biol Cell.* 2018;mbc.E17-09-0560. doi:10.1091/mbc.E17-09-0560.
20. Calado-Botelho S, Osterberg M, Reichert AS, et al. TIM23-mediated insertion of transmembrane  $\alpha$ -helices into the mitochondrial inner membrane. *EMBO J.* 2011;30(6):1003-1011. doi:10.1038/emboj.2011.29.
21. Funes S, Davidson E, Magallo S, Herion P, King MP, González-Halphen D. A Green Algal Apicoplast Ancestor. *Science (80- ).* 2002;298:2155.
22. Hartl FU, Pfanner N, Nicholson DW, Neupert W. Mitochondrial protein import. *Biochim Biophys Acta.* 1989;988(1):1-45. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2642391/>. Accessed December 5, 2018.
23. Milenkovic D, Ramming T, Mu JM, et al. Identification of the Signal Directing Tim9 and Tim10 into

- the Intermembrane Space of Mitochondria. 2009;20:2530-2539. doi:10.1091/mbc.E08.
24. Sideris DP, Petrakis N, Katrakili N, et al. A novel intermembrane space-targeting signal docks cysteines onto Mia40 during mitochondrial oxidative folding. *J Cell Biol*. 2009;187(7):1007-1022. doi:10.1083/jcb.200905134.
  25. Jiménez-Suárez A, Vázquez-Acevedo M, Miranda-Astudillo H, González-Halphen D. Cox2A/Cox2B subunit interaction in Polytomella sp. cytochrome c oxidase: role of the Cox2B subunit extension. *J Bioenerg Biomembr*. 2017;49(6):453-461. doi:10.1007/s10863-017-9728-6.
  26. González-Halphen D, Funes S, Pérez-Martínez X, et al. Genetic Correction of Mitochondrial Diseases. *Ann New York Acad Sci*. 2004;1019:232-239.
  27. Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet*. 2005;6(5):389-402. doi:10.1038/nrg1606.
  28. Calvo SE, Mootha VK. The mitochondrial proteome and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2010;11:25-44. doi:10.1146/annurev-genom-082509-141720.
  29. Gorman GS, Chinnery PF, DiMauro S, et al. Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Prim*. 2016;2:1-23. doi:10.1038/nrdp.2016.80.
  30. Claros MG, Perea J, Shu Y, Samatey FA, Popot JL, Jacq C. Limitations to in vivo import of hydrophobic proteins into yeast mitochondria. The case of a cytoplasmically synthesized apocytochrome b. *Eur J Biochem*. 1995;771:762-771.
  31. Figueroa-Martínez F, Vázquez-Acevedo M, Cortés-Hernández P, et al. What limits the allotropic expression of nucleus-encoded mitochondrial genes? The case of the chimeric Cox3 and Atp6 genes. *Mitochondrion*. 2011;11(1):147-154. doi:10.1016/j.mito.2010.09.003.
  32. Björkholm P, Ernst AM, Hagström E, Andersson SGE. Why mitochondria need a genome revisited. *FEBS Lett*. 2017;591:65-75. doi:10.1002/1873-3468.12510.
  33. von Heijne G. Membrane protein structure prediction: Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J Mol Biol*. 1992;225(2):487-494. doi:10.1016/0022-2836(92)90934-C.
  34. Andersson H, von Heijne G. Membrane protein topology: effects of delta mu H+ on the translocation of charged residues explain the "positive inside" rule. *EMBO J*. 1994;13(10):2267-2272. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8194517>. Accessed November 5, 2018.
  35. Jiménez-Suárez A, Vázquez-Acevedo M, Rojas-Hernández A, Funes S, Uribe-Carvajal S, González-Halphen D. In Polytomella sp. mitochondria, biogenesis of the heterodimeric COX2 subunit of cytochrome c oxidase requires two different import pathways. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1817(5):819-827. doi:10.1016/j.bbabi.2012.02.038.
  36. Cberman-Thibault H, Augustin S, Lechauve C, et al. Nuclear expression of mitochondrial ND4 leads to the protein assembling in complex I and prevents optic atrophy and visual loss. *Mol Ther — Methods Clin Dev*. 2015;2(October 2014):15003. doi:10.1038/mtm.2015.3.
  37. Manfredi G, Fu J, Ojaimi J, et al. Rescue of a deficiency in ATP synthesis by transfer of MTATP6, a mitochondrial DNA-encoded gene, to the nucleus. *Nat Genet*. 2002;30:394-399.

38. Bonnet C, Augustin S, Ellouze S, et al. The optimized allotypic expression of ND1 or ND4 genes restores respiratory chain complex I activity in fibroblasts harboring mutations in these genes. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1783(10):1707-1717. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.04.018.
39. Bokori-Brown M, Holt IJ. 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.* 2006;9(4):455-469.
40. Guy J, Qi X, Pallotti F, et al. Rescue of a mitochondrial deficiency causing Leber hereditary optic neuropathy. *Ann Neurol.* 2002;52(5):534-542.
41. Ojaimi J, Pan J, Santra S, Snell WJ, Schon EA. An Algal Nucleus-encoded Subunit of Mitochondrial ATP Synthase Rescues a Defect in the Analogous Human Mitochondrial-encoded Subunit. *Mol Biol Cell.* 2002;13(November):3836-3844. doi:10.1091/mbc.E02.
42. Boominathan A, Vanhoozer S, Basisty N, et al. Stable nuclear expression of ATP8 and ATP6 genes rescues a mtDNA Complex V null mutant. *Nucleic Acids Res.* 2016;1-16. doi:10.1093/nar/gkw756.
43. Minet M, Dufour M, Lacroute F. Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* cDNAs. 1992;2(3):417-422.
44. Taxis C, Knop M. System of centromeric, episomal, and integrative vectors based on drug resistance markers for *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechniques.* 2006;40(1):73-78. doi:10.2144/000112040.
45. Gietz RD, Schiestl RH. Quick and easy yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc.* 2007;2(1):35-37. doi:10.1038/nprot.2007.14.
46. Herrmann JM, Fölsch H, Neupert W, Stuart RA. Isolation of yeast mitochondria and study of mitochondrial protein translation. In: *Cell Biology: A Laboratory Handbook Vol. 1*, Academic Press, San Diego.; 1994:538-544.
47. Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem.* 1978;87(1):206-210. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/98070>. Accessed August 3, 2017.
48. Schagger H. Denaturing electrophoretic techniques. In: *A Practical Guide to Membrane Protein Purification*, Academic Press, San Diego.; 1994:55-79.
49. Schagger H. Native gel electrophoresis. In: *A Practical Guide to Membrane Protein Purification*, Academic Press, San Diego.; 1994:81-104.
50. Wittig I, Schagger H. Electrophoretic Methods to Isolate Protein Complexes from Mitochondria. In: *Methods in Cell Biology*. Vol 80.; 2007:723-741. doi:10.1016/S0091-679X(06)80033-6.
51. Wittig I, Karas M, Schagger H. High Resolution Clear Native Electrophoresis for In-gel Functional Assays and Fluorescence Studies of Membrane Protein Complexes. *Mol Cell Proteomics.* 2007;6(7):1215-1225. doi:10.1074/mcp.M700076-MCP200.
52. Zerbetto E, Vergani L, Dabbeni-Sala F. Quantification of muscle mitochondrial oxidative

- phosphorylation enzymes via histochemical staining of blue native polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. 1997;18(11):2059-2064. doi:10.1002/elps.1150181131.
53. Wittig I, Schägger H. Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics*. 2005;5(17):4338-4346. doi:10.1002/pmic.200500081.

### Figure legends

Figure 1. Substituting position 56 with residues of similar properties to arginine in allotypic Cox2 restores cellular respiration to a cox2-null strain. (A) Ten-fold serial dilutions of yeast liquid cultures from strains transformed with the indicated constructs or with an empty vector (plasmid) were plated on fermentable (Glucose), respiratory (Ethanol+glycerol) and minimal, selective media (-ura or -arg). (B) Immunoblots decorated with an anti-Cox2 antibody of cytosolic (c) (100 µg) and mitochondrial (m) (50 µg) fractions of the indicated yeast strains. The Cox2 precursor and mature forms of Cox2 are indicated. Antibodies anti-Atp2 and anti-Oxa1 were used to immunodetect the corresponding mitochondrial markers and anti-Hog1 was used for the cytosolic marker.

Figure 2. Mutations that allow the nuclear expression of COX2 in legumes also confer allotypic expression in yeast. (A) Sequence alignments of the first transmembrane segment (TMS1) from the yeast Cox2 (mScCox2), the mitochondrial Cox2 version of *Glycine max* (mGmCox2) and the nuclear Cox2 version of *Glycine max* (nGmCox2). An \* (asterisk) indicates positions which have fully conserved residues, a : (colon) indicates conservation between residues of strongly similar properties and a . (period) indicates conservation between residues of weakly similar properties. Boxes indicate the key changes that occurred in the legume sequence (see text). Two yeast Cox2 constructs were made based on this alignment: Cox2<sup>V49Q/L51G</sup> and Cox2<sup>L47Q/V49G</sup> (B) Ten-fold serial dilutions of yeast cultures from the indicated strains were spotted on fermentable (Glucose), respiratory (Ethanol+glycerol) and minimal, selective media (-ura or -arg). (C) In-gel activity staining of complex IV and of complex V, as a loading control. Isolated mitochondria (250 µg) from the indicated strains were solubilized with lauryl maltoside and resolved by BN-PAGE. (D) Strains (WT, Δcox2 and Δcox18) were plated on fermentable (Glucose), respiratory (Lactate) and minimal, selective media (-ura or -arg).

Figure 3. The allotypically-synthesized proteins face the limiting step in their biogenesis when passing through the outer and inner membrane translocators. (A) Immunoblots decorated with anti-Cox2 of cytosolic (c) (100 µg) and mitochondrial (m) (50 µg) fractions. Arrows indicate the precursor and mature forms of Cox2. The mitochondrial markers Oxa1 and the cytosolic marker Hog1 were decorated with their corresponding antibodies. (B) Isolated mitochondria (50 µg) were treated with proteinase K (PK) to degrade proteins external to the outer membrane. Parallel samples were preincubated with Triton X-100 (TX100) to dissolve the membranes and to make all mitochondrial proteins accessible to protease degradation. The asterisk indicates a partial degradation of Cox2 possibly due to an imperfect mitochondrial preparation. (C) Carbonate extraction separating the membrane extrinsic proteins in the supernatant (S) from the integral membrane proteins in the pellet (P) from yeast expressing the indicated constructs. Atp2 was used as a soluble protein marker and Oxa1 as an integral membrane protein marker.

Figure 4. A split yeast Cox2 subunit, emulating the naturally nucleus-encoded Cox2a and Cox2b subunits of green algae, fails to restore cellular respiration. (A) Cox2 protein sequence indicating the fragments that correspond to Cox2a (blue) and Cox2b (green). (B) Tertiary structure model indicating the segments that correspond to Cox2a (blue) and Cox2b (green) forming a heterodimer that is equivalent to the Cox2 full-length protein. (C) Cox2a and Cox2b constructs are illustrated: On top, Cox2a is fused to the MTS of Su9 at its N-terminus and to the corresponding extension from *Polytomella parva* at its C-terminal (yellow). At the bottom, the N-terminus of Cox2b is fused to a mitochondrial intermembrane space sorting signal (MISS) followed by the corresponding extension from *Polytomella parva* (grey). (D) Ten-fold serial dilutions of yeast cultures from the indicated strains were spotted on fermentable (Glucose), respiratory (Ethanol + glycerol) and minimal, selective media (-leu, -his or both). (E) Immunoblot of isolated mitochondria (50 µg) from the indicated strains. Arrows indicate the full-length Cox2 (Cox2), Cox2b with the extension (Cox2b<sup>ext</sup>) and Cox2b without the extension (Cox2b). The fragment corresponding to Cox2a could not be detected by the anti-Cox2 antibody, which only recognizes the C-terminal of the orthodox Cox2. (F) Proteinase K (PK) protection assay of Cox2 in mitoplasts. Mitoplasts were prepared by hypoosmotic shock and incubated with proteinase K (PK). The asterisk indicates partial degradation of the full-length Cox2 as previously observed<sup>19</sup>. Oxa1 was used as an intermembrane space marker due to its accessibility to PK degradation in mitoplasts (our anti-Oxa1 antibody recognizes the N-terminal of Oxa1) and Atp2 as a mitochondrial matrix marker.

Figure 5. Lowering the expression of allotypic *COX2* improves respiratory growth. (A) Ten-fold serial dilutions of yeast cultures from the indicated strains were plated on fermentable (Glucose); respiratory (Ethanol+glycerol); minimal, selective media (-arg or -ura) and in the presence of hygromycin B (+hygB). Letter p represents expression from a multi-copy plasmid and letter n represents expression from a single copy inserted in the nuclear genome. (B) Cox2 expression in isolated mitochondria (50 µg) from the indicated strains. Arrows indicate the precursor and mature forms of Cox2. Letters p and n indicate expression levels as in A. (C) Biogenesis model of allotypically-synthesized Cox2. On the left, insertion of Cox2 resulting into its correct topology. On the right, the high hydrophobicity of the first TMS leads to Cox2 being prematurely released by TIM23 and to its incorrect insertion. (D) Model of mitochondrial protein import of allotypically-synthesized Cox2. On the left, the mitochondrial import machinery is saturated by the overexpression of allotypically-synthesized Cox2. On the right, a lower expression of this protein allows the import of other mitochondria-targeted proteins through free translocases. TOM: translocase of the outer membrane, TIM: translocase of the inner membrane, MPP: mitochondrial processing peptidase, MTS: mitochondrial targeting sequence.

