



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UN/M  
POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN DE LA  
PROTEÍNA Pet309p A LA MEMBRANA  
INTERNA MITOCONDRIAL DE  
*Saccharomyces cerevisiae***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :  
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

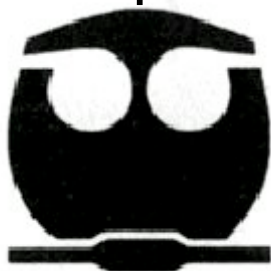
P R E S E N T A :

Miguel Ángel Shingú Vázquez

Tutor: Dra. Xochitl Pérez Martínez

MÉXICO, D. F.

Noviembre 2006





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# **ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN DE LA PROTEÍNA Pet309p A LA MEMBRANA INTERNA MITOCONDRIAL DE *Saccharomyces cerevisiae***

## **RECONOCIMIENTOS**

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Xochitl Pérez Martínez en el laboratorio 204-Oriente, en el Departamento de Bioquímica del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Xochitl Pérez Martínez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Javier Plasencia de la Parra	Facultad de Química, UNAM
Dr. Salvador Uribe Carvajal	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Se reconoce la asesoría técnica de la Dra. Yolanda M. Camacho Villasana, del Departamento de Bioquímica del Instituto de Fisiología Celular.

Se agradece la asesoría y el apoyo del Dr. Salvador Uribe Carvajal en los experimentos de oximetría.

El proyecto fue apoyado por CONACYT (47514) y PAPIIT-UNAM (IN201805). Durante los estudios de maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT .

El Jurado de Examen de grado estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Marietta Tuena Sangri	Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
Vocal	Dra. Gloria Soberón Chávez	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
Secretario	Dra. Marina Gavilanes Ruiz	Facultad de Química, UNAM.
Suplente	Dr. José de Jesús García Trejo	Instituto Nacional de Cardiología.
Suplente	Dr. Salvador Uribe Carvajal	Facultad de Química, UNAM.

# Dedicatorias

A la Dra. Xochitl Pérez Martínez por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por compartir su sabiduría conmigo, gracias por su confianza, apoyo y guía.

A mis padres Celia y Filemón que han sido mi ejemplo a seguir y a quienes les debo todo lo que soy.

A mis hermanos Carmen, Juan y Cecilia, sin ustedes mi vida estaría vacía.

A Luisa, gracias por tu comprensión y apoyo. Eres un milagro en mi vida. Te amo.

A mi tío German, por ser un gran amigo y un ejemplo a seguir.

A mis amigos Alejandro, Angélica, Carmen, Ernesto, Faviola, Itzel, Jenny, Lorena, Martín, Paco, Paola, Pilo, Olga, Selene, Viri y Yolanda. Sin su apoyo y amistad todo sería difícil .

# CONTENIDO

Abreviaturas	1
Resumen	2
Introducción	4
La mitocondria y la producción de energía	4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo experimental	5
Citocromo <i>c</i> oxidasa (COX)	6
La subunidad 1 de la citocromo <i>c</i> oxidasa (Cox1p)	8
Genoma mitocondrial	10
Traducción en la mitocondria y activadores traduccionales	13
Pet309p	16
Justificación	20
Hipótesis y objetivos	21
Materiales y métodos	22
Resultados	35
Efecto del epítotope 3xHA fusionado a Pet309p sobre la respiración.	35
Curvas de crecimiento	38
Purificación de mitocondrias	38
Detección de Pet309p-3xHA	39
Localización de Pet309p-3xHA en las fracciones mitocondriales	42
Extracción alcalina de mitocondrias	43
Topología de Pet309p-3xHA	44
Discusión	47
Conclusión	52
Apéndice	53
Bibliografía	69

# Abreviaturas

- 3xHA Triple epítoto de hemaglutinina
- 5´UTR mRNA Región no traducida en el extremo 5´ del RNA mensajero (del inglés untranslated region)
- COB Gen del citocromo *b*
- COX Citocromo *c* oxidasa
- *COX1* Gen de la subunidad 1 de la COX
- Cox1p Subunidad 1 de la COX
- *COX2* Gen de la subunidad 2 de la COX
- Cox2p Subunidad 2 de la COX
- *COX3* Gen de la subunidad 3 de la COX
- Cox3p Subunidad 3 de la COX
- mRNA Ácido ribonucleico mensajero
- mtDNA DNA mitocondrial
- Nicodenz Siglas en ingles de 5-(N-2,3-dihydroxypropylacetamido)-2, 4, 6-tri-iodo-N,N´, bis(2,3 dihydroxypropylacetamido) isophthalamide
- PMSF Siglas en inglés de Phenylmethylsulfonyl fluoride
- PPR Siglas en inglés de Pentatricopeptide repeat
- TA Temperatura ambiente
- TEMED Siglas en inglés de ,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
- TLCK Siglas en inglés de N $\alpha$ -Tosyl-Lys Chloromethyl Ketone, Hydrochloride

