

LOS CÓDIGOS GENÉTICOS MITOCONDRIALES: CARACTERÍSTICAS, ORIGEN Y EVOLUCIÓN*

Karen Aguilar Guerra¹, Alfonso Vilchis Peluyera², Víctor Valdés López^{2**}

¹Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología, D.F. México.

²Laboratorio de Biología Molecular y Genómica, Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, UNAM, D.F. México. **Autor de correspondencia correo E: vvaldes@unam.mx

RESUMEN

La mitocondria, un organelo altamente especializado, presente en casi todas las células eucariontes, encargado principalmente de la producción de energía celular a través de fosforilación oxidativa y que además participa en diferentes procesos celulares, tiene como característica que presenta su propio genoma, cuya estructura, tamaño y contenido génico varía de especie a especie. Desde la descripción del primer genoma mitocondrial, se observó que existen organismos en los que se presentan variantes del código genético universal, las cuales asignan significados diferentes a ciertos codones. Hoy en día la lista de variantes ha ido en aumento, y en esta revisión se hace un análisis de las variantes mitocondriales encontradas hasta el momento y cómo estas son reconocidas por los sistemas de traducción de estos organelos. Adicionalmente, se analizan las diferentes hipótesis postuladas sobre cómo han surgido estas variantes.

PALABRAS

CLAVE:

Mitocondria, código genético, variantes del código.

ABSTRACT

The mitochondrion is a highly specialized organelle, present in almost all eukaryotic cells that carry out the energy production through oxidative phosphorylation and also takes part in many cellular processes. Mitochondria has its own genome, whose size, structure and genetic content varies in different organisms, Since the first mitochondrial genome description, it was shown that many organisms exhibit genetic code variants, which give different meanings to some codons. Nowadays, the number of variants has increased. In this work we analyze the code variants that have been found, focusing on mitochondrial variants and how they are recognized for the translation systems in these organelles. We also analyzed the different hypothesis on the origin of these variants.

KEY WORDS:

Mitochondria, genetic code, code variants.

INTRODUCCIÓN

La mitocondria es un organelo altamente especializado, presente en casi todas las células eucariontes, principalmente encargado de la producción de energía celular a través de fosforilación oxidativa. Adicionalmente, la mitocondria participa en diferentes procesos celulares, entre ellos, múltiples rutas metabólicas la cascada de señalización de calcio, crecimiento celular, diferenciación, control del ciclo celular, muerte celular, regulación del metabolismo celular, síntesis del grupo hemo y

síntesis de esteroides (1). Este organelo, al igual que el cloroplasto, presenta su propio genoma, el cual se encuentra empaquetado en complejos de DNA-proteína conocidos como nucleoides, que a su vez están asociados a la membrana interna mitocondrial y esparcidos uniformemente a lo largo de las crestas (2). El DNA mitocondrial (mtDNA), es 'DNA multicopia' dado que una célula puede contener miles de copias de mtDNA repartidas en cientos de mitocondrias (3) cuyo número varía según la demanda de energía de ese tipo celular específico.

Mediante reconstrucciones filogenéticas usando secuencias de proteínas como HSP70 o Cpn60 y árboles filogenéticos del rRNA de la subunidad pequeña del ribosoma, se ha determinado que la mitocondria forma un conjunto monofilético formando un clado separado de las especies bacterianas. Sin embargo, estas comparaciones indican que filogenéticamente su pariente más cercano pertenece al grupo de las α -proteobacterias (4), lo cual reafirma la hipótesis de que las mitocondrias tienen un origen bacteriano, tal cual fue postulado originalmente por Lynn Margulis en 1967 (5).

La secuenciación de genomas ha mostrado que el genoma mitocondrial, y por ende la mitocondria, surgió una sola vez en la evolución. Lo anterior se dedujo ya que en cualquier genoma mitocondrial se observan genes con función asignada, que son un subconjunto de los genes encontrados en el genoma mitocondrial de *Reclinomonas americana*, eucarionte unicelular que presenta un genoma mitocondrial con un alto grado de semejanza a los genomas bacterianos, en particular α -proteobacterias. Hasta el año 2013, se había reportado a *Reclinomonas americana* como el organismo con el mayor número de genes mitocondriales, 96 genes asignados, y 2 ORFs (Marcos de lectura abierto) de más de 100 residuos (6). Entre los genes que codifica este genoma mitocondrial, está el RNA ribosomal 5S (rRNA 5S), una RNA polimerasa de tipo bacteriano, a diferencia de la polimerasa presente en la mitocondria del resto de los organismos estudiados hasta la fecha, que es una RNA polimerasa con alta identidad con la RNA polimerasa de los fagos T3 y T7 - (6). Sin embargo, actualmente se reconoce que el genoma mitocondrial de otro protista jacobino, *Andalucia godoyi*, muestra el mayor número de genes identificados, alcanzando la cifra de 100 (6). Las características de organización genómica de este grupo de protistas jacobinos y su similitud con genomas bacterianos probablemente arrojarán luz sobre su ancestría y evolución. Adicionalmente, en el genoma de estos organismos eucariontes unicelulares se observan grupos de genes que conservan el orden (sintenia) de sus homólogos bacterianos.

Con excepción de los mitosomas y la gran mayoría de los hidrogenosomas -organelos sin genoma derivados de mitocondrias presentes en algunos eucariontes unicelulares anaerobios como *Entamoeba histolytica*- (7, 8, 9) los organismos eucariontes presentan gran variedad en la organización y estructura de su genoma mitocondrial así como de tamaño y contenido génico (presentando desde 96 genes codificadores de proteínas y RNAs estables en *R. americana*, hasta 3 genes codificantes de proteínas, en organismos pertenecientes al *phylum*

Apicomplexa) (10). En las células de vertebrados, el mtDNA está organizado como una molécula circular de doble hebra de entre 14,000-20,000 pb (2). En las células animales el DNA mitocondrial (mtDNA) usualmente codifica componentes de la cadena respiratoria y componentes de la maquinaria para la traducción de proteínas mitocondriales. La secuenciación del genoma mitocondrial humano ha mostrado que posee 16,569 pares de bases entre las cuales se encuentran 13 genes codificantes para proteínas, la mayor parte involucradas en los mecanismos de transporte de electrones en el proceso de la fosforilación oxidativa; también presenta los genes para las subunidades ribosomales 12S y 16S (rRNA), así como 22 genes para RNAs de transferencia (tRNAs). Una característica relevante del genoma mitocondrial humano es su economía: prácticamente no existen o hay muy pocas bases no codificantes entre los genes; esta compactación del genoma mitocondrial humano recuerda a la que exhiben los genomas procariontes (11).