Figure 1

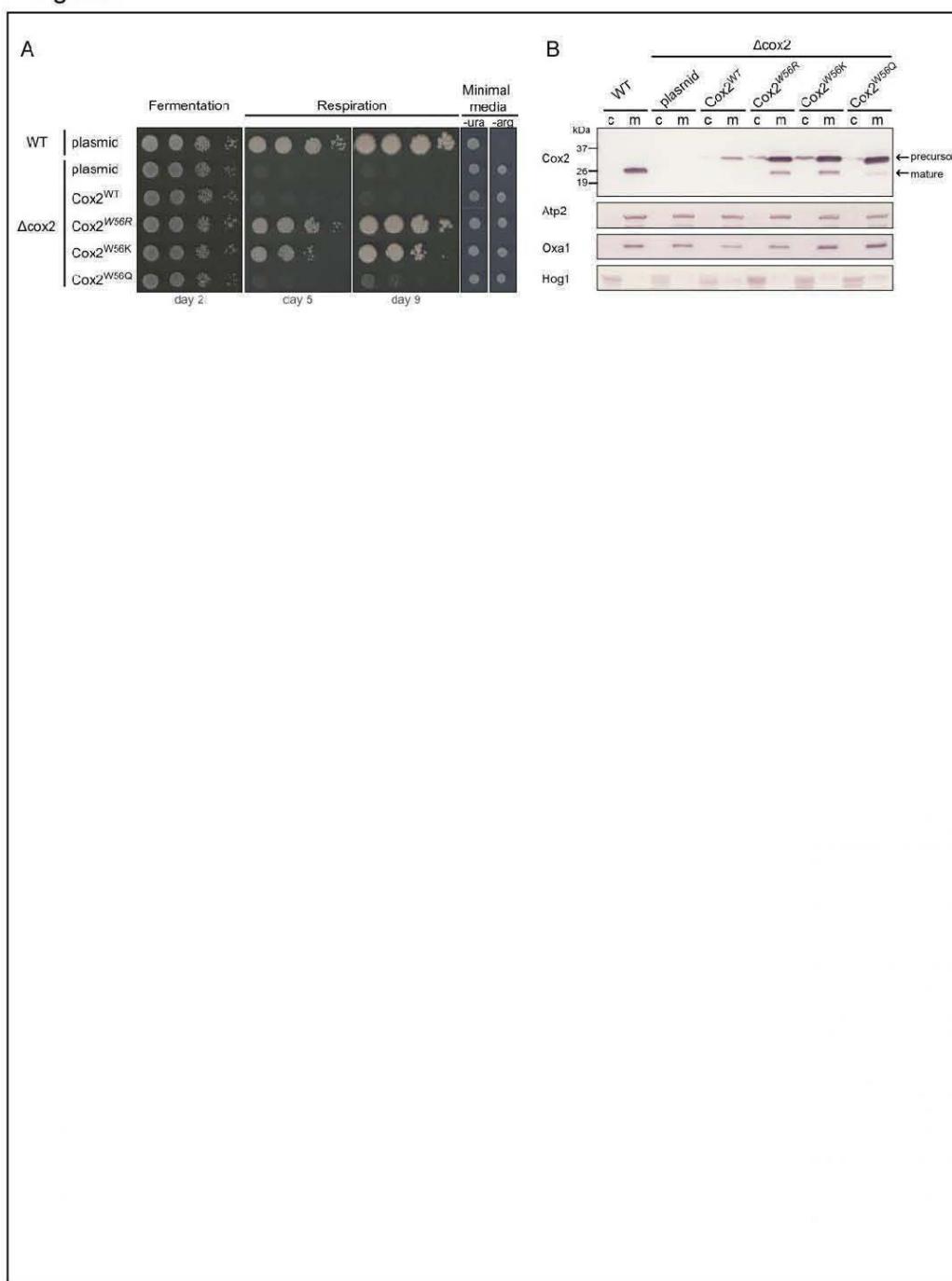


Figure 2

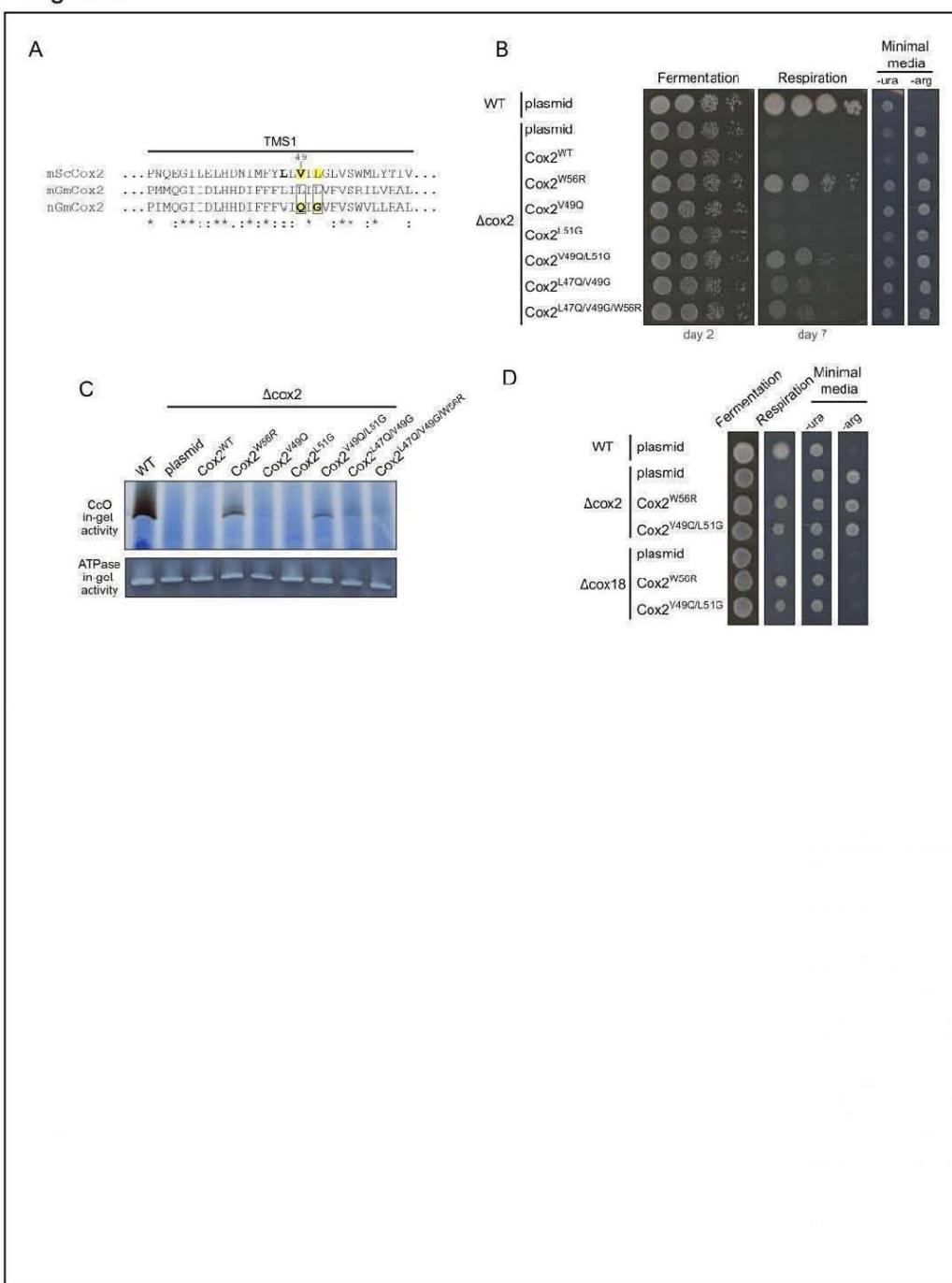


Figure 3

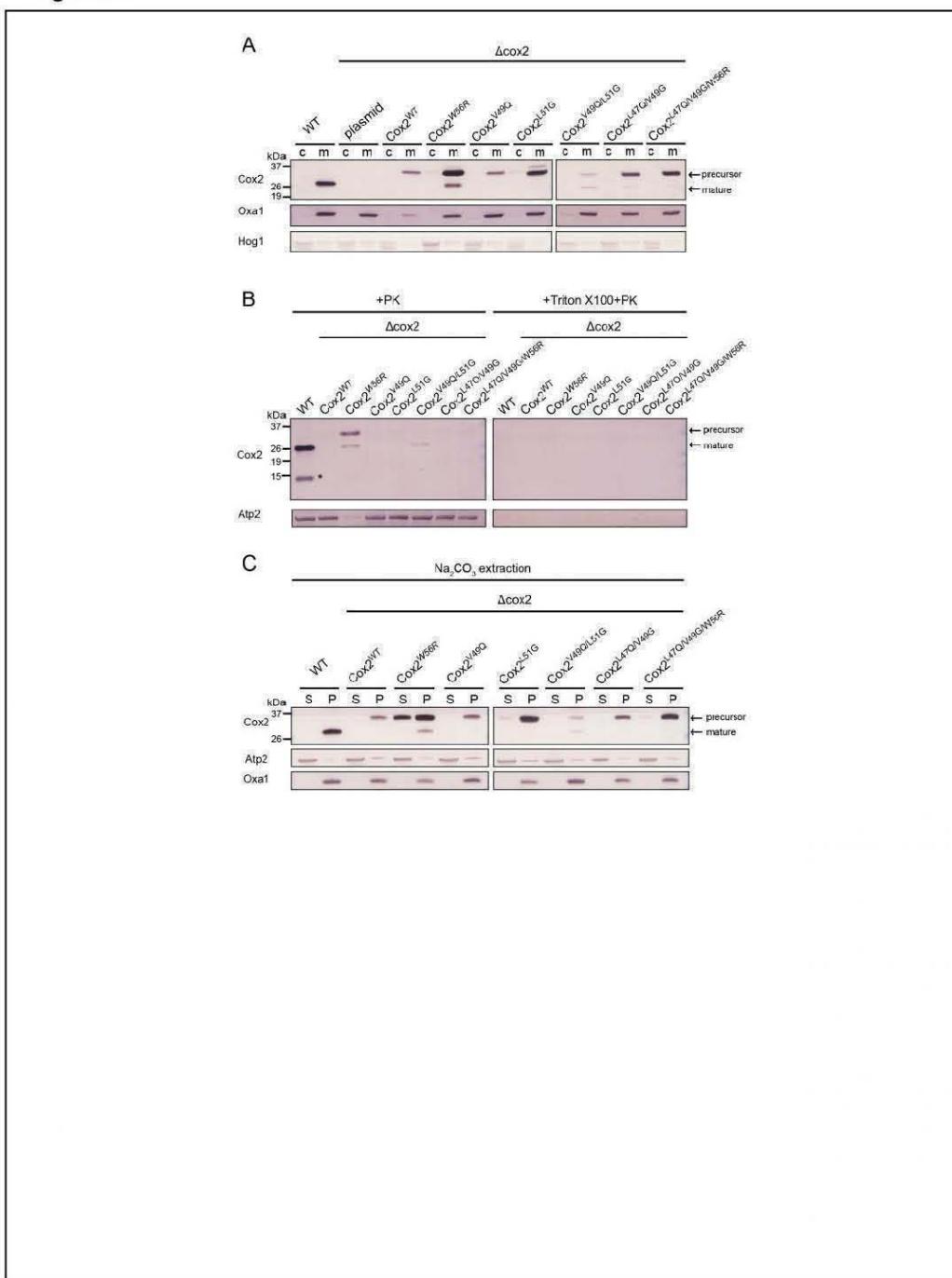


Figure 4

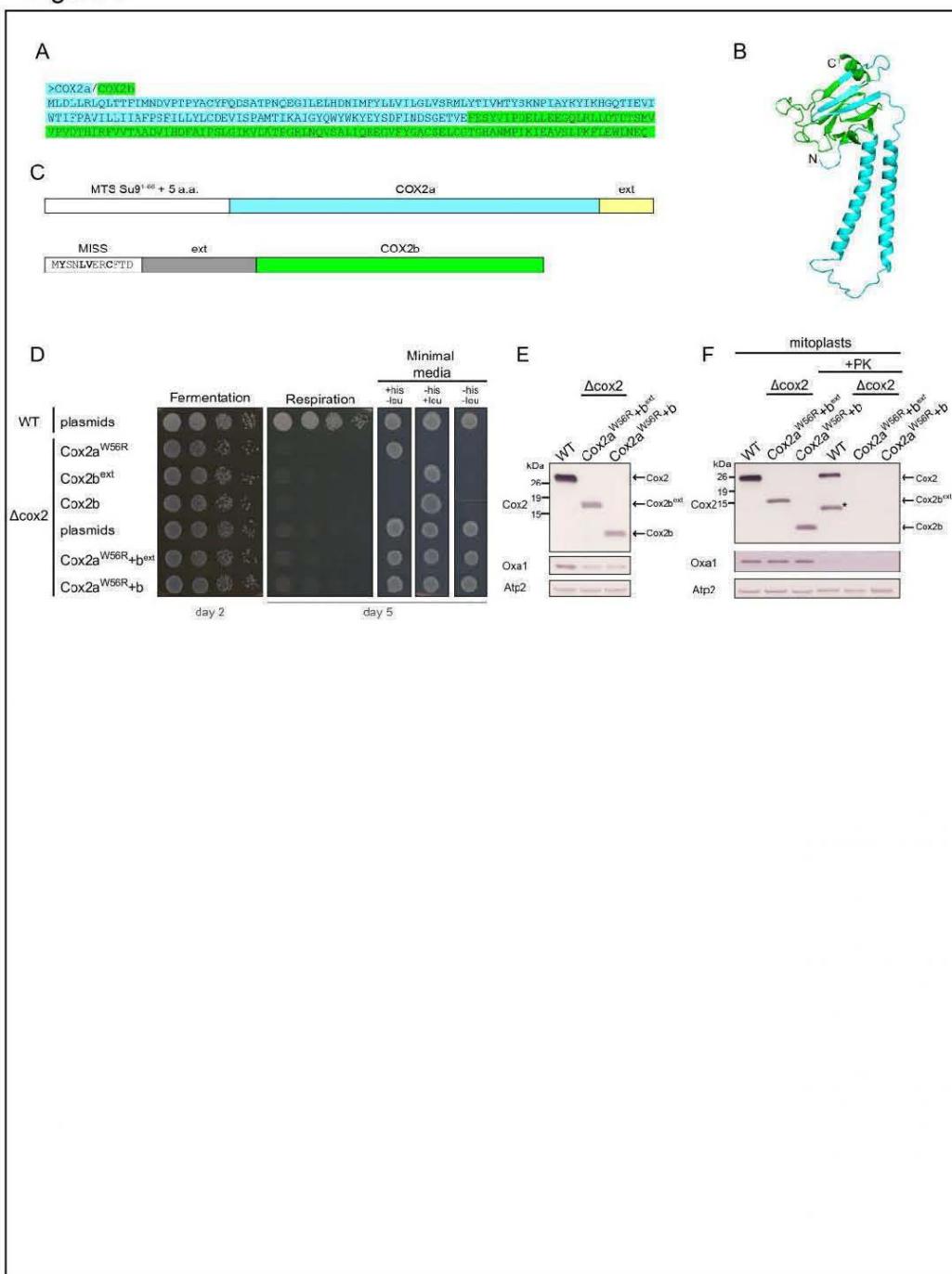
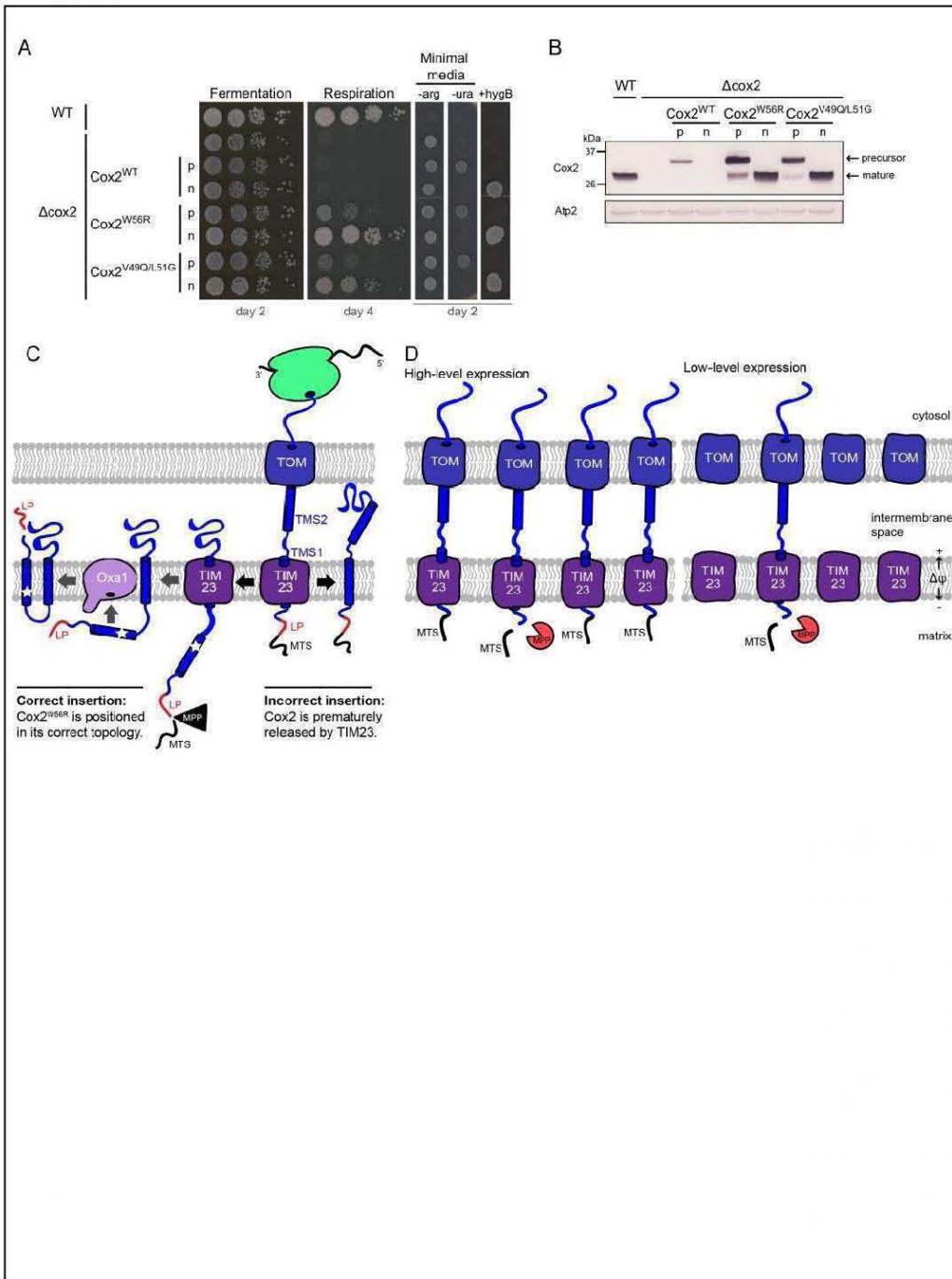


Figure 5



### 6.3 Degradación de Cox2 por proteasas mitocondriales (objetivo vii)

En los compartimentos mitocondriales existen proteasas de mantenimiento que reconocen y degradan proteínas mal plegadas o dañadas<sup>117</sup>. Es posible que una fracción de Cox2<sup>W56R</sup> que llega a la membrana interna desde el citosol sea degradada por estas proteasas, como se ha reportado en la expresión alotópica de otras proteínas mitocondriales<sup>48</sup>. Nos preguntamos si habría un crecimiento respiratorio más eficiente en una cepa que exprese alotópicamente a Cox2<sup>W56R</sup> y que a la vez carezca del gen COX2 mitocondrial, así como de otro gen que codifique para alguna proteasa mitocondrial.

Obtuvimos una colección de cepas, incluyendo una cepa doble mutante, en colaboración con el Doctor J.P. di Rago de la Universidad de Burdeos. Esta cepa carece del gen mitocondrial COX2, así como del gen que codifica para Yme1 ( $\Delta$ cox2/ $\Delta$ yme1), una subunidad que forma parte de un complejo con actividad de proteasa que degrada proteínas del espacio intermembranal. La cepa doble mutante  $\Delta$ cox2/ $\Delta$ yme1 transformada con Cox2<sup>W56R</sup> tiene una mayor recuperación del crecimiento respiratorio comparada con la cepa  $\Delta$ cox2 sencilla transformada con Cox2<sup>W56R</sup> (Figura 7A). Estos resultados sugieren que la ausencia de la proteasa favorece la importación de Cox2<sup>W56R</sup> para recuperar la respiración.

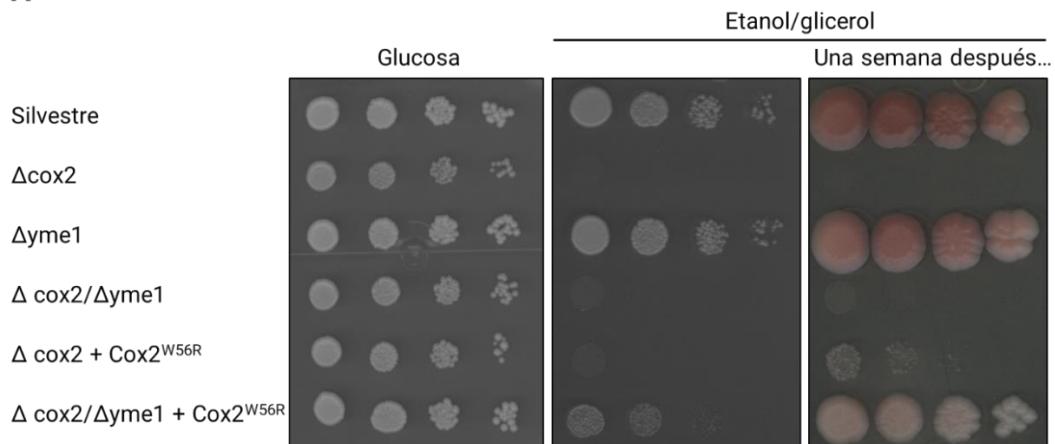
La acumulación del precursor de Cox2<sup>W56R</sup>, así como su procesamiento a la forma madura, es muy similar entre la doble mutante y la mutante sencilla (Figura 7B). Este resultado indica que los niveles basales de proteína no son los que determinan las diferencias observadas en el crecimiento respiratorio.

Realizamos ensayos de actividad de CcO en geles nativos para observar diferencias entre las cepas. La actividad de este complejo es muy similar entre la cepa  $\Delta$ cox2/ $\Delta$ yme1 y la cepa  $\Delta$ cox2, ambas transformadas con Cox2<sup>W56R</sup> alotópica. Incluso, la actividad de CcO en la cepa silvestre es comparable con la de las dos cepas mutantes (Figura 7C). Como control, incluimos la actividad de ATPasa del complejo V mitocondrial. Para nuestra sorpresa, observamos una actividad disminuida de este complejo en la cepa mutante  $\Delta$ cox2 transformada con Cox2<sup>W56R</sup> alotópica, comparada con la cepa silvestre o la cepa  $\Delta$ cox2/ $\Delta$ yme1 (Figura 7C). Estos datos indican que la diferencia que observamos en el crecimiento respiratorio entre las cepas se debe a que la cepa  $\Delta$ cox2 tiene un defecto en la actividad de otro de sus complejos de la OXPHOS, el complejo V o ATPasa, y no a que la ausencia de la proteasa Yme1 favorezca el rescate de la respiración por Cox2<sup>W56R</sup>. Como en la inmunodetección de Cox2 utilizamos como control de carga a la subunidad Atp2 del complejo V y sus niveles basales son comparables entre las cepas, sabemos que el defecto se debe a una actividad disminuida y no a una baja acumulación de sus componentes, al menos de Atp2, la subunidad catalítica  $\beta$ .

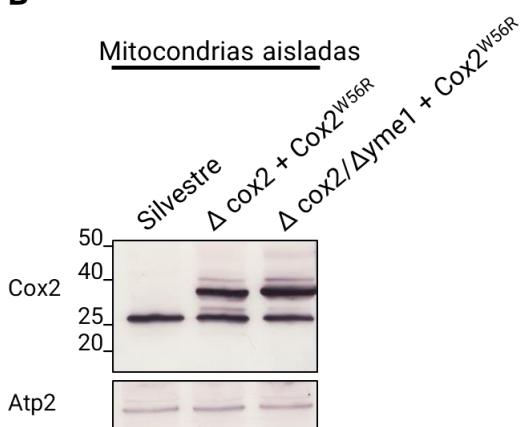
Esta cepa  $\Delta$ cox2, proveniente de una cepa parental distinta a la de la utilizada para todos los experimentos previos, tiene un defecto en el complejo V, por lo que decidimos dejar de utilizar a esta colección de cepas en nuestros ensayos. Requerimos de una cepa doble mutante ( $\Delta$ cox2/ $\Delta$ yme1) que comparta su fondo genético con nuestra cepa  $\Delta$ cox2 y así poder compararlas. Recientemente, recibimos una cepa doble mutante  $\Delta$ cox2/ $\Delta$ yme1 del grupo de T.D. Fox de la Universidad de Cornell (ver apéndice 11.5).

Como se menciona en las perspectivas, los pasos siguientes incluyen transformar a esta cepa con el gen  $COX2^{W56R}$  y evaluar el efecto de la ausencia de esta proteasa sobre el crecimiento respiratorio.

**A**



**B**



**C**

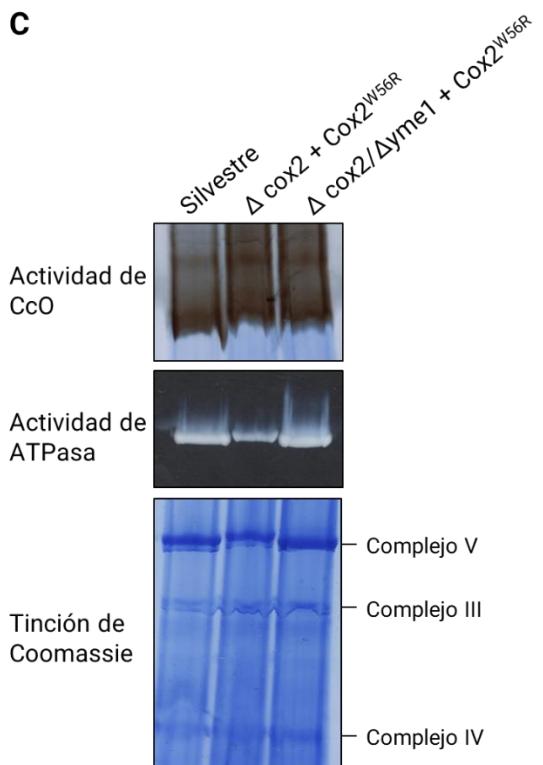


Figura 7. La cepa mutante carente del gen mitocondrial  $COX2$ , utilizada para evaluar el efecto de proteasas mitocondriales, tiene un defecto en la actividad del complejo V. (A) Diluciones seriadas de cultivos líquidos de levadura de las cepas que se indican fueron sembradas en cajas de Petri conteniendo medio fermentativo (glucosa) o respiratorio (etanol/glicerol). (B) Inmunodetecciones con anticuerpos anti-Cox2 de mitocondrias aisladas de las cepas indicadas. Se observa a la versión precursora y a la versión madura de Cox2. Como control de carga se incluye la inmunodetección de la proteína mitocondrial Atp2. (C) Tinción de geles azules nativos de mitocondrias solubilizadas con lauril maltósido de las cepas que se indican. Se revelaron las actividades en gel del complejo IV (CcO) y de ATPasa del complejo V. También se incluye la tinción de Coomassie de los complejos III, IV y V.

## 7. DISCUSIÓN

La expresión alotópica de genes mitocondriales tiene una potencial aplicación como terapia génica para enfermedades mitocondriales<sup>92,93,118</sup>. Diversas investigaciones comparten la conclusión de que la alta hidrofobicidad de algunas proteínas mitocondriales es el factor limitante para su relocalización experimental exitosa. Nuestros resultados se suman a este argumento. Sin embargo, más allá de su posible aplicación en la medicina, consideramos que nuestro trabajo tiene un interés biológico inmediato ya que contribuye a comprender por qué los organelos mantienen a algunos genes codificados en su genoma.

La alta hidrofobicidad de algunas proteínas mitocondriales ha impedido que los genes que las codifican sean relocalizados al núcleo, ya sea natural o experimentalmente<sup>19,38–40,45,119,120</sup>. La presencia exclusivamente mitocondrial de genes como *NAD1*, *NAD4*, *NAD5*, *COB* y *COX1*<sup>19</sup> nos sugiere que su expresión alotópica es improbable. Es necesario revisar los reportes de expresión alotópica de *Nad1*, *Nad4* y *Cox1*<sup>94,98,121</sup> para validar que se refieran a una relocalización exitosa y no se trate de un evento de reversión o compensación del gen mitocondrial mutante. La evidencia acumulada sobre la retención de algunos genes que codifican para proteínas hidrofóbicas en los genomas mitocondriales nos inclina a sugerir la posibilidad de que la transferencia experimental de estos genes al núcleo sea altamente improbable de lograr, por lo que consideramos que simplemente la mitocondria está imposibilitada para importar y ensamblar correctamente proteínas con múltiples cruces transmembranales.

En este trabajo nos enfocamos en la subunidad Cox2 y en las modificaciones que permiten su expresión alotópica. Tomando en cuenta al antecedente de que la ruta de biogénesis de Cox2 alotópica difiere de la ruta canónica<sup>114</sup> y de acuerdo con nuestros resultados, proponemos que, en la ruta de biogénesis alternativa, TIM23 transfiere al TMS1 de Cox2 hacia la matriz y que después libera al TMS2 lateralmente (figura 5B), aunque este es un proceso ineficiente. Proponemos que el paso limitante reside en la correcta inserción de Cox2 en la membrana interna mitocondrial, probablemente en el paso del TMS1 a través de TIM23. Entre los resultados que apoyan nuestra hipótesis se incluyen: (i) Dado que la translocasa Cox18 no participa en la inserción del TMS2 de Cox2<sup>W56R</sup> alotópica, es probable que este segmento se inserte en la membrana de manera lateral a través de TIM23; (ii) la mutación *per se* no afecta directamente a la CcO por lo que el paso limitante reside en su ruta de biogénesis (iii) de las dos bandas que corresponden al precursor y a la versión madura de las Cox2 alotópicas, la banda más abundante corresponde a la del precursor; (iv) observamos un comportamiento diferencial en cuanto al procesamiento de las distintas versiones de Cox2, Cox2<sup>WT</sup> no se procesa mientras que las sustituciones que disminuyen la hidrofobicidad del TMS1 alcanzan su forma madura (más aún si contienen una carga positiva). El complejo TIM23 puede detectar la hidrofobicidad de los segmentos que la atraviesan y translocarlos a la matriz o liberarlos lateralmente en función de la hidrofobicidad<sup>110</sup>; (v) por ensayos bioquímicos detectamos a los precursores en la fracción mitocondrial, con el extremo carboxilo-terminal orientado hacia el citosol y asociados a las membranas, sugiriendo que Cox2 se encuentra en tránsito a través de las membranas mitocondriales; (vi) los pasos subsecuentes a la inserción, como el procesamiento por Imp1 y la adquisición de cobre, no son limitantes; (vii) al disminuir la dosis de Cox2 observamos mayor maduración de esta proteína, sugiriendo que el sistema de transporte mitocondrial se satura con la sobreexpresión de precursores.

De acuerdo con los puntos antes mencionados, proponemos que en los casos donde TIM23 libera prematuramente al TMS1, Cox2 queda insertada en una topología incorrecta (con el amino terminal orientado hacia la matriz y el carboxilo hacia el espacio intermembranal). En estos casos, las proteasas mitocondriales actuarían para degradar a las proteínas mal plegadas o insertadas<sup>117</sup>. Aún queda por determinarse si la ausencia de proteasas de mantenimiento mitocondrial, como Yme1, favorece la entrada de Cox2 desde el citosol para que continúe con su inserción y ensamblaje en la membrana interna.

Inesperadamente, disminuir la dosis de Cox2 alotópica es de las modificaciones con una mayor contribución para recuperar la respiración de una cepa  $\Delta$ cox2. Además, esto correlaciona con una menor acumulación de los precursores y la mayor acumulación correspondiente de las versiones maduras. Consideramos que este efecto se debe a que la subunidad Cox2 proveniente desde el citosol está saturando a las translocasas mitocondriales (específicamente a TIM23) y que esto limita la importación de ésta. La mayoría de los reportes de expresión alotópica tanto en levadura como en mamíferos utilizan plásmidos de alta expresión para asegurar que los niveles de proteína no sean limitantes en la importación hacia las mitocondrias<sup>94,98–100,102,103,122,123</sup>. Nuestro trabajo sugiere que “menos es más”: bajos niveles de proteínas hidrofóbicas expresadas alotópicamente, promueven su importación y ensamblaje en las mitocondrias.