# Resumen

La mitocondria es un organelo complejo especializado en la producción de ATP por medio del acoplamiento entre la cadena transportadora de electrones y el complejo de la ATP sintasa. Posee su propio material genético así como la maquinaria necesaria para expresar su genoma. A pesar de participar en una gran cantidad de procesos bioquímicos sólo unos pocos componentes de la fosforilación oxidativa son codificados por el DNA mitocondrial.

La citocromo *c* oxidasa (COX) es la enzima terminal en la cadena transportadora de electrones, reduce al oxígeno para formar agua. El complejo COX de *S. cerevisiae* consta de 12 polipéptidos diferentes. Tres de esas subunidades (Cox1p, Cox2p y Cox3p) son codificadas por los genes mitocondriales *COX1*, *COX2* y *COX3* y son el centro catalítico de la COX.

La biogénesis de las subunidades mitocondriales es muy compleja y se sabe muy poco. En la levadura, la traducción de los RNA mensajeros mitocondriales depende de proteínas codificadas por genes nucleares. Estas proteínas son llamadas activadores traduccionales. Algunos activadores se unen a la membrana interna mitocondrial, y todos actúan específicamente sobre el extremo 5'UTR de su mRNA mitocondrial blanco para iniciar la traducción. Algunos interaccionan genéticamente con la subunidad pequeña del ribosoma mitocondrial. Se cree que los activadores traduccionales ayudan a que el inicio de la traducción se lleve a cabo cerca del sitio de inserción en la membrana de las proteínas sintetizadas.

Pet309p es un activador traduccional que se requiere específicamente para la traducción del mRNA derivado del gen *COX1*, así como para estabilizar al mRNA de *COX1*. Se desconocía si Pet309p se asociaba a la membrana mitocondrial o si se comportaba como una proteína soluble. El objetivo de este trabajo es estudiar la asociación de Pet309p con la membrana interna mitocondrial, así como su localización en la mitocondria.

Para poder detectar a Pet309p se fusionó en su extremo carboxilo un triple epítotope de hemaglutinina (3xHA). Se establecieron las condiciones para purificar mitocondrias utilizando un gradiente discontinuo de Nicodenz. Con las mitocondrias purificadas se detectó a Pet309p-3xHA cuando se expresa en copia única cromosomal. Por medio del fraccionamiento mitocondrial se demostró que Pet309p-3xHA se encuentra unida a la membrana mitocondrial. La extracción alcalina de las proteínas mitocondriales indicó que Pet309p-3xHA es una proteína periférica de membrana. Con el ensayo de protección de Pet309p-3xHA contra la digestión con proteinasa K en mitocondrias y mitoplastos (mitocondrias sin membrana externa) se demostró que Pet309p-3xHA se encuentra del lado de la matriz mitocondrial.

En conclusión, se encontró que Pet309p es una proteína periférica de la cara interna de la membrana interna mitocondrial. Creemos que la asociación de Pet309p con la membrana interna es importante para facilitar la síntesis localizada de Cox1p, ya que esta interacción parece ser lo suficientemente fuerte como para atraer la maquinaria de traducción a la membrana interna mitocondrial.



