



Memoria del LII Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

Respiración y citocromo *c* oxidasa: ¿Cómo se ensambla esta enzima?

Respiration and cytochrome *c* oxidase: How is this enzyme assembled?

Pérez-Martínez, Xochitl¹ ; Camacho-Villasana, Yolanda¹ ; Shingú-Vázquez, Miguel²,
Zamudio-Ochoa, Angélica³ ; García-Villegas, Rodolfo⁴ ; García-Guerrero, Aldo E.⁵ and
Pedroza-Davila, Ulrik¹

1. Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.
2. Yanunijarra Aboriginal Corporation. Fitzroy Crossing, Australia
3. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Thomas Jefferson University, Philadelphia, USA.
4. AstraZeneca, Gotemburgo, Suecia.
5. Department of Biochemistry, University of Utah School of Medicine. Utah, USA.

✉ Correspondencia. Avenida Universidad 3000, Col. Universidad Nacional Autónoma de México C.U., Coyoacán, CDMX, CP 04510. Tel: (+52)5556225662. xperez@ifc.unam.mx

Editor responsable: Mercedes Esparza Perusquía
DOI: <https://doi.org/10.22201/fm.0188137xp.2025.49.05>

Recibido: 12 de marzo de 2025
Revisado: 24 de marzo de 2025
Aceptado: 4 de abril de 2025

Resumen

La citocromo *c* oxidasa es la enzima encargada de transformar el oxígeno que inhalamos en agua. Es una enzima compuesta por 13 subunidades y varios grupos prostéticos. La citocromo *c* oxidasa se localiza en la membrana plasmática de bacterias y en la membrana interna de la mitocondria y forma parte de la fosforilación oxidativa. En este proceso se produce la mayor parte de las moléculas de adenosín trifosfato (ATP) que contienen la energía que las células requieren para todas sus funciones. Si una parte de este proceso falla, entonces las células no podrán producir las cantidades de ATP que requieren y se desarrollarán patologías. Por eso es tan importante estudiar a la mitocondria y a los complejos de la fosforilación oxidativa, así como a las enfermedades asociadas a las fallas en este proceso. En el presente trabajo hablaremos de la citocromo *c* oxidasa y de lo que entendemos a la fecha de cómo se ensambla esta enzima en los eucariontes. Nuestro laboratorio estudia los mecanismos de biogénesis de la subunidad más grande de esta enzima, la subunidad I (Cox1). Esta subunidad no sólo contiene el sitio catalítico de

Abstract

Cytochrome *c* oxidase is the enzyme responsible for transforming the oxygen we inhale into water. It is an enzyme composed of 13 subunits and several prosthetic groups. Cytochrome *c* oxidase is in the mitochondrial inner membrane and the membrane of bacteria and is part of the oxidative phosphorylation. In this process, most of the adenosine triphosphate (ATP) molecules, which contain the energy required by cells for all their functions, are produced. If any part of this process fails, the cells will be unable to produce the ATP they need, leading to pathologies. Thus, studying mitochondria, the oxidative phosphorylation complexes, and diseases associated with failures in this process is so important. In this work, we will discuss cytochrome *c* oxidase and what we currently understand about how this enzyme assembles in the eukarya. Our laboratory studies the mechanisms of biogenesis of the largest subunit of this enzyme, subunit I (Cox1). This subunit not only contains the catalytic site of the enzyme for oxygen reduction, but it is also the

reducción de oxígeno de la enzima, sino que es también un centro de nucleación para incorporar el resto de las subunidades del complejo enzimático. Cox1 se codifica en el DNA mitocondrial, la proteína se sintetiza en los ribosomas localizados en la matriz mitocondrial y debe insertarse en la membrana interna mitocondrial, adquirir sus grupos prostéticos y ensamblarse con el resto de subunidades, unas provenientes del citosol y otras también codificadas en el genoma mitocondrial. La síntesis y el ensamblaje de Cox1 son procesos acoplados, de tal forma que si algo falla en el ensamblaje de la citocromo *c* oxidasa, entonces la síntesis de Cox1 disminuye. En este trabajo discutiremos lo que sabemos sobre los mecanismos de esta intrincada regulación síntesis/ensamblaje de Cox1.

Palabras claves: Citocromo *c* oxidasa, levadura, mRNA mitocondrial, mitocondrias, traducción

nucleation center for incorporating the remaining subunits of the complex. Cox1 is encoded in the mitochondrial DNA, the protein is synthesized in ribosomes located in the mitochondrial matrix, and it must be inserted into the mitochondrial inner membrane, acquire its prosthetic groups, and assemble with the rest of the subunits—some originating from the cytosol and others also encoded in the mitochondrial genome. The synthesis and assembly of Cox1 are coupled processes, so if there is a failure in the assembly of cytochrome *c* oxidase, the synthesis of Cox1 decreases. In this work, we will discuss the mechanisms behind this intricate synthesis/assembly regulation of Cox1.

Keywords: Cytochrome *c* oxidase, mitochondria, mitochondrial mRNA, translation, yeast

Introducción

La citocromo *c* oxidasa forma parte de la fosforilación oxidativa.

Podemos entender a la fosforilación oxidativa mitocondrial como un proceso que consta de dos partes. En la primera parte un grupo de enzimas conocidas como complejos respiratorios transfieren electrones desde diversos metabolitos hasta el oxígeno molecular (O_2), reduciéndolo a agua (H_2O). El O_2 es entonces el último aceptor de electrones de la cadena respiratoria. Acoplado a esta serie de reacciones REDOX algunos complejos respiratorios bombean protones (H^+) desde la matriz mitocondrial al espacio intermembranal o al interior de las crestas. Lo que genera una diferencia de potencial eléctrico y de pH entre ambos compartimientos. En la segunda parte, la energía contenida en esta diferencia de concentración de protones transmembranal (denominada fuerza protón motriz por Peter Mitchell, Δp (1)) es utilizada por la enzima ATP sintasa para fosforilar al ADP (la Δp se emplea para la liberación del ATP del sitio β ATP) (Figura 1).

La composición de la citocromo *c* oxidasa varía ligeramente dependiendo del organismo. Sin embargo, tres subunidades están altamente conservadas y conforman el centro catalítico de la enzima: las subunidades I, II y III₂. Los electrones provenientes del citocromo *c* ingresan a la citocromo *c* oxidasa por la subunidad II (Cox2) que contiene un centro binuclear de cobre, Cu_A . Ahora los electrones

se transfieren a un hemo tipo a localizado en la subunidad I (Cox1) y posteriormente a un centro binuclear compuesto por un hemo tipo a_3 (hemo a_3) y un cobre (Cu_B). Es aquí donde se lleva a cabo la reacción de reducción del oxígeno para transformarse en agua. La subunidad III (Cox3) no cuenta con un sitio catalítico, pero podría participar en la conducción del oxígeno al centro binuclear hemo a_3/Cu_B en Cox1. Los protones que contribuyen a la fuerza protón motriz se transfieren al espacio intermembranal a través de Cox1 (6). Mucho de los mecanismos de reducción del oxígeno y de la transferencia de protones en la citocromo *c* oxidasa se comprende gracias al trabajo de Mårten Wikström (Universidad de Helsinki), famoso además por sostener acalorados debates con Peter Mitchell acerca del tema, y en donde Wikström demostró estar en lo correcto por encima de Peter Mitchell (quien postuló la teoría quimiosmótica y fue ganador del premio Nobel) (Figura 2).

¿Cómo es que las subunidades codificadas en el genoma mitocondrial pueden ensamblarse en la membrana interna del organelo junto con las subunidades que se importan desde el citosol? ¿Cómo se integran los grupos prostéticos de la enzima? ¿Cómo se sintetizan las subunidades Cox1, Cox2, Cox3 en la mitocondria? ¿Existen enfermedades en humanos asociadas a mutaciones en el proceso de ensamblaje de esta enzima?