La cantidad tan pequeña de genes que presenta el DNA mitocondrial se debe a que la mayoría de los genes del "simbionte" se transfirieron al núcleo del hospedero, o se perdieron por completo. Tal transferencia, parece haber sido gradual, emergiendo de esta manera un patrón de reducción secuencial de los genes codificados en el mtDNA. Un número considerable de linajes eucariontes han adoptado de manera secundaria un estilo de vida anaerobio, con la consecuente modificación de la mitocondria formando así hidrogenosomas o mitosomas. Esta modificación se ha acompañado por la pérdida parcial o completa del genoma mitocondrial. La pérdida de genes del DNA mitocondrial pudo deberse a la sustitución de su función por genes no relacionados codificados en el DNA nuclear. Por otro lado, pudo haber una pérdida completa de genes mitocondriales determinados y, por ende, de sus funciones correspondientes, sin ningún complemento funcional nuclear (4).

Se han identificado aproximadamente 1500 proteínas que conforman la estructura y función de una mitocondria (12). La replicación y mantenimiento del DNA mitocondrial es llevado a cabo totalmente por proteínas codificadas por el DNA nuclear (nDNA). Sin embargo, para mantener una formación y función correctas de la mitocondria, se requiere de la coordinación de la expresión de genes codificados en el DNA mitocondrial y nuclear (1). Es importante recalcar que el genoma mitocondrial, igualmente presenta diversas características que lo diferencian de otros genomas, entre ellas, su tamaño reducido, su bajo contenido en GC, así como el uso de variantes del código genético en algunos organismos.

VARIANTES MITOCONDRIALES DEL CÓDIGO GENÉTICO ESTÁNDAR

En los años que siguieron al desciframiento del código genético, se observó que los organismos examinados, desde bacterias hasta humanos, usaban esencialmente el mismo código genético, por lo que se planteó que éste era universal, y que había persistido desde hacía miles de millones de años, desde antes que los tres dominios, archaia, bacteria y eukarya, divergieran a partir de un ancestro común (13). Crick, en 1968, propuso la hipótesis del "accidente congelado", en la que menciona que la correspondencia entre codones y aminoácidos se podría haber debido al azar; pero una vez que se estableció, fue tan fundamental para la vida, que cualquier cambio hubiera desencadenado una catástrofe (14), ya que una alteración mayor en el código daría lugar a cambios en la secuencia de aminoácidos de las proteínas sintetizadas, lo cual, podría ser letal para la célula (13). A esta hipótesis le siguieron otras más para explicar la naturaleza, el origen y la evolución del código genético: la "teoría estereoquímica" (15), la "teoría adaptativa" (15, 16) y la "teoría de coevolución" (15, 17). Actualmente se piensa que estas hipótesis (con excepción de la teoría estereoquímica, para la cual no se ha encontrado evidencia de que ocurra en la naturaleza) no son mutuamente excluyentes, sino que, por el contrario, podrían juntas dar una explicación de la existencia del código genético.

A medida que se fueron analizando un mayor número de genomas, específicamente, cuando se empezaron a estudiar genomas mitocondriales, se observó que existe cierto número de ellos que presentan variantes del código, los cuales, asignan a ciertos codones significados diferentes; estas variantes pueden representar aminoácidos diferentes a los asignados en el código genético "universal" o bien representar codones de término en lugar de ser codificantes de aminoácidos (11), descubrimiento que dejó en evidencia que el código no está "fossilizado" (o congelado), sino que ha evolucionado, y lo sigue haciendo. Por consiguiente, la correspondencia entre codones y aminoácidos no ha sido obra de la casualidad, sino que es resultado de la selección natural, de igual manera que lo es la robustez del código genético minimizando el impacto de mutaciones y errores durante la traducción. Una característica altamente conservada del código genético "universal" es su "degeneración", entendiéndose por este término el hecho de que, con excepción de dos codones monocodificantes, varios codones codifiquen el mismo aminoácido; esta característica también se observa en los codones de término. Por otra

parte, el código genético "universal" no exhibe ambigüedad; esto es, un codón no especifica más de un solo aminoácido; esta característica es esencial para el funcionamiento y mantenimiento de la correspondencia de significado entre un codón y su aminoácido respectivo. La no ambigüedad también se observa en los codones de término, con excepción de cuando los codones de término UGA y UAG sufren una recodificación post-transcripcional y son traducidos como los aminoácidos selenocisteína y pirrolisina, respectivamente (18, 19). Las características anteriores de degeneración y no ambigüedad pueden haber sido objeto de procesos de selección natural sobre el código genético para minimizar efectos mutacionales en los genes (degeneración) y para evitar la existencia de significados múltiples en la codificación entre codones y aminoácidos (no ambigüedad). Fue en 1979 que se describieron las primeras variantes del código genético estándar en la mitocondria de humano (20), observándose que, en mitocondrias de células humanas, el codón UGA codifica para Trp y no se usa como un codón de paro como en el código estándar; y que el codón AUA codifica para Met y no para Ile (21). Hoy en día, se sabe que existen variantes del código en genomas mitocondriales de todos los eucariontes (excepto plantas superiores), así como en genomas de bacterias, en genomas nucleares de algunos hongos, diplomonadas, protozoos ciliados y algas verdes (22). En la actualidad, se conocen 26 variantes del código estándar. Hasta la fecha se han identificado 18 de ellas en genomas mitocondriales y las 8 restantes están presentes en genomas nucleares. En la Figura 1, se muestra el código genético estándar y sus variantes reportadas en la literatura; el significado de cada codón se encuentra de color azul para el código estándar, rosa para las variantes mitocondriales y verde para las variantes de genomas nucleares y bacterianos. El número subíndice que acompaña a cada variante del código se refiere a los números asignados para los diferentes códigos genéticos usados en diversos organismos, tanto en genomas nucleares y bacterianos, como en genomas mitocondriales en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Es interesante observar que algunos codones tienden a ser reasignados con mayor frecuencia; sin embargo, sus significados varían. El codón UGA ha sido reasignado de codón de paro a codificante de Gly, Cys, y Trp; los codones AGA y AGG han sido reasignados de Arg a Ser, Gly, Lys y codones de paro; en el caso particular del codón AGG, se ha perdido su uso en el hemicordado *Balanoglossus carnosus*. Es importante mencionar que todos los