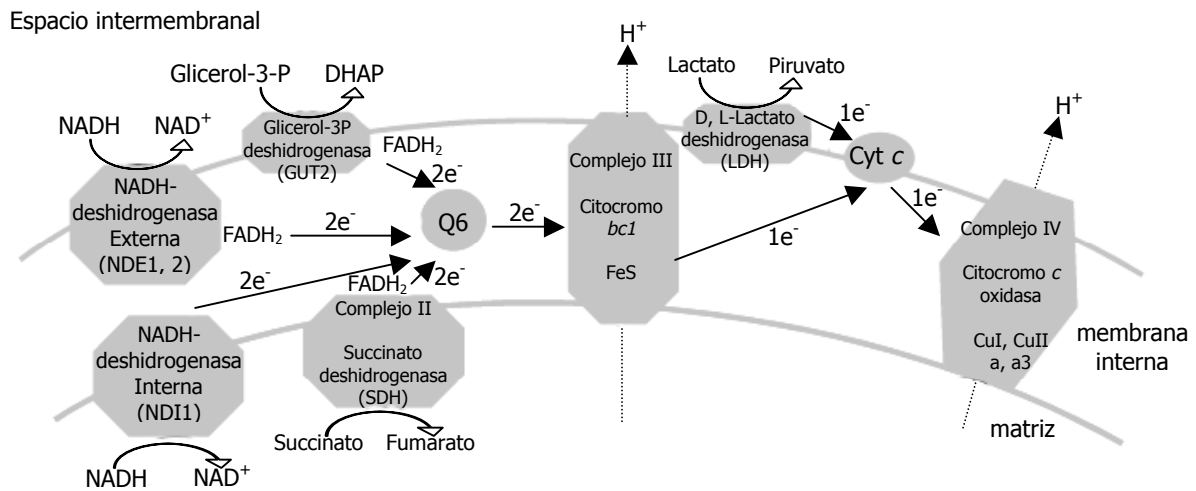
# Introducción

## La mitocondria y la producción de energía

La mitocondria es un organelo complejo especializado en la producción de ATP. Consiste de cuatro compartimentos: membrana externa, membrana interna, espacio intermembranal y matriz mitocondrial. Posee su propio material genético, así como la maquinaria necesaria para expresar su genoma (Dujon, 1981).

La producción de energía celular ocurre principalmente a través de la fosforilación oxidativa, que es un proceso en el que los electrones pasan a través de una serie de moléculas transportadoras embebidas en la membrana interna. A este conjunto de moléculas se les llama cadena transportadora de electrones. Los electrones son aceptados del NADH, el cual a su vez es producido por la oxidación de nutrientes en el ciclo del ácido cítrico. Finalmente, los electrones son transferidos al oxígeno molecular para formar agua (Saraste, 1999).

La cadena transportadora de electrones de *S. cerevisiae* (figura 1) consiste de: dos NADH deshidrogenasas: una interna (matriz mitocondrial) y una externa (espacio intermembranal), el complejo II o succinato deshidrogenasa, el complejo III o citocromo *bc1*, y el complejo IV o citocromo *c* oxidasa. Otros componentes son una glicerol 3-fosfato deshidrogenasa y una D, L-lactato deshidrogenasa (Figura 1) (Bakker *y col.*, 2001; Rosenfeld *y Beauvoit*, 2003). Estos complejos tienen una orientación específica en la membrana interna mitocondrial. El paso de electrones entre estos complejos libera energía que es almacenada como un gradiente de protones a través de la membrana interna y es usada por la ATP sintasa para generar ATP a partir de ADP y fosfato (Hatefi, 1985).



**Figura 1.** La cadena respiratoria de *S. cerevisiae* consiste de: dos NADH deshidrogenasas (NDE1,2 y NDI1), complejo II (succinato deshidrogenasa), complejo III (citocromo *bc1*) y complejo IV (citocromo *c* oxidasa). Otros donadores de electrones son el glicerol-3-P y el lactato. Modificado de Rosenfeld y Beauvoit (2003).

## ***Saccharomyces cerevisiae* como modelo experimental**

*S. cerevisiae* ha sido frecuentemente utilizada como modelo para estudiar la función mitocondrial. Es una levadura facultativa y el hecho de que la respiración no sea esencial para su viabilidad hace a este organismo un modelo ideal para estudiar los mecanismos genéticos y bioquímicos responsables del funcionamiento mitocondrial. Se pueden obtener mutantes no respiratorias que generan colonias pequeñas o "petite" en presencia de glucosa (u otra fuente de carbono fermentable) y que no crecen en fuentes de carbono como glicerol o etanol (Roman, 1981; Tzagoloff y Dieckmann, 1990).

El fenotipo "petite" o "pet" se debe a que la mutación lleva a la pérdida de uno o varios elementos de la cadena respiratoria, incluyendo a los citocromos *a* y *b* o incluso a la pérdida total del DNA mitocondrial (Roman, 1981., Tzagoloff y Dieckmann, 1990). Este fenotipo también es observado en cepas que como resultado de una mutación en el genoma nuclear pierden la capacidad de respirar (Tzagoloff y Dieckmann, 1990).