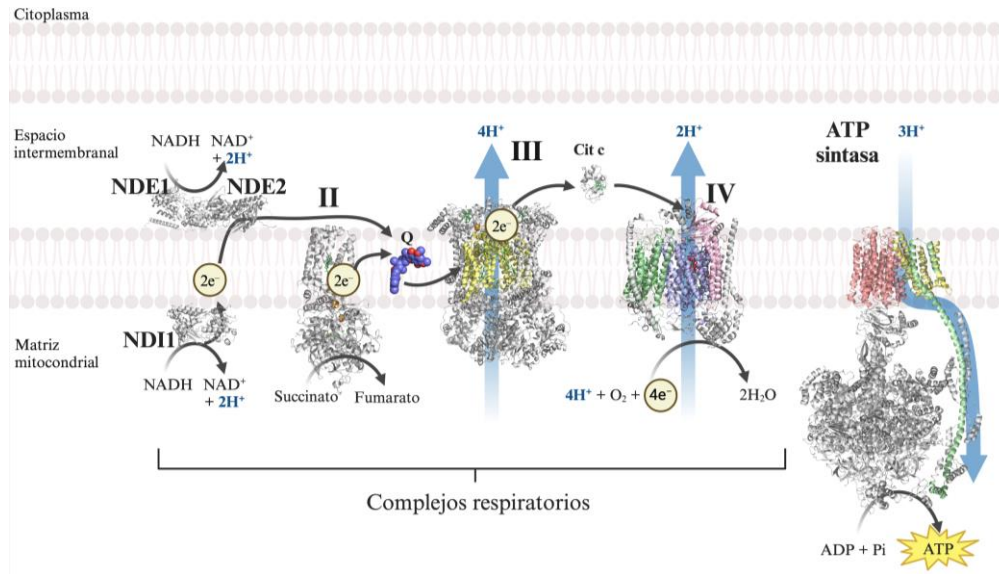


Figura 1. La fosforilación oxidativa en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Metabolitos como el NADH y succinato se oxidan por componentes de la cadena respiratoria mitocondrial. En mamíferos quien recibe los electrones provenientes del NADH es el complejo I. Sin embargo, *S. cerevisiae* no presenta al CI característico de los eucariotes, y en su lugar cuenta con un conjunto de deshidrogenasas alternas que oxidan al NADH citosólico y mitocondrial (NDE1, NDE2 y NDI1). Por otro lado, el succinato se oxida por el complejo II (succinato deshidrogenasa). En ambos casos los electrones se transfieren a una poza de quinonas (Q), las cuales a su vez transfieren los electrones al complejo III₂ (complejo bc1). Los electrones del complejo III₂ pasan al citocromo *c*, una proteína soluble de espacio intermembranal. Finalmente, el complejo IV (citocromo *c* oxidasa) transfiere los electrones del citocromo *c* al oxígeno para producir agua. Los complejos III₂ y IV translocan protones al espacio intermembranal. La fuerza protón motriz presente en este gradiente se utiliza por la ATP sintasa para producir ATP mientras transloca protones de regreso a la matriz mitocondrial. Las subunidades de los complejos de la fosforilación oxidativa que están en colores se codifican en el genoma mitocondrial, mientras que las subunidades en gris son importadas desde el citoplasma. PDBs empleados: NDE1, NDE2 y NDI1, AlphaFold 3 (2), Complejo II PDB 1ZOY (3), complejos bc1 y citocromo *c* oxidasa PDB 9ETZ (4), ATP sintasa PDB 5FIL (5).

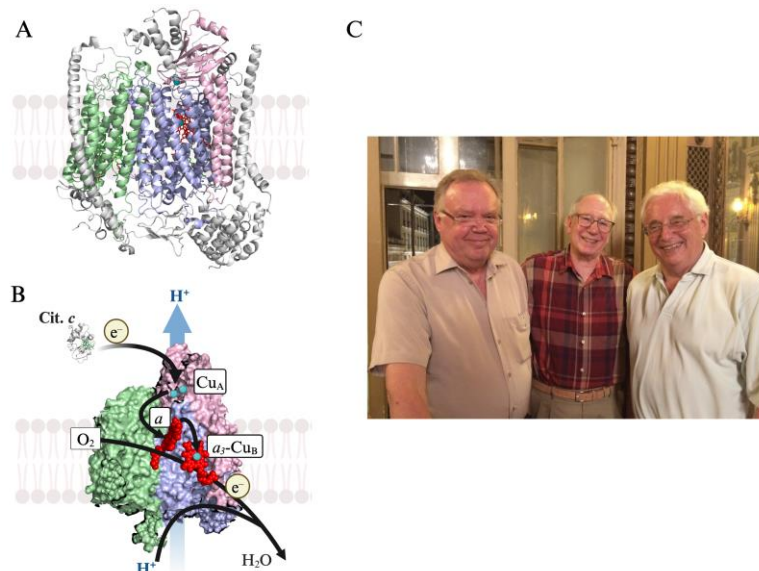


Figura 2. Estructura y función de la citocromo *c* oxidasa. **A)** Estructura de la citocromo *c* oxidasa de la levadura *S. cerevisiae*. En gris se muestran las subunidades codificadas en el genoma nuclear y que se importan a la mitocondria. En colores se muestran a las subunidades Cox1 (lila), Cox2 (rosa) y Cox3 (verde), que forman el centro catalítico de la enzima y que se codifican en el genoma mitocondrial. PDB 9ETZ (4) Modificado con Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.5.5 Schrödinger, LLC). **B)** Descripción de la transferencia de electrones y protones que se lleva a cabo en la citocromo *c* oxidasa. **C)** Fotografía en que se muestra, de izquierda a derecha a Márten Wikström (1945-2024), de la universidad de Helsinki, dedicado a estudiar los mecanismos de reacción de la citocromo *c* oxidasa, Robert Gennis (Universidad de Illinois, Urbana-Champaign), dedicado a estudiar las cadenas transportadoras de electrones en bacterias, y John Walker (Universidad de Cambridge), dedicado a estudiar a la ATP sintasa y ganador del premio Nobel. Foto tomada por Xochitl Pérez Martínez en la European Bioenergetics Conference (EBEC 2014).

© 2025 Mensaje Bioquímico. ISSN-0188-137X

Comité Editorial: Echeverría-Rodríguez, O.; Esparza-Perusquía, M.; Meraz-Cruz, N.; Riveros-Rosas, H.; Vázquez-Meza, H. y Vilchis-Landeros, M.M. Publicado por el Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM.

Uno de los modelos que más nos ha permitido comprender la biogénesis de la citocromo *c* oxidasa es la levadura de pan *S. cerevisiae* (Figura 3). Es un organismo de fácil manipulación y en el que se han desarrollado herramientas bioquímicas y moleculares para responder distintas preguntas sobre la célula. Este es un organismo anaerobio facultativo que puede sobrevivir fermentando o respirando. Esta característica ha permitido estudiar mutantes de genes relacionados a la función mitocondrial que en otros organismos serían letales. Además, junto con el alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* son los

organismos en que a la fecha es posible mutar el DNA mitocondrial por biobalística. Una herramienta poderosa para entender con mayor profundidad los mecanismos de expresión del genoma mitocondrial (9). Varias proteínas involucradas en el ensamblaje de la citocromo *c* oxidasa se han descrito por primera vez en la levadura, y están conservadas en los mamíferos. La levadura ha sido también un modelo esencial para entender las bases moleculares de patologías derivadas de mutaciones que afectan el ensamblaje de la citocromo *c* oxidasa en los humanos (para ver un ejemplo consulta (10)).