		Segundo nucleótido				
		U	C	A	G	
Primer nucleótido	U	UUU } F	UCU } S	UAU } Y	UGU } C	U C A G
		UUC } F	UCC } S	UAC } Y	UGC } C	
		UUA } L, St ₁₂	UCA } S, St ₁₁	UAA } St, Q ₇ , Y ₁₈	UGA } St, W ₂ , C ₃ , G ₄ , Y ₂₇ W _{6,7,13-22}	
		UUG } L	UCG } S	UAG } St, Q _{6,7} , A ₉ , L _{10,11}	UGG } W	
	C	CUU } L, T ₁₄	CCU } P	CAU } H	CGU } R	U C A G
		CUC } L, T ₁₄	CCC } P	CAC } H	CGC } R, ⁻¹⁴	
		CUA } L, T ₁₄	CCA } P	CAA } Q	CGA } R	
		CUG } S ₈ , A ₂₆	CCG } P	CAG } Q	CGG } R	
	A	AUU } I	ACU } T	AAU } N	AGU } S	U C A G
		AUC } I	ACC } T	AAC } N	AGC } S	
		AUA } I, M _{14,19-22}	ACA } T	AAA } K, ⁻¹⁵ , N ₁₇₋₁₉	AGA } R, S ₁₅₋₂₀ , G ₂₁ , ⁻²²	
		AUG } M	ACG } T	AAG } K	AGG } R, ^{-15,22} , K ₁₆ , S ₁₇₋₂₀ , G ₂₁	
	G	GUU } V	GCU } A	GAU } D	GGU } G	U C A G
		GUC } V	GCC } A	GAC } D	GGC } G	
		GUA } V	GCA } A	GAA } E	GGA } G	
		GUG } V	GCG } A	GAG } E	GGG } G	

Figura 1. Representación del código genético estándar y sus variantes. En esta figura se utiliza la nomenclatura de una sola letra de los aminoácidos; "St" se usa para marcar los codones de paro; se usa un guion corto (-) para marcar los codones que están ausentes en esos organismos. En color azul, se observa el significado de los codones en el Código genético estándar; en color verde, las variantes del código usadas en genomas nucleares y bacterianos; y en color rosa, se observan las variantes mitocondriales del código. El número subíndice que acompaña a cada variante del código, se refiere a los números asignados para los diferentes códigos genéticos usados por los organismos en la base de datos del National Center for Biotechnology Information [NCBI] (25). Imagen modificada y actualizada de (23).

codones que han sido reasignados en genomas nucleares, también corresponden a reasignaciones en los genomas mitocondriales (23).

Además, es posible observar que cambios iguales se presentan en linajes diferentes, por ejemplo, la reasignación de UGA de codón de paro a Trp en mitocondrias de eucariontes, como mohos y levaduras, así como en equinodermos, platelmintos, trematodos, artrópodos, urocordados y vertebrados. Adicionalmente, esta reasignación se ha dado no solo en genomas mitocondriales de organismos eucariotas, sino también en genomas bacterianos, ejemplo de ellos, es su reasignación en *Mycoplasma*, así como en la α -proteobacteria *Candidatus Hodgkinia cicadicola*, organismo simbiote del insecto Cicada, que presenta un genoma muy reducido, de 144 kb (24). Hay que recordar que se ha determinado que el pariente más cercano de las mitocondrias pertenece al filo de α -proteobacteria (8). Asimismo, existen variantes, que tienen el mismo significado en *phyla* diferentes, un ejemplo de ello, es la reasignación del codón AUA de Ile a Met en levaduras, así como

trematodos, artrópodos, urocordados y vertebrados (los últimos cuatro sí están relacionados, no así las levaduras).

Igualmente, se puede ver que ciertas modificaciones han surgido específicamente en ciertos grupos, como los organismos del *phylum* Phlathyelminthes, que son los únicos organismos que presentan la reasignación del codón AAA de Lys a Arg. O bien, en el caso de las levaduras, la reasignación de la familia de codones CUN de Leu a Thr.

En la mitocondria de vertebrados, y de manera específica de humano, los codones AGA/G, son codones no asignados, ya que no hay tRNAs que sean específicos para estos codones; además, no hay presencia de proteínas en la mitocondria de humano que los reconozcan directamente como codones de paro; por lo tanto, no codifican para codones de paro como anteriormente se creía y como se había reportado inclusive en la compilación "The Genetic Codes" del NCBI (25).

Como es evidente, hay un mayor número de variantes del código en los genomas mitocondriales

que en los genomas nucleares o bacterianos. Se piensa, que esto se debe a que el tamaño de los genomas mitocondriales es reducido, de hasta 300 kbp (9), presenta un número reducido de genes codificantes (2), lo cual permite que, si ocurre un cambio en el código, el número de genes (codificantes de proteínas) que serían afectados por dicho cambio, sea menor. Adicionalmente, el genoma mitocondrial presenta un alto contenido de A-T, lo cual se ha sugerido, que tiene un alto impacto en la preferencia para el uso de codones (26).

Se ha determinado que los cambios de correspondencia de codones ocurren principalmente en codones de paro (27). Ejemplos de estas variantes son la traducción del codón UGA como Trp, así como la reasignación de los codones UAG y UAA que en lugar de ser codones "universales" de paro, cambian a codones que codifican para Gln (Glutamina) en *Diplomonadas*, ciliados y algas verdes (22). Se cree que el hecho de que las variantes del código estén concentradas en codones de paro, se debe a que en estas posiciones no hay sustituciones de aminoácidos, y por ende no se dan cambios que podrían ser deletéreos en las proteínas; además, se piensa que, si un codón se utiliza raramente, su uso para otros propósitos será más probable, como es el caso de los codones de paro que solo se presenta uno por mRNA (23).

Existen dos casos en los que codones de paro, UAG y UGA, son usados para especificar aminoácidos inusuales. Tales aminoácidos son: selenocisteína (Sec), que se encuentra en proteínas redox de organismos de todos los tres dominios, y pirrolisina (Pyl), presente en algunas bacterias y arqueas del género *Methanosarcina*. Cabe aclarar que solamente codones de paro son reinterpretados en este sentido por el aparato traductor. En estos casos, se ha observado que el significado del codón es influenciado por su contexto en el mRNA y que existe un tRNA con el anticodón respectivo (18, 19, 28). En estos casos, tales codones de paro tienen un significado dual, lo que quiere decir que durante la traducción de algunos mRNAs pueden servir para la inserción de uno de estos aminoácidos y en otros, son leídos como señal de paro (29). El caso anterior, es diferente a lo que ocurre en la reasignación de codones, (las variantes del código estándar revisadas en este trabajo), en donde un codón que en el código estándar significa un aminoácido específico, es reinterpretado en todos los casos como un aminoácido diferente.