*S. cerevisiae* tiene herramientas de genética y bioquímica mitocondrial muy accesibles. Adicionalmente su DNA mitocondrial puede ser manipulado genéticamente, lo cual ha permitido una mejor disección de los mecanismos de expresión del genoma mitocondrial (Bonney y Fox, 2002).

Muchas de las proteínas recientemente descubiertas en esta levadura tienen homólogos mitocondriales en humanos. Así, *S. cerevisiae* es un organismo adecuado para estudiar las bases moleculares de un número creciente de enfermedades de origen mitocondrial en humanos ocasionadas por mutaciones en genes nucleares (Foury y Uxue, 2001).

## **Citocromo c oxidasa (COX)**

En las mitocondrias y algunos procariotes, la citocromo c oxidasa (COX) o complejo IV (E.C. 1.9.3.1) es la enzima terminal en la cadena transportadora de electrones (Figura 1) (Frey y Murray, 1994). Pertenece a la familia de enzimas hemo-cobre y no sólo reduce el oxígeno molecular ( $O_2$ ) para formar agua, sino que también actúa como una bomba de protones generando un gradiente electroquímico que es empleado por la ATP sintasa para sintetizar ATP (Michel y col., 1998, Pereira y col., 2001). La COX de eucariotes es una enzima compleja que consiste de once a trece subunidades, dependiendo del organismo. En contraste, la COX de la mayoría de procariotes consiste únicamente de tres subunidades (Mazourek y col., 1999).

El complejo COX de *S. cerevisiae* consta de 12 polipéptidos diferentes. Tres de esas subunidades (Cox1p, Cox2p y Cox3p) son codificadas por los genes mitocondriales *COX1*, *COX2* y *COX3* y son traducidas por ribosomas mitocondriales. Estas tres subunidades están altamente conservadas entre diferentes organismos y componen el centro catalítico de la COX. Estas subunidades contienen centros metálicos redox ( $Cu_A$ , hemo *a* y hemo  $a_3-Cu_B$ ), los cuales juegan un papel clave en la estabilidad y la función de la enzima (Capaldi, 1990).

El resto de las subunidades son codificadas en el genoma nuclear, traducidas en el citoplasma e importadas a la mitocondria. Las subunidades nucleares muestran

una conservación de secuencia relativamente más baja que sus contrapartes mitocondriales y son relativamente más pequeñas (5.4-14.9 KDa), sin embargo son indispensables para el ensamblaje y función de la enzima (Khalimonchuk y Rödel, 2005; Capaldi, 1990). Se entiende poco el ensamblaje de COX, pero en general se ha postulado que es un proceso secuencial que involucra un gran número de proteínas que lo facilitan y asisten y cuyas funciones se presentan en la tabla 1.

El ensamblaje de la holoenzima COX es muy complejo, ya que las subunidades codificadas en el núcleo deben ser importadas y translocadas al sitio de montaje en la membrana interna mitocondrial. Por otro lado las subunidades de origen mitocondrial deben ser procesadas e insertadas en la bicapa lipídica de la misma membrana y también deben unir los grupos prostéticos y metales. Se cree que en humano esta inserción se da en forma de subcomplejos con las subunidades nucleares (Nijtmans y *col.*, 1998).