A



B

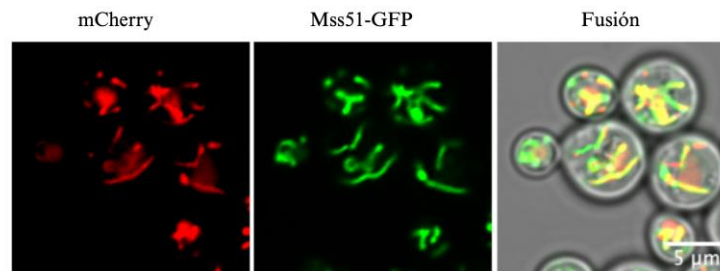


Figura 3. La levadura *S. cerevisiae* como modelo de estudio de la mitocondria. **A)** La levadura *S. cerevisiae* puede crecer en medios fermentables o respiratorios. En la imagen se muestra el crecimiento de la levadura en medio fermentativo de glucosa por 3 días a 30°C. **B)** Estructura de la red mitocondrial de levadura en el microscopio confocal. Las células de levadura se cotransformaron con 2 plásmidos, uno codifica a una proteína mCherry fluorescente que se dirige a la mitocondria gracias a una presecuencia mitocondrial. El otro plásmido contiene a Mss51 fusionada con GFP. Mss51 es un factor de biogénesis de la subunidad Cox1 de la citocromo *c* oxidasa (ver más adelante). A la derecha se observa la colocalización de mCherry y Mss51-GFP en la mitocondria. Foto tomada con la ayuda de la Dra. Ariann Mendoza, IFC, UNAM.

Traducción de los mRNAs mitocondriales

Las proteínas que se codifican en el genoma mitocondrial se transcriben en la matriz del organelo y sus transcritos se procesan para formar RNAs mensajeros (mRNAs). Cada mRNA mitocondrial tiene un grupo de proteínas específicas conocidas como activadores traduccionales, los cuales actúan en la región 5' no traducida de su mRNA blanco y permiten que el mitoribosoma inicie la traducción. En el caso de las subunidades de la citocromo *c* oxidasa los activadores traduccionales del mRNA de *COX1* son Pet309 y Mss51, mientras que para el mRNA de *COX2* es Pet111 y para el mRNA de *COX3* son Pet494, Pet122 y Pet54 (Figura 4) (11).

La citocromo *c* oxidasa de levadura se ensambla por módulos

El grupo de Alexander Tzagoloff de la Universidad de Columbia propuso que cada una de las 3 subunidades codificadas en la mitocondria forma un módulo con subunidades importadas del citosol y con factores de ensamblaje que participan en diferentes etapas (12, 13). Se han identificado una variedad de factores de ensamblaje, aunque sus mecanismos de acción se desconocen. A su vez la citocromo *c* oxidasa puede formar supercomplejos, asociaciones supramoleculares en que una o dos copias de la citocromo *c* oxidasa se asocian con el dímero obligado de complejo III. La formación de supercomplejos también requiere de factores proteicos (14) (Figura 5).

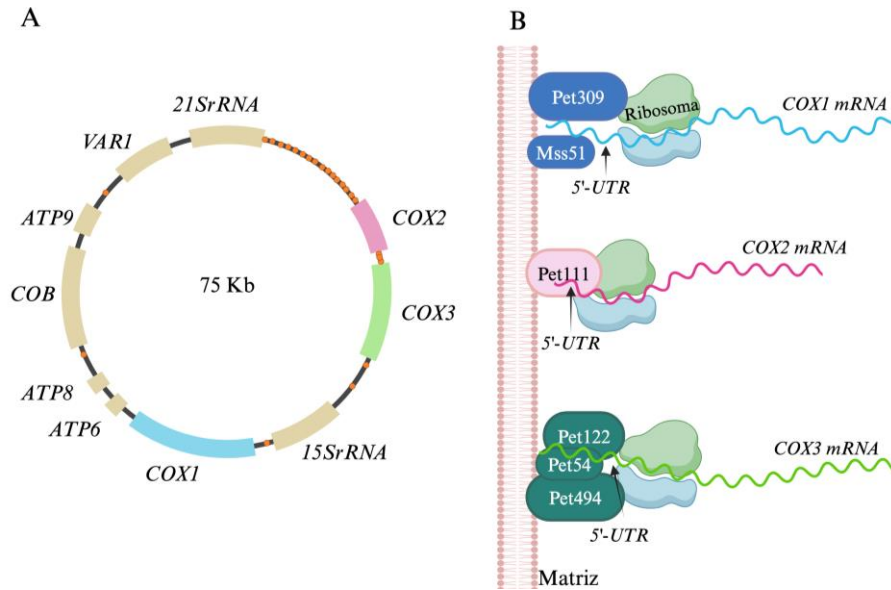


Figura 4. El genoma mitocondrial de la levadura. **A)** Mapa circular del genoma mitocondrial de la levadura, el cual codifica para 8 proteínas que incluyen a Var1, proteína de la subunidad chica del mitorribosoma, Cox1, Cox2 y Cox3 de la citocromo *c* oxidasa, citocromo *b* del complejo *bc₁*, y Atp6, Atp8 y Atp9 de la ATP sintasa. **B)** Esquema de los mRNAs mitocondriales de *COX1*, *COX2* y *COX3* con sus respectivos activadores traduccionales.

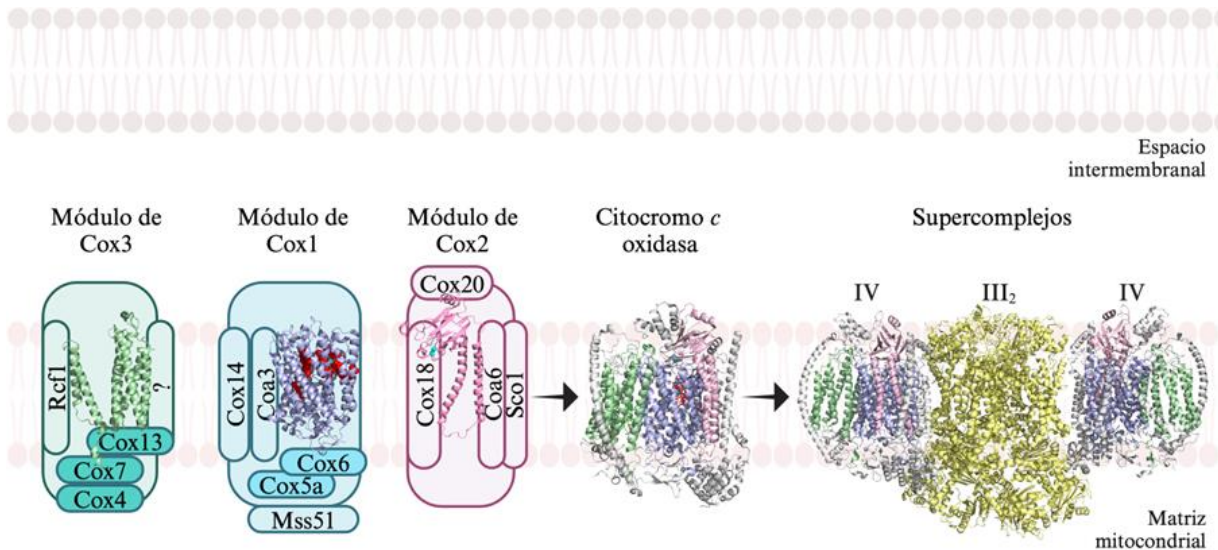


Figura 5. La citocromo *c* oxidasa de *S. cerevisiae* se ensambla por módulos. Cada módulo contiene una de las subunidades codificadas en la mitocondria. El módulo de Cox3 (verde) contiene a las subunidades Cox3, Cox4, Cox7 y Cox13, así como al factor de ensamblaje Rcf1. El módulo de Cox1 (lila) contiene a las subunidades Cox1, Cox6, Cox5a, además de los factores de ensamblaje Mss51, Coa3, Cox14, así como Shy1 y Coa1. El módulo de Cox2 (rosa) contiene a la subunidad Cox2 y a los factores de ensamblaje Cox18, Coa6, Cox20, Sco1y Sco2 (13). Una o dos copias de la citocromo *c* oxidasa pueden formar supercomplejos con el dímero obligado de complejo III (representado en amarillo)

Módulo de ensamblaje de Cox1, un delicado equilibrio entre la síntesis de Cox1 en la mitocondria y el ensamblaje de la citocromo *c* oxidasa

Nuestro laboratorio se ha centrado en comprender cuáles son los mecanismos de las primeras etapas de biogénesis de la subunidad Cox1 en *S. cerevisiae*.