Para entender cómo es que se da el reconocimiento de estas variantes del código en la mitocondria de los diversos organismos eucariontes, se investigó la existencia de información sobre la

secuencia del anticodón en los aminoacil-tRNAs que permiten dicho reconocimiento. En la Tabla 1, se muestran algunas de las variantes mt del código genético y la secuencia del anticodón que las reconoce.

Como se puede ver, algunos de los anticodones en los tRNAs mitocondriales, presentan alguna base modificada; es importante observar que tales modificaciones solamente están presentes en la primera posición del anticodón; un ejemplo de ello, es la presencia de 5-formilcitolina (5fC) en la primera posición del anticodón del tRNA^M (C*AU), modificación presente en diversos organismos como mamíferos, moluscos, nemátodos y artrópodos. Es importante resaltar el caso del tRNA^{TP} (U*CA), el cual presenta diferentes modificaciones en la primera posición del anticodón, dependiendo del organismo en el que se encuentra; 5-carboximetilaminometil-2-thiouridina (cmnm(5)s(2)U) en el nematodo *Ascaris suum* (30), cmnm5U en *Saccharomyces cerevisiae* (31) y en el ciliado *Tetrahymena thermophila* (32), 5-taurinometiluridina (τm^5U) en el Ascidia *Halocynthia roretzi* (33), o C a U en *Leishmania tarentolae* [organismo en el cual este tRNA está codificado en su genoma nuclear y donde se ha observado que es modificado por uno de los sistemas de edición de RNAs presente en la mitocondria, una vez que este tRNA es importado del citoplasma] (34, 35).

Las modificaciones aquí presentadas no son las únicas en estas moléculas, ya que los tRNAs son moléculas que presentan, en todos los organismos, modificaciones químicas post-transcripcionales (aproximadamente el 17% del total de sus nucleótidos están modificados); las cuales afectan su estabilidad y plegamiento interfiriendo en su estructura y función. Estas modificaciones se clasifican en relación a cómo alteran la función de un tRNA, pudiendo afectar la estructura completa del tRNA, o bien, afectando solamente a los centros funcionales de los tRNAs. Debido a lo anterior, tales modificaciones tienen efectos en la decodificación y en la síntesis de proteínas (36). Algunas de estas modificaciones son importantes para la discriminación entre los codones que codifican para un mismo aminoácido en una misma familia de codones, por ejemplo, AAA/G para Lys contra AAU/C para Asn (37). Otras modificaciones permiten a los organismos aumentar la capacidad decodificante de los tRNAs (36), un ejemplo de ello, es la modificación de una adenina en Inosina –un análogo de la guanosina - en la primera posición del anticodón, que puede interactuar con A, C o U de la tercera posición del codón, permitiendo así que un mismo tRNA pueda decodificar tres diferentes codones, los cuales codifican para el

Tabla 1

tRNAs que reconocen variantes del código genético en mitocondrias. Se muestran los diferentes tRNAs que reconocen las variantes del código genético observadas en los genomas mitocondriales de diversos organismos. Se indica la secuencia del anticodón que reconoce los codones cuyo significado varía al del código estándar, así como en los organismos se ha identificado la presencia de tales tRNAs. Algunos tRNAs, pueden presentar modificaciones post-transcripcionales en la secuencia del anticodón y la posición en la que ocurren tales modificaciones se ha marcado con un (*); además, en estos casos, se indica cual es la modificación en ese tRNA en específico.

tRNAs que reconocen variantes del código genético en mitocondria			
tRNA	Anticodón	Codón	Organismo donde se encontró
Thr	UAG	CUN	Levadura <i>S. cerevisiae</i>
Met	C*AU *5-formilcitolina (f5C)	AUR	Mamíferos; nematodo <i>Ascaris suum</i> ; <i>D. melanogaster</i> ; molusco <i>Loligo brekeri</i>
Leu	CUA	UAG	Alga de la familia <i>Scenedesmeaceae</i> , <i>Scenedesmus obliquus</i> hongo <i>chytridiomycete Spizellomyces punctatus</i>
Asn	GU*U *Pseudouridina (Ψ)	AAA/U/C	Equinodermos como <i>Asterina pertinifera</i> y platelmintos
Trp	UCA	UGA	Levaduras
Trp	C*CA *Modificada a U en la mitocondria	UGA	<i>Leishmania tarentolae</i>
Trp	U*CA *5-taurinomethyluridina (τm^5U) o 5-taurinomethyl-2-tiouridina (τm^5s^2U)	UGR	Ascidia <i>Halocynthia roretzi</i>
Trp	U*CA *5-carboximethylaminomethyl-2-tiouridina (cmnm(5)s(2)U) o 5-carboximethylaminomethyluridina (cmnm5U)	UGR	cmnm(5)s(2)U en nemátodo <i>Ascaris suum</i> ; cmnm5U en <i>S. cerevisiae</i> , en el ciliado <i>Tetrahymena thermophila</i>
Ser	G*CU *7-metilguanosa (m ⁷ G)	AGN	Estrella de mar; molusco <i>Loligo bleekeri</i>
Ser	GCU	AGY/ AGN	Platelmintos. Moluscos de la clase bivalva.
Ser	GCU	AGU/C/A	<i>D. melanogaster</i>
Gly	U*CU	AGR	Urocordados ¹⁰⁰

* Modificación post-transcripcional. N Los cuatro nucleótidos (A, G, C, U); Y Pirimidinas (U/C); R Purinas (A/G)

mismo aminoácido, evitando de esta manera, la necesidad del uso de un mayor número de tRNAs (38).

Estos anticodones modificados, como se puede ver, en algunos casos permiten el reconocimiento de diversas bases, por ejemplo, el tRNA^{Ser} (G*CU) que en molusco (39, 40) y estrellas de mar (41), presentan 7-metilguanosa (m⁷G) en la primera posición, la cual, permite el reconocimiento de A, U, G o C en la tercera posición del codón. En otros casos, la modificación del anticodón permite que solamente se reconozcan bases púricas (A y G); ejemplo de ello son las modificaciones cmnm(5)s(2)U, cmnm5U, y τm^5U en la primera posición del tRNA^{Trp} (U*CA) o 5fC en la primera posición del anticodón del tRNA^{Met} (C*AU). Un caso particular

es el del tRNA^{Asn} (GU*U) en donde la uridina en segunda posición es modificada a pseudouridina, lo cual permite el reconocimiento del codón AAA como Asn (42, 43).