Cabe mencionar que la sustitución W56R, reportada por el grupo de Schultz en el 2011<sup>109</sup>, es la que permite una mayor recuperación de la respiración de entre todas las sustituciones que probamos. Esta modificación, en conjunto con la MTS fusionada, la recodificación y la expresión en bajas dosis, logró el balance perfecto requerido para una expresión alotópica exitosa: disminuyó la hidrofobicidad del TMS1 lo suficiente para llegar a la matriz mitocondrial, pero no tanto como para dejar de ser reconocido por Oxa1 para su inserción en la membrana interna. Al mismo tiempo, no afectó ni el ensamblaje, ni la actividad, ni la estabilidad del complejo CcO. Este balance le permitió a Cox2<sup>W56R</sup> recuperar la respiración de una cepa carente del gen mitocondrial COX2 en niveles cercanos a los de una cepa silvestre. La aproximación de generar miles de alelos por mutagénesis al azar pareciera ser la opción para seguir si se busca encontrar residuos clave en la expresión alotópica.

Como parte de nuestro estudio, exploramos la sustitución del residuo W56 de Cox2 por otros residuos parecidos a la arginina y encontramos que una carga positiva (arginina y lisina) es determinante para una mejor recuperación de la respiración que una sustitución que sólo reduce la hidrofobicidad (glutamina). La baja acumulación de la versión madura de Cox2<sup>W56Q</sup> indica que su inserción en la membrana interna es el paso limitante.

Una contribución fundamental de nuestro trabajo fue que seguimos una aproximación alternativa y logramos la expresión alotópica de Cox2 al emular las modificaciones que sucedieron naturalmente en la leguminosa *Glycine max*. Las sustituciones también residen dentro del TMS1, pero en este caso se trató de una doble sustitución (las sustituciones individuales no fueron exitosas). Sin embargo, la recuperación de la respiración fue menor que la de la sustitución W56R. Esto puede deberse a que las cadenas laterales de los residuos modificados afectan el ensamblaje/actividad/estabilidad del complejo. En línea con esto, la expresión de Cox2<sup>W56R</sup> o Cox2<sup>V49Q/L51G</sup> en bajas dosis resulta en una acumulación similar de sus versiones maduras, sugiriendo que su inserción en la membrana interna es comparable

en ambas (Artículo 2, Figura 5B). Que el rescate de Cox2<sup>V49Q/L51G</sup> sea menor que el de Cox2<sup>W56R</sup> indica que la doble sustitución V49Q/L51G afecta la actividad de la CcO de levadura. Aún más, la adición de W56R como tercera sustitución empeora la recuperación de la respiración, indicando que las sustituciones basadas en leguminosas tienen un efecto dominante negativo sobre la respiración en levadura. En este caso, podría ser que la triple mutante disminuyó la hidrofobicidad de Cox2 a tal grado que el TMS1 ya no es reconocido como cruce transmembranal, resultando en un defecto en su inserción en la membrana interna, o bien, que esta acumulación de sustituciones afecta directamente a la CcO.

Cuando se reportaron los residuos clave que definen a las versiones de Cox2 mitocondrial y nuclear en leguminosas, únicamente se evaluó la presencia del gen COX2 y de su transcripto en mitocondrias y núcleos (figura 1), pero no se evaluó ni la traducción ni el ensamblaje de estas versiones. En nuestro modelo de coexpresión de Cox2 en levadura, observamos que las dos versiones se ensamblan en la población de complejos CcO. Incluso, la presencia de la versión mitocondrial promueve el ensamblaje de la citosólica, resultando en una población heterogénea de CcOs. Esta coexpresión también se asemeja a lo que sucedería en el tratamiento de enfermedades mitocondriales mediante la expresión alotópica: estarían presentes tanto la versión endógena mutante, como la sintetizada en el citosol. Nuestros resultados validan el concepto de que una subunidad alotópica logra ensamblarse en su complejo aún en presencia de su contraparte mitocondrial, resultando en una recuperación suficiente para mejorar parcialmente el funcionamiento mitocondrial.

Proponemos que la presencia de Cox2 endógena promueve el ensamblaje de la proteína mitocondrial mediante el ciclo de retroalimentación negativa que sigue Cox1, la subunidad catalítica de la CcO, donde su síntesis se promueve en función de su avance en la línea de ensamblaje. En una cepa donde sólo se expresa Cox2<sup>W56R</sup> alotópica, hay poco ensamblaje y por tanto se abate la síntesis de Cox1. Por otro lado, en una cepa que coexpresa a ambas versiones, Cox2 endógena promueve el ensamblaje de Cox1, por lo que también se favorece su síntesis y aumenta su disponibilidad para ensamblarse con las proteínas Cox2<sup>W56R</sup> provenientes del citosol.

Dados los resultados positivos que obtuvimos con las sustituciones basadas en leguminosas, intentamos emular otra modificación que ocurrió naturalmente en otros organismos: fragmentar al gen COX2 en COX2A y COX2B. Esta fragmentación ocurrió en diferentes linajes independientemente (algas verdes, parásitos apicomplejos y escatólidos<sup>30,31,34</sup>) y podría representar una estrategia viable para mejorar la expresión alotópica de COX2. Sin embargo, no logramos recuperar la respiración de cepas de levadura que coexpresaban alotópicamente los dos fragmentos de Cox2. Aunque aún no logramos inmunodetectar al fragmento Cox2a<sup>W56R</sup>, especulamos que la falla en la recuperación de la respiración reside en una interacción inadecuada del heterodímero Cox2a<sup>W56R</sup>/Cox2b. Aún queda por determinarse si esta fragmentación es posible cuando ambas subunidades están codificadas en el genoma mitocondrial. Supekova y colaboradores demostraron que tanto la MTS de Oxa1 como la de Su9 dirigen a Cox2<sup>W56R</sup> a las mitocondrias por lo que inferimos que Cox2a<sup>W56R</sup>, fusionada a la MTS de Su9, se inserta correctamente en la membrana interna mitocondrial. Dirigimos a Cox2b al espacio intermembranal al fusionar la presecuencia MISS/ITS a su amino terminal. Con la intención de reforzar la interacción de los fragmentos, agregamos la extensión C-terminal del alga *Polytomella parva* a Cox2a y la extensión N-terminal de la misma alga a Cox2b. Estas extensiones contribuyen a la interacción de los fragmentos en el alga,

pero no parecen ser útiles en nuestro sistema de levadura. Otras posibilidades que podrían explicar la falla en la recuperación del crecimiento respiratorio son que la proteína fragmentada Cox2a no entra a la mitocondria, aunque contiene la mutación W56R, que la fragmentación afectó el plegamiento o la estabilidad de los dominios de Cox2, o bien, que la presecuencia MISS/ITS, fusionada a Cox2b, es secuestrada por componentes del espacio intermembranal (como Mia40), evitado su contacto con Cox2a.

Nuestros resultados reportan factores no explorados que impactan la expresión alotópica de la proteína mitocondrial Cox2. Estos incluyen expresar a los genes alotópicos en una sola copia en combinación con mutaciones que les permiten a las proteínas para las que codifican ser insertadas correctamente en las mitocondrias. Estas sustituciones pueden identificarse al estudiar las modificaciones presentes en organismos que naturalmente relocalizaron a algún gen mitocondrial al núcleo. Consideramos que nuestras observaciones son relevantes para comprender las condiciones que restringen la transferencia funcional de genes mitocondriales al núcleo.

Nuestro trabajo también sugiere que, además de la adquisición de una MTS y de disminuir la hidrofobicidad en los TMS claves de las proteínas, se requiere de la presencia de translocadores, chaperonas y proteasas que garanticen que la proteína expresada alotópicamente se inserte con la topología correcta en la membrana interna mitocondrial. En este proyecto se trabajó con una proteína que contiene dos TMS, sin embargo, el sistema de expresión alotópica seguramente se complica exponencialmente a medida que aumenta el número de TMS que deben importarse. Es probable que la ingeniería genética sólo logre expresar alotópicamente aquellas proteínas cuyos genes se transfirieron al núcleo naturalmente en ciertos organismos a lo largo de 1500 millones de años de evolución.

Aun así, podemos argumentar que cuando se busca relocalizar experimentalmente un gen mitocondrial al núcleo podemos sacar ventaja de nuestra capacidad de generar mutaciones específicas y dirigidas y de centrar los esfuerzos hacia disminuir la hidrofobicidad de los cruces transmembranales de la proteína resultante. Asimismo, dirigirse a los casos donde el gen que codifica a la proteína de interés migró naturalmente al núcleo. Cabe mencionar la posibilidad de que existan organismos con estos genes atípicamente codificados en el núcleo y que estos casos permanezcan aún desconocidos. Tomando esto en cuenta, nos resulta de particular interés explorar y emular la relocalización al núcleo del gen ATP6, el cual está codificado en el genoma mitocondrial de algunas algas verdes.

## 8. CONCLUSIONES

Divido las conclusiones en cuatro puntos. Primero, el paso limitante en la expresión alotópica de Cox2 es su ruta de biogénesis. La presencia de la sustitución W56R en una subunidad Cox2 codificada en el genoma mitocondrial no muestra defecto alguno. Además, disminuir la dosis de Cox2 alotópica permite una mejor respiración de la cepa transformada ya que a menor cantidad de subunidades, observamos más inserción, maduración de Cox2 y recuperación de la respiración.

Segundo, todas las sustituciones que permiten la expresión alotópica de Cox2 disminuyen la hidrofobicidad del primer segmento transmembranal. Además de la sustitución W56R previamente reportada, otras sustituciones en la misma posición por residuos con propiedades fisicoquímicas similares permiten la recuperación de la respiración de una cepa de levadura carente del gen *COX2* mitocondrial transformada con alguna de estas variantes de Cox2. La presencia de una carga positiva es favorable sobre aquellos residuos que solamente disminuyen la hidrofobicidad. También encontramos que las sustituciones que permiten la expresión nuclear de Cox2 en leguminosas, permiten la expresión alotópica en levaduras, aunque en menor medida que la sustitución W56R. Estos residuos también residen en el primer segmento transmembranal de Cox2 y son sustituciones por aminoácidos menos hidrofóbicos. Inferimos que Cox2 alotópica requiere de esta disminución para poder seguir una ruta de biogénesis alternativa que le permita llegar a su topología final (Figura 5B).

Tercero, al emular la fragmentación de Cox2 para su expresión nuclear, como ocurrió en las algas verdes y los apicomplejos, no logramos recuperar el crecimiento respiratorio en nuestro sistema de levadura.

Finalmente, encontramos que, en presencia de tanto la versión mitocondrial de Cox2 como de la versión alotópica, ambas son capaces de ensamblarse en su complejo, resultado en una población mixta de CcOs. Incluso, la presencia de la versión mitocondrial favorece el ensamblaje de la versión alotópica. Probamos el concepto de que la expresión alotópica de una proteína en presencia de la versión endógena, como sucedería en el tratamiento de enfermedades mitocondriales, es capaz de ensamblarse en cantidades suficientes para contribuir a la recuperación de la respiración mitocondrial.

## 9. PERSPECTIVAS

- Evaluar el ensamblaje y la actividad de CcO en presencia de Cox2 mitocondrial y Cox2<sup>W56R</sup> alotópica integrada en el genoma nuclear. Sobre todo, utilizando a una variante de Cox2 mitocondrial que contenga alguna mutación que afecte a la CcO, asemejando lo que sucede en los síndromes mitocondriales.
- Estudiar el efecto de diversas proteínas de la levadura sobre la eficiencia de importación de la cCox2<sup>W56R</sup> alotópica (por ejemplo, sobre-expresar o eliminar a la subunidad Mgr2 del complejo TIM23, a chaperonas citosólicas o a la proteasa Yme1).
- Medir el estrés mitocondrial que genera la sobreexpresión de Cox2, por ejemplo, evaluar el potencial transmembranal de las mitocondrias en condiciones de saturación en la importación.
- Integrar la doble sustitución de leguminosas en el gen COX2 mitocondrial para evaluar la contribución directa de las sustituciones sobre el ensamblaje y actividad de la CcO.
- Continuar explorando la fragmentación de Cox2 en Cox2a y Cox2b. Expresarlas en bajas dosis, sin las extensiones y probar presecuencias alternativas (por ejemplo: MTS\_Oxa1 para Cox2a y MTS\_Cytb2 para Cox2b). Además de etiquetar a Cox2a para su inmunodetección. También, generar cepas que expresen a ambos fragmentos en el genoma mitocondrial o a COX2A desde el genoma mitocondrial y a COX2B en el nuclear (ver apéndice 11.3 para plásmido para transformar mitocondrias con COX2A).

## 10. MATERIALES Y MÉTODOS

### 10.1. Biología Molecular

#### 10.1.1. Preparación de Células Competentes

Se inoculó un cultivo de LB (o de 2xYT) con bacterias DH5α y se incubó a 37 °C durante toda la noche en agitación (250 rpm). Se diluyó el cultivo 1:100 en medio fresco (éste es el volumen 1/1) y se incubó durante 2-3 horas a 37 °C en agitación hasta alcanzar una D.O.<sub>550</sub> de 0.3-0.6. Se colocó el matraz en hielo y se transfirió el cultivo a botes de centrífuga con tapa de rosca estériles. A partir de este punto todos los pasos se llevaron a cabo en frío. Se centrifugaron las muestras a 4600 rpm (rotor Beckman JA 25.5 o equivalente) a 4 °C durante 10 min. Se resuspendieron suavemente las células con 1/20 de volumen de medio 2xYT-CC frío y se incubó en hielo durante 10 min. Se hicieron alícuotas de 200 µL, las cuales se congelaron en N<sub>2</sub> líquido y se almacenaron a -70 °C.

Protocolo modificado de Chung C. et al. (1989)<sup>124</sup>.

#### 2xYT

16 g/L	Triptona
10 g/L	Extracto de Levadura
5.0 g/L	NaCl

Ajustar pH a 7.0 con 5N NaOH y aforar a un volumen final de 1 L con H<sub>2</sub>O destilada. Esterilizar en el autoclave.

#### 2xYT-CC

60 mL	2xYT
0.7 g	NaCl
10 g	PEG ( <u>3350</u> , 4000 or 8000)
10 mL	100 % glycerol
1 mL	1 M MgCl <sub>2</sub>
1 mL	1 M MgSO <sub>4</sub>
5 mL	DMSO

Ajustar pH a 6.5-7.0 y aforar a un volumen final de 100 mL con H<sub>2</sub>O destilada. Esterilizar por filtración, hacer alícuotas y almacenar a -20 °C.

#### 10.1.2. Transformación de Células Competentes

Se descongelaron los viales de células competentes en hielo. Se mezcló el DNA (2-10 µL de reacción de ligación) con 50-100 µL de KCM frío. Se agregaron gentilmente 50-100 µL (el mismo volumen que el de KCM agregado) de células competentes y se incubaron las muestras en hielo durante 30 min. Se dio un choque térmico a 42 °C durante exactamente 1.5 min y se regresaron los tubos al hielo. Se le agregaron 300-500 µL de LB a las muestras y se incubaron a 37 °C en agitación (350 rpm) durante 1 h. Se centrifugó 1 min a 18400xg, se descartó el exceso de sobrenadante y se resuspendieron las células en el volumen restante. Se sembraron las suspensiones en cajas de LB conteniendo el antibiótico de selección\*,\*\* y se incubaron a 37 °C durante toda la noche.

\*La ampicilina se utilizó a una concentración final de 100 µg/mL y la kanamicina a 50 µg/mL.

\*\*Para seleccionar colonias azules, previo al sembrado, se esparcieron en las cajas 4 µL de IPTG (200 mg/mL) más 40 µL de X-gal (20 mg/mL en DMSO).

#### KCM

100 mM	KCl
30 mM	CaCl <sub>2</sub>
50 mM	MgCl <sub>2</sub>

Preparar soluciones madre a una concentración de 1 M, esterilizar por filtración, hacer alícuotas y almacenar a -20 °C.

### 10.1.3. Aislamiento de DNA Plasmídico

Dependiendo del uso que se le dio al DNA plasmídico, se eligió utilizar uno de los dos protocolos descritos abajo. Por ejemplo, para obtener DNA de varias clonas en poco tiempo y hacer pruebas de digestión, se utilizó la “miniprep cruda”. O bien, para hacer clonaciones o mandar a secuenciar, se utilizó la “miniprep limpia”.

#### 10.1.3.1. *Minipreps crudas*

Se crecieron cultivos de bacterias en 1.5 mL de LB+antibiótico a 37 °C en agitación durante toda la noche (8-12 h). Se transfirieron los cultivos a tubos Eppendorf y se centrifugaron a 3500 rpm durante 3 min. Se resuspendieron las bacterias en 200 µL de solución I + 0.1 mg/mL de RNasa (2 µL) y se resuspendió usando un vórtex. Se agregaron 200 µL de la solución II, se mezcló invirtiendo los tubos 5 veces y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 200 µL de la solución III, se mezcló invirtiendo los tubos 5 veces y se centrifugó a 14000 rpm (18400xg) durante 10 min. Se transfirió el sobrenadante a un tubo Eppendorf nuevo y se precipitó el DNA con un volumen equivalente de isopropanol (0.6 mL). Se centrifugó a 14000 rpm (18400xg) durante 10 min y se descartó el sobrenadante. Se lavó la pastilla con 1 mL de etanol al 70 % y se centrifugó a 14000 rpm (18400xg) durante 5 min. Se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente (~10 min) y se resuspendió en 40 µL de H<sub>2</sub>O (65 °C). Se usaron 10 µL para reacciones de digestión enzimática en un volumen final de 30 µL.

#### Solución I

50 mM Tris-HCl pH 7.5

10 mM EDTA

#### Para 1 L

50 mL 1 M Tris-HCl pH 7.5

50 mL 0.2 M EDTA

#### Solución II

0.2 M NaOH

1 % SDS

16 mL 50 % NaOH (primero)

50 mL 20 % SDS

Si no, el SDS se precipita

#### Solución III

1.32 M acetato de potasio

129.5 g acetato de potasio pH 5.2

Con ácido acético

#### Solución madre de RNasa

10 µg/µL.

#### **10.1.3.2. Minipreps limpias**

Se crecieron cultivos de bacterias en 3 mL de LB+antibiótico a 37 °C en agitación durante toda la noche (8-12 h). Se transfirieron los cultivos a tubos Eppendorf y se centrifugaron a 13400 rpm (16800xg, todos los pasos de centrifugación se hicieron a esta velocidad) durante 1 min. Se resuspendieron las bacterias en 400 µL de amortiguador STET, se agregaron 8 µL de lisozima\* (50 mg/mL en H<sub>2</sub>O) y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Se hirvieron las muestras durante 45 segundos (se usó un seguro en las tapas para evitar que el tubo Eppendorf se abriera con el calor) y se centrifugaron durante 10 min. Se removió la pastilla usando un palillo. Se agregaron 5 µL de RNAsa (10 mg/mL) y se incubó a 37 °C durante 15 min. Se agregaron 16 µL de CTAB (5 % m/v), se incubó a temperatura ambiente durante 5 min y se centrifugó durante 5 min. Se removió el sobrenadante con una pipeta, se agregaron 300 µL de NaCl 1.2 M y se resuspendió el precipitado usando una pipeta. Se agregaron 750 µL de etanol al 100 %, se mezcló invirtiendo el tubo y se centrifugó durante 10 min. Se descartó el sobrenadante, se lavó la pastilla con 1 mL de etanol al 70 % y se centrifugó durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla. Dicha pastilla se resuspendió en 30 µL de amortiguador TE o de H<sub>2</sub>O desionizada usando una pipeta y un vórtex. Se centrifugó durante 5 min y el sobrenadante de transfirió a un tubo Eppendorf nuevo (evitando pipetejar la pastilla).

\*La lisozima debe prepararse en fresco, se recomienda pre pesar la enzima en varios tubos y solubilizar al momento de usar.

#### **STET**

8 % sacarosa  
0.1 % Triton X-100\*  
50 mM EDTA  
50 mM Tris-HCl pH 8.0

\*Agregar después de esterilizar en autoclave.

#### **TE**

10 mM Tris  
1 mM EDTA

#### **Para 500 mL**

5 mL 1 M Tris-HCl pH 8.0  
1 mL 0.5 M EDTA pH 8.0

#### **10.1.4. Digestión con Enzimas de Restricción**

En el siguiente orden se agregaron:

1. H<sub>2</sub>O (c.b.p. un volumen final de 20-50µL)
2. Amortiguador 10x\* 2-5 µL
3. DNA (desde 200 ng para pruebas de digestión hasta 8-10 µg para clonaciones)
4. Enzima 1-5 U/µg DNA (para pruebas de digestión usar 0.2 µL)

\*Se usó el amortiguador SDB o el recomendado por el proveedor de la enzima.

Se revolvió la reacción dando golpes suaves al tubo. Se centrifugó por ~8 segundos en una centrífuga de mesa para bajar todo el líquido y se incubó entre 1h y toda la noche a 37 °C.

#### **SDB\***

#### **Para 10.5 mL 10x**

33 mM Tris-Aacetato pH 8.3	3.3 mL 1 M Tris-Aacetato pH 8.3
62.5 mM Acetato de Potasio	1.25 mL 5 M Acetato de Potasio
10 mM Acetato de Magnesio	1 mL 1 M Acetato de Magnesio
4 mM Espermidina	4 mL 0.1 M Espermidina
0.5 mM Ditioeritrol	0.5 mL 0.1 M Ditioeritrol

\*Este amortiguador funciona muy bien con la mayoría de las enzimas de restricción. También puede usarse para reacciones de ligación (+ATP), de fosforilación (+5 µL 1M Tris-HCl pH 8.4 en 50 µL) y reacciones del fragmento Klenow (+dNTPs).

#### 10.1.5. Geles de agarosa y preparación de muestras

Se disolvió 0.8 % de agarosa en amortiguador TAE 1X en el microondas. Se dejó enfriar a ~60 °C antes de verter en el molde y se agregó 0.5-1 µg/ml de Bromuro de Etilio (~2 µL de una solución a 10 mg/ml). Se homogeneizó usando el peine y éste se colocó a ~1 cm del lado del electrodo negativo. Las muestras de DNA se prepararon agregando amortiguador de carga DNA 1X. Se cargaron las muestras en cada pozo además de un pozo conteniendo 1 µL de marcador de peso molecular. El gel se corrió a 5V/cm de distancia entre los electrodos (~70 V).

<b>TAE 50X</b>	<b>1 L</b>
Trizma Base	242 g
Ácido Acético Glacial	57.2 mL
EDTA 0.5 M (pH 8.0)	100 mL

#### **Amortiguador de Carga DNA 6X**

Azul de Bromofenol	0.25 %
Xilencyanol FF	0.25 %
Glicerol	30 %

#### **Marcador de Peso Molecular de DNA (1 kb Plus DNA Ladder, ThermoFisher)**

Agregar 2 µL de marcador por cada 3 µL de Amortiguador de Carga DNA 6x.