Como se mencionó, Cox1 es la subunidad más grande de la citocromo *c* oxidasa y contiene el centro catalítico para reducir al oxígeno y para translocar protones hacia el espacio intermembranal. Es una proteína que contiene 12 cruces transmembranales, con los extremos amino y carboxilo terminales localizados en la matriz mitocondrial. El extremo N-

terminal de Cox1 se expone al medio acuoso de la matriz mitocondrial con tan solo 6 aminoácidos, mientras que el extremo C-terminal cuenta con 56 aminoácidos expuestos al medio acuoso y que rodean

la base de los cruces transmembranales de Cox1 (Figura 6) (4).

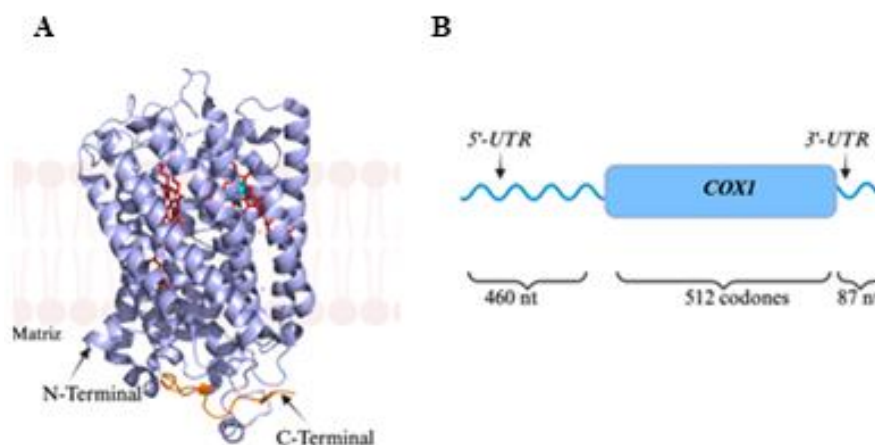


Figura 6. Estructura de Cox1 de *S. cerevisiae*. **A)** Estructura de Cox1 obtenida a partir del modelo de supercomplejos de la levadura obtenido por Cryo-EM (PDB 9ETZ, (4)). Se observan los grupos hemo α y β en rojo y el centro de Cub en turquesa. En naranja se muestran los últimos 15 aminoácidos del extremo C-terminal de Cox1. La imagen modificada con Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.5.5 Schrödinger, LLC). **B)** El mRNA de *COX1* se transcribe como un precursor que contiene un número variable de intrones, así como a los genes *ATP8* y *ATP6* que se encuentran río abajo de *COX1*. Este precursor debe procesarse para traducirse. El sitio de acción de los activadores traducciónales está en el extremo 5' no traducido (5'-UTR) del mRNA (15, 16).

Síntesis de Cox1

La biogénesis de Cox1 y su módulo de ensamblaje comienza con la síntesis de Cox1 mediante ribosomas localizados en la matriz mitocondrial. El mRNA de Cox1 maduro contiene 460 y 87 nucleótidos en sus extremos 5' y 3' no traducidos, respectivamente (Figura 6B). La región 5' no traducida de este mRNA es blanco de su activador traduccional, Pet309, que permite el inicio de la traducción. Sin este activador traduccional el mRNA de *COX1* pierde estabilidad y no puede traducirse (16, 17), por lo tanto, no hay Cox1 ni citocromo *c* oxidasa, haciendo que las células sean incapaces de crecer en un medio respiratorio (Figura 7A). Pet309 es una proteína periférica de membrana que se asocia al mRNA de *COX1* y al ribosoma mitocondrial (18, 19). Se piensa que ayuda al mitoribosoma a localizar el inicio de traducción del mRNA de *COX1* (19, 20). Pet309 forma parte de un grupo de proteínas presentes en cloroplastos y mitocondrias que contienen motivos PPR (de las siglas en inglés pentatricopeptide repeat). Cada repetición contiene 35 aminoácidos y forma dos alfa hélices antiparalelas. El conjunto de motivos PPR forman una superhélice. Imaginemos una escalera de caracol, cada peldaño es un motivo PPR y todos juntos forman a la escalera. El modelo actual sugiere que por el centro de la superhélice se asocia el mRNA de cadena sencilla (18, 19) (Figura 7B).

La proteína Pet309 reconoce dos regiones en el extremo 5' no traducido del mRNA de *COX1* que se localizan a ~200 y ~40 bases río arriba del AUG de inicio (21). Se predice que cada repetición PPR

interacciona con uno o dos nucleótidos específicos del RNA, ya que se predice que Pet309 tiene 24 motivos PPRs y la secuencia de unión en el mRNA de *COX1* es de ~40 bases (21). En nuestro laboratorio descubrimos que la eliminación de un sólo motivo PPR o de conjuntos de motivos PPRs inhibe la síntesis de Cox1, aunque Pet309 continúe asociada al mRNA de *COX1* (Figura 7C). Esto podría deberse a que, si bien la proteína mutada puede aún asociarse al mRNA, esta interacción no proporciona la estructura adecuada al mRNA para que el mitoribosoma reconozca el codón de inicio de traducción en *COX1* (22). En colaboración con los grupos de Antoni Barrientos y Flavia Fontanesi de la Universidad de Miami encontramos que la helicasa mitocondrial Mss116 acompaña a Pet309 en su función. Probablemente Mss116 ayuda a que el mRNA de *COX1* adquiera una conformación adecuada para que Pet309 pueda reconocer la secuencia e interactuar con este mRNA (20).

Mss51 es otra proteína específica que se necesita para activar la traducción del mRNA de *COX1* (16, 23). Al igual que Pet309, la presencia de Cox1 y de la citocromo *c* oxidasa dependen de Mss51 (Figura 7A). La función de Mss51 se localiza en el extremo 5' no traducido del mRNA de *COX1* (15, 16). A diferencia de Pet309, Mss51 también podría participar en la elongación de la traducción e interacciona físicamente con el péptido Cox1 recién sintetizado (15, 16). Esto indica que Mss51 tiene funciones adicionales a las de activador traduccional.