No en todos los tRNAs se encuentra modificada la base de la primera posición del anticodón y, sin embargo, se observa que estos tRNAs pueden reconocer más de una base en la tercera posición del codón. Por ejemplo, el tRNA^{Thr} (UAG) que puede reconocer las bases A, U, G o C en la tercera posición del codón en *S. cerevisiae* (44), el tRNA^{Lys} (CUU) que permite reconocer A o G en *Drosophila melanogaster* (42), o el tRNA^{Ser} (GCU) que permite reconocer pirimidinas en platelmintos (45); además el tRNA^{Ser} (GCU) permite el reconocimiento de U, C, G o C en moluscos de la clase bivalva (46). Este

hecho muestra que un mismo tRNA puede reconocer a más de un codón, y que, además, parece que la capacidad para decodificar codones de un tRNA varía de un organismo a otro.

El hecho de que el código genético consista de 64 codones, 61 de los cuales representan aminoácidos, mientras que tres son señales de paro, implica la existencia de codones que codifican para un mismo aminoácido (el código, es pues degenerado), y que, en ciertos casos, el nucleótido de la tercera posición del codón no es determinante para el significado de dicho codón. Esta observación llevó a diversos investigadores a plantear diferentes modalidades en la interacción codón-anticodón. En la actualidad, se sabe que en algunos organismos y organelos (todos ellos con genomas reducidos) el número de tRNAs es menor a 61, por lo que un mismo tRNA se encarga de reconocer a más de un aminoácido; de igual manera, se conoce la existencia de tRNAs isoaceptores (tRNAs diferentes, los cuales son cargados con el mismo aminoácido).

Ya en 1966, Francis Crick propuso la "hipótesis del bamboleo" ("The Wobble Hypothesis"); en ella plantea que, en las dos primeras posiciones de un triplete, el apareamiento de bases se da estrictamente entre los pares de bases estándar (G/C y A/T); sin embargo, en la tercera posición, se da un cierto "bamboleo" en el apareamiento de las bases, debido a que hay más de una posición de apareamiento posible entre ellas (47). Lo anterior se debe a que la estructura del sitio A (aceptor) del ribosoma - sitio en que se da el apareamiento codón-anticodón - permite un aumento en la flexibilidad de este primer nucleótido del anticodón (47).

De acuerdo a esta hipótesis del bamboleo, se requiere un mínimo de treinta y un tRNAs (excluyendo el iniciador) para reconocer los sesenta y un codones que codifican para aminoácidos en el código genético estándar, ya que se requieren al menos dos tRNAs por cada familia de cuatro codones; además, se requiere de un tRNA por par de codones o único codón. No obstante, genomas reducidos de ciertos organismos como *Mycoplasma* o bien de organelos como la mitocondria, codifican para un número menor de tRNAs (48); por ejemplo, el genoma mitocondrial de mamíferos codifica sólo para 22 tRNAs, de los cuales 18 codifican cada uno para un sólo aminoácido, 2 para Ser y 2 para Leu (49). Adicionalmente, se sabe que no hay importación de tRNAs codificados en el genoma nuclear en humanos, con la posible excepción de tRNA^{Gln}, importado a mitocondrias en células de individuos con epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas (49). Se ha demostrado, por otra parte, la importación de tRNAs en *Tetrahymena*, tripanosomátidos,

levaduras, plantas y marsupiales (50), por lo que se infiere que debe haber modificaciones en las reglas de bamboleo para la traducción de mRNAs en el ribosoma mitocondrial.

Es interesante observar que en la mitocondria de mamíferos está presente una uridina no modificada en la primera posición del anticodón, la cual puede aparearse con cualquiera de las cuatro bases en la tercera posición del codón; dicha uridina está presente en los tRNAs específicos para ocho familias de cuatro codones: Pro, Thr, Ala, Ser, Leu, Val, Gly, y Arg. Esto reduce el número total de tRNAs requeridos en la mitocondria por ocho, y la conversión de AGA y AGG a codones de término elimina la necesidad de otro tRNA, obteniéndose así un total de 22 tRNAs requeridos.

Las diferentes normas de bamboleo para la traducción mitocondrial y nuclear, muy probablemente, surgen de las diferencias en la estructura detallada del sistema que traduce los dos genomas. Cabe mencionar que las mitocondrias presentan tRNAs con estructuras "truncadas" de forma inusual. Son más cortos que los tRNAs citoplásmicos, y con frecuencia, no presentan nucleótidos que están conservados o semi-conservados y que tienen un importante papel en el plegamiento de la estructura terciaria en forma de "L" (38); además, como ya se ha mencionado en puntos anteriores, la gran mayoría de los codones que han tenido un cambio en su significado, han ocurrido en la mitocondria. Se cree que estas características se deben al acortamiento de los genomas mitocondrial (51). Además, se ha postulado que algunas de estas variantes del código, hacen al código más "simple", como en casos en los que dos codones que tienen diferente significado, son reemplazados por un par que codifica para el mismo aminoácido. Por ejemplo, UGG y UGA (ambos codones codifican para Trp en los genomas mt de todos los eucariontes excepto en plantas, en lugar de que uno codifique para Trp y el otro ser un codón de paro); otro caso son los codones AUG y AUA (ambos codifican para Met en algunos *phyla* de animales y levaduras, en lugar de codificar para Met e Ile respectivamente).

En el caso de los codones AGA/G en mitocondria de humano, que anteriormente se creía eran codones de paro en los ORFs: MTCO1 y MTND6, y que no son reconocidos por ningún tRNA mitocondrial, actualmente se sabe que los ribosomas mitocondriales de humano utilizan un mecanismo de desplazamiento del marco de lectura del ribosoma (ribosome frameshifting), de tal manera que al estar precedidos estos codones AGA/G por una "U", el ribosoma puede posicionar el codón UAG en el sitio A, utilizando de esta manera solamente

los codones de paro canónicos; también existe evidencia de que los factores de liberación que forman parte de la familia de 4 miembros hasta ahora conocidos que son transportados a mitocondria (mtRF1, mtRF1a, ICT1, c12orf65), ninguno es capaz de reconocer los codones AGA/G como codones de paro, aunque ICT1 podría estar involucrado en la terminación de la traducción. Se ha postulado que este mecanismo se puede dar por tres razones: la pausa del ribosoma mitocondrial en los codones AGA/G que no son reconocidos por tRNAs, por la presencia de secuencias "resbaladizas" ("slippery" sequences) río arriba, o bien por la formación de estructuras secundarias en 3' (52). Sin embargo, aún existen dudas al respecto, dado que se ha observado que ICT1 y C12orf65 son esenciales en el proceso de traducción mitocondrial, y que ICT1 podría funcionar de tal manera que permitiría el paro de la síntesis de proteína. Lamentablemente, aún no existen modelos de traducción mitocondrial *in vitro* en vertebrados, por lo que no hay hasta la fecha manera en que estas hipótesis puedan probarse (53).