#### 10.1.6. Clonación

Se digirieron los vectores (~8-10 µg) (plásmidos utilizados, apéndice 11.1) e insertos (~8-12 µg) con las enzimas correspondientes y las reacciones se cargaron en geles de agarosa al 0.8 %. Después de la electroforesis, se cortaron las bandas del gel usando un

bisturí, procurando exponer las muestras el menor tiempo posible a luz UV. Se purificó el DNA con un sistema comercial para geles de Promega (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, no. cat. A9281). Si se utilizó la misma enzima de restricción para la digestión de ambos extremos del vector e inserto, es necesario desfosforilar al vector con fosfatasa alcalina (Claf Intestinal Phosphatase, CIP) para evitar su recircularización. Para esto, se incubó al vector purificado en presencia de 1  $\mu$ L de CIP (1U/  $\mu$ L) y amortiguador de CIP 1x durante 30 min a 37 °C. Se purificó la reacción de fosfatasa alcalina con el sistema comercial de Promega. Se cuantificó la cantidad de DNA del vector y del inserto en un espectrofotómetro “Nanodrop” y se hicieron las cuentas para las reacciones de ligación usando 50 ng de vector en cada una y con tasas de 1:3 y 1:5 (vector:inserto) de acuerdo a la fórmula:

$$\frac{\text{ng de vector} \times \text{tamaño del inserto en kb}}{\text{tamaño del vector en kb}} \times \text{tasa molar inserto: vector} = \text{ng de inserto}$$

Se utilizó 1  $\mu$ L de ligasa en un volumen final de 20  $\mu$ L y se incubó a 16 °C durante toda la noche. Se transformaron células competentes con 5  $\mu$ L de la reacción de ligación, se purificó DNA plasmídico de las varias clonas y se analizaron las transformantes por digestiones analíticas. Se seleccionó una clona que contuviera al inserto con la orientación correcta y se verificó la clonación por secuenciación (oligonucleótidos utilizados, apéndice 11.2).

#### 10.1.7. Mutagénesis Sitio Dirigida

Las secuencias de COX2 con mutaciones puntuales fueron construidas por mutagénesis sitio-dirigida de acuerdo a las instrucciones del proveedor (QuikChange II site-directed mutagenesis kit, Agilent Technologies). Los oligonucleótidos de estas mutagénesis fueron diseñados usando la herramienta en línea del proveedor (QuikChange Primer Design, <https://www.agilent.com/store/primerDesignProgram.jsp>). Todas las construcciones fueron verificadas por secuenciación.

#### 10.1.8. PCR

En el siguiente orden se agregaron:

	<b>rxn 25<math>\mu</math>L</b>	<b>[final]</b>
H <sub>2</sub> O	c.b.p. 25 $\mu$ L	-
Amortiguador 10x	2.5 $\mu$ L	1X
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	0.75 $\mu$ L	1.5 mM
dNTPs 10 mM	0.5 $\mu$ L	0.2 mM c/u
Cebador directo 10 $\mu$ M	1.25 $\mu$ L	0.5 $\mu$ M
Cebador reverso 10 $\mu$ M	1.25 $\mu$ L	0.5 $\mu$ M
DNA Templado	varía	1-500 ng
Taq DNapol (5U/ $\mu$ L)	0.5-1 $\mu$ L	1-5 U/rxn

Alternativamente, se utilizó el sistema de polimerasa Accuzyme® Mix (no. cat. BIO-25028) el cual contiene un amortiguador que ya incluye MgCl<sub>2</sub>, dNTPs y DNapol .

Todas las reacciones de PCR fueron incubadas en un termociclador TECHNE TC-512 con las siguientes especificaciones:

<i>Heated lid:</i>	105 °C	
<i>Heated lid before program:</i>	off	
<i>Pause before program:</i>	off	
Desnaturalización inicial:	3m	94 °C
<i>Hot start:</i>		80 °C*
# ciclos 25-35		
Desnaturalización:	45s	94 °C
Apareamiento:	30s	~55 °C (dependiendo de la Tm de los cebadores)
Extensión:	90 seg/kb	72 °C
Extensión final:	10 m	72 °C
<i>Final hold:</i>		4 °C

\*Para usar el método de "Hot start": mantener la reacción a 80 °C después de la desnaturalización inicial y agregar la TaqDNAPol.

#### 10.1.9. Diseño de construcciones de COX2

El gen COX2<sup>W56R</sup> de levadura fue recodificado para su expresión nuclear, además, la secuencia que codifica para la MTS de Oxa1 (más 5 residuos de la proteína madura) fue fusionada al extremo 5' de la secuencia (apéndice 11.3). Esta construcción fue sintetizada por la compañía GeneScript (Piscataway, NJ, EEUU) y clonada en el vector pFL61 con enzimas de restricción NotI (plásmidos utilizados, apéndice 11.1). Las otras construcciones con mutaciones puntuales fueron construidas por mutagénesis sitio-dirigida utilizando a Cox2<sup>W56R</sup> como templado. La presencia de las mutaciones sitio-dirigidas fueron confirmadas por secuenciación. Algunas de las construcciones (Cox2<sup>WT</sup>, Cox2<sup>L47Q/V49G</sup> y Cox2<sup>L47Q/V49G/W56R</sup>) fueron obtenidas por Nallely Cabrera y Miriam Vázquez (IFC, UNAM)

Las construcciones Cox2a<sup>W56R-ext</sup> y ext-Cox2b fueron diseñadas con base en el alineamiento de la secuencia de Cox2 de levadura con las secuencias de Cox2a y Cox2b del alga *Polytomella parva*. La secuencia que codifica para la MTS de Su9 (*Neurospora crassa*) fue fusionada al extremo 5' de la secuencia de COX2a<sup>W56R-ext</sup>. Además, Cox2a y Cox2b están fusionadas en sus extremos carboxilo y amino, respectivamente, a extensiones presentes en sus homólogos en el alga *Polytomella parva* (estos diseños fueron obtenidos por Valentín de la Cruz Torres en el laboratorio<sup>125</sup>, ver apéndice 11.3). La secuencia que codifica para la presecuencia MISS/ITS fue fusionada al extremo 5' de la secuencia de ext-Cox2b (apéndice 11.3) (Valentín de la Cruz previamente obtuvo una construcción de ext-Cox2b con la presecuencia del citocromo b2 y en su transcripto el UTR 3' de COX10, ver su tesis doctoral<sup>125</sup> y apéndice 11.3).

El gen mitocondrial COX2 conteniendo la mutación W56R fue construido por mutagénesis sitio-dirigida utilizando como templado al plásmido pJM2\_COX2<sup>126</sup> (plásmidos utilizados, apéndice 11.1). Para generar la construcción del gen mitocondrial COX2A mencionado en las perspectivas, se sintetizó en la compañía GeneScript una secuencia flanqueada por sitios de restricción para clonar en el plásmido pJM2\_COX2. Al clonar esta secuencia en pJM2\_COX2 con las enzimas indicadas, se obtuvo al plásmido pJM2 con COX2A para la transformación mitocondrial (pJM2\_COX2A) (secuencias de las construcciones utilizadas, apéndice 11.3).

La integración al genoma nuclear de las construcciones de Cox2 se logró por la transformación integrativa del plásmido pRS306H<sup>127</sup> en el locus nuclear de URA3 y seleccionado por la resistencia de la cepa a higromicina B (200 mg/L). Los fragmentos conteniendo a las construcciones de COX2 y flanqueados por el promotor y terminador de PGK fueron clonados desde el plásmido pFL61 al pRS306H usando las enzimas de restricción HindIII y Smal.

## 10.2. Levaduras

### 10.2.1. Cultivo y mantenimiento

Todas las cepas utilizadas en el presente trabajo se describen en el apéndice 11.5. Las células se crecieron en los medios especificados en el apéndice 11.4 y se incubaron a 30 °C (a menos que se especifique otra temperatura) y en agitación (250 rpm) en el caso de cultivos líquidos. Los cultivos se inocularon usando un asa de cultivo para tomar colonias (1-2 colonias) provenientes de cajas Petri, o bien, diluyendo precultivos saturados a una D.O.<sub>600</sub> de 0.01 - 0.03. El crecimiento de los cultivos se monitoreó midiendo la D.O.<sub>600</sub> de diluciones 1:4 en celdas de 1 mL.

Las cepas se almacenaron a -70 °C en medio YPD o en medio SD (ver apéndice 11.4) + 30 % de glicerol estéril. Para recuperar cada una de las cepas, se usó un palillo de brocheta estéril, se tomó un poco de muestra del vial y se estrió en una caja con medio YPD o SD. No fue necesario un espacio estéril para sacar las cepas, bastó con abrir la caja lo suficiente para estriarla con el palillo y cerrarla rápidamente.

### 10.2.2. Curvas de Crecimiento

Para graficar curvas de crecimiento y calcular tiempos de duplicación, se utilizó un lector espectrofotométrico automatizado para placas de 96 pozos (Bioscreen C spectrophotometer, Growth Curves, USA) (laboratorio del Dr. Antonio Peña, IFC, UNAM). Se prepararon las placas con 250 µL de cultivos diluidos a una D.O.<sub>600</sub> de 0.01 en cada pozo; a los pozos de la periferia de la placa se les agregó H<sub>2</sub>O para evitar que se evaporaran las muestras. Se ajustaron los parámetros del programa "Bioscreener" para leer la absorbancia de los cultivos a 600 nm cada 2 horas, con agitación rápida, alta y constante, a 30 °C, durante 3-5 días. El cuarto del espectrofotómetro se mantuvo a 25 °C y con un humidificador trabajando durante el tiempo del experimento. Los datos se guardaron como una hoja de Excel para graficarlos y analizarlos.

### 10.2.3. Diluciones por Goteo

Se obtuvieron cultivos con una D.O.<sub>600</sub> de 0.8-1.2 y se lavaron con H<sub>2</sub>O estéril. Se diluyeron los cultivos a una D.O.<sub>600</sub> de 0.5 y se hicieron tres diluciones seriadas 1:10 con H<sub>2</sub>O estéril. Se colocó una hoja guía con puntos formando filas y columnas bajo las cajas de Petri. Se tomaron 3 µL y se colocaron como una gota sobre una caja de Petri con el medio requerido (usando el primer punto como guía). Se gotearon sobre las cajas todas las diluciones de cada una de las cepas y se dejaron crecer a 30 °C durante 2-3 días (medios fermentativos) o 5-7 días (medios respiratorios). Se digitalizaron imágenes de las cajas (abiertas y boca abajo) con un escáner HP ScanJet G4050 a 600 ppp y utilizando un papel carbón como fondo negro.

### 10.2.4. Mediciones de Consumo de Oxígeno

La tasa de consumo de oxígeno de células de levadura se monitoreó con un oxímetro (modelo 782, Warner/Strathkelvin Instruments) y un electrodo tipo-Clark en una cámara de 1 mL a 30 °C<sup>128</sup> (laboratorio del Dr. Salvador Uribe, IFC, UNAM). Los datos se

analizaron con el programa 782 Oxygen System (Warner/Strathkelvin Instruments). El medio del ensayo contuvo 20 mM MES pH 6.0 (triétilanolamina) y 50 mM de etanol como sustrato. Donde se indica, la actividad de citocromo c oxidasa se inhibió con 200 µM de NaCN. Las células se lavaron con H<sub>2</sub>O previo a las mediciones y, donde se indica, fueron lavadas y ayunadas durante toda la noche en H<sub>2</sub>O. Las muestras se normalizaron al número de células (3 x 10<sup>7</sup> células).

#### 10.2.5. Transformación de Levaduras

Las transformaciones con DNA plasmídico se realizaron con el método de CH<sub>3</sub>Li <sup>129</sup>. Se crecieron de 2 a 3 colonias de una caja recién sembrada en 2 mL de YPD a 30 °C durante toda la noche (13-14 h). De ser necesario, en la mañana se diluyó el cultivo con YPD y se incubó por 1-2 horas más, hasta alcanzar una D.O.<sub>600</sub> de 0.5-0.8. Se centrifugaron 100-500 µL del cultivo a 14000 rpm (18400xg) durante 1 min a temperatura ambiente. Se lavaron las células con H<sub>2</sub>O y se descartó el sobrenadante. Se mezclaron las células con 52.5 µL de la mezcla de transformación (se puede hacer una mezcla maestra para todas las transformaciones). Se mezcló en el orden que sigue:

PEG 3350	50 %	40 µL
DTT	1 M	5 µL
CH <sub>3</sub> Li	1 M	5 µL
DNA de esperma de salmón	(10 mg/mL) *	2.5 µL

\*Desnaturalizar a 95 °C por 10 min y colocar tubo inmediatamente en hielo.

Se agregó el DNA (100-400 ng para transformación con plásmido o 4-8 µg para transformación integrativa) y se mezcló brevemente usando un vórtex. Se incubaron las reacciones a 42 °C durante 30 min (para transformación con plásmido) o 1.5 h (para transformación integrativa) y se mezclaron cada ~10 min. En el caso de transformaciones integrativas: se lavaron las células con 1 mL de H<sub>2</sub>O, se resuspendieron en 3 mL de YPD y se incubaron a 30 °C durante 2 h. Las mezclas se sembraron directamente en cajas Petri conteniendo el medio de selección (apéndice 11.4) y se incubaron a 30 °C hasta obtener colonias.

#### 10.2.6. Transformación Mitocondrial por Biolística

Se utilizó el sistema de biolística PDS-1000/He de Bio-Rad (no.cat. 165-2257) (referirse al manual para más información). Este protocolo toma en cuenta una transformación única. Aunque deberían encontrarse transformantes en cada caja, normalmente se hacen 6 bombardeos por cada DNA a transformarse (6 cajas, 6 discos, etc.), para asegurar la obtención de mutantes.

##### *Preparación de las levaduras:*

Se creció un cultivo de toda la noche de la cepa p<sup>0</sup> (DFS160 en este caso, ver apéndice 11.5) en 2 mL de YPR (apéndice 11.4) a 30 °C. Se diluyeron 0.3 mL del cultivo de toda la noche en 30 mL de medio YPR fresco y se creció a 30 °C hasta llegar a la fase estacionaria (de 2 a 3 días). Se bajaron las células por centrifugación y se resuspendieron en 0.6 mL de YPD. Se esparció la suspensión celular en 6 cajas de SD+Sorb+ade+arg-leu (100 µL por caja) (ver apéndice 11.4), aproximadamente 1-3 horas antes del bombardeo.

##### *Preparación de partículas de tungsteno (para 1-8 transformaciones):*

Se esterilizaron 10-50 mg de partículas de tungsteno (AESTAR Tungsten powder 0.6 micrones) (se determinó el peso exacto al pesar el tubo Eppendorf antes y después de agregar las partículas) en un tubo Eppendorf con 1.5 mL de etanol al 70 %: se mezcló por vórtex, se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugó durante 15 minutos. Se lavaron las partículas con H<sub>2</sub>O estéril, se mezcló por vórtex y se centrifugó durante 15 minutos en una centrífuga de mesa. Se agregó glicerol estéril al 50 % (16.7 µL de glicerol/mg de partículas) y se almacenaron las partículas a -20 °C).

*Precipitación del DNA en partículas de tungsteno:*

Se utilizaron los siguientes DNAs:

- a) Para seleccionar transformantes nucleares: plásmido de 2µ/LEU2 (en este caso Yep351).
- b) Para la transformación mitocondrial: el gen mitocondrial de interés en cualquier plásmido (en este caso pJM2-Cox2<sup>W56R</sup>)<sup>126</sup>.

A un tubo Eppendorf en hielo se le agregó:

- \*5 µg de Yep351 + 10-15 µg del plásmido mitocondrial (volumen total de <51 µL).
- \* 100 µL de partículas de Tungsteno en glicerol al 50 % (se cortó la punta de la pipeta), se mezcló por vórtex durante 5 sec.
- \* 4 µL de Espermidina 1M (Sigma-S0266) (preparar alícuotas de 20 µL y congelar a -70 °C).
- \* 100 µL de CaCl<sub>2</sub> 2.5 M (esterilizado por filtración, frío).

Se incubó en hielo durante 10 minutos y se mezcló por vórtex cada tres minutos. Se centrifugó durante 30 segundos y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 200 µL de etanol al 100 %, se resuspendió, se centrifugó durante 30 segundos y se descartó el sobrenadante. De nuevo, se agregaron 200 µL de etanol al 100 %, se resuspendió, se centrifugó durante 30 segundos y se descartó el sobrenadante. Las partículas se resuspendieron en 80 µL de etanol al 100 % usando una pipeta.

Se insertó un macroacarreador o "flying disc" (no se esteriliza) por cada porta macroacarreador usando pinzas estériles y se colocaron en una caja Petri (6 discos/caja). Se distribuyeron las partículas resuspendidas en cada uno de los 6 discos, se distribuyó la suspensión en toda la superficie y se dejó secar a temperatura ambiente durante 10 minutos hasta que nada de líquido fuera visible.

*Bombardeo:*

Se esterilizó la unidad (cámara de bombardeo y superficie) distribuyendo etanol al 70 %, se dejó secar por 10 minutos y se limpió usando una toalla de papel. Se abrió la válvula principal del tanque de helio a 2000 psi y se ajustó la segunda válvula a la misma presión. Para el disco de ruptura (1330 psi): se colocó el disco de ruptura en el sujetador color bronce usando pinzas estériles y se atornilló en la parte de arriba. Se ajustó usando la llave de torsión provista por el proveedor. (No tratar discos de ruptura con isopropanol como se sugiere en el manual ya que disminuye la taza de transformación dramáticamente. Asegurarse de que la tapa que retiene al disco de ruptura esté ajustada). Ensamblaje para el lanzamiento del macroacarreador (ver manual del proveedor): se colocó el porta macroacarreador junto con el macroacarreador sobre su soporte en posición boca abajo, se atornilló la tapa y se colocó en el quinto nivel contando desde abajo. Se colocó la caja de Petri abierta en el segundo nivel contando desde abajo y se cerró la cámara. Se encendió el interruptor, se aplicó vacío (utilizando

una bomba de vacío) poniendo el interruptor de en medio en "Vac" hasta llegar a -20 inch/Hg y se movió el mismo interruptor a "Hold". Se presionó el botón "Fire" hasta que se dispara y se soltó. Se liberó el vacío cambiando el interruptor de en medio a "Vent" (y se apagó la bomba de vacío). Después del bombardeo, se abrió la cámara y se removieron los fragmentos de los macroacarreadores del agar usando pinzas estériles. Se incubaron las cajas durante 6 días a 30 °C. Se hicieron réplicas a cajas de SD-leu, se incubaron durante 3 días a 30 °C y se identificaron a las transformantes contenido al plásmido nuclear Yep351. Se realizaron 3 rondas de purificación para obtener a las cepas  $\rho^-$  sintéticas: se hicieron réplicas a cajas YPD y a cajas YPD contenido un césped de la cepa de prueba (*tester strain*, SCS188 en este caso). Se hicieron réplicas de las cajas YPD con las cruzas a cajas de YPEG. Se eligieron las colonias que recuperan la respiración al cruzarlas con la cepa de prueba como las cepas  $\rho^-$  sintéticas y se prepararon gliceroles.

#### *Citoinducción:*

Las cepas  $\rho^-$  sintéticas (cepas donadoras) fueron apareadas con las cepas receptoras EHW154 o NAB97 al mezclar 1 mL de la cepa donadora con 100  $\mu$ L de la receptora en un tubo Eppendorf estéril (ambas provenientes de un cultivo de YPD líquido). Se centrifugaron las mezclas durante 30 segundos y se descartó la mayoría del sobrenadante. Se añadió la mezcla a una caja YPD nueva usando una pipeta (sin separar la punta del agar) y se dejó secar a 30 °C. Se revisó a las 3 horas la formación de cigotos al microscopio (células *Shmoo*), cuando las células formaron las suficientes *Shmoos*, se rasparon con un asa de cultivo y se resuspendieron en YPD líquido (se hicieron raspados a las 3 y 6 h). Se incubaron las células a 30 °C durante 3 o 6 h (o toda la noche), se hizo una dilución 1:100 con H<sub>2</sub>O estéril en un volumen final de 1 mL y se mezcló por vórtex. Se plaquearon 100  $\mu$ L en cajas Petri contenido medio de selección contra la cepa donadora (SD-ade) y se incubaron durante 3 días a 30 °C. Se hicieron réplicas a cajas SD-ade, YPEG, SD-arg, y SD-lys y se seleccionaron las cepas de interés por su habilidad para crecer en medio YPEG como haploides. Se confirmó la correcta transformación del genoma mitocondrial por PCR y secuenciación.

#### **10.2.7. Extracción de DNA Genómico o DNA mitocondrial**

Se inocularon 2-3 colonias en 2 mL de YPD y se incubaron a 30 °C durante toda la noche. Alternativamente, se utilizaron mitocondrias aisladas para extraer su DNA. Se centrifugaron los 2 mL a 14000 rpm (18400xg) durante 1 min a temperatura ambiente y se desecharon todo el sobrenadante. Se lavaron las células con H<sub>2</sub>O y se resuspendieron en 500  $\mu$ L de amortiguador de lisis. Se agregaron 500  $\mu$ L de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló en vórtex durante 3 min. Se centrifugaron las muestras a 14000 rpm (18400xg) durante 5 min a 4 °C, se transfirió la fase acuosa (arriba) a otro tubo y se precipitó el DNA adicionando 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y tres volúmenes de etanol al 100 %. Se incubaron los viales durante 10 min a -20 °C (o toda la noche) y se centrifugaron a 14000 rpm (18400xg) durante 10 min a 4 °C. Se lavó la pastilla con 1 mL de etanol al 70 % y se centrifugó a 14000 rpm (18400xg) durante 5 min a temperatura ambiente. Se dejó secar la pastilla durante ~10 min a temperatura ambiente. Se resuspendió la pastilla en 50  $\mu$ L de agua o TE. Se amplificó el DNA por PCR el mismo día o se congeló durante 1 o 2 días a -20 °C.

<b>Amortiguador de lisis 20 mL</b>	[final]
400 µL de Tritón X-100	2 %
2 mL de SDS al 10 %	1 %
400 µL de NaCl 5M	100 mM
100 µL de Tris-HCl 2M pH 8.0	10 mM
40 µL de EDTA-Na 0.5 M pH 8.0	1 mM
17.06 mL de H <sub>2</sub> O	

#### 10.2.8. Extracción de DNA Plasmídico

Se crecieron cultivos pequeños (de al menos 1.4 mL) en medio mínimo de selección para el plásmido durante toda la noche a 30 °C. Se centrifugaron las células durante 5 segundos, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron las células en el líquido residual. Se agregaron 0.2 mL de amortiguador de lisis (ver protocolo anterior), 0.2 mL de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y 0.3 g de perlas de vidrio\*. Se mezcló por vórtex durante 2 min y se centrifugó a 14000 rpm (18400xg) durante 5 min a temperatura ambiente. Se transformaron 0.2 mL de células *E. coli* competentes con 1-5 µL de la fase acuosa (arriba), o bien, se transformaron levaduras con 15 µL de la fase acuosa.

\*perlas de vidrio de 0.45-0.52 mm, sólidas, para homogeneizadores celulares. Las perlas se prepararon remojándolas en ácido nítrico concentrado durante 1 h, lavando extensivamente con H<sub>2</sub>O y dejando secar por completo.

Protocolo obtenido de C. S. Hoffman y F. Winston (1987)<sup>130</sup>.