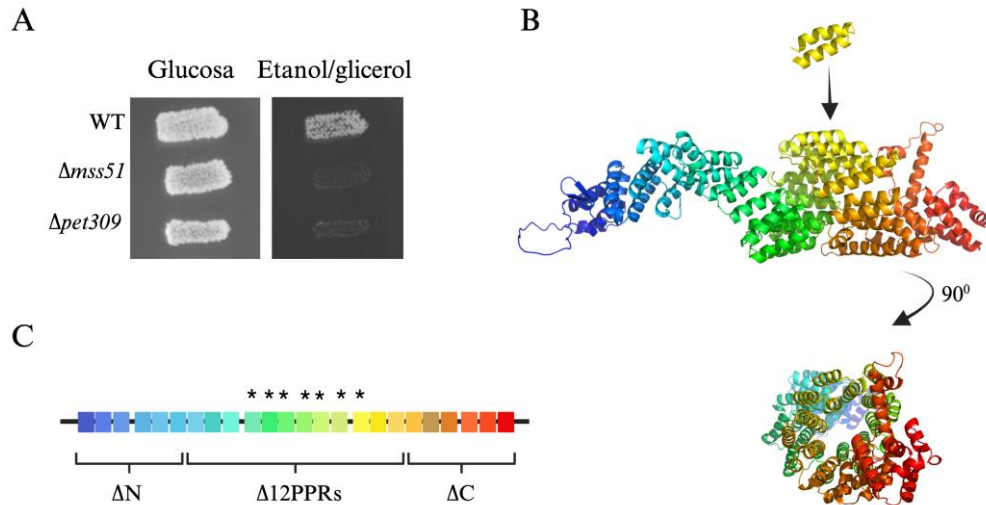


Figura 7. Pet309 y Mss51 son activadores traducciónales específicos para el mRNA de COX1. **A)** Fenotipo de las mutantes nulas Δpet309 y Δmss51 . Las células se crecieron en un medio fermentativo (glucosa) o respiratorio (etanol/glicerol) por 3 días a 30°C. **B)** Modelo estructural de Pet309 obtenido con AlphaFold (2). Cada motivo PPR forma un par de alfa hélices antiparalelas, y el conjunto de varios motivos forma una superhélice. El modelo sugiere que dentro de esta superhélice interacciona el mRNA de COX1 de cadena sencilla. **C)** Cada motivo PPR es necesario para que el mRNA de COX1 se traduzca. Se muestra un mapa de Pet309, con cada motivo PPR representado por un cuadro de color. Se muestran las regiones amino (ΔN), central de 12 motivos PPR (Δ12PPRs) y la región carboxilo (ΔC) que se han eliminado del gen. Con asterisco se muestran algunos de los motivos PPR eliminados individualmente. Ninguna de las versiones mutadas de Pet309 fue capaz de traducir el mRNA de COX1 (18, 19).

Una mutante nula de Mss51 si permite la traducción del mRNA de COX1, pero el producto proteico es aberrante, indicando que la traducción del mRNA inicia en alguna región incorrecta. Esto sugiere que además de Pet309 y Mss116, Mss51 tiene una función crucial en la traducción, asistiendo al ribosoma para colocarse en el sitio exacto del mRNA de COX1 (22) (Figura 8).

Ensamblaje de Cox1 en la membrana interna mitocondrial

El trabajo de diversos laboratorios, incluido nuestro grupo, ha demostrado que cualquier alteración en el ensamblaje de la citocromo *c* oxidasa por medio de mutaciones, provoca que la síntesis de Cox1 en la mitocondria disminuya sustancialmente. Sin embargo, la reducida cantidad de Cox1 que logra sintetizarse permanece estable temporalmente. Estos defectos en la citocromo *c* oxidasa pueden ser mutaciones en las subunidades de la enzima o en los factores de ensamblaje (15, 24) (Figura 9A). Incluso se ha reportado que algunas mutaciones independientes a la citocromo *c* oxidasa, como por ejemplo, en el citocromo *c* o en la ATP sintasa, también impactan la síntesis de Cox1 mitocondrial (25, 26), demostrando que la regulación de la síntesis de Cox1 es crucial no sólo para la citocromo *c* oxidasa, sino en la fosforilación oxidativa. En la actualidad se han identificado al menos 4 factores que coordinan la síntesis de Cox1 con su ensamblaje:

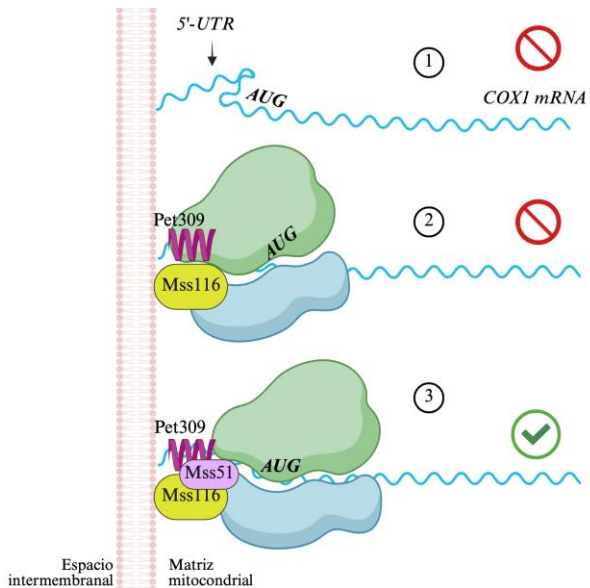


Figura 8. Modelo del mecanismo de inicio de la traducción del mRNA de COX1. 1) El mRNA de COX1 es inerte a la traducción en ausencia de sus activadores traducciónales. 2) Pet309 se asocia con la helicasa Mss116, probablemente juntas identifican el sitio de unión al mRNA de COX1 y modifican la estructura del extremo 5'-UTR del mRNA. Estas proteínas pueden regular la unión del mitorribosoma al mRNA de COX1. Sin embargo, el ribosoma aún no se coloca en la posición necesaria para iniciar la traducción desde el codón de inicio (20, 22). 3) Mss51 es el otro activador traducciónal del mRNA de COX1. Esta proteína asiste al mitorribosoma para que encuentre el sitio correcto de inicio de la traducción. La ausencia de Mss51 provoca que Pet309 comience la traducción en un sitio diferente del mRNA de COX1, produciendo un péptido aberrante (22).

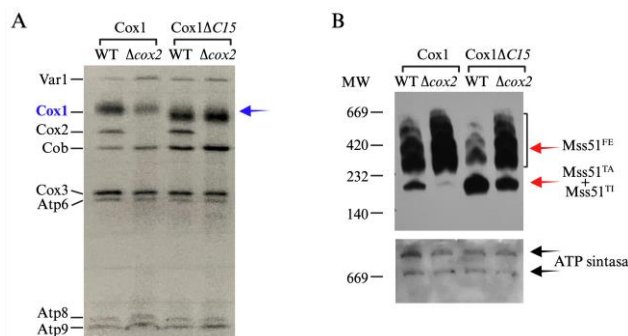


Figura 9. La síntesis de Cox1 disminuye si la citocromo *c* oxidasa presenta mutaciones que le impiden ensamblarse correctamente. **A)** En ausencia de la subunidad Cox2 (Δcox2), la síntesis de Cox1 disminuye dramáticamente. En contraste, si se elimina Cox2 junto con el extremo C-terminal de Cox1 (Cox1 Δ C15) la síntesis de Cox1 se recupera, aunque la citocromo *c* oxidasa no se pueda ensamblar. En este experimento las células de la levadura se incubaron con cicloheximida para inhibir la traducción citosólica. Posteriormente se incubaron con ^{35}S -Metionina para marcar a las proteínas recién sintetizadas en la matriz mitocondrial. Las mitocondrias se purificaron, y las proteínas recién sintetizadas se separaron en un gel de SDS-PAGE. Las proteínas se analizaron mediante autoradiografía. Cox1 se señala en azul. **B)** Mitocondrias purificadas de las cepas analizadas en A) se separaron mediante una electroforesis nativa en geles azules (BN-PAGE). Las muestras se transfirieron a una membrana de PVDF y se analizaron por western blot utilizando anticuerpos contra Mss51 y contra la ATP sintasa (como control de carga).

Las proteínas Mss51, Coa3, Cox14, y el extremo carboxilo terminal de la propia Cox1. Mss51 es la proteína maestra que coordina la síntesis y el ensamblaje de Cox1 (15, 16). En cambio, Coa3, Cox14 y el extremo C-terminal de Cox1 regulan la función y asociación de Mss51 a los intermediarios de ensamblaje (24, 27-29).