PROPUESTAS DEL ORIGEN DE LOS CÓDIGOS GENÉTICOS MITOCONDRIALES

Diversos autores han propuesto algunas formas en las que pudieron haber surgido las diferentes variantes del código genético ahora presentes en los organismos. Estos trabajos, se basan en las variantes mitocondriales del código, ya que superan en número a las presentes en genomas nucleares y bacterianos. Por un lado, figuran las hipótesis que proponían que los códigos mitocondriales representaban formas primitivas anteriores a la fijación del código universal, así como las que sostenían que las reasignaciones de codones observadas en mitocondrias se habrían dado por evolución del código universal. Los descubrimientos de los años subsecuentes, indican que muy probablemente, tales cambios en el código genético de genomas mitocondriales, así como de procariontes y eucariontes, han surgido a partir del código universal (26).

Se considera que los genomas mitocondriales podrían mostrar predisposición a cambios debido a que presentan características que los diferencian de los genomas bacterianos y nucleares. Las mitocondrias presentan un genoma pequeño, el cual codifica para pocas proteínas que son esenciales para el proceso de respiración, no para su propia replicación o mantenimiento. Este hecho permite deducir que los genomas mitocondriales no deben estar bajo fuerte presión de selección para la exactitud de la traducción, por lo cual podría

haber mayor libertad a cambios de significado de codones en comparación con genomas nucleares o bacterianos. Además, usualmente son genomas ricos en A-T, lo cual permite que haya preferencia en el uso de codones (23, 54). Estas características del genoma mitocondrial son la base de diferentes teorías que se han postulado para entender cómo han surgido los cambios en el código genético dando lugar a los diferentes códigos mitocondriales que existen hoy en día. Dichas teorías se presentan a continuación:

En la teoría de captura de codón, propuesta por Osawa y Jukes en 1992 (55) se plantea la desaparición temporal de un codón de un aminoácido o bien un codón de paro de los marcos de lectura mediante el cambio a un codón sinónimo así como la pérdida o modificaciones del correspondiente tRNA que traduce dicho codón; o en el caso de codones de paro, por modificaciones o pérdida en el factor de liberación (RF) que lo reconoce; produciéndose de esta manera un codón no asignado (el cual ya no es reconocido por ningún tRNA ni por RFs). Este codón, más tarde reaparece en los marcos de lectura abiertos por el cambio de otro codón, y aparece, además, un tRNA que va a reconocer a este codón que reapareció, pero ahora con una asignación diferente, esto es, un tRNA ya existente, por mutación va a ser capaz de reconocer a este codón, pero con un significado diferente al que tenía inicialmente (55). Un ejemplo claro de la posibilidad de que este mecanismo se lleve a cabo, es el caso de la reasignación del codón UGA, un codón de paro, que, en la mitocondria de diversos organismos, así como en *Mycoplasma*, codifica para Trp. UGA es un codón de paro poco utilizado en las bacterias, y, como se mencionó anteriormente, por presión mutacional, es posible que los pocos codones de paro UGA, desaparecieran en un inicio por mutación a un codón de paro UAA, para así disminuir el contenido de GC de los genomas de estos organismos. El RF que reconociera el codón UGA, perdería dicha función, convirtiéndose de esta manera en un codón no asignado. Posteriormente, el anticodón del tRNA^{Trp} (CCA), igualmente habría mutado, bajo presión mutacional A-T, a UCA; este anticodón, puede reconocer los codones UGA y UGG, ambos específicos para Trp en mt de diversos organismos (55).

En la teoría del intermediario ambiguo, propuesta por Schultz y Yarus en 1994, se argumenta que el codón a reasignar, no necesariamente debe desaparecer; sino que por el contrario, existe un periodo de transición en el que este codón se traduce ambiguamente como dos aminoácidos distintos (50). Esto es, que la reasignación de codones ocurre mediante un estado intermediario

en el que un codón particular se decodifica ambiguamente tanto por un tRNA afín, como por un tRNA mutado. Como resultado, tal decodificación ambigua, así como la competencia entre los dos tRNAs, podría llevar a la eliminación del gen que codifica al tRNA afín, así como la decodificación del codón por el tRNA mutado. De igual manera, se propone que este mismo mecanismo también aplica para la reasignación de codones de paro a codones con sentido, en los que surge un tRNA que reconoce un codón de paro por mutación y compite por el codón de paro para ser reconocido por el factor de liberación (15). Un ejemplo de este mecanismo es la reasignación del codón AAA de Lys a Asn observada en genomas mitocondriales de equinodermos, platelmintos y tremátodos (56). Este codón es frecuentemente más utilizado que su codón sinónimo AAG en organismos donde codifica para Lys, hecho por el cual se cree, sería difícil su desaparición. En equinodermos y platelmintos el tRNA^{Lys} (UUU) ha mutado a CUU, reconociendo solamente AAG; además, el tRNA^{Asn} (GU*U) presenta modificaciones, una de ellas, una uridina en la segunda posición del anticodón que permite el reconocimiento del codón AAA; adicionalmente, en algunos equinodermos, se presenta la modificación en la base inmediata al anticodón en posición 5', de U a C, lo cual se piensa igualmente ayuda en el reconocimiento de este codón (57). Por lo tanto, se cree que el proceso pudo haber comenzado por una ganancia de función del tRNA^{Asn}, por lo que presentó la capacidad para reconocer el codón AAA; en estos organismos dejó de ocurrir la modificación del tRNA^{Asn} (G*UU), donde G es modificada a Q para evitar errores al distinguir entre G y A en la tercera posición del codón. Entonces, cambios sucesivos en el tRNA^{Asn} incrementarían el número de codones AAA traducidos como Asn, y mutaciones en el tRNA^{Lys} lo harían no funcional, eliminándose así la ambigüedad al leer dicho codón (40).