#### 10.2.9. Extracto Total de Proteínas

Se crecieron de 2-10 mL de cultivo a 30 °C en agitación durante toda la noche. Se centrifugó el cultivo, se desechó el sobrenadante, se resuspendería en 1 mL de H<sub>2</sub>O y se pasó a un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Se agregaron 150 µL de una solución NaOH 1.85 M y β-mercaptoetanol 7.4 %. (para 1 mL: 926 µL NaOH 2 M [0.8 g/10 mL] y 74 µL de β-mercaptoetanol) y se incubaron las muestras en hielo durante 15 min. Se agregaron 150 µL de TCA al 50 %, se mezcló invirtiendo el tubo y se incubó en hielo durante 15 min. Se centrifugó a 14000 rpm (18400xg) durante 10 min a temperatura ambiente. Se lavó la pastilla con 1.5 mL de acetona fría y se resuspendería con vórtex (o usando un pistilo para tubos Eppendorf). Se centrifugó a 14000 rpm (18400xg) durante 5 min a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla (a 40 °C durante ~ 5 min). Se resuspendería la pastilla con SDS 5 % (100 µL/muestra) y se cuantificó la concentración de proteína usando un espectrofotómetro "Nanodrop" (absorbancia a 280nm).

#### 10.2.10. Aislamiento de Mitocondrias

Se utilizaron dos protocolos para aislar mitocondrias. Dependiendo del tratamiento que se les dio a las mitocondrias, se eligió el protocolo a seguir. Por ejemplo, para las

pruebas iniciales de inmunodetección, se utilizó el método mecánico; para la obtención de mitoplastos o para mediciones de oximetría con mitocondrias acopladas, se utilizó el método con zimoliasa.

#### 10.2.10.1. Método Mecánico

Se cosecharon células de un litro de cultivo centrifugando a 6000 rpm en un rotor Beckman Coulter JA-10 durante 6 min. Si las mitocondrias no se aislaron ese mismo día, se resuspendió la pastilla en medio de extracción sin albúmina y se congeló a -70 °C. Se lavaron las células con H<sub>2</sub>O destilada fría (llenando los tubos ~3/4 de su volumen) por centrifugación y se descartó el sobrenadante. Se resuspendieron las células en medio de extracción y se rompieron utilizando un homogeneizador con una camisa de hielo (Bead-beater Biospec Products, U.S.A) y perlas de vidrio de 0.45 mm de diámetro mediante tres pulsos de 20 segundos con 40 segundos de descanso entre cada uno (Uribe, S. y cols., 1985)<sup>131</sup>. Se aislaron las mitocondrias del homogenado por centrifugación diferencial en un rotor Beckman Coulter JA-25.5 a 4 °C (Peña y cols., 1977)<sup>132</sup>: 2500 rpm durante 5 min y el sobrenadante a 9500 rpm durante 10 min. El sedimento se resuspendió con un pincel fino en medio de extracción con poco volumen primero y ya resuspendido se añadió más amortiguador de extracción. Se centrifugó a 5500 rpm durante 5 min y el sobrenadante se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min. Se resuspendió el sedimento con 2 o 3 gotas de medio de extracción sin albúmina, obteniendo una suspensión de mitocondrias.

Medio de Extracción	Solución Madre	
Manitol	0.6M	0.8 M (4 °C)
Ácido Maléico (pH 6.8 con Tris)	10 mM	500 mM
Albúmina Sérica Bovina	0.1 %	

#### 10.2.10.2. Método con Zimoliasa

El protocolo abajo descrito es para un volumen de cultivo de 50-100 mL. Para 150-200 mL, se usó el doble de amortiguador en todos los pasos. Se obtuvieron cultivos a una D.O.<sub>600</sub> de 0.8-1.5. (*Antes de empezar: se prepararon los amortiguadores y se pesaron los tubos Falcon*). Se centrifugaron las células a 4500 rpm (1660xg) durante 5 min (en tubos Falcon de 50 mL), se lavaron con 10 mL de H<sub>2</sub>O, se centrifugó nuevamente y se desechó el sobrenadante. Se incubaron las células con 10 mL de **Amortiguador Tris-DTT** a 30 °C en agitación durante 10 min. Se centrifugó a 4500 rpm (1660xg) durante 5 min y se desechó el sobrenadante. Se añadieron 10 mL de **Amortiguador de Zimoliasa** y se incubó en agitación a 30 °C durante 1 h para formar esferoplastos. Se centrifugaron los esferoplastos a 4500 rpm (1660xg) durante 5 min a 4 °C. Se resuspendió la pastilla en 1 mL de **Amortiguador Dounce** y se homogeneizó 30 veces usando un homogeneizador y pistilo de vidrio (estrecho) a 4 °C. Se pasaron los homogenados a tubos de 1.5 mL y se centrifugaron a 4500 rpm (1400xg) durante 5 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante en tubos nuevos y se centrifugaron a 12000 rpm (9700xg) durante 10 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante (fracción citosólica) en tubos nuevos y se resuspendió la pastilla en 100 µL de **Amortiguador SH** (mitocondrias). Se alicuotaron las muestras, se determinó la concentración de proteína por el método de Lowry, se congelaron las alícuotas en N<sub>2</sub> líquido y se guardaron a -70 °C (para BN-PAGE es recomendable solubilizar mitocondrias antes de congelar).

Amortiguador Tris-DTT	Solución madre	vol. para 50 mL
-----------------------	----------------	-----------------

100 mM	Tris	1.0 M	5 mL
10 mM	DTT	1.0 M	500 µL
<b>Amortiguador de Zimoliasa</b>		<b>Solución madre</b>	<b>vol. para 50 mL</b>
1.2 mM	Sorbitol	2.4 M	25 mL
20 mM	KH2PO4 (pH 7.4)	1.0 M	1 mL
3 – 5 mg	Zimoliasa por g de peso húmedo		
<b>Amortiguador Dounce</b>		<b>Solución madre</b>	<b>vol. para 5 mL</b>
0.6 M	Sorbitol	2.4 M	1.25 mL
10 mM	Tris-HCl (pH 7.4)	1.0 M	50 µL
1 mM	EDTA	0.5 M	10 µL
0.2 %	BSA	-	10 mg
1 mM	*PMSF	0.1 M	50 µL
*(preparar al momento con EtOH)			
<b>Amortiguador SH</b>		<b>Solución madre</b>	<b>vol. para 1 mL</b>
0.6 M	Sorbitol	2.4 M	250 uL
20 mM	Hepes (pH 7.4)	1.0 M	20 uL

#### 10.2.11. Solubilización de Muestras para Electroforesis Nativa

Es recomendable que se solubilicen las mitocondrias después de aislarlas, o bien, que se guarden en hielo durante la noche y se solubilicen al día siguiente (aunque las mitocondrias congeladas a -70 °C también pueden ser solubilizadas para BN-PAGE con buenos resultados). Se tomaron 400 µg de proteína (medición por Lowry) y se resuspendieron en 400 µL de **amortiguador de lavado** (con pipeta, suavemente). Se centrifugaron a 12,000 rpm (9700xg) por 2 min, se desechó el sobrenadante y se repitió el paso de lavado. Se homogeneizaron las mitocondrias en 55 µL de **amortiguador de muestra** y se agregaron 6 µL de lauril-maltósido al 10 % (concentración final de 1 %) (para observar supercomplexos, se utilizó digitonina al 10 %). Se incubó en hielo durante 30 min, se centrifugó a 13200 rpm (11700xg) durante 12 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante (en este punto se pueden congelar las muestras en N<sub>2</sub> líquido y a -70 °C). Se agregaron 3 µL de **solución de Azul de Coomasie al 5 %** y se cargaron 30 µL (200 µg) /pozo en un gel azul nativo (chico). Se corrió el gel en frío con **amortiguador del cátodo (0.002 %)** a voltaje constante (50 V) durante ~16 h o a amperaje constante (15 mA) durante 1-1.5 horas.

<b>Amortiguador de lavado (4 °C)</b>		<b>para 100 mL</b>
250 mM	Sorbitol	4.56 g
50 mM	Bis-Tris	1.05 g
pH 7.0 (con HCl)		
<b>Amortiguador de muestra (4 °C)</b>		<b>para 50 mL</b>
750 mM	Ácido amino-caproico	4.92 g
50 mM	Bis-Tris	0.52 g
pH 7.0 (con HCl)		
<b>Solución de Azul de Coomassie al 5 %</b>		<b>para 1 mL</b>

5 %	Azul de Coomassie Serva Blue G	50 mg
Disolver en amortiguador de muestra (usar vórtex)		
<b>Amortiguador del cátodo (superior, 0.002 %)</b>		<b>para 1L</b>
50 mM	Tricina	8.96 g
15 mM	Bis-Tris	3.14 g
0.002 %	Azul de Coomassie Serva Blue G	20 mg
(el azul de coomassie se tarda en disolver, preparar con antelación)		
<b>Amortiguador del ánodo (inferior)</b>		<b>para 1L</b>
50 mM	Bis-Tris	10.46 g
pH 7.0 (con HCl)		

#### 10.2.12. Ensayos de Degradación con Proteinasa K de Mitocondrias y Mitoplastos

Las mitocondrias (50 µg) fueron convertidas a mitoplastos diluyendo 1:10 en Hepes 20 mM (pH 7.4) + 1 mg/mL de albúmina sérica bovina en un volumen final de 100 µL. Las mitocondrias control (50 µg) fueron diluidas a un volumen final de 100 µL de amortiguador SH + 1 mg/mL de albúmina sérica bovina. Las muestras fueron incubadas a 20 °C durante 30 minutos en presencia de 100 µg/mL de proteinasa K; se prepararon reacciones paralelas en presencia de Tritón X-100 al 1 %. Se agregaron 2 µL de PMSF 200 mM (4 mM final) a todas las suspensiones y se incubaron en hielo durante 10 min. Se centrifugaron las muestras a 14000 rpm (18400xg) durante 10 min a 4 °C, se descartaron 90 µL del sobrenadante y se resuspendió la pastilla con 4 µL de amortiguador de muestra para SDS-PAGE 6x (+4mM PMSF). Se incubaron los tubos en agua hirviendo durante 1 minuto y se cargaron las muestras en geles de SDS-tricina al 12 %.

Protocolo modificado de He y Fox (1997)<sup>80</sup>.

#### 10.2.13. Extracción con Carbonato de Sodio de Proteínas Periféricas de Membrana

Las proteínas solubles o periféricas de membrana fueron separadas de las integrales de membrana mediante extracción con carbonato. Cincuenta µg de mitocondrias fueron incubadas con 100 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.1 M (pH 11.0, frío) en hielo durante 30 minutos. Las muestras se centrifugaron a 90000xg en un rotor TLA 55 durante 30 min a 4 °C. Los sobrenadantes y las pastillas fueron incubados con 500 µL de ácido tricloroacético al 12.5 % durante 15 min en hielo y se centrifugaron a 14000 rpm (18400xg) durante 15 min a 4 °C. Las muestras se lavaron agregando 500 µL de acetona al 100 % fría y se centrifugaron a 14000 rpm (18400xg) durante 10 min a 4 °C. Las pastillas se secaron por ~10 min a temperatura ambiente y se resuspendieron en 15 µL de amortiguador de muestra para SDS-PAGE 1x. Se incubaron los tubos en agua hirviendo durante 1 minuto y se cargaron las muestras en geles de SDS-tricina al 12 %.

Protocolo modificado de Kim, H., et al. (2015)<sup>133</sup>.

## 10.3. Proteínas

### 10.3.1. Cuantificación de Proteínas

#### 10.3.1.1. *Método de Lowry*

Las muestras de mitocondrias aisladas se diluyeron 1:10 en H<sub>2</sub>O, de esta dilución se tomaron 10 µL (o 20 o 30 µL) y se aforaron a 1 mL con H<sub>2</sub>O en tubos de ensayo (mitocondrias 1:1000) (se prepararon muestras por duplicado). Se preparó una curva estándar de albúmina: 0, 20, 40, 60, 80 y 100 µg/mL en un volumen de 1 mL. Se agregaron 3 mL de la **solución C** a cada tubo, se mezclaron con un vórtex y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. Se adicionaron 300 µL de la **solución D**, se mezclaron los tubos con un vórtex y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia de cada muestra a 660 nm usando un espectrofotómetro Shimadzu (UV160U). Los resultados arrojados por el espectrofotómetro indican una concentración de las muestras en µg/mL, dado que las mitocondrias están diluidas 1:1000, la concentración real de las mitocondrias está en mg/mL.

#### **Solución A**

2 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
0.4 % NaOH  
0.16 % Tartrato de sodio y potasio  
1 % SDS

#### **Solución B**

4 % CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O

#### **Solución C**

Mezclar 100 vol A + 1 vol B

#### **Solución D**

Mezclar 1 vol de agente Folin + 1 vol H<sub>2</sub>O

Protocolo modificado de Markwell et al. (1978)<sup>134</sup>.

### 10.3.2. Espectrometría de Masas

Después de teñir el gel de SDS-Tricina con Azul de Coomassie Brillante, las bandas de interés fueron enviadas a identificación por espectrometría de masas (LC/ESI-MS/MS) al laboratorio de bioquímica de proteínas de la Universidad de Texas A&M.

## 10.4. Electroforesis de Proteínas

### 10.4.1. Geles Desnaturalizantes SDS-Tricina-PAGE (Von Jagow)

Se prepararon geles de acrilamida al 12 % de 8.5 cm x 6 cm y 1.5 mm de grosor (Sistema Mini-PROTEAN Tetra Cell de Bio-Rad), el gel separador se dejó polimerizar al menos 30 min y el concentrador durante 15 min. Los geles se pueden guardar envueltos en papel plastificado "Ega-Pack" por 2 días a 4 °C. Las muestras se prepararon agregando amortiguador de muestra 6x e hirviendo durante 1 min, se cargaron en los geles y se corrieron a 70 V hasta que alcanzaron el gel separador y posteriormente se corrieron a 80-100 V.

12 %	1 gel		2 geles		3 geles	
	Separador	Concentrador	Separador	Concentrador	Separador	Concentrador
Acrilamida 30%/Bis-acrilamida 0.98 %	3.12 ml	400 µl	6.24 ml	800 µl	9.36 ml	1200 µl
Amortiguador Electroforético	3.63 ml	750 µl	7.26 ml	1.5 ml	10.89 ml	2.25 ml
Glicerol 79.5 %	1 ml	-	2 ml	-	3 ml	-
H <sub>2</sub> O	-	1.85 ml	-	3.7 ml	-	5.55 ml
Persulfato de Amonio 10 %	50 µl	25 µl	100 µl	50 µl	150 µl	75 µl
TEMED	5 µl	5 µl	10 µl	10 µl	15 µl	15 µl

**Amortiguador electroforético** **500 mL**

Tris	3 M	181.7 g
HCl	1 N	40.3 mL
SDS	0.3 %	1.5 g

**Amortiguador de muestra 6x** **10 mL**

Tris-HCl pH 6.8	375 mM	0.591 g
SDS	6 %	0.6 g
Glicerol	48 %	4.8 mL
Mercaptoetanol	9 %	0.9 mL
Azul de Bromofenol	0.03 %	3 mg

**Amortiguador de cátodo (superior)** **3 L**

Tris	0.1 M	36.3 g
Tricina	0.1M	53.8 g
SDS	0.1 %	3 g

**Amortiguador de ánodo (inferior)** **3 L**

Tris-HCl pH 8.9	0.2 M	72.7 g
-----------------	-------	--------

**10.4.2. Tinción con Azul de Coomassie**

Se incubaron los geles de SDS-tricina con solución teñidora durante toda la noche. Se incubaron con solución desteñidora hasta que desapareció la tinción del fondo.

**Solución teñidora**

Etanol	50 %
Ácido Acético	10 %
Coomassie Brilliant Blue	10 %

**Solución desteñidora**

Ácido Acético	10 %
---------------	------

#### **10.4.3. Transferencia e inmunodetección**

Se utilizó el sistema de transferencia “*Mini Trans-Blot*” de Bio-Rad. Se equilibraron en **amortiguador de transferencia**: el gel SDS-Tricina-PAGE, una membrana de nitrocelulosa (*Trans-Blot*, Bio-Rad) del tamaño del gel, 6 papeles filtro “Whatman” (con dimensiones ~1 cm/lado más grande que la membrana) y 2 esponjas rectangulares. Se colocaron en la rejilla (de positivo a negativo): una esponja, 3 papeles filtro, la membrana, el gel, 3 papeles filtro y una esponja (pasando un tubo de ensayo sobre el “sándwich” para eliminar burbujas). Se colocó la rejilla en la cámara de transferencia y se llenó con 1 L de amortiguador de transferencia. Se transfirió en agitación (con un agitador magnético al fondo de la cámara) a 350/380 mA por 1.5/1 h o toda la noche a 90 mA, a 4 °C.

Después de la transferencia, se lavó la membrana 2 veces con TBS por 5 min y se bloqueó incubando en agitación con TBS + 3 % de gelatina durante 5 h o toda la noche a temperatura ambiente. Opcionalmente, y para verificar la correcta transferencia de las proteínas, antes del bloqueo se tiñó la membrana con rojo de Ponceau al 0.1 % en 5 % de ácido acético: se incubó durante 5 min, se lavó con **TBS** hasta eliminar la tinción y se siguió con el paso de bloqueo. Se lavó 2 veces con **TTBS**, se agregó el primer anticuerpo (apéndice 11.6) en una solución de TTBS + 1 % de gelatina y se incubó de 4 h a toda la noche en agitación a temperatura ambiente. Se lavó 2 veces con **TTBS**, se agregó el segundo anticuerpo (acoplado a fosfatasa alcalina) (apéndice 11.6) en una solución de **TTBS** + 1 % de gelatina y se incubó en agitación durante 2 h a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó 2 veces con **TTBS** y se agregaron 10 mL de **solución reveladora** + 200 µL de **BCIP** + 200 µL de **NBT**.

<b>Amortiguador de transferencia húmeda</b>	<b>1 L</b>	
Tris	25 mM	3 g
Glicina	192 mM	14.4 g
SDS	0.1 %	1 g
Metanol	20 %	200 mL
<b>TBS</b>	<b>10X</b>	
Tris-HCl pH 7.5	20 mM	24 g/L
NaCl	0.5 M	292 g/L
<b>TTBS</b>		
TBS 1X	+ 0.05 % Tween-20	
<b>Solución Reveladora</b>		

NaHCO <sub>3</sub>	0.1M
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
pH 9.8	

**BCIP** (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate p-toluidine salt, Sigma, B8503)  
30 mg en 4 mL de Dimetil Formamida (DMF)

**NBT** (Nitrotetrazolium Blue chloride, Sigma, N6876)  
60mg en 2.8 mL de DMF y 1.2 mL de H<sub>2</sub>O

#### **10.4.4. Normalización de Bandas de Proteínas**

Se determinaron las densidades de las bandas de las proteínas de interés (PI) y de los controles de normalización (CN) usando al programa *Gel Analyzer 2010a*. Se identificó al CN con el valor de densidad más alto. Se dividieron todos los valores de CN entre el valor de CN más alto para obtener los valores de CN relativos (si se hizo correctamente, el valor de CN más alto es de 1 y el resto son una fracción de éste, por ejemplo, 0.97). Se dividieron todos los valores de las PI entre los valores de CN relativos de sus respectivos carriles.

#### **10.4.5. Desnudamiento de membranas para una posterior inmunodetección**

Se utilizó este protocolo de desnudamiento (*stripping*) hasta tres veces en la misma membrana. Se calentó el amortiguador de desnudamiento a 50 °C y se agregó el volumen suficiente para cubrir la membrana en un recipiente con tapa hermética. Se agregó la membrana y se incubó a 50 °C durante 45 min con agitación cada ~10 min. Se desechó el amortiguador (como es requerido para los amortiguadores conteniendo β-mercaptopropano-2-ol) y se enjuagó la membrana durante 1-2 min bajo el chorro de la llave. Se lavó la membrana durante 5 min con TTBS (trazos de β-mercaptopropano-2-ol pueden dañar a los anticuerpos). Se bloqueó la membrana y se continuó con la siguiente inmunodetección.

<b>Amortiguador de desnudamiento</b>	<b>100 mL</b>
SDS	10 %
Tris-HCl pH 6.8	0.5 M
H <sub>2</sub> O destilada	67.5 mL
β-mercaptopropano-2-ol	0.8 mL

#### **10.4.6. Electroforesis en Geles Azules Nativos (BN-PAGE)**

##### **10.4.6.1. *Preparación y corrida de BN-PAGE***

El gradiente de acrilamida debe de ajustar al tamaño de los complejos proteicos que se desean estudiar, por ejemplo, para resolver supercomplejos de mitocondrias solubilizadas con digitonina, se recomienda un gradiente del 5-12 %, o bien, para complejos de mitocondrias solubilizadas con laurilmaltósido se recomienda un gradiente del 5-15 %. Se utilizaron cámaras de electroforesis del Sistema Mini-PROTEAN Tetra Cell de Bio-Rad (8.5 cm x 6 cm y 1.5 mm de grosor). Se utilizó un formador de gradientes con dos cilindros separados (con una barra magnética dentro del cilindro de alta concentración de acrilamida, el más cercano a la salida) sobre un agitador magnético y a su vez sobre una plataforma ajustable (Jiffy Jack). Se colocó una manguera delgada para conectar la salida del formador de gradientes con los vidrios del gel. Se ajustó la altura de la plataforma para que la salida del formador de gradientes quedara al menos 20 cm por arriba de las placas de vidrio. Se prepararon las soluciones del gel de alta concentración, de baja concentración y concentrador **sin** agregar persulfato de amonio. A partir de este punto se trabajó rápidamente. Inmediatamente después de agregar persulfato de amonio a los geles de alta y baja concentración y mezclar por vórtex, se vertieron las soluciones en el formador de gradientes con las válvulas cerradas (el de alta concentración más cercano a la salida). Se encendió el agitador magnético y se abrieron ambas válvulas. Se aseguró que ambas soluciones bajaran a la misma velocidad (dando ligeros golpes con la palma abierta sobre el

formador de gradientes para eliminar burbujas). Antes de que polimerizara el gel, se agregó persulfato de amonio a la solución del gel concentrador, se vertió y se puso el peine (esto para asegurar una corrida constante). Se agregó inmediatamente agua al formador de gradientes para evitar que polimerizaran los residuos de las soluciones. Los geles se pueden guardar en el refrigerador envueltos en papel plastificado "Ega-Pack" por 2 días. Se cargaron las muestras y se corrió el gel a 50-60 V a 4 °C durante ~16 h.

1 Gel	Acrilamida (H %)			Acrilamida (L %)		Concentrador 4 %
	10 %	12 %	15 %	5 %	8 %	
Acrilamida 48.5 %*	0.72 mL	0.87 mL	1.08 mL	0.36 mL	0.58 mL	0.25 mL
Bis-acrilamida 1.5 %						
Amortiguador 3x		1.17 mL			1.17 mL	1 mL
Glicerol 80 %		1 mL			0.25 mL	-
H <sub>2</sub> O destilada	0.6 mL	0.44 mL	0.23 mL	1.7 mL	1.5 mL	1.75 mL
TEMED		6 µL			6 µL	6 µL
Persulfato de Amonio 10 %		18 µL			18 µL	18 µL

\* La solución de acrilamida 48.5 % puede cristalizar a 4 °C. Guardar a temperatura ambiente.