Mss51 se asocia físicamente a Cox1 durante la formación de los primeros intermediarios de ensamblaje, pero una vez que se ha estructurado el módulo de Cox1, Mss51 pierde interacción con este intermediario (16, 24). Los análisis de Mss51 en las mitocondrias de la levadura mediante electroforesis azul nativa nos han permitido establecer que Mss51 se encuentra en al menos tres poblaciones diferentes: una es la conformación traduccionalmente activa (Mss51^{TA}), que es la conformación que actúa en la región 5'-no traducida del mRNA de *COX1*, y que colabora con Pet309/Mss116 para iniciar la traducción. La segunda es la conformación de factor de ensamblaje (Mss51^{FE}), que interacciona físicamente con la proteína Cox1 y asiste en su inserción/ensamblaje en la membrana interna mitocondrial. La tercera, identificada por nuestro laboratorio, en la que Mss51 está libre de Cox1 pero mantiene una conformación traduccionalmente inactiva (Mss51^{TI}) (Figura 9B). Mss51^{TI} es un estado intermedio entre las conformaciones Mss51^{TA} y Mss51^{FE}.

Nuestra investigación y la de otros grupos han permitido proponer un modelo de cómo se acopla la síntesis de Cox1 con su ensamblaje en la membrana interna mitocondrial. En este modelo, Mss51^{TA} activa la traducción del mRNA de *COX1* junto con Mss116 y Pet309. Una vez que la síntesis de Cox1 se lleva a cabo, entonces Mss51 cambia, de su conformación traduccionalmente activa (Mss51^{TA}) a su conformación de factor de ensamblaje (Mss51^{FE}). Mss51^{FE} interacciona físicamente con el péptido Cox1 recién sintetizado y ayuda a su ensamblaje en la membrana, aunque el mecanismo exacto se desconoce. Una vez que concluye el ensamblaje del módulo en que se encuentra Cox1, entonces Mss51^{FE} se disocia de dicho intermediario, y adquiere la conformación traduccionalmente inactiva (Mss51^{TI}). Mss51^{TI} cambia a su conformación Mss51^{TA} para iniciar nuevas rondas de traducción del mRNA de *COX1* junto con Mss116 y Pet309. En una mutante de la levadura en que no se puede ensamblar la citocromo *c* oxidasa, entonces Mss51^{FE} se queda atrapada con el módulo de ensamblaje de Cox1, y por lo tanto no puede iniciar nuevas rondas de traducción del mRNA de *COX1*. Como consecuencia, la síntesis de Cox1 disminuye (16, 24, 29) (Figura 10).

Cox14 y Coa3 son dos proteínas transmembranales que forman parte de los intermediarios de ensamblaje de Cox1, y permiten que Mss51 se asocie con la proteína Cox1. En ausencia de Coa3/Cox14 la proteína Cox1 se sintetiza sin ninguna regulación, desacoplando la síntesis de Cox1 con el ensamblaje de la citocromo *c* oxidasa. En este contexto Mss51 se libera del complejo de ensamblaje y se encuentra en la conformación Mss51^{TA}. La proteína Cox1 forma agregados de vida media corta, haciendo que las cepas mutantes Δcox14 y Δcoa3 sean incapaces de respirar (15, 24, 29).

El extremo carboxilo terminal de Cox1 también juega un papel esencial en este mecanismo de regulación traduccional por ensamblaje. Esta región soluble de Cox1 se localiza en la matriz mitocondrial y es esencial para que Mss51 y Cox1 puedan interactuar físicamente (27, 28). Más aún, nuestro laboratorio descubrió que los últimos 15 aminoácidos del extremo C-terminal de Cox1 actúan como “sensores” del estado de ensamblaje de Cox1 y de la citocromo *c* oxidasa. Adicionalmente, el C-terminal de Cox1 controla la estabilidad de la propia Cox1 e incluso el ensamblaje de la citocromo *c* oxidasa en supercomplejos. Si esta región de Cox1 se elimina mediante mutagénesis del gen mitocondrial *COX1*, entonces Cox1 se sintetiza en exceso e incrementa su estabilidad. Llama la atención que en el contexto anterior una mutante de la citocromo *c* oxidasa es capaz de formar supercomplejos aunque estos no son funcionales (27). Estas observaciones nos permiten

concluir que la región C-terminal de Cox1 modula su ensamblaje y estabilidad, que el ensamblaje de supercomplejos es independiente a este proceso y la citocromo *c* oxidasa se asocia al complejo respiratorio III₂ de manera temprana.

Finalmente, nuestro grupo encontró que la proteína Pet54 participa en el recambio de Mss51 entre sus conformaciones Mss51^{TI} y Mss51^{TA} (31).

Más estudios se necesitan para profundizar en el papel de Mss51^{TI}, para comprender el mecanismo de acción de Pet54 en este proceso o si existen otras proteínas que también participen en el recambio de Mss51, en cuyo caso una candidata es la chaperona Hsp70 mitocondrial conocida como Ssc1 (32) (Figura 10).

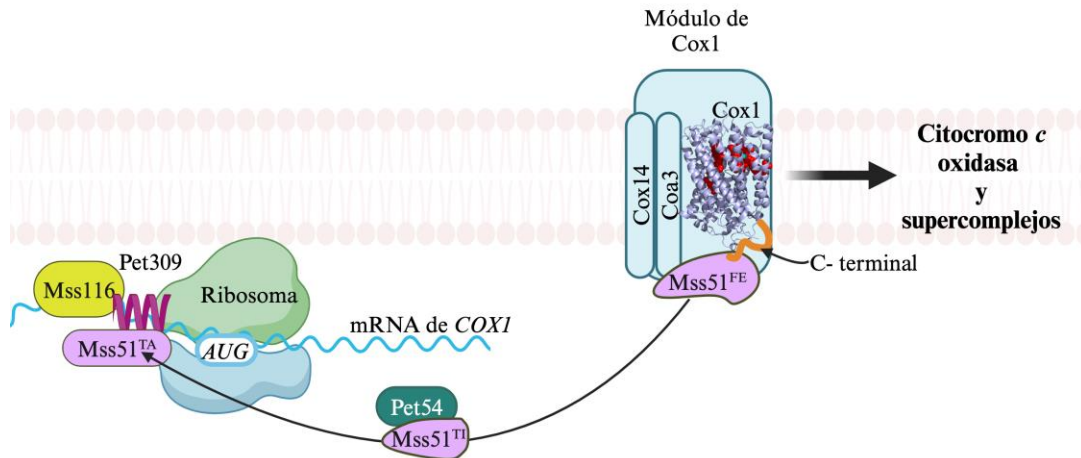


Figura 10. Modelo de regulación de la síntesis de Cox1 dependiente del estado de ensamblaje de la citocromo *c* oxidasa. Pet309/Mss116 junto con Mss51^{TA} activan la traducción del mRNA de *COX1*. Mss51 además interacciona con el péptido Cox1 recién sintetizado y forma parte de los primeros intermediarios de ensamblaje de Cox1, función que realiza en su conformación Mss51^{FE}. Los factores de ensamblaje Coa3 y Cox14 son también parte de los primeros intermediarios de ensamblaje y permiten la interacción entre Mss51^{FE} y Cox1. El extremo carboxilo terminal de Cox1, que se encuentra expuesto a la matriz mitocondrial también contribuye a la asociación de Mss51^{FE} con Cox1. Consideramos que esta región de Cox1 es dinámica y cambia su conformación conforme se ensambla Cox1. Por lo tanto, el extremo C-terminal de Cox1 sirve como “sensor” que regula la afinidad de Mss51^{FE} con Cox1, la estabilidad de Cox1 y la formación de supercomplejos. Una vez que el ensamblaje de la citocromo *c* oxidasa continúa, entonces Mss51^{FE} se libera del módulo de Cox1 y recambia a su conformación Mss51^{TI}. Finalmente se transforma en su conformación Mss51^{TA} para sintetizar más Cox1. Este recambio se lleva a cabo por Pet54 (31). Otros factores de ensamblaje como Shy1, Coa1, Cox11, Cox15 participan en ensamblar el módulo de Cox1 e integrar los grupos prostéticos en Cox1 (13).