<b>Proteína</b>	<b>Función</b>	<b>Referencia</b>
Pet309p	Activador traduccional del mRNA de <i>COX1</i> .	Manthey y McEwen, 1995
Pet111p	Activador traduccional del mRNA de <i>COX2</i> .	Mulero y Fox, 1993 a, b
Pet54p	Activador traduccional del mRNA de <i>COX3</i> .	Constanzo y Fox, 1988; Brown y col., 1994
Pet122p	Activador traduccional del mRNA de <i>COX3</i> .	
Pet494p	Activador traduccional del mRNA de <i>COX3</i> .	
Mss51p	Involucrada en la traducción e inserción de Cox1p.	Pérez-Martínez y col., 2003; Barrientos y col., 2004.
Cox24p	Requerida para el procesamiento del transcrito de <i>COX1</i> .	Barros y col., 2006
Cox14p	Requerida para la expresión y ensamblaje de Cox1p	Fiory y col., 2000; Barrientos y col., 2004.
Pet100p	Facilita la formación y ensamblaje del complejo COX.	Church y col., 1996; Church y col., 2005.
Oxa1p	Facilita la inserción en la membrana interna de las subunidades mitocondriales.	Hell y col., 2001.
Mba1p	Involucrada en la translocación de las subunidades mitocondriales.	Preuss y col., 2001.
Cox18p	Requerida para la translocación del C-terminal del precursor de Cox2p.	Saracco y Fox, 2002.
Pnt1p	Requerida para la translocación del precursor de Cox2p.	He and Fox, 1999.
Mss2p	Requerida para la translocación del precursor de Cox2p.	Broadley y col., 2001.
Cox10p	Farnesil-transferasa, facilita el primer paso de biosíntesis del grupo hemo <i>a</i> .	Nobrega y col., 1990.
Shy1p	Necesaria para el ensamblaje de COX	Mashkevich y col., 1997.
Cox19p	Metalochaperona, requerida para el ensamblaje de COX.	Nobrega y col., 2002.
Cox23p	Requerida para el ensamblaje de COX, puede estar involucrada en el metabolismo del cobre.	Barros y col., 2004.
Cox11p	Metalochaperona, se cree que provee el cobre para Cox1p.	Tzagoloff y col., 1990.
Sco1p	Metalochaperona, se cree que provee el cobre a Cox2p.	Schulze y Rödel, 1988., 1989.

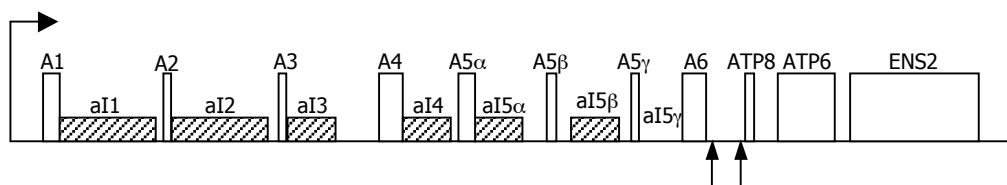
**Tabla 1.** Algunas proteínas involucradas en la biogénesis de COX en *S. cerevisiae*.

## **La subunidad 1 de la citocromo c oxidasa (Cox1p)**

La subunidad I de COX (Cox1p) es codificada por el gen mitocondrial *COX1*. Es la subunidad más grande (55-57 KDa) e hidrofóbica del complejo de la citocromo c oxidasa. Contiene un grupo hemo *a* y un centro redox binuclear hemo  $a_3$ -Cu<sub>B</sub>, así como un ion sodio (Tsukihara y col., 1995; Kirichenko y col., 1998).

Cox1p cruza la membrana interna mitocondrial con 12 hélices transmembranales las cuales forman canales hidrofóbicos. Es parte integral del núcleo catalítico y de ensamblaje de la enzima (Capaldi, 1990; Michel y *col.*, 1998). Cox1p debe sintetizarse en los ribosomas de la matriz mitocondrial e insertarse en la membrana interna para ensamblarse en COX. Los estudios en levaduras han mostrado que la ausencia de Cox1p afecta el ensamblaje de las otras dos subunidades del centro catalítico (Cox2p y Cox3p), así como de Cox4p (Lemaire y *col.*, 1998).

En *S. cerevisiae* el gen *COX1* es transcrito como un RNA precursor policistrónico (Figura 2), el cual contiene los genes *COX1*, *ATP8*, *ATP6* y *ENS2* que codifican a la subunidad I de COX, la subunidad 8 de la ATPasa, la subunidad 6 de la ATPasa y una subunidad de la endonucleasa respectivamente. Este transcrito policistrónico es procesado entre los cistrones *COX1* y *ATP8*, liberando así el transcrito *COX1* de los cistrones *ATP8-ATP6-ENS2*. Adicionalmente, en algunas cepas de *S. cerevisiae* la región codificante de *COX1* contiene intrones, los cuales deben ser removidos para que la proteína funcional Cox1p pueda ser traducida. Por lo tanto, la expresión del gen *COX1* involucra varios pasos de procesamiento del RNA, para así traducir el mRNA de *COX1* maduro (Figura 2) (Dieckmann y Staples, 1994).