<b>Amortiguador 3x</b>	<b>100 ml</b>	
Ácido ε amino caproico	1.5 M	19.68 g
Bis-Tris	150 mM	3.14 g
pH 7.0 (HCl)		

<b>Amortiguador del cátodo (superior)</b>	<b>1 L</b>	
Tricina	50 mM	8.96 g
Bis-Tris	15 mM	3.14 g
Azul de Coomassie Serva G	0.002 %	20 mg

<b>Amortiguador del ánodo (inferior)</b>	<b>1 L</b>	
Bis-Tris	50 mM	10.46 g
pH 7.0 (HCl)		

#### *10.4.6.2. Actividad en gel de Citocromo c Oxidasa*

Se prepararon 50 mL de amortiguador de fosfatos ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  50 mM) y se les agregó 1 mL de citocromo c (5 mg/mL) y 1 mL de diaminobencidina (DAB) (10 mg/mL), ambos disueltos por separado en amortiguador de fosfatos. Se agregó la solución a un recipiente contenido un gel azul nativo y se permitió que la reacción continuara hasta que se revelara el color máximo ( $\geq 6$  h). Se paró la reacción incubando al gel en agua, o bien en metanol 50 %, ácido acético 10 %.

Protocolo modificado de Zerbetto et al., (1997) y Molnar et. al., (2004)<sup>135,136</sup>

Aunque los protocolos de referencia varían en cuanto a la concentración de citocromo c y DAB y la presencia de catalasa o sacarosa, el protocolo descrito arriba funciona bien en el caso de geles azules nativos de mitocondrias de levadura (150-250  $\mu\text{g}$  de proteína mitocondrial).

#### *10.4.6.3. Actividad en gel de ATPasa*

Para incrementar la actividad de ATPasa, se preincubó al gel durante 3 horas en amortiguador de glicina 270 mM y Tris-HCl 35 mM (pH 8.4). Opcionalmente, se puede incubar un carril idéntico con oligomicina (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en el mismo amortiguador para inhibir la reacción de la fracción  $\text{F}_1\text{F}_0$ . El gel se incubó durante 10 min en glicina 270 mM, Tris-HCl 35 mM (pH 8.4),  $\text{MgSO}_4$  14 mM,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  0.2 % (disolver el  $\text{MgSO}_4$  y el  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  por separado y mezclarlos rápidamente para evitar que el Pb precipite y la solución se vea más turbia, aunque se forme el precipitado, la reacción ocurre). Se agregó ATP 8 mM final (primero se disolvió en 1 mL de amortiguador de glicina y Tris-HCl). Se incubó en agitación hasta que se observaron los precipitados de plomo en el gel. Se detuvo la reacción con metanol 50 % durante 30 min y después con agua durante 30 min. Para disolver los precipitados de sulfato de plomo del gel, éste se incubó durante toda la noche en metanol 50 %, ácido acético 10 %. Despues de disolver los precipitados, el gel se puede teñir con Azul de Coomassie. Protocolo modificado de Wittig y Schägger (2005)<sup>137</sup>.

### **10.5. Análisis de Secuencias**

Se obtuvieron las secuencias de las proteínas mitocondriales de la página: *Saccharomyces Genome Database* (<https://www.yeastgenome.org/>). Se utilizó la página *Mitofates*<sup>138</sup> para predecir los sitios de procesamiento proteolítico y obtener las versiones maduras de las proteínas (los péptidos líder de Cox2 y de Atp6 también se eliminaron). Se separaron por un espacio los residuos de las secuencias al usar la función “reemplazar” de Word (se buscó cada uno de los códigos de una letra de todos los residuos y se sustituyeron por la misma letra, pero seguida de un espacio). Cada secuencia se copió a *Excel* y sus residuos se separaron en distintas filas, pero en la misma columna. Se asignó un valor de hidrofobicidad a cada código de una letra: se presionó Alt-F11 para ingresar al Editor de *Visual Basic*. En el menú de opciones del Editor de *Visual Basic*, se seleccionó la opción “Insertar” y luego “Módulo” (aparece un Módulo en blanco). Se copió la siguiente función en el Módulo y se cerró el Editor de *Visual Basic*.

```
Function txtNum(Valor) As String  
    If Valor = "L" Then Valor = -0.2  
    If Valor = "I" Then Valor = -0.02
```

```

If Valor = "M" Then Valor = 0.04
If Valor = "A" Then Valor = 0.10
If Valor = "V" Then Valor = 0.16
If Valor = "F" Then Valor = 0.17
If Valor = "C" Then Valor = 0.18
If Valor = "T" Then Valor = 0.25
If Valor = "G" Then Valor = 0.43
If Valor = "S" Then Valor = 0.56
If Valor = "W" Then Valor = 1.12
If Valor = "N" Then Valor = 1.41
If Valor = "K" Then Valor = 1.56
If Valor = "P" Then Valor = 1.65
If Valor = "H" Then Valor = 1.77
If Valor = "Y" Then Valor = 1.83
If Valor = "D" Then Valor = 2.09
If Valor = "Q" Then Valor = 2.23
If Valor = "E" Then Valor = 2.55
If Valor = "R" Then Valor = 3.01
txtNum = Valor

```

End Function

Se usó esta fórmula para convertir cada código de una letra a un número, por ejemplo, si en la celda A1 está la letra "M", en la celda B1 se colocó la fórmula "=txtNum(A1)". Se puede ampliar la lista de textos a convertir, solo aumentando la línea:

```
If Valor = "texto" Then Valor = numero
```

Usando Excel, se calculó la ventana de 17 residuos de mínima hidrofilicidad (se cambió el resultado a negativo para así obtener el valor de máxima hidrofobicidad) y se calculó la hidrofilicidad promedio de cada una de las secuencias (se cambiaron los resultados a negativos para que los valores altos correspondieran a mayor hidrofobicidad). Se graficaron ambos parámetros de todas las proteínas en una gráfica de dispersión.

Los valores de hidrofobicidad de las secuencias de las proteínas mitocondriales se obtuvieron con base en la escala de hidrofobicidad reportada por Calado-Botelho y colaboradores<sup>110</sup>.

## 11. APÉNDICES

### 11.1. Plásmidos utilizados

Plásmido	Características	Fuente/Referencia
pFL61	Vector de expresión en levadura, origen de replicación 2 $\mu$ , promotor y terminador de PGK, marcador de auxotrofía URA3, resistencia a ampicilina en bacterias.	<sup>139</sup>
pMK	pFL61 con LEU2 en lugar de URA3.	Colección lab. DGH
pNB210	pFL61 con HIS3 en lugar de URA3.	Colección lab. DGH
pJM2	Plásmido construido al clonar al gen COX2 de la cepa D273-10B en pTZ18u.	Prof. Thomas D. Fox, Cornell University (USA) <sup>126</sup>
pRS306H	Plásmido integrativo de levadura en el locus de URA3, confiere resistencia a higromicina B, resistencia ampicilina en bacterias.	Prof. Patrice Hamel, Ohio State University (USA) <sup>127</sup>

## 11.2. Oligonucleótidos utilizados

Nombre	Secuencia 5'->3'	Origen de secuencia	Comentarios
MCS de PGK-F	CAGATCATCAAGGAAGTAATTATC	Promotor PGK 5' de plásmido pFL61	Diseñado por Alaín Macedo (IFC) 21/11/08
MCS de PGK-R	CTATTATTTAGCGTAAAGGATG	Promotor PGK 3' de plásmido pFL61	Diseñado por Alaín Macedo (IFC) 21/11/08
ScCox2F2	GGAAGCGGGAATCCCGTAAGGAGTG	En el 5'UTR de COX2, ~310 nt río arriba del codón de inicio de COX2	Diseño a partir de xpCox2F2 de XPM* (cambia una C)
ScCox2F3	TAATTAAATTTACTTATTATAATTTTAATTAT	Del codón de paro de COX2 a +34 del 3'UTR	Diseño a partir de xpcox2F3 de XPM*
ScCox2R4	ATTTATTTTAATATAAGGTGATTGAATAG	En el 3'UTR de COX2, ~120 nt río abajo del codón de paro de COX2	Diseño a partir de xpcox2R4 de XPM* (pero sin el sitio Pacl que genera del de XPM*)
ScCox2UTR5-F	AGCAGGATTCACATCTCCTTCGGC	En el 5'UTR de COX2, ~970 nt río arriba del codón de inicio de COX2, 368 nt río arriba de donde está el cassette de COX2 en pJM2	Diseñado para amplificar COX2 mitocondrial de <i>S. cerevisiae</i> . Pero usé a la cepa de ref. S288C para diseñarlos y el genoma mit varía.
ScCox2UTR3-R	TGAACCTTCAGCTTCATAAAAACCTAAATTC	En el 3'UTR de COX2, ~651 nt río abajo del codón de paro de COX2	Diseñado para amplificar COX2 mitocondrial de <i>S. cerevisiae</i> . Pero usé a la cepa de ref. S288C para diseñarlos y el genoma mit varía.
COB cDNA F1	ggATTATATTAATgAAAAAAAATgAg	250 nt río arriba del codón de inicio de COB	Para amplificar el cDNA de COB
COB cDNA R1	AgTTAAAATgAAAATAATAACACC	350 nt río abajo del codón de inicio de COB, antes del primer introón de COB según SGD.	Para amplificar el cDNA de COB
ScCox2F1	taattatccctcccttcgggttcc		Diseñado para amplificar COX2 mitocondrial desde 5' UTR de <i>S. cerevisiae</i> D273-10B, desde tRNAmet
ScCox2R1	gtaaagagctgctggctataaccag		Diseñado para amplificar COX2 mitocondrial desde 3' UTR de <i>S. cerevisiae</i> D273-10B
ncScCox2_6xHis-Rv	gcg <del>gcggccg</del> <ins>tttagtgatgtatgtatgtatgtttcattcaaccatcc</ins>	Sobre el codón de paro de Cox2 recodificado para su expresión nuclear, la Tm es de los 19 residuos que se aparean con el templado	Diseñado para agregar una cola de 6x His en el extremo C-terminal de Cox2 clonado en pFL61

<b>ncCox2+Sac1</b>	<b>gcg<b>GAGCTCGCGGCCGCTTATTGTT</b></b>	Sobre el codón de paro de Cox2 recodificado para su expresión nuclear.	El amplificado utilizando este oligo (Rv) y PGK-F puede ser usado para clonar a plásmido pSP64 desde pFL61 a las construcciones Cox2WT, Cox2V49Q, Cox2L51G y Cox2V49Q/L51G con enzimas BamHI y SacI
<b>Oxa1 P-MTS R</b>	<b>gcggcgccgcatttggcccgatcgaaat</b>	Presecuencia y primeros residuos de Oxa1	Laboratorio Dra. Funes (IFC, UNAM) para secuenciar a Oxa1-Cox2 en pSP64 hacia el promotor SP6
<b>Oxa1 A 5' Ncol</b>	<b>gggcatggcttcaaactcacctctcgactc</b>	Al inicio de la presecuencia de Oxa1	Calc Tm de parte que sí se pega. Laboratorio Dra. Funes (IFC, UNAM) para secuenciar a Oxa1-Cox2 en pSP64
<b>OxaMTS Forward</b>	<b>gatggatcccttgtcaaaactcacctctcg</b>	Al inicio de la presecuencia de Oxa1	Laboratorio Dra. Funes (IFC, UNAM) para secuenciar a Oxa1-Cox2 en pSP64
<b>Sc5'UTR3-F</b>	<b>GCTGTGGTTTCAGGGCCAT</b>	5' UTR del gen nuclear URA3 de <i>S. cerevisiae</i>	Para amplificar COX2 insertado en el genoma nuclear
<b>pRS306HR1</b>	<b>GGGACAATTCAACGCGTCTG</b>	Oligonucleótido río abajo del MCS del plásmido pRS3056H	Para amplificar COX2 insertado en el genoma nuclear

\* Dra. Xochitl Pérez Martínez (IFC, UNAM)

### 11.3. Secuencias de las construcciones utilizadas

- Gen *COX2<sup>W56R</sup>* de levadura recodificado para su expresión nuclear y fusionado a la secuencia que codifica para la MTS de Oxa1 en el extremo 5'.

PstI-NotI-BamHI-MTSOXA1+5 codones de OXA1-SalI-(péptido líder) COX2W56R-stop-NotI-SacI

>MTSOxa1\_cCOX2<sup>W56R</sup> (inserto sintetizado en GeneScript y clonado en pUC57)  
CTGCAGGCGGCCGGATCCATGTTCAAACTCACCTCTCGACTCGCACGTCAAGGTTGCTGCCTTTC  
CAGACTGCCACCGCTCGAACCATAGTATTGCCCGGCCCCATCCGTATGGATCTCTTCAGGCCAA  
AGATTTAATTCGACGGGCCA STCGACTTGGATTGTTGAGATTGCAATTGACTACTTTATTATGAATG  
ATGTTCCAACCTCCATATGCTTGTATTCAAGATTGCTACTCCAAATCAAGAAGGTATTTGGAATT  
GCATGATAATATTGTTATTGTTGGTATTGGTTCTAGAATGTTGTATACTATTGTT  
ATGACTTATTCTAAAAATCCAATTGCTTATAAATATTAACATGGTCAAACATTGAAGTTATTTGGA  
CTATTTCCAGCTGTTATTGTTGATTATTGCTTCCATCTTATTGTTGTATTGATGA  
AGTTATTCTCAGCTATGACTATTAAAGCTATTGGTTATCAATGGTATTGAAATATGAATATTCTGAT  
TTTATTAAATGATTGGTGAAACTGTTGAATTGAATCTTATGTTATTCCAGATGAATTGTTGGAAGAAG  
GTCAATTGAGATTGTTGGTACTGATACTTCTATGGTTGTTCCAGTTGATACTCATATTAGATTGTTGT  
TACTGCTGCTGATGTTATTCATGATTGCTATTCCATCTTGGTATTAAAGTTGATGCTACTCCAGGT  
AGATTGAATCAAGTTCTGCTTGATTCAAAGAGAAGGTGTTTATGGTGTCTGAATTGTTG  
GTACTGGTCATGCTAATATGCCAATTAAATTGAAGCTGTTCTTGCCAAAATTGGAAATGGTTGAA  
TGAACAA TAA GCGGCCGCGAGCTC

>MTSOxa1\_cCox2<sup>W56R</sup>  
MFKLTSRLVTSRFAASSRLATARTIVLPRPHPSWISFQAKRFNSTGPVLDLLRLQLTTFIMNDVPTPYA  
CYFQDSATPNQEGILEHDNIMFYLLVIILGLVSRMLYTIVMTYSKNPIAYKYIKHGQTIEVIWTIFPAVI  
LLIIAFPSFILLYLCDEVISPAMTIKAIGYQWYWKEYESDFINDSGETVEFESYVIPDELLEEGQLLLD  
TDTSMVVPVDTHIRFVVTAADVIHDFAIPLGIKVDATPGRLNQVSALIQREGVFYGACSELCGTGHANM  
PIKIEAVSLPKFLEWLNEQ\*

- Gen COX2 de levadura recodificado para su expresión nuclear y fragmentado en *COX2a<sup>W56R</sup>* y *COX2b* (estas las secuencias fueron obtenidas por Valentín De la Cruz<sup>125</sup>).

PstI-NotI-BamHI-MTSSu9+5 codones de SU9-SalI-(péptido líder) COX2a<sup>W56R</sup>ext-stop-NotI-SacI

(inserto sintetizado en GeneScript y clonado en pUC57, sub clonado en pMK)

>MTSSu9\_cCOX2A<sup>W56R</sup>

```
CTGCAGGGGCCGGATCCATGGCCTCCACTCGTGTCCCTCGCCTTCGCCTGGCCTCCCAGATGGCTGC  
TTCCGCCAAGGTTGCCCGCCCTGCTGTCCGCGTTGCTCAGGTCAAGCGCACCATCCAGACTGGCTCC  
CCCCTCCAGACCCTCAAGCGCACCCAGATGACCTCCATCGTCAACGCCACCACCCGCCAGGCTTCCAGA  
AGCGCGCC TACTCTTCCGAGATC GTCGAC TTGGATTGTTGAGATTGCAATTGACTACTTTATTATGAA  
TGATGTTCCAACCTCCATATGCTTGTATTTCAGATTCTGCTACTCCAAATCAAGAAGGTATTTGGAA  
TTGCATGATAATATTATGTTATTGTTGGTTATTGGGTTGGTTCTAGAATGTTGTATACTATTG  
TTATGACTTATTCTAAAAATCCAATTGCTTATAAATATTAACATGGTCAAACATTGAAGTTATTG  
GACTATTTCAGCTGTTATTGTTGATTATTGCTTTCCATCTTATTGTTGTATTG  
GAAGTTATTCTCCAGCTATGACTATTAAAGCTATTGGTATCAATGGTATTGAAATATGAATATTCTG  
ATTTTATTAATGATTCTGGTGAACATTGCAACATAAATTGTTGGATGCTGATAGATTGGTTGC  
TATTGCTGAAAAAACTATTACTAAATAAGCGGCCGCAGCTC
```

NotI-BamHI-MTS\_CYTB2<sup>140</sup>+10 codones de CYTB2-XbaI-PstI-ext-COX2b-stop-AfIII-SmaI-NaeI-EagI-  
3'UTRCox10- SacI-NotI

(inserto sintetizado en GeneScript y clonado en pUC57, sub clonado en pNB210)

>MTSCytb2\_cCOX2B

```
GCGGCCGGATCCATGCTAAAATACAAACCTTACTAAAAATCTGAAGAACTGTGAGGCTGCTATCCT  
CAGAGCGCTAAAGACTAGATTGAACACAATCCGCGGTACGGTTCTACCGTTCAAATCCAAGTCGTT  
GAACAAGACTCAAGAAAACGACACAGTCATGGACTGCCTGAGAGTCGGTGCAATTCTAGCCGCTACTA  
GTTCCGTGGCGTATCTAAACTGGATAATGGCAAATAGACAAAC GAGCCGAAACTGGATATGAATAAAC  
AAAGCTCGACCTGGACATGTCGATGCTAAAGATCAATTGAAAGAACATTGAAAGCTTCTCCATCTTT  
AGAGCTGAATTGAAAGATAAATTGAAAGCTGTTGTTCTAAAGTTCCAGCTCTCAACCAATTCAAT  
ATAATTTGAATCTTATGTTATTCCAGATGAATTGTTGGAAGAAGGTCAATTGAGATTGTTGGATACTGA  
TACTTCTATGGTTGTTCCAGTTGATACTCATATTAGATTGTTACTGCTGCTGATGTTATTGAT  
TTGCTATTCCATCTTGGGTATTAAGTTGATGCTACTCCAGGTAGATTGAATCAAGTTCTGTTG  
TTCAAAGAGAAGGTGTTTTATGGTGTGTTCTGAATTGTTGACTGGTCAATTGCTAATATGCCAAT  
TAAAATTGAAGCTGTTCTTGCAAAATTTGGAATGGTGAATGACAATAACTTAAAGCCCCCGCA  
TGCCGGCGGGATATACTGATTAAAAAAATCACACTAGAGAATCAAATATAAAATAGAGTCATACAC  
TTGGTACATGAGCTCGCGGCCGC
```

- Gen *MISS/ITS\_COX2b*

Secuencia de residuos de MISS/ITS (mitochondrial intermembrane space sorting signal) de artículos de Milenkovic et al.<sup>141</sup> y Sideris et al<sup>142</sup>.

Traduce secuencia con <http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=4932&aa=1&style=GCG>.

M Y S N L V E R C F T D

NotI-BamHI-**MISS**-BamHI-SacI-**ext**-SacI-COX2B-NotI

>Cox2Bconext (inserto sintetizado en GeneScript y clonado en pNB210)

gcggccgatccATGTATTCTAATCTAGTTGAAAGATGTTTACTGATggatccgagct  
catgtctgatgctaaagatcaattgaaagaacaattgaaagcttctccatcttttagagctgaa  
ttgaaagataaaattgaaagctgcttggctaaagttccagcttcaccaattcaata  
atgagctc atgtttgaatcttatgttattccagatgaattgttggaaagaaggtcaattgagatt  
gttggatactgataacttctatgggtttccagttgatactcatattagattgttactgtt  
gctgatgttattcatgatttgctattccatcttgggtattaaagttgatgctactccaggtt  
gattgaatcaagttctgtttgatc aaagagaagggtttttatggtgcttgttcaatt  
gtgtggtactggtcatgctaataatgccaattaaaattgaagctgtttcttgccaaaatttttg  
aatgggttgaatgaacaataagcgcccgc

Revisé en Serial Cloner que no se generaran nuevos sitios de corte de las enzimas usadas ni codones de paro.

>Cox2Bsinext (extensión eliminada con enzima de restricción SacI)

gcggccgcggatccATGTATTCTAATCTAGTTGAAAGATGTTTACTGATggatccgagct  
catgtttgaatcttatgttattccagatgaattgttggagaagaaggtaattgagattgttggat  
actgatacttctatggttgttccaggtaactcatatttagattttgttactgctgctgatg  
ttattcatgatttgctattccatcttgggtattaaagttgatgctactccaggtagattgaa  
tcaagttctgcattgattcaaagagaagggttttatggtgctgttgaatttgtgtgg  
actggtcatgctaataatgccaattaaaattgaagctgtttcttgcattttggatgg  
tgaatgaacaataagcggcgc

- Secuencias diseñadas para generar construcciones del gen mitocondrial COX2A en el plásmido pJM2 y hacer transformaciones mitocondriales por biolística.

>COX2A de *S. cerevisiae* con extensión de *Polytomella parva*

```
ATGTTAGATTATAAGATTACAATTAACAAACATTCAATTGAATGATGTACCAACACCTTATGCATGTT
ATTTTCAGGATTCAAGAACACCAAATCAAGAAGGTATTTAGAATTACATGATAATATTATGTTTATT
ATTAGTTATTTAGTTAGTATCTGAATGTTATACATTGTTATAACATATTCAAAAAACCTATT
GCATATAAAATATTAACATGGACAAACTATTGAAGTTATTGAACAATTTCAGCTGTAATT
TAATTATTGCTTCCCTCATTTATTATATTATGTGATGAAGTTATTCACCAGCTATAACTAT
TAAAGCTATTGGATATCAATGATATTGAAAATATGAATATTCACTGTTATTATGATAGTGAAACT
GTTGAATTACAACATAAATTATTAGATGCTGATAGATTAGCTATTGCTGAAAAAACATTACAAAAT
AA
```

Se diseñó una secuencia desde el sitio **NsiI** (ATGCA/T) dentro del ORF de COX2a con **extensión**. Se agregó en el extremo 3' el codón de **STOP** (TAA) y el 3'UTR de COX2 hasta el sitio **NdeI** (CA/TATG). (Hay otro sitio NdeI dentro de la secuencia de COX2 pero éste se elimina al quitar el fragmento correspondiente a COX2B).