La teoría de la racionalización del genoma sugiere que los cambios en los códigos de genomas

mitocondriales, así como de parásitos intracelulares obligados, se debe a selección para minimizar sus aparatos de traducción (23). La presión selectiva para minimizar el genoma mitocondrial produce reasignaciones de codones específicos, en particular, uno de los tres codones de paro (15). Además, predice una simplificación del repertorio de tRNAs así como enzimas modificadoras. Por ejemplo, una misma familia de codones puede ser reconocida por un único tRNA que presenta una U en la primera posición del anticodón (23).

Como es claro, las variantes del código han surgido por diferentes mecanismos en diferentes linajes y en diversos momentos de la evolución, observándose modificaciones en las propiedades de reconocimiento de tRNAs así como cambios en el aparato de término de la traducción en el caso de codones de paro. Algunos de estos cambios observados, parecen proveer de cierta ventaja selectiva en circunstancias particulares, lo cual muestra que el código genético no está "congelado", y en algunos linajes, ha seguido evolucionando, permitiendo así cambios adaptativos.

El estudio de las variantes del código genético, probablemente proporcionará nuevas ideas sobre la manera en que la fidelidad en la decodificación del mRNA interfiere con la composición de bases del genoma, el uso de codones y su reasignación, proporcionándose las bases para investigaciones sobre la estructura del código y el proceso de evolución molecular, haciendo posible explorar la relación entre las reglas de codificación y la evolución de los genomas (23, 26).

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la M. en C. Ana Paulina Mendoza von der Borch y a la Q. Viviana Escobar Sánchez, del Laboratorio de Biología Molecular y Genómica de la Facultad de Ciencias por su valioso apoyo en la revisión crítica de este trabajo y la configuración de las imágenes.



REFERENCIAS

1. Osellame L, Blacker T, Duchon M (2012) Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 26:711-723.
2. Chinnery P, Hudson G (2013) Mitochondrial genetics. *Br Med Bull* 106:135-159.
3. Kasiviswanathan R., Collins T, Copeland W (2012) The interface of transcription and DNA replication in the mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1819:970 - 978.
4. Gray M, Burger G, Lang B (2001) The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biol* 2: REVIEWS 1018.1- 1018.5.
5. Hirt R, Horner D (ed.) (2004) *Organelles, Genomes and Eukaryote Phylogeny: An Evolutionary Synthesis in the Age of Genomics*. CRC Press, New York, p 400.
6. Burger G, Gray M, Forget L, Lang B (2013) Strikingly bacteria-like and gene-rich mitochondrial genomes throughout jakobid protists. *Genome Biol Evol* 5:418-438.
7. Avila G, Tovar J (2004) Mitosomes of *Entamoeba histolytica* are abundant mitochondrion-related remnant organelles that lack a detectable organellar genome. *Microbiol* 150:1245-1250.
8. Van der Giezen M, Tovar J, Clark C (2005) Mitochondrion-derived organelles in protists and fungi. *Int Rev Cytol* 244:175-225.
9. Boxma B, de Graaf R, van der Staay G, van Alen T, Ricard G, Gabaldón T, van Hoek A, Moon-van der Staay S, Koopman W, van Hellemond J, Tielens A, Friedrich T, Veenhuis M, Huynen M, Hackstein J (2005) An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen. *Nature* 434: 74 -79.
10. Barbrook A, Howe C, Kurniawan D, Tarr S (2010) Organization and expression of organellar genomes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365:785-797.
11. Anderson S, Bankier A, Barrell B, de Bruijn M, Coulson A, Drouin J, Eperon I, Nierlich D, Roe B, Sanger F, Schreier P, Smith A, Staden R, Young I (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465.
12. Zhang J, Lin A, Powers J, Lam M, Lotz C, Liem D, Lau E, Wang D, Deng N, Korge P, Zong N, Cai H, Weiss J, Ping P (2012) Perspectives on: SGP symposium on mitochondrial physiology and medicine: mitochondrial proteome design: from molecular identity to pathophysiological regulation. *J Gen Physiol* 139:395-406.
13. Marshall W. Nirenberg - Nobel Lecture: The Genetic Code. Nobelprize.org. Nobel Media AB 2013. Web 1 Jun 2014. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1968/nirenberg-lecture.html
14. Freeland S, Hurst L (2004) Evolution encoded. *Sci Am* 290:84-91.
15. Koonin E, Novozhilov A (2009) Origin and evolution of the genetic code: the universal enigma. *IUBMB Life* 61, 99-111.
16. Woese C (1965) On the evolution of the genetic code. *Proc Natl Acad Sci U S A* 54: 1546-1552.
17. Wong J (1975) A co-evolution theory of the genetic code. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:1909-1912.
18. Baranov P, Gesteland R, Atkins J (2002) Recoding: Translational Bifurcations in Gene Expression. *Gene* 286: 187-201.
19. Srinivasan G, James C, Krzycki J (2002) Pyrrolysine encoded by UAG in Archaea: charging of a UAG-decoding specialized tRNA. *Science* 296:1459-1462.
20. Bender A, Hajieva P, Moosmann B (2008) Adaptive antioxidant methionine accumulation in respiratory chain complexes explains the use of a deviant genetic code in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:16496-16501.
21. Barrell B, Bankier A, Drouin J (1979) A different genetic code in human mitochondria. *Nature* 282:189-194.
22. Vallabhaneni H, Fan-Minogue H, Bedwell DM, Farabaugh PJ (2009) Connection between stop codon reassignment and frequent use of shifty stop frameshifting. *RNA* 15:889-897.
23. Knight R, Freeland S, Landweber L (2001) Rewiring the keyboard: evolvability of the genetic code. *Nat Rev Genet* 2:49-58.
24. McCutcheon J, McDonald B, Moran N (2009) Origin of an alternative genetic code in the extremely small and GC-rich genome of a bacterial symbiont. *PLoS Genet* 5, e1000565.
25. Elzanowski A, Ostell J. *The Genetic Codes*. National Center for Biotechnology. 18 Nov 2016. Web. 05 Jun 2017. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Utils/wprintgc.cgi?mode=c>
26. Santos M, Moura G, Massey S, Tuite M (2004) Driving change: the evolution of alternative genetic codes. *Trends Genet* 20:95-102.