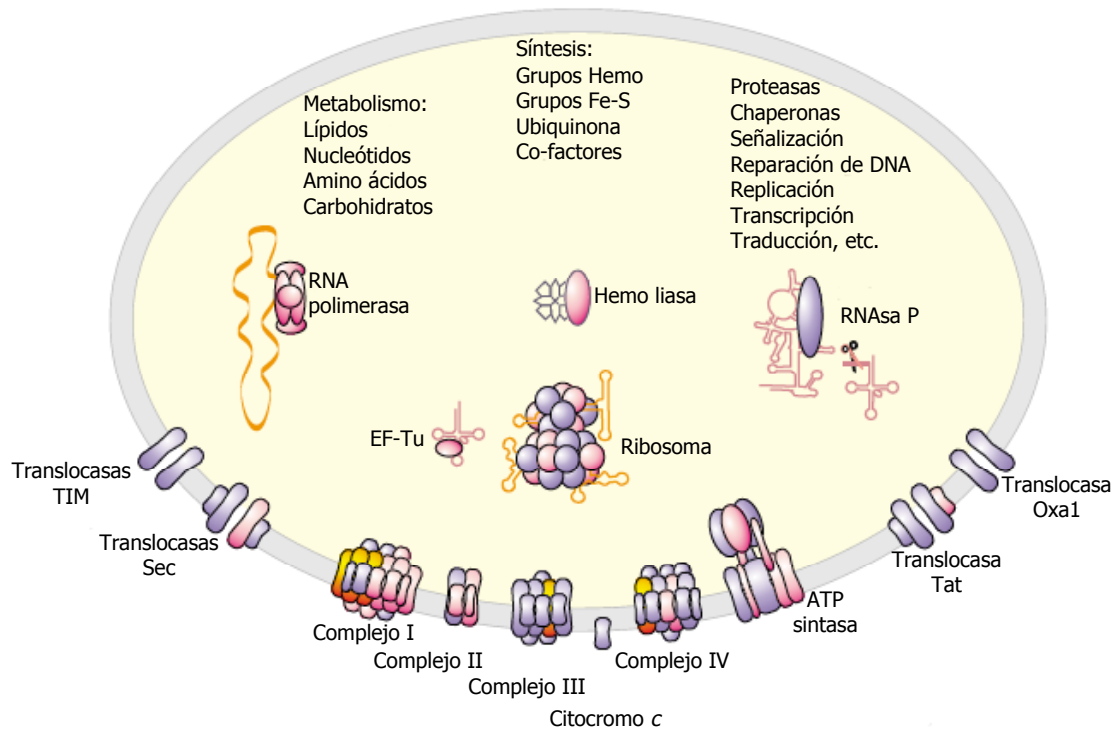


**Figura 2.** Unidad de transcripción de *COX1*, *ATP8*, *ATP6* y *ENS2*. Exones (□) de *COX1* (numerados como A1-A6) y de *ATP8*, *ATP6* y *ENS2*; intrones (▨) denominadas aI1-aI5γ. Las flechas indican sitios de procesamiento en el 3'-UTR. Modificado de Dieckmann y Staples (1994).

En levadura, la expresión del gen *COX1* es muy compleja y poco comprendida. Se han identificado y caracterizado un gran número de proteínas que facilitan la expresión de este gen (Tabla 1) (Kloeckener *y col.*, 1987; Pel *y col.*, 1992). Entre estas proteínas se encuentran: Mss116p, que se requiere para la escisión de varios intrones en *COX1* (Seraphin *et al.*, 1989), Nam1p, que está involucrada en la acumulación de varios transcritos mitocondriales, incluido el gen *COX1* (Ben *y col.*, 1989). Cox24p es necesaria para el procesamiento del transcrito de *COX1* (Barros *y col.*, 2006). Mss51p se requiere para la traducción del mRNA de *COX1* (Decoster *y col.*, 1990) e interacciona con Cox1p recién sintetizada (Pérez-Martínez *y col.*, 2003). Pet309p es el activador traduccional específico de Cox1p (Manthey and McEwen, 1995). Pet309p es la proteína en estudio de este trabajo, por lo que se revisará detalladamente más adelante.

## **Genoma mitocondrial**

Como se mencionó anteriormente, la mitocondria tiene un papel central en la producción de energía de las células eucariontes. También participa en: el metabolismo de aminoácidos y lípidos, la homeostasis de iones, el metabolismo intermediario, la síntesis de grupos hemo y la apoptosis, entre muchas otras funciones. Sin embargo, a pesar de participar en una gran cantidad de procesos bioquímicos sólo unos pocos componentes moleculares de esas vías son codificados por el DNA mitocondrial (Figura 3) (Burger *y col.*, 2003).