Consideraciones finales

Las primeras preguntas que surgen después de leer este trabajo son ¿para qué necesita Cox1 una regulación tan compleja? ¿Por qué la síntesis de Cox1 es tan sensible a defectos en el ensamblaje de la citocromo *c* oxidasa o incluso de la ATP sintasa o el citocromo *c*? En un contexto silvestre, donde no tenemos mutaciones en los complejos de la fosforilación oxidativa ¿para qué sirve regular tanto la síntesis de Cox1 en la mitocondria? ¿Existen otros contextos celulares, por ejemplo, metabólicos, en que el ensamblaje de la citocromo *c* oxidasa se regule? Parte de las respuestas podrían buscarse en el estrés oxidativo. Es sabido que la mitocondria produce importantes cantidades de especies reactivas de oxígeno (ROS), y se suele señalar al complejo I (en los mamíferos) y al complejo bc1 como los principales productores de ROS (33). Nuestra hipótesis es que el intrincado mecanismo de regulación de Cox1 contribuye a que la citocromo *c*

oxidasa no sea una fuente importante de ERO. En levadura se ha demostrado que los grupos hemo *a/a3* presentes en Cox1 pueden producir especies pro oxidantes si el módulo de Cox1 no está bien ensamblado (34). Es necesario comprobar esta hipótesis.

¿Qué tan conservado es este proceso tan estudiado en *S. cerevisiae*? Varios factores de ensamblaje de Cox1 como Cox14 y Coa3 están conservados en los mamíferos (10, 35). Mss51 también está conservado en los mamíferos, aunque su función en la mitocondria parece haber divergido (36). El extremo C-terminal de Cox1 parece tener funciones importantes en otros organismos. En el mamífero se describió una mutación patológica en que se pierden 35 aminoácidos del extremo C-terminal de Cox1, promoviendo su inestabilidad (37). Un ejemplo interesante de la posible importancia del extremo C-terminal de Cox1 es el del protista *Acanthamoeba castellanii* que de manera natural ha perdido la parte

del gen mitocondrial *COX1* que codifica para el extremo C-terminal. Sin embargo, esta región del gen ahora está codificada en el núcleo y el péptido se importa a la mitocondria, sugiriendo que su presencia es necesaria para que la citocromo *c* oxidasa funcione correctamente (38).

Como se puede observar, muchas preguntas en torno a la citocromo *c* oxidasa siguen sin resolverse. A la citocromo *c* oxidasa se le empezó a estudiar hace 100 años, tiempo en el que hemos logrado comprender sus mecanismos de catálisis, su conformación, su asociación con patologías en humanos, así como algunos de sus mecanismos de biogénesis. Sin embargo, otros 100 años se requieren para seguirla estudiando y comprendiendo.

Agradecimientos

Se agradece al PAPIIT (IN223623), al CONACYT (47514, 82505, 179387 y 284514). por los apoyos de Ciencia Básica proporcionados en el pasado y por las becas a todos los estudiantes de posgrado del

laboratorio, al IFC-UNAM y a la PEW Latin American Fellowship. Las licencias de Biorender para las figuras 1-10 y el resumen gráfico son: OB283XV9ZK, AL283XWK0V, KJ280R9JPJ, KS280RA146, UB283XY733, RQ283YDJS8, VA283YG34N, SA283YI95U, YP280R9SA6, SH280R9OHN, SH280R99JY. Se agradece a todos los estudiantes que han pasado por el laboratorio y que han contribuido a la resolución de las miles de preguntas que nos hemos hecho. Un especial agradecimiento a los Maestros en Ciencias Itzel García Cordero, Paulina Gutiérrez Alejandre y Emmanuel Frías Jiménez, así como a los Dres. Juan Pablo Mayorga, Olga Zurita Rendón, Ariann Mendoza, Teresa Lara Ortiz, Laura Ongay, Miriam Vázquez Acevedo y Guadalupe Codiz Huerta por las contribuciones realizadas al trabajo del laboratorio. Un especial agradecimiento a los Dres. Diego González Halphen, Antonio Peña Díaz, Salvador Uribe Carvajal (todos del IFC, UNAM) y a Tom Fox (Cornell University) por el apoyo brindado.

Referencias

- Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism *Nature* 191, 144-148
- Abramson, J., Adler, J., Dunger, J., Evans, R., Green, T., Pritzel, A. et al. (2024) Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3 *Nature* 630, 493-500
- Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D. et al. (2005) Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II *Cell* 121, 1043-1057
- Lobez, A. P., Wu, F., Di Trani, J. M., Rubinstein, J. L., Oliveberg, M., Brzezinski, P. et al. (2024) Electron transfer in the respiratory chain at low salinity *Nat Commun* 15, 8241
- Zhou, A., Rohou, A., Schep, D. G., Bason, J. V., Montgomery, M. G., Walker, J. E. et al. (2015) Structure and conformational states of the bovine mitochondrial ATP synthase by cryo-EM *Elife* 4, e10180
- David L., N., Cox, M. M., Lehninger, A., and *Biochemistry*, L. P. o. (2021) *Lehninger Principles of Biochemistry*, 8th Ed., W. H. Freeman,
- Attardi, G., P., Cantatore, E., Ching, S., Crews, R., Gelfand, C., Merkel, J. et al. (1980) The organization and expression of the mitochondrial genome., Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam
- Borst, P., and Grivell, L. A. (1978) The mitochondrial genome of yeast *Cell* 15, 705-723
- Camacho-Villasana, Y., Pedroza-Dávila, U., and Perez-Martínez, X. (2024) Mitochondrial Transformation in Baker's Yeast to Study Translation and Respiratory Complex Assembly *J Vis Exp*
- Aich, A., Boshnakovska, A., Witte, S., Gall, T., Unthan-Fechner, K., Yousefi, R. et al. (2024) Defective mitochondrial COX1 translation due to loss of COX14 function triggers ROS-induced inflammation in mouse liver *Nat Commun* 15, 6914
- García-Guerrero, A. E., Zamudio-Ochoa, A., Camacho-Villasana, Y., García-Villegas, R., Reyes-Prieto, A., and Perez-Martínez, X. (2016) Evolution of translation in mitochondria, Springer,
- Franco, L. V. R., Su, C. H., McStay, G. P., Yu, G. J., and Tzagoloff, A. (2018) Cox2p of yeast cytochrome oxidase assembles as a stand-alone subunit with the Cox1p and Cox3p modules *J Biol Chem* 293, 16899-16911
- McStay, G. P., Su, C. H., and Tzagoloff, A. (2013) Modular assembly of yeast cytochrome oxidase *Mol Biol Cell* 24, 440-452
- Eldeeb, M. H., Camacho Lopez, L. J., and Fontanesi, F. (2024) Mitochondrial respiratory supercomplexes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* *IUBMB Life* 76, 485-504
- Perez-Martínez, X., Butler, C. A., Shingu-Vázquez, M., and Fox, T. D. (2009) Dual functions of Mss51 couple synthesis of Cox1 to assembly of cytochrome *c* oxidase in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria *Mol Biol Cell* 20, 4371-4380
- Perez-Martínez, X., Broadley, S. A., and Fox, T. D. (2003) Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p *EMBO J* 22, 5951-5961
- Manthey, G. M., and McEwen, J. E. (1995) The product of the nuclear gene PET309 is required for translation of mature mRNA and stability or production of intron-containing RNAs derived from the mitochondrial *COX1* locus of *Saccharomyces cerevisiae* *EMBO J* 14, 4031-4043
- Tavares-Carreón, F., Camacho-Villasana, Y., Zamudio-Ochoa, A., Shingú-Vázquez, M., Torres-Larios, A., and Pérez-Martínez, X. (2008) The pentatricopeptide repeats present in Pet309 are necessary for translation but not for stability of the mitochondrial *COX1* mRNA in yeast *J Biol Chem* 283, 1472-1479
- Zamudio-Ochoa, A., Camacho-Villasana, Y., García-Guerrero, A. E., and Perez-Martínez, X. (2014) The Pet309 pentatricopeptide repeat motifs mediate efficient binding to the mitochondrial COX1 transcript in yeast *RNA Biol* 11, 953-967
- De Silva, D., Poliquin, S., Zeng, R., Zamudio-Ochoa, A., Marrero, N., Perez-Martínez, X. et al. (2017) The DEAD-box helicase Mss116 plays distinct roles in mitochondrial ribogenesis and mRNA-specific translation *Nucleic Acids Res* 45, 6628-6643
- Bridgers, J. B., Carlström, A., Sherpa, D., Couvillion, M. T., Rovšnik, U., Gao, J. et al. (2025) Translational activators align mRNAs at the small mitoribosomal subunit for translation initiation *bioRxiv*
- Zambrano, A., Fontanesi, F., Solans, A., de Oliveira, R. L., Fox, T. D., Tzagoloff, A. et al. (2007) Aberrant translation of