>Diseño de construcción de **COX2A** con **extensión** para cortar y pegar en vector pJM2\_COX2 (1,064 bp).

```
ATGCATGTTATTCAGGATTCAAGAACACCAAATCAAGAAGGTATTTAGAATTACATGATAATATTAT
GTTTTATTTATTAGTTATTTAGGTTAGTATCTGAATGTTATACATTGTTATAACATATTCAAAA
AATCCTATTGCATATAAAATATTAACATGGACAAACTATTGAAGTTATTGAACAATTTCAGCTG
TAATTATTAAATTATTGCTTCCCTCATTTATTATTTATTATGTGATGAAGTTATTCACCAGC
TATAACTATTAAAGCTATTGGATATCAATGATATTGAAAATATGAATATTCACTGTTATTATGATAGT
GGTGAACACTGTTGAATTACAACATAAATTATTAGATGCTGATAGATTAGCTATTGCTGAAAAACAA
TTACAAAATAATTAATATTACTTATTATAATTTTAATTATTAAAAATAATAATAATAAAT
TATAATAATATTCTAAATATAAAAGATATAGATTATATTCTATTCAATCACCTTATATTAAAATA
TAAATATTATTAAAGAGGTTATCATACTTCTTAAATAATAATTATTGTTCAAAAGATAATAA
AAATAATAAAAGATAATTAGAAATAGATAATTTTATAAATGATTAGTAGGATTACAGATGGAGAT
GGTAGTTTATATTAAATTAATGATAAAAAATATTAAAGATTTTATGGTTAGAATACATATTG
ATGATAAAGCATGTTAGAAAAGATTAGAAATATATTAAATACCTCTAATTGAAAGAACTACTAA
AACAAATTATATTAGTAAATTCAACAAAGAAATGGTTATATTCTAATATTGTAATTGATAAGTAT
CCTGTTAACATTAAATTATAGTTATTATAAATGAAAATAGCTATAATTAAATTTAAATGGTA
TATCTTATAATAAAAGATTATTAAATATTAAATACAATTAAATTATGAAAGTTACCTAATT
AAAAATTCATATG
```

>Diseño de construcción de **COX2A** sin extensión para cortar y pegar en vector pJM2\_COX2 (1,001 bp).

```
ATGCATGTTATTCAGGATTCAAGAACACCAAATCAAGAAGGTATTTAGAATTACATGATAATATTAT
GTTTTATTTATTAGTTATTTAGGTTAGTATCTGAATGTTATACATTGTTATAACATATTCAAAA
AATCCTATTGCATATAAAATATTAACATGGACAAACTATTGAAGTTATTGAACAATTTCAGCTG
TAATTATTAAATTATTGCTTCCCTCATTTATTATTTATTATGTGATGAAGTTATTCACCAGC
TATAACTATTAAAGCTATTGGATATCAATGATATTGAAAATATGAATATTCACTGTTATTATGATAGT
GGTGAACACTGTTGAATAATTAATATTACTTATTATAATTTTAATTATTAAAAATAATAATAA
TAATAATTATAAAATTCTAAATATAAAAGATATAGATTATATTCTATTCAATCACCTTATATT
AAAAATATAAAATTATTAAAGAGGTTATCATACTTCTTAAATAATAAAATTATTGTTCAAAAG
ATAATAAAATAATAAAAGATAATTAGAAATAGATAATTTTATAAATGATTAGTAGGATTACAGA
TGGAGATGGTAGTTTATATTAAATTAATGATAAAAAATATTAAAGATTGTTATGGTTAGAATA
CATATTGATGATAAAGCATGTTAGAAAAGATTAGAAATATATTAAATACCTCTAATTGAAAGAAC
TACTTAAACAAATTATATTAGTAAATTCAACAAAGAAATGGTTATATTCTAATATTGTAATTGTTGA
TAAGTATCCTGTTAACATTAAATATTAGTTATTATAAATGAAAATAGCTATAATTAAATTTA
AATGGTATATCTTATAATAAAAGATTATTAAATATTAAATACAATTAAATTATGAAAGTTAC
CTAATTAAACATTCATATG
```

>cox2a con extensión en plásmido pJM2

M13R

>cox2a sin extensión en plásmido pJM2

**GGAACAGCTATGAcCATTACGAATTTAATACGACTCACTATAGGAATTCGAGCTCGGTACCGGGGATCCTCT**  
**AGAGTCGACCTGCAGGGGGGGGGCCCCGGAACCTTAAATAAAAGGGGGCGACCGGACTATTTTTTTAAA**  
TATATATTATTAATAATATAAATATAAGTCCCCGCCGGGGACCCGAAGGAGTATAAATAAAATTAAATA  
TATATTATATATATTATAATAATAATAATAATAACTCCTGCTTCATACTTATAAAATA  
AGGTAATCACTAATATATTATAATAATAATTATTTATAATTATTTATAATAATAAAATTATATATAT  
TATATATAATCTAAATATTATTTATAATAATTTAaATATTaATATATATGATATGAATTATTAGTTCCGGAAGCG  
GAATCCCGTAAGGAGTGAGGGACCCcTCCCTACTAAcGGGAGGGGACCGAACCCTGAAGGAGTTTATTAGT  
ATTTTATAAAATATATTTATGATTAATAATATTATATATTATTTATAAAATAATATAATTAAATAATT  
TTTAATAAAAAAGGTGGGTTGGTAATATAATTTTATTATTTATAATATAATAATAAAATTATAAAATA  
TTTAATTAAAAGTAGTATTAAACATATTATAAAAGACAAAAGAGTCTAAAGGTAAAGATTATTAAA**ATGTTAGATT**  
**TATTAAGATTACAATTAAACAACATTCAATTGAATGATGTACCAACACCTT**ATGCA**ATTATTTCAGGATTCAA**  
CACCAAATCAAGAAGGTATTTAGAATTACATGATAATATTATGTTTATTATTAGTTATTAGTTAGGTTAGTATCTT  
GAATGTTATATAACATTGTTATAACATATTCAAAAATCCTATTGCATATAAAATATTAAACATGGACAAAATATTG  
AAGTTATTGAACAATTTCAGCTGAATTATTATAATTATTGCTTCCATTATTATTATATTATGTTG  
**ATGAAAGTTATTCAACCAGCTATAACTATTAAAGCTATTGGATATCAATGATATTGAAAATATGAATATTCAGATTTA**  
**TTAATGATAGGGTGAACATGTTGAATA**TTAATATTACTTATTATTAAATTATTCTAAATAATAAAAGATATAGATTATCTATTCAATCACCTTATATTAAAAA  
TAATAATAATTATAATAATTCTAAATAATAAAAGATATAGATTATCTATTCAATCACCTTATATTAAAAA  
TATAAAATTATTAAAAGAGGTTATCATACTTCTTAAATAATAAAATTATTGTTCAAAAAGATAATAAAATA  
TAATAAGAATAATTAGAAATAGATAATTTTATAAAATGATTAGTAGGATTACAGATGGAGATGGTAGTTTATAT  
TAAATTAAATGATAAAAATATTAAAGATTTTTATGGTTTGAATACATATTGATGATAAAGCATGTTAGAAA  
GATTAGAAATATATTAAATACCTCTAAATTGAGAAACTACTTAAACAAATTATTAGTAAATTCAACAAAGAA

ATGGTTATTCATAATTGTAACCTTTGATAAGTATCCTGTTAACATTAAATTATAGTTATTATAAATG  
AAAAATAGCTATAATAATTAAATGGTATATCTTATAATAAAAGATTAAATTAACATTAA  
TAATTATGAAGTTACCTAATTAAAATTC **CATAT**GATAAAATAATGATTATTGAATTAGGTTATTGAAGC  
TGAAGGTTCATTTGATCTATCTCCAAAACGTAATATTGTGGTTTAATGTTCACACATAAACGTAGTATTAATAC  
ATTAAAAGCTATTAAATCTTATGTATTAAATAATTGAAAACCAATTGATAATAACACCATTATTAAATTAAAATAAATT  
ATTAAAAGATTGAGATTCTATTAAACTAAACCTGATAAAAATGGAGTTATTAAATTAGAATTAAATAGAAT  
AGATTTTATATTATGTTACCTAAATTATTCATTAAATGATATAGTCGAAAGAAATTGATTCCAATT  
ATGAAAAACACTTATAGAAATCTATATAAAAGGTTACATAATACACTAAAGGTTCAATTATTAAATTAA  
TAATAATTAAATAAAAAAGATATTCTAATTATAATTTCCTTCGGGGTCCGG**ctcccg****ggcccccc**

Se mandaron a sintetizar las construcciones a GeneScript y se obtuvieron insertadas en el plásmido pUC57. Posteriormente se clonaron a pJM2.

## 11.4. Medios de Cultivo de Levaduras

### YPD/YPGal

Bacto-extracto de levadura	1 %
Bacto-peptona	2 %
Glucosa/Galactosa	2 %

### YPEG

Bacto-extracto de levadura	1 %
Bacto-peptona	2 %
Glicerol	3 %
Etanol	3 % (agregar después de esterilizar)

### MEDIO MÍNIMO SINTÉTICO

Base Nitrogenada (sin a.a. ni $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )	0.17 %
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5 %
Glucosa o Rafinosa o Galactosa	2 %
Aminoácidos y nucleótidos	ver la siguiente tabla

### MEDIO DE LACTATO

1 L

Bacto-extracto de levadura	3 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1 g
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.5 g
$\text{NaCl}$	0.5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.6 g
$\text{FeCl}_3$	3 mg (o 0.3 mL de una solución madre al 1 % m/v)
Ácido láctico	2 % (v/v)
Ajustar pH a 5.5 con KOH	

### SD+Sorb+ade+arg

Glucosa	5 %
Base Nitrogenada (con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , sin a.a.)	0.67 %
Sorbitol	1 M
adenina	0.01 %
arginina	0.0105 %
agar	2 %

(se contamina fácilmente, preparar 3 días antes del bombardeo y guardar a 4 °C)

Los medios líquidos y sólidos tienen la misma composición excepto que se agregó agar al 1.75 % para solidificar.

Todos los medios se esterilizaron por autoclave 20 min a 121 °C (250 °F).

Aminoácidos	Solución madre (g/100mL)	Vol. del stock para 1 L de medio (mL)	Concentración final en el medio (mg/litro)	Vol. de la solución para esparcir en caja petri (mL)
Adenina	0.2*	10	20	0.2
Uracilo	0.2*	10	20	0.2
L-Arginina HCl	1	2	20	0.1
L- Ácido Aspártico	1*,#	10	100	0.2
L- Ácido Glutámico	1*	10	100	0.2
L- Histidina HCl	1	2	20	0.1
L- Isoleucina	1	3	30	0.1
L- Leucina	1	10	100	0.1
L- Lisina	1	3	30	0.1
L- Metionina	1	2	20	0.1
L- Fenilalanina	1*	5	50	0.1
L- Serina	8	5	400	0.1
L- Treonina	4*,#	5	200	0.1
L- Triptófano	1	2	20	0.1
L- Tirosina	0.2	15	30	0.2
L- Valina	3	5	150	0.1

\*Guardar a temperatura ambiente

# Esterilizar por filtración y agregar después de esterilizar el medio en autoclave

## 11.5. Cepas de Levadura Utilizadas

Cepa	Genotipo	Fuente/Referencia
NB40-36A	D273-10B; MAT $\alpha$ , <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, [rho+]</i>	Prof. Thomas D. Fox, Cornell University (USA)
EHW154	D273-10B; MAT $\alpha$ , <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, his3-ΔHindIII, [rho+] cox2-208::ARG8m</i>	Prof. Thomas D. Fox, Cornell University (USA)
DFS160	D273-10B; MAT $\alpha$ , <i>arg8Δ::ura3, ura3-52, leu2Δ, ade2-101, kar1-1, [rho<sup>0</sup>]</i>	Prof. Thomas D. Fox, Cornell University (USA)
SCS188A	D273-10B; MAT $\alpha$ , <i>ade2-101, ura3-52, kar1-1, [rho+] cox2-75c</i>	Prof. Thomas D. Fox, Cornell University (USA)
SCS101	D273-10B; MAT $\alpha$ , <i>ura3-52, leu2-3, 112, lys2, his3-ΔHindIII, arg8-Δ::hisG, [rho+] COX2::3xHA</i>	Prof. Thomas D. Fox, Cornell University (USA)
DRG101	D273-10B; MAT $\alpha$ , <i>lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3, 112, his3-ΔHindIII, [rho+] COX2W56R</i>	This study
YMR245W	BY4741; MAT $\alpha$ , <i>his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, coa6-Δ51-315, [rho+]</i>	<sup>143</sup>
CAB116	MAT $\alpha$ , <i>arg8::hisG, his3-ΔHindIII, leu2-3, 112, lys2, ura3-53, cox18Δ::KanMX4, [rho+]</i>	Prof. Thomas D. Fox, Cornell University (USA)

## 11.6 Anticuerpos Utilizados

### Primarios

Anticuerpo	Preparado en	Dilución	Comentarios
<b>αCox1</b>	Mouse	1:3,300	TTBS/gelatina 1%
<b>αCox2 (Invitrogen)</b>	Mouse	1:7,500	TTBS/gelatina 1%
<b>αCox2 (abcam)</b>	Mouse	1:6,500	TTBS/gelatina 1%
<b>αCox3</b>	Mouse	1:15,000	TTBS/gelatina 1%
<b>αHA-probe</b>	Rabbit	1:4,000	TTBS/gelatina 1%
<b>αHA (sigma)</b>	Rat	1:10,000	Usar α-mouse como anticuerpo secundario (que no esté pre-adsorbido con proteínas séricas de rata, ya que esto evita que tenga reacción cruzada con rata). (Lab. Dra. Xochitl Pérez, IFC, UNAM)
<b>αAtp2 Polytomella</b>	Rabbit	1:50,000	TTBS/gelatina 1%. Polyclonal.
<b>αOxa1</b>	Rabbit	1:1,000	TBS/leche 5 %. Guardar leche. (Lab. Dra. Soledad Funes, IFC, UNAM).
<b>αHog1</b>	Rabbit	1:2,000	TBS/leche 5 %. Y-215 SC-9079 Sta. Cruz. (Lab. Dra. Soledad Funes, IFC, UNAM).
<b>αMss51</b>	Rabbit	1:1,000	Guardar leche. Alícuota del laboratorio de Dra. Xochitl Pérez (IFC, UNAM) donado por Antonio Barrientos (Miami University, USA). Polyclonal. Reconoce el C-terminal. ¿Varias señales? Hacer pruebas de especificidad aumentando [Tween-20] de la leche.

### Secundarios

Anticuerpo	Preparado en	Dilución	Comentarios
<b>arabbit</b>	Goat	1:10,000	Acoplado a fosfatasa alcalina (AP).
<b>amouse (Sigma)</b>	Goat	1:15,000	Acoplado a AP. Pre-adsorbido con proteínas séricas de rata, no se puede usar con ab primarios hechos en rata.
<b>amouse (Sta. Cruz)</b>	Goat	1:10,000	Acoplado a AP.

## 12. REFERENCIAS

1. Tzameli I. Special Issue: The evolving role of mitochondria in metabolism The evolving role of mitochondria in metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23:417-419. doi:10.1016/j.tem.2012.07.008.
2. Dölle C, Rack JGM, Ziegler M. NAD and ADP-ribose metabolism in mitochondria. *FEBS J.* 2013;280(15):3530-3541. doi:10.1111/FEBS.12304@10.1002/(ISSN)1742-4658(CAT)FREEREVIEWCONTENT(VI)REVIEWS1213.
3. Guda P, Guda C, Subramaniam S. Reconstruction of pathways associated with amino acid metabolism in human mitochondria. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2007;5(3-4):166-176. doi:10.1016/S1672-0229(08)60004-2.
4. Bartlett K, Eaton S. Mitochondrial beta-oxidation. *Eur J Biochem.* 2004;271(3):462-469. doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03947.x.
5. Mesmin B. Mitochondrial lipid transport and biosynthesis: A complex balance. *J Cell Biol.* 2016;214(1):9-11. doi:10.1083/jcb.201606069.
6. Bhagavan NV, Ha C-E, Bhagavan NV, Ha C-E. Metabolism of Iron and Heme. *Essentials Med Biochem.* 2015:511-529. doi:10.1016/B978-0-12-416687-5.00027-0.
7. Braymer JJ, Lill R. Iron-sulfur cluster biogenesis and trafficking in mitochondria. *J Biol Chem.* 2017;292(31):12754-12763. doi:10.1074/jbc.R117.787101.
8. Miller WL. Steroid hormone synthesis in mitochondria. *Mol Cell Endocrinol.* 2013;379(1-2):62-73. doi:10.1016/j.mce.2013.04.014.
9. Wang C, Youle RJ. The role of mitochondria in apoptosis\*. *Annu Rev Genet.* 2009;43:95-118. doi:10.1146/annurev-genet-102108-134850.
10. Contreras L, Drago I, Zampese E, Pozzan T. Mitochondria: The calcium connection. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg.* 2010;1797(6-7):607-618. doi:10.1016/J.BBABI0.2010.05.005.
11. Ernster L, Schatz G. Mitochondria: a historical review. *J Cell Biol.* 1981;91(3 Pt 2):227s-255s.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2112799/>&tool=pmc entrez&rendertype=abstract.
12. Wallin IE. Bacteria and the Origin of Species. *Science.* 1926;64(1651):173-175. doi:10.1126/science.64.1651.173.
13. Sagan L. On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol.* 1967;14:255-274.
14. Roger AJ, Muñoz-Gómez SA, Kamikawa R. The Origin and Diversification of Mitochondria. *Curr Biol.* 2017;27(21):R1177-R1192. doi:10.1016/j.cub.2017.09.015.
15. Emelyanov V V. Evolutionary relationship of Rickettsiae and mitochondria. *FEBS Lett.* 2001;501(1):11-18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC11457448/>. Accessed December 12, 2018.
16. Martijn J, Vosseberg J, Guy L, Offre P, Ettema JG. Deep mitochondrial origin outside the sampled alphaproteobacteria. 2018. doi:10.1038/s41586-018-0059-5.

17. Zaremba-Niedzwiedzka K, Caceres EF, Saw JH, et al. Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity. *Nature*. 2017;541(7637):353-358. doi:10.1038/nature21031.
18. Javaux EJ, Knoll AH, Walter MR. Morphological and ecological complexity in early eukaryotic ecosystems. *Nature*. 2001;412(6842):66-69. doi:10.1038/35083562.
19. Adams K, Palmer JD. Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. *Mol Phylogenet Evol*. 2003;29(3):380-395. doi:10.1016/S1055-7903(03)00194-5.
20. Thorsness PE, Fox TD. Escape of DNA from mitochondria to the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. 1990;346(6282):376-379. doi:10.1038/346376a0.
21. Allio R, Donega S, Galtier N, Nabholz B. Large Variation in the Ratio of Mitochondrial to Nuclear Mutation Rate across Animals: Implications for Genetic Diversity and the Use of Mitochondrial DNA as a Molecular Marker. *Mol Biol Evol*. 2017;34(11):2762-2772. doi:10.1093/molbev/msx197.
22. Martin W, Herrmann RG. Update on Gene Transfer from Organelles to the Nucleus. *Gene Transfer from Organelles to the Nucleus : How Much , What Happens , and Why ? Plant Physiol*. 1998;118:9-17.
23. Lynch M. Mutation accumulation in nuclear, organelle, and prokaryotic transfer RNA genes. *Mol Biol Evol*. 1997;14(9):914-925. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a025834.
24. Timmis JN, Ayliffe M a, Huang CY, Martin W. Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat Rev Genet*. 2004;5(2):123-135. doi:10.1038/nrg1271.
25. Sharma I, Rawat D., Pasha S., Biswas S, Sharma Y. Complete nucleotide sequence of the 6 kb element and conserved cytochrome b gene sequences among Indian isolates of *Plasmodiumfalciparum*. *Int J Parasitol*. 2001;31(10):1107-1113. doi:10.1016/S0020-7519(01)00218-1.
26. Lang BF, Burger G, O'Kelly CJ, et al. An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature*. 1997;387(6632):493-497. doi:10.1038/387493a0.
27. Burger G, Gray MW, Forget L, Lang BF. Strikingly bacteria-like and gene-rich mitochondrial genomes throughout jakobid protists. *Genome Biol Evol*. 2013;5(2):418-438. doi:10.1093/gbe/evt008.
28. Gray MW. Mitochondrial Evolution. *Science (80- )*. 1999;283(5407):1476-1481. doi:10.1126/science.283.5407.1476.
29. Adams KL, Song K, Roessler PG, et al. 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*. 1999;96(24):13863-13868. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=24156&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
30. Pérez-Martínez X, Antaramian a, Vazquez-Acevedo M, et al. Subunit II of cytochrome c oxidase in Chlamydomonad algae is a heterodimer encoded by two independent nuclear genes. *J Biol Chem*. 2001;276(14):11302-11309. doi:10.1074/jbc.M010244200.