27. Lekomtsev S (2007) Non-standard genetic codes and translation termination. *Mol Biol (Mosk)* 41:964-972.
28. Parker J (1989) Errors and alternatives in reading the universal genetic code. *Microbiol Rev* 53:273-298.
29. Lobanov A, Turanov A, Hatfield D, Gladyshev V (2010) Dual functions of codons in the genetic code. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 45:257-265.
30. Sakurai M, Ohtsuki T, Suzuki T, Watanabe K (2005) Unusual usage of wobble modifications in mitochondrial tRNAs of the nematode *Ascaris suum*. *FEBS Lett* 579:2767-2772.
31. Martin RP, Sibler A, Gehrke C, Kuo K, Edmonds C, McCloskey J, Dirheimer G (1990) 5-[[[(carboxymethyl)amino]methyl]uridine is found in the anticodon of yeast mitochondrial tRNAs recognizing two-codon families ending in a purine. *Biochemistry* 29:956-959.
32. Hekele A, Beier H (1991) Nucleotide sequence and functional characterization of a mitochondrial tRNA(Trp) from *Tetrahymena thermophila*. *Nucleic Acids Res* 19:1941.
33. Suzuki T, Miyauchi K, Suzuki T, Yokobori S, Shigi N, Kondow A, Takeuchi N, Yamagishi A, Watanabe K (2011) Taurine-containing uridine modifications in tRNA anticodons are required to decipher non-universal genetic codes in ascidian mitochondria. *J Biol Chem* 286:35494-35498.
34. Alfonzo J, Blanc V, Estevez A, Rubio M, Simpson L (1999) C to U editing of the anticodon of imported mitochondrial tRNA(Trp) allows decoding of the UGA stop codon in *Leishmania tarentolae*. *Embo J* 18:7056-7062.
35. Simpson L, Thiemann O, Savill N, Alfonzo J, Maslov D (2000) Evolution of RNA editing in trypanosome mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6986-6993.
36. Jackman J, Alfonzo J (2013) Transfer RNA modifications: nature's combinatorial chemistry playground. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 4:35-48.
37. Agris P. (2004) Decoding the genome: a modified view. *Nucleic Acids Res* 32:223-38.
38. Christian B, Spremulli L (2012) Mechanism of protein biosynthesis in mammalian mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1819, 1035-1054.
39. Tomita K, Ueda T, Watanabe K (1998) 7-Methylguanosine at the anticodon wobble position of squid mitochondrial tRNA(Ser)GCU: molecular basis for assignment of AGA/AGG codons as serine in invertebrate mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1399:78-82.
40. Ohira T, Suzuki T, Miyauchi K, Suzuki T, Yokobori S, Yamagishi A, Watanabe K (2013) Decoding mechanism of non-universal genetic codes in *Loligo bleekeri* mitochondria. *J Biol Chem* 288:7645-7652.
41. Matsuyama S, Ueda T, Crain P, McCloskey J, Watanabe K (1998) A novel wobble rule found in starfish mitochondria. Presence of 7-methylguanosine at the anticodon wobble position expands decoding capability of tRNA. *J Biol Chem* 273:3363-3368.
42. Tomita K, Ueda T, Watanabe K (1999) The presence of pseudouridine in the anticodon alters the genetic code: a possible mechanism for assignment of the AAA lysine codon as asparagine in echinoderm mitochondria. *Nucleic Acids Res* 27:1683-1689.
43. Watanabe K, Yokobori S (2011) tRNA Modification and Genetic Code Variations in Animal Mitochondria. *J Nucleic Acids* 623095.
44. Su D, Lieberman A, Lang B, Simonovic M, Söll D, Ling J (2011) An unusual tRNA^{Thr} derived from tRNA^{His} reassigns in yeast mitochondria the CUN codons to threonine. *Nucleic Acids Res* 39:4866-4874.
45. Garey J, Wolstenholme D (1989) Platyhelminth mitochondrial DNA: evidence for early evolutionary origin of a tRNA(serAGN) that contains a dihydrouridine arm replacement loop, and of serine-specifying AGA and AGG codons. *J Mol Evol* 28:374-387.
46. Yu H, Li Q (2011) Mutation and selection on the wobble nucleotide in tRNA anticodons in marine bivalve mitochondrial genomes. *PLoS One* 6, e16147.
47. Crick FH (1966) Codon--anticodon pairing: the wobble hypothesis. *J Mol Biol* 19:548-555.
48. Alkatib S, Sharff L, Rogalski M, Fleischmann T, Matthes A, Seeger S, Schöttler M, Ruf S, Bock R (2012) The contributions of wobbling and superwobbling to the reading of the genetic code. *PLoS Genet* 8, e1003076.
49. Bilbille Y, Gustillo E, Harris K, Jones C, Lusic H, Kaiser R, Delaney M, Spremulli L, Deiters A, Agris P (2011) The human mitochondrial tRNA^{Met}: structure/function relationship of a unique modification in the decoding of unconventional codons. *J Mol Biol* 406:257-274.
50. Rubio M, Rinehart J, Krett B, Duvezin - Caubet S, Reichert A, Söll D, Alfonzo J (2008) Mammalian mitochondria have the innate ability to import tRNAs by a mechanism distinct from protein import. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 9186-9191.

51. Watanabe, K. (2010) Unique features of animal mitochondrial translation systems. The non-universal genetic code, unusual features of the translational apparatus and their relevance to human mitochondrial diseases. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 86, 11-39.
52. Lightowlers R, Chrzanowska-Lightowlers Z (2010) Terminating human mitochondrial protein synthesis. A shift in our thinking. *RNA Biol* 7:282-286.
53. Lind C, Sund J, Åqvist J (2013) Codon-reading specificities of mitochondrial release factors and translation termination at non-standard stop codons. *Nat Commun* 4:1-8.
54. Lang B, Burger G. *Thraustochytrium aureum*. Mitochondrial genome organization, gene content, genetic code. OGMP. 23-Oct-2007. Web. 1-Jun-2014.
<http://megasun.bch.umontreal.ca/ogmp/projects/taure/gen.html>
55. Osawa S, Jukes T, Watanabe K, Muto A (1992) Recent Evidence for Evolution of the Genetic Code. *Microbiol Rev* 56:229-264.
56. Cantatore P, Roberti M, Rainaldi G, Gadaleta M, Saccone C (1989) The complete nucleotide sequence, gene organization, and genetic code of the mitochondrial genome of *Paracentrotus lividus*. *J Biol Chem* 264:10965-10975.
57. Sengupta S, Yang X, Higgs P (2007) The mechanisms of codon reassignments in mitochondrial genetic codes. *J Mol Evol* 64:662-688.