- cytochrome c oxidase subunit 1 mRNA species in the absence of Mss51p in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* Mol Biol Cell 18, 523-535
23. Siep, M., van Oosterum, K., Neufeglise, H., van der Spek, H., and Grivell, L. A. (2000) Mss51p, a putative translational activator of cytochrome c oxidase subunit-1 (COX1) mRNA, is required for synthesis of Cox1p in *Saccharomyces cerevisiae* Curr Genet 37, 213-220
 24. Barrientos, A., Zambrano, A., and Tzagoloff, A. (2004) Mss51p and Cox14p jointly regulate mitochondrial Cox1p expression in *Saccharomyces cerevisiae* EMBO J 23, 3472-3482
 25. Barrientos, A., Pierre, D., Lee, J., and Tzagoloff, A. (2003) Cytochrome oxidase assembly does not require catalytically active cytochrome C J Biol Chem 278, 8881-8887
 26. Rak, M., Tetaud, E., Godard, F., Sagot, I., Salin, B., Duvezin-Caubet, S. et al. (2007) Yeast cells lacking the mitochondrial gene encoding the ATP synthase subunit 6 exhibit a selective loss of complex IV and unusual mitochondrial morphology J Biol Chem 282, 10853-10864
 27. García-Villegas, R., Camacho-Villasana, Y., Shingú-Vázquez, M., Cabrera-Orefice, A., Uribe-Carvajal, S., Fox, T. et al. (2017) The Cox1 Carboxyl-terminal Domain is a Central Regulator of Cytochrome c Oxidase Biogenesis in Yeast Mitochondria J Biol Chem 292, 10912-10925
 28. Shingú-Vázquez, M., Camacho-Villasana, Y., Sandoval-Romero, L., Butler, C. A., Fox, T. D., and Pérez-Martínez, X. (2010) The carboxyl-terminal end of Cox1 is required for feedback assembly regulation of Cox1 synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria J Biol Chem 285, 34382-34389
 29. Mick, D. U., Vukotic, M., Piechura, H., Meyer, H. E., Warscheid, B., Deckers, M. et al. (2010) Coa3 and Cox14 are essential for negative feedback regulation of COX1 translation in mitochondria J Cell Biol 191, 141-154
 30. Valencik, M. L., and McEwen, J. E. (1991) Genetic evidence that different functional domains of the PET54 gene product facilitate expression of the mitochondrial genes COX1 and COX3 in *Saccharomyces cerevisiae* Mol Cell Biol 11, 2399-2405
 31. Mayorga, J. P., Camacho-Villasana, Y., Shingú-Vázquez, M., García-Villegas, R., Zamudio-Ochoa, A., García-Guerrero, A. E. et al. (2016) A Novel Function of Pet54 in Regulation of Cox1 Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondria J Biol Chem 291, 9343-9355
 32. Fontanesi, F., Soto, I. C., Horn, D., and Barrientos, A. (2010) Mss51 and Ssc1 facilitate translational regulation of cytochrome c oxidase biogenesis Mol Cell Biol 30, 245-259
 33. Rigoulet, M., Yoboue, E. D., and Devin, A. (2011) Mitochondrial ROS generation and its regulation: mechanisms involved in H₂O₂ signaling Antioxid Redox Signal 14, 459-468
 34. Khalimonchuk, O., Bird, A., and Winge, D. R. (2007) Evidence for a pro-oxidant intermediate in the assembly of cytochrome oxidase J Biol Chem 282, 17442-17449
 35. Clemente, P., Peralta, S., Cruz-Bermudez, A., Echevarria, L., Fontanesi, F., Barrientos, A. et al. (2013) hCOA3 stabilizes cytochrome c oxidase 1 (COX1) and promotes cytochrome c oxidase assembly in human mitochondria J Biol Chem 288, 8321-8331
 36. Moyer, A. L., and Wagner, K. R. (2015) Mammalian Mss51 is a Skeletal Muscle-Specific Gene Modulating Cellular Metabolism J Neuromuscul Dis 2, 371-385
 37. Hornig-Do, H. T., Tatsuta, T., Buckermann, A., Bust, M., Kollberg, G., Rotig, A. et al. (2012) Nonsense mutations in the COX1 subunit impair the stability of respiratory chain complexes rather than their assembly Embo J 31, 1293-1307
 38. Gawryluk, R. M., and Gray, M. W. (2010) An ancient fission of mitochondrial cox1 Mol Biol Evol 27, 7-10



DRA. XOCHITL PÉREZ MARTÍNEZ
ORCID: 0000-0002-3651-8413

Nacida en CDMX, la Dra. Xochitl Pérez Martínez estudió la licenciatura en Química en la Facultad de Química de la UNAM. Realizó un doctorado en Ciencias (Bioquímicas) en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Hizo una estancia posdoctoral en la Universidad de Cornell, donde

obtuvo la prestigiosa beca PEW Latin American Fellows. Se incorporó como investigadora titular en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM en el 2004, y a finales del año 2024 celebró los primeros 20 años de su laboratorio. Ha recibido importantes distinciones como La medalla Alfonso Caso y el reconocimiento Weizmann de Ciencia a la mejor tesis doctoral de su campo, la distinción UNAM para jóvenes académicos, la Medalla José Laguna por sus contribuciones al campo de la bioenergética y las biomembranas, entre otros. Ha publicado en revistas de gran prestigio como, Nucleic Acids Res., EMBO J., TiBs, J. of Biol. Chem., entre otros. Ha formado una importante escuela entre sus estudiantes egresados, ya que algunos laboran en universidades o centros de salud de México y del mundo, y otros estudiantes se han incorporado en industrias biotecnológicas y farmacéuticas en el extranjero. Su labor cuenta con el reconocimiento internacional, que se refleja en sus colaboraciones y en invitaciones para impartir pláticas en foros de Estados Unidos y Europa, llevando el nombre de México y de la UNAM en alto. Si quieres conocer más acerca de su quehacer científico y del maravilloso mundo de las mitocondrias sigue sus redes sociales en Instagram @mitocondrias204 y Tik Tok @Xochitl.lab