31. Szafranski P. Evolutionarily recent, insertional fission of mitochondrial cox2 into complementary genes in bilaterian Metazoa. *BMC Genomics*. 2017;18(1):269. doi:10.1186/s12864-017-3626-5.
32. Daley DO, Adams KL, Clifton R, et al. Gene transfer from mitochondrion to nucleus: novel mechanisms for gene activation from Cox2. *Plant J*. 2002;30(1):11-21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11967089>.
33. Daley DO, Clifton R, Whelan J. Intracellular gene transfer: reduced hydrophobicity facilitates gene transfer for subunit 2 of cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(16):10510-10515. doi:10.1073/pnas.122354399.
34. Funes S, Davidson E, Magallo S, Herion P, King MP, González-Halphen D. A Green Algal Apicoplast Ancestor. *Science (80-)*. 2002;298:2155.
35. Nedelcu AM, Lee RW, Lemieux C, Gray MW, Burger G. The complete mitochondrial DNA sequence of *Scenedesmus obliquus* reflects an intermediate stage in the evolution of the green algal mitochondrial genome. *Genome Res*. 2000;10(6):819-831. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10854413>. Accessed December 13, 2018.
36. Lindmark DG, Müller M. Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *J Biol Chem*. 1973;248(22):7724-7728. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4750424>. Accessed December 13, 2018.
37. Embley TM, van der Giezen M, Horner DS, Dyal PL, Foster P. Mitochondria and hydrogenosomes are two forms of the same fundamental organelle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2003;358(1429):191-201; discussion 201-2. doi:10.1098/rstb.2002.1190.
38. Popot JL, de Vitry C. On the microassembly of integral membrane proteins. *Annu Rev Biophys Biophys Chem*. 1990;19:369-403. doi:10.1146/annurev.bb.19.060190.002101.
39. Claros MG, Perea J, Shu Y, Samatey FA, Popot JL, Jacq C. Limitations to in vivo import of hydrophobic proteins into yeast mitochondria. The case of a cytoplasmically synthesized apocytochrome b. *Eur J Biochem*. 1995;771:762-771.
40. Björkholm P, Harish A, Hagström E, Ernst AM, Andersson SGE. Mitochondrial genomes are retained by selective constraints on protein targeting. *Proc Natl Acad Sci*. 2015;201421372. doi:10.1073/pnas.1421372112.
41. Björkholm P, Ernst AM, Hagström E, Andersson SGE. Why mitochondria need a genome revisited. *FEBS Lett*. 2017;591:65-75. doi:10.1002/1873-3468.12510.
42. Allen JF. Why chloroplasts and mitochondria contain genomes. *Comp Funct Genomics*. 2003;4(1):31-36. doi:10.1002/cfg.245.
43. Amiott E a, Jaehning J a. Mitochondrial transcription is regulated via an ATP "sensing" mechanism that couples RNA abundance to respiration. *Mol Cell*. 2006;22(3):329-338. doi:10.1016/j.molcel.2006.03.031.
44. Allen JF. Why chloroplasts and mitochondria retain their own genomes and genetic systems: Colocation for redox regulation of gene expression. *Proc Natl Acad Sci*. 2015;112(33):201500012. doi:10.1073/pnas.1500012112.
45. Johnston IG, Williams BP. Evolutionary inference across eukaryotes identifies

- specific pressures favoring mitochondrial gene retention. *Cell Syst.* 2016;2(2):101-111. doi:10.1016/j.cels.2016.01.013.
46. Pérez-Martínez X, Vazquez-Acevedo M, Tolkunova E, et al. Unusual location of a mitochondrial gene. Subunit III of cytochrome C oxidase is encoded in the nucleus of Chlamydomonad algae. *J Biol Chem.* 2000;275(39):30144-30152. doi:10.1074/jbc.M003940200.
  47. Funes S, Davidson E, Claros MG, et al. The typically mitochondrial DNA-encoded ATP6 subunit of the F1F0-ATPase is encoded by a nuclear gene in Chlamydomonas reinhardtii. *J Biol Chem.* 2002;277(8):6051-6058. doi:10.1074/jbc.M109993200.
  48. Bietenhader M, Martos A, Tetaud E, et al. Experimental relocation of the mitochondrial ATP9 gene to the nucleus reveals forces underlying mitochondrial genome evolution. *PLoS Genet.* 2012;8(8):e1002876. doi:10.1371/journal.pgen.1002876.
  49. Calvo SE, Mootha VK. The mitochondrial proteome and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2010;11:25-44. doi:10.1146/annurev-genom-082509-141720.
  50. Dolezal P, Likic V, Tachezy J, Lithgow T. Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. *Science (80- ).* 2006;313(5785):314-318.
  51. Fukasawa Y, Oda T, Tomii K, Imai K. Origin and Evolutionary Alteration of the Mitochondrial Import System in Eukaryotic Lineages. *Mol Biol Evol.* 2017;34(7):1574-1586. doi:10.1093/molbev/msx096.
  52. Gentle I, Gabriel K, Beech P, Waller R, Lithgow T. The Omp85 family of proteins is essential for outer membrane biogenesis in mitochondria and bacteria. *J Cell Biol J Cell Biol.* 2004;164(1). doi:10.1083/jcb.200310092.
  53. Gakh O, Cavadini P, Isaya G. *Mitochondrial Processing Peptidases.* www.bba-direct.com. Accessed February 10, 2019.
  54. Kuhn A, Stuart R, Henry R, Dalbey RE. The Alb3/Oxa1/YidC protein family: membrane-localized chaperones facilitating membrane protein insertion? *Trends Cell Biol.* 2003;13(10):510-516. doi:10.1016/J.TCB.2003.08.005.
  55. Clements A, Bursac D, Gatsos X, et al. *The Reducible Complexity of a Mitochondrial Molecular Machine.* www.pnas.org/cgi/content/full/. Accessed February 10, 2019.
  56. Boorstein WR, Ziegelhoffer T, Craig EA. Molecular evolution of the HSP70 multigene family. *J Mol Evol.* 1994;38(1):1-17.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8151709>. Accessed February 10, 2019.
  57. Herrmann JM. Converting bacteria to organelles : evolution of mitochondrial protein sorting. *Trends Microbiol.* 2003;11(2):74-79.
  58. Herrmann J, Neupert W. Protein Insertion into the Inner Membrane of Mitochondria. *IUBMB Life (International Union Biochem Mol Biol Life).* 2003;55(4-5):219-225. doi:10.1080/1521654031000123349.
  59. Neupert W, Herrmann JM. Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem.* 2007;76:723-749. doi:10.1146/annurev.biochem.76.052705.163409.
  60. Schmidt O, Pfanner N, Meisinger C. Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(9):655-

667. doi:10.1038/nrm2959.
61. Verechshagina NA, Konstantinov YM, Kamenski PA, Mazunin IO. Import of Proteins and Nucleic Acids into Mitochondria. 2018;83(6).
  62. Bohnert M, Rehling P, Guiard B, Herrmann JM, Pfanner N, van der Laan M. Cooperation of stop-transfer and conservative sorting mechanisms in mitochondrial protein transport. *Curr Biol*. 2010;20(13):1227-1232. doi:10.1016/j.cub.2010.05.058.
  63. Houtkooper RH, Mouchiroud L, Ryu D, et al. Mitonuclear protein imbalance as a conserved longevity mechanism. *Nature*. 2013;497(7450):451-457. doi:10.1038/nature12188.
  64. Couvillion MT, Soto IC, Shipkovenska G, Churchman LS. Synchronized mitochondrial and cytosolic translation programs. *Nature*. 2016;(1):1-17. doi:10.1038/nature18015.
  65. Haltia T, Semo N, Arrondo JL, Goñi FM, Freire E. Thermodynamic and structural stability of cytochrome c oxidase from Paracoccus denitrificans. *Biochemistry*. 1994;33(32):9731-9740. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8068652>. Accessed March 10, 2014.
  66. Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, et al. The Whole Structure of the 13-Subunit Oxidized Cytochrome c Oxidase at 2.8 Å. *Science (80-)*. 1996;272(may):1136-1144.
  67. Michel H. The mechanism of proton pumping by cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci*. 1998;95(22):12819-12824. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9788998](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9788998).
  68. Wikström M. Cytochrome c Oxidase. *Encycl Life Sci*. 2010:1-10. doi:10.1002/9780470015902.a0000649.pub2.
  69. Herrmann JM, Funes S. Biogenesis of cytochrome oxidase-sophisticated assembly lines in the mitochondrial inner membrane. *Gene*. 2005;354:43-52. doi:10.1016/j.gene.2005.03.017.
  70. Soto IC, Fontanesi F, Liu J, Barrientos A. Biogenesis and assembly of eukaryotic cytochrome c oxidase catalytic core. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1817(6):883-897. doi:10.1016/j.bbabi.2011.09.005.
  71. McStay GP, Su CH, Tzagoloff A. Modular assembly of yeast cytochrome oxidase. *Mol Biol Cell*. 2013;24(4):440-452. doi:10.1091/mbc.E12-10-0749.
  72. Perez-Martinez X, Butler CA, Shingu-Vazquez M, Fox TD. Dual Functions of Mss51 Couple Synthesis of Cox1 to Assembly of Cytochrome c Oxidase in *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondria. *Mol Biol Cell*. 2009;20:4371-4380. doi:10.1091/mbc.E09.
  73. García-Villegas R, Camacho-Villasana Y, Shing-Vázquez MÁ, et al. The Cox1 C-terminal domain is a central regulator of cytochrome c oxidase biogenesis in yeast mitochondria. *J Biol Chem*. 2017;292(26):10912-10925. doi:10.1074/jbc.M116.773077.
  74. Balsa E, Marco R, Perales-Clemente E, et al. NDUFA4 Is a Subunit of Complex IV of the Mammalian Electron Transport Chain. *Cell Metab*. 2012;16(3):378-386. doi:10.1016/J.CMET.2012.07.015.

75. Fernández-Vizarra E, Tiranti V, Zeviani M. Assembly of the oxidative phosphorylation system in humans: What we have learned by studying its defects. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2009;1793(1):200-211. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.05.028.
76. Franco LVR, Su CH, McStay GP, Yu GJ, Tzagoloff A. Cox2p of yeast cytochrome oxidase assembles as a stand-Alone subunit with the Cox1p and Cox3p modules. *J Biol Chem.* 2018;293(43):16899-16911. doi:10.1074/jbc.RA118.004138.
77. Timón-Gómez A, Nývltová E, Abriata LA, Vila AJ, Hosler J, Barrientos A. Mitochondrial cytochrome c oxidase biogenesis: Recent developments. *Semin Cell Dev Biol.* 2017;1-16. doi:10.1016/j.semcdb.2017.08.055.
78. Green-Willms NS, Butler CA, Dunstan HM, Fox TD. Pet111p, an Inner Membrane-bound Translational Activator That Limits Expression of the *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondrial Gene COX2. *J Biol Chem.* 2001;276(9):6392-6397. doi:10.1074/jbc.M009856200.
79. Pratje E, Mannhaupt G, Michaelis G, Beyreuther K. A nuclear mutation prevents processing of a mitochondrialy encoded membrane protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 1983;2(7):1049-1054. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6313350>. Accessed June 30, 2017.
80. He S, Fox TD. Membrane translocation of mitochondrialy coded Cox2p: distinct requirements for export of N and C termini and dependence on the conserved protein Oxa1p. *Mol Biol Cell.* 1997;8(8):1449-1460. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC140403/>
81. Hell K, Herrmann JM, Pratje E, Neupert W, Stuart RA. Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(5):2250-2255. doi:10.1073/pnas.95.5.2250.
82. Sevarino KA, Poyton RO. Mitochondrial Membrane Biogenesis: Identification of a Precursor to Yeast Cytochrome c Oxidase Subunit II, an Integral Polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980;77:142-146. doi:10.2307/8158.
83. Torello AT, Overholtzer MH, Cameron VL, Bonnefoy N, Fox TD. Deletion of the leader peptide of the mitochondrialy encoded precursor of *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome c oxidase subunit II. *Genetics.* 1997;145(4):903-910. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9093845>. Accessed June 30, 2017.
84. Hell K, Tzagoloff A, Neupert W, Stuart RA. Identification of Cox20p, a Novel Protein Involved in the Maturation and Assembly of Cytochrome Oxidase Subunit 2\*. 2000. <http://www.jbc.org/>. Accessed December 21, 2018.
85. Saracco SA, Fox TD. Cox18p Is Required for Export of the Mitochondrialy Encoded *Saccharomyces cerevisiae* Cox2p C-Tail and Interacts with Pnt1p and Mss2p in the Inner Membrane. *Mol Biol Cell.* 2002;13(6):1122-1131. doi:10.1091/mbc.01.
86. Fiumera HL, Broadley SA, Fox TD. Translocation of mitochondrialy synthesized Cox2 domains from the matrix to the intermembrane space. *Mol Cell Biol.* 2007;27(13):4664-4673. doi:10.1128/MCB.01955-06.
87. Funes S, Nargang FE, Neupert W, Herrmann JM. The Oxa2 Protein of *Neurospora crassa* Plays a Critical Role in the Biogenesis of Cytochrome Oxidase and

- Defines a Ubiquitous Subbranch of the Oxa1/YidC/ Alb3 Protein Family □ D. *Mol Biol Cell*. 2004;15:1853-1861. doi:10.1091/mbc.E03-11-0789.
88. Fiumera HL, Dunham MJ, Saracco SA, Butler CA, Kelly JA, Fox TD. Translocation and assembly of mitochondrialy coded *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome c oxidase subunit Cox2 by Oxa1 and Yme1 in the absence of Cox18. *Genetics*. 2009;182(2):519-528. doi:10.1534/genetics.109.101196.
  89. Pacheu-Grau D, Bareth B, Dudek J, et al. Cooperation between COA6 and SCO2 in COX2 maturation during cytochrome c oxidase assembly links two mitochondrial cardiomyopathies. *Cell Metab*. 2015;21(6):823-833. doi:10.1016/j.cmet.2015.04.012.
  90. Bonnefoy N, Remacle C, Fox TD. Genetic Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Chlamydomonas reinhardtii* Mitochondria. *Methods Cell Biol*. 2007;80:525-548. doi:10.1016/S0091-679X(06)80026-9.
  91. de Grey AD. Mitochondrial gene therapy: an arena for the biomedical use of inteins. *Trends Biotechnol*. 2000;18(9):394-399.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10942964>. Accessed June 30, 2017.
  92. DiMauro S, Hirano M, Schon EA. Approaches to the treatment of mitochondrial diseases. *Muscle Nerve*. 2006;34(3):265-283. doi:10.1002/mus.20598.
  93. Kyriakouli DS, Boesch P, Taylor RW, Lightowers RN. Progress and prospects: gene therapy for mitochondrial DNA disease. *Gene Ther*. 2008;15(14):1017-1023. doi:10.1038/gt.2008.91.
  94. Guy J, Qi X, Pallotti F, et al. Rescue of a mitochondrial deficiency causing Leber hereditary optic neuropathy. *Ann Neurol*. 2002;52(5):534-542.
  95. Oca-Cossio J, Kenyon L, Hao H, Moraes CT. Limitations of Allotopic Expression of Mitochondrial Genes in Mammalian Cells. *Genetics*. 2003;165(October):707-720.
  96. Perales-Clemente E, Fernández-Silva P, Acín-Pérez R, Pérez-Martos A, Enríquez JA. Allotopic expression of mitochondrial-encoded genes in mammals: achieved goal, undemonstrated mechanism or impossible task? *Nucleic Acids Res*. 2011;39(1):225-234. doi:10.1093/nar/gkq769.
  97. Bonnet C, Kaltimbacher V, Ellouze S, et al. 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*. 2007;10(2):127-144.
  98. Bonnet C, Augustin S, Ellouze S, et al. 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*. 2008;1783(10):1707-1717. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.04.018.
  99. Manfredi G, Fu J, Ojaimi J, et al. Rescue of a deficiency in ATP synthesis by transfer of MTATP6, a mitochondrial DNA-encoded gene, to the nucleus. *Nat Genet*. 2002;30:394-399.
  100. Ojaimi J, Pan J, Santra S, Snell WJ, Schon EA. An Algal Nucleus-encoded Subunit of Mitochondrial ATP Synthase Rescues a Defect in the Analogous Human Mitochondrial-encoded Subunit. *Mol Biol Cell*. 2002;13(November):3836-3844. doi:10.1091/mbc.E02.

101. Zullo S, Parks W, Chloupkova M, et al. 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.* 2005;8(1):18-28.
102. Bokori-Brown M, Holt IJ. 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.* 2006;9(4):455-469.
103. Figueroa-Martínez F, Vázquez-Acevedo M, Cortés-Hernández P, et al. What limits the allotropic expression of nucleus-encoded mitochondrial genes? The case of the chimeric Cox3 and Atp6 genes. *Mitochondrion*. 2011;11(1):147-154. doi:10.1016/j.mito.2010.09.003.
104. Tsukihara T, Shimokata K, Katayama Y, Shimada H, Muramoto K. The low-spin heme of cytochrome c oxidase as the driving element of the proton-pumping process. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100(26):15304-15309.
105. Shimokata K, Katayama Y, Murayama H, et al. The proton pumping pathway of bovine heart cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104(10):4200-4205.
106. Sanchirico M, Tzellas A, Fox TD, Conrad-Webb H, Periman PS, Mason TL. Relocation of the unusual VAR1 gene from the mitochondrion to the nucleus. *Biochem Cell Biol.* 1995;73(11-12):987-995. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8722014>. Accessed October 3, 2013.
107. Nagley P, Farrell LB, Gearing DP, Nero D, Meltzer S, Devenish RJ. 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.* 1988;85(7):2091-2095. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dbt=Citation&list\\_uids=2895470](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dbt=Citation&list_uids=2895470).
108. Law RH, Devenish RJ, Nagley P. Assembly of imported subunit 8 into the ATP synthase complex of isolated yeast mitochondria. *Eur J Biochem.* 1990;188(2):421-429. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2138540>. Accessed June 30, 2017.
109. Supekova L, Supek F, Greer JE, Schultz PG. A single mutation in the first transmembrane domain of yeast COX2 enables its allotropic expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(11):5047-5052. doi:10.1073/pnas.1000735107.
110. Calado-Botelho S, Osterberg M, Reichert AS, et al. TIM23-mediated insertion of transmembrane  $\alpha$ -helices into the mitochondrial inner membrane. *EMBO J.* 2011;30(6):1003-1011. doi:10.1038/emboj.2011.29.
111. Lott MT, Leipzig JN, Derbeneva O, et al. mtDNA variation and analysis using MITOMAP and MITOMASTER. *Curr Protoc Bioinforma.* 2013;1(123):1.23.1-26.
112. Cruz-Torres V, Vázquez-Acevedo M, García-Villegas R, Pérez-Martínez X, Mendoza-Hernández G, 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. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1817(12):2128-2139. doi:10.1016/j.bbabi.2012.09.006.
113. Jiménez-Suárez A, Vázquez-Acevedo M, Rojas-Hernández A, Funes S, Uribe-Carvajal S, González-Halphen D. In Polytomella sp. mitochondria, biogenesis of

- the heterodimeric COX2 subunit of cytochrome c oxidase requires two different import pathways. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1817(5):819-827.  
doi:10.1016/j.bbabi.2012.02.038.
114. Elliott LE, Saracco SA, Fox TD. Multiple roles of the Cox20 chaperone in assembly of *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome c oxidase. *Genetics*. 2012;190(2):559-567. doi:10.1534/genetics.111.135665.
115. Gerdes F, Tatsuta T, Langer T. Mitochondrial AAA proteases – Towards a molecular understanding of membrane-bound proteolytic machines. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2012;1823(1):49-55.  
doi:10.1016/j.bbamcr.2011.09.015.
116. Jiménez-Suárez A, Vázquez-Acevedo M, Miranda-Astudillo H, González-Halphen D. Cox2A/Cox2B subunit interaction in *Polytomella* sp. cytochrome c oxidase: role of the Cox2B subunit extension. *J Bioenerg Biomembr*. 2017;49(6):453-461.  
doi:10.1007/s10863-017-9728-6.
117. Anand R, Langer T, James Baker M. Proteolytic control of mitochondrial function and morphogenesis ☆. *BBA - Mol Cell Res*. 2013;1833:195-204.  
doi:10.1016/j.bbamcr.2012.06.025.
118. Tischner C, Wenz T. Keep the fire burning: Current avenues in the quest of treating mitochondrial disorders. *Mitochondrion*. 2015;24:32-49.  
doi:10.1016/j.mito.2015.06.002.
119. González-Halphen D, Funes S, Pérez-Martínez X, et al. Genetic Correction of Mitochondrial Diseases. *Ann New York Acad Sci*. 2004;1019:232-239.
120. Neupert W. A perspective on transport of proteins into mitochondria: a myriad of open questions. *J Mol Biol*. 2015;427(6):1135-1158.  
doi:10.1016/j.jmb.2015.02.001.
121. Tsukihara T, Shimokata K, Katayama Y, et al. The low-spin heme of cytochrome c oxidase as the driving element of the proton-pumping process. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(26):15304-15309.
122. Cberman-Thibault H, Augustin S, Lechauve C, et al. Nuclear expression of mitochondrial ND4 leads to the protein assembling in complex I and prevents optic atrophy and visual loss. *Mol Ther – Methods Clin Dev*. 2015;2(October 2014):15003. doi:10.1038/mtm.2015.3.
123. Boominathan A, Vanhoozer S, Basisty N, et al. Stable nuclear expression of ATP8 and ATP6 genes rescues a mtDNA Complex V null mutant. *Nucleic Acids Res*. 2016;1-16. doi:10.1093/nar/gkw756.
124. Chung C, Niemela S, Miller R. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(April):2172-2175.
125. De La Cruz Torres V. Expresión alotópica del gen mitocondrial cox2 en *Saccharomyces cerevisiae*: caracterización de la citocromo c oxidasa resultante. 2014.
126. Mulero JJ, Fox TD. Alteration of the *Saccharomyces cerevisiae* COX2 mRNA 5'-untranslated leader by mitochondrial gene replacement and functional interaction with the translational activator protein PET111. *Mol Biol Cell*. 1993;4(12):1327-1335.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC275768/>

- ntrez&rendertype=abstract.
127. Taxis C, Knop M. System of centromeric, episomal, and integrative vectors based on drug resistance markers for *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechniques*. 2006;40(1):73-78. doi:10.2144/000112040.
  128. Estabrook RW. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP : O ratios. *Methods Enzymol*. 1967;10:41-47. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0076687967100104>.
  129. Gietz RD, Schiestl RH. Quick and easy yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc*. 2007;2(1):35-37. doi:10.1038/nprot.2007.14.
  130. Hoffman CS, Winston F. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*. 1987;57:267-272. <https://pdfs.semanticscholar.org/2f80/5824d164cf3104d1b950642f57e09f5312d.pdf>. Accessed January 14, 2019.
  131. Uribe S, Ramirez J, Peña A. Effects of beta-pinene on yeast membrane functions. *J Bacteriol*. 1985;161(3):1195-1200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC354770/>. ntrez&rendertype=abstract. Accessed October 3, 2013.
  132. Peña A, Piña MZ, Escamilla E, Piña E. A novel method for the rapid preparation of coupled yeast mitochondria. *FEBS Lett*. 1977;80(1):209-213. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/330241>. Accessed October 3, 2013.
  133. Kim H, Calado-Botelho S, Park K, Kim H. Use of carbonate extraction in analyzing moderately hydrophobic transmembrane proteins in the mitochondrial inner membrane. *Protein Sci*. 2015;24:2063-2069. doi:10.1002/pro.2817.
  134. Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem*. 1978;87(1):206-210. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC260733/>. Accessed August 3, 2017.
  135. Zerbetto E, Vergani L, Dabbeni-Sala F. Quantification of muscle mitochondrial oxidative phosphorylation enzymes via histochemical staining of blue native polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. 1997;18(11):2059-2064. doi:10.1002/elps.1150181131.
  136. Molnar AM, Alves AA, Pereira-Da-Silva L, Macedo D V, Dabbeni-Sala F. *BN-PAGE and Muscle Mitochondrial Complexes*; 2004. <http://www.scielo.br/pdf/bjmbr/v37n7/5337.pdf>. Accessed January 12, 2019.
  137. Wittig I, Schägger H. Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics*. 2005;5(17):4338-4346. doi:10.1002/pmic.200500081.
  138. Fukasawa Y, Tsuji J, Fu S-C, Tomii K, Horton P, Imai K. MitoFates: Improved Prediction of Mitochondrial Targeting Sequences and Their Cleavage Sites. *Mol Cell Proteomics*. 2015;14(4):1113-1126. doi:10.1074/mcp.M114.043083.
  139. Minet M, Dufour M, Lacroute F. Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* cDNAs. 1992;2(3):417-422.
  140. Beasley EM, Muller S, Schatz G. The signal that sorts yeast cytochrome b2 to the mitochondrial intermembrane space contains three distinct functional regions.

*EMBO J.* 1993;12(6):2303-2311.

141. Milenkovic D, Rassing T, Mu JM, et al. Identification of the Signal Directing Tim9 and Tim10 into the Intermembrane Space of Mitochondria. 2009;20:2530-2539. doi:10.1091/mbc.E08.
142. Sideris DP, Petrakis N, Katrakili N, et al. A novel intermembrane space-targeting signal docks cysteines onto Mia40 during mitochondrial oxidative folding. *J Cell Biol.* 2009;187(7):1007-1022. doi:10.1083/jcb.200905134.
143. Winzeler EA, Shoemaker DD, Astromoff A, et al. Functional Characterization of the *S. cerevisiae* Genome by Gene Deletion and Parallel Analysis. *Science (80- ).* 1999;285(5429):901-906.