**Figura 3.** Se muestra la mayoría de las funciones mitocondriales en membrana interna y matriz. La mayoría de los componentes mitocondriales son codificados en el núcleo (azul), en rosa se muestran los componentes codificados en algunos eucariontes por el DNA mitocondrial y en otros por el DNA nuclear. Una pequeña porción es invariablemente codificada por el DNA mitocondrial (amarillo-naranja). EF-Tu: factor de elongación Tu. Modificado de Burger y col., 2003.

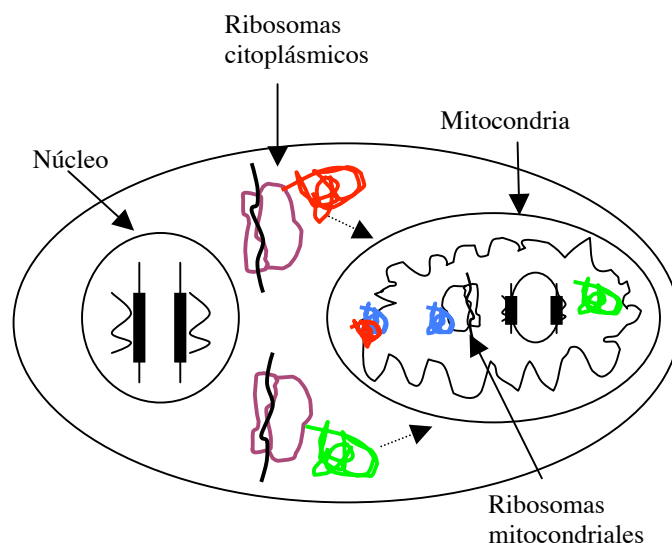
Se cree que el DNA mitocondrial (mtDNA) de la levadura es una molécula circular. Tiene un tamaño de 75 a 80 Kbp dependiendo de la cepa (Foury y col., 1998). El número de moléculas de mtDNA por célula varía dependiendo de las condiciones de crecimiento: de 40 a 60 moléculas en condiciones aeróbicas y aproximadamente 8 en anaerobiosis (Miyakawa y col., 1987). Codifica 8 proteínas de las cuales 7 son componentes de los complejos de la cadena respiratoria: subunidades I, II y III de COX (Cox1p, Cox2p y Cox3p respectivamente), apocitocromo *b* (Cobp), y las subunidades 6, 8 y 9 del componente  $F_0$  de la ATP sintasa mitocondrial (Atp6p, Atp8p y Atp9p respectivamente). El otro producto proteico es



Var1p, una proteína soluble que forma parte de la subunidad pequeña del ribosoma mitocondrial (Constanzo y Fox, 1990, Hudspeth y *col.*, 1982).

El mtDNA también contiene genes de los rRNA's 21S y 15S, un juego completo de 24 tRNA's así como un RNA que es componente de una enzima semejante a la RNasa-P involucrada en el procesamiento de tRNA (Constanzo y Fox, 1990).

Tanto los complejos de la cadena respiratoria como los componentes para la expresión del sistema genético mitocondrial son en su mayoría productos de genes nucleares que se sintetizan en el citoplasma y se importan a la mitocondria. Esto lleva a la idea de que la expresión genética nuclear y mitocondrial deben ser reguladas y sincronizadas en varios niveles, permitiendo una acumulación balanceada de las subunidades de la cadena respiratoria (Figura 4). Sin embargo, los mecanismos de regulación de genes mitocondriales y del ensamblaje de sus productos en complejos funcionales son difíciles de estudiar y poco comprendidos (Constanzo y Fox, 1990; Fox, 1996-a).



**Figura 4.** Esquema de interacción entre proteínas de origen nuclear y mitocondrial. Subunidades nucleares de los complejos respiratorios (en rojo), proteínas de vías metabólicas (en verde) y proteínas de origen mitocondrial (subunidades de complejos respiratorios en azul). Se muestran los ribosomas citoplásmicos y mitocondriales. Modificado de Fox (1996a)

## Traducción en la mitocondria y activadores traduccionales.

La principal función del genoma mitocondrial es generar las subunidades más hidrofóbicas de los complejos respiratorios, las cuales están unidas a la membrana interna. Por lo tanto, el sistema genético mitocondrial está altamente especializado en la producción y ensamblaje de proteínas integrales de membrana (Fox, 1996-b).

La principal herramienta para analizar la expresión genética mitocondrial es el estudio de mutantes nucleares de levadura que bloquean esta expresión. Los estudios de Cabral y Schatz (1978) demuestran la importancia del procesamiento post-transcripcional en el control de la expresión de los genes mitocondriales. Ellos identificaron mutaciones nucleares en dos genes que bloquean específicamente el ensamblaje de COX al impedir la síntesis de subunidades codificadas por el genoma mitocondrial: la mutante *pet494* carecía de Cox3p y la mutante *pet111* carecía de Cox2p.

En los últimos años se han identificado otras mutantes que ocasionan fenotipos similares y que afectan la expresión de varios genes mitocondriales de levadura (Rödel, 1986; Constanzo y Fox, 1990; Manthey y McEwen, 1995).

En levadura, la traducción de los RNA mensajeros mitocondriales depende de proteínas codificadas por genes nucleares que se importan a la mitocondria. Estas proteínas son llamadas activadores traduccionales (Tabla 1) (Constanzo y Fox 1990).

Los activadores son específicos para cada mRNA mitocondrial. Así, Pet309p es específico para *COX1* (Manthey y McEwen, 1995; Manthey *et al*; 1998); Pet111p es específico para *COX2* (Mulero y Fox, 1993b); Pet54p, Pet122p y Pet494p son específicos para *COX3* (Constanzo y Fox, 1988); Cbs1p y Cbs2p son específicos para *COB* (Rödel, 1986); Aep1p y Aep2p son específicos para *ATP9*; Nca3p es específica para *ATP6* y Nca2p es específica para *ATP8* (Grivell, 1995). A la fecha no se ha descrito un activador traduccional para la proteína soluble Var1p.

La activación de la traducción de los mRNA de origen mitocondrial se da por la interacción de los activadores traduccionales con el extremo 5'UTR de sus mRNA mitocondriales blanco (Figura 5). Cabe mencionar que a la fecha esta interacción se ha demostrado únicamente a nivel genético. Por ejemplo, Mulero y Fox (1993b)

demuestran que Pet111p actúa específicamente en el extremo 5'UTR del mRNA de *COX2* para activar la traducción, observan que una mutante nula de *pet111* recupera su capacidad de respirar en presencia de un mRNA quimérico con la región codificante de *COX2* y el extremo 5'UTR de *COX3*. Esto sugiere que los activadores traduccionales funcionan durante el inicio de la traducción y no se requieren durante la fase de elongación.

La interacción de los activadores traduccionales con el extremo 5'UTR de los mRNA también ha sido demostrada para Pet54p, Pet122p y Pet494p (los activadores traduccionales de *COX3*). Para ello se utilizaron construcciones donde la región codificante del gen del citocromo *b* se fusionó a la región 5'UTR del gen de *COX3*. El citocromo *b* del mRNA quimérico fue traducido a niveles comparables con los del mRNA silvestre y su traducción dependía de Pet54p, Pet122p y Pet494p (Constanzo y Fox, 1988).

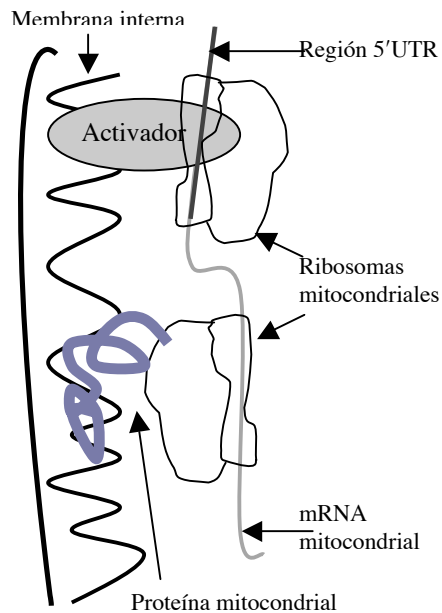
Hasta el momento, en los activadores traduccionales no se han identificado motivos de unión al mRNA, a excepción de Pet309p, que es el único activador traduccional que presenta dominios PPR (ver más adelante). Tampoco en los extremos 5'-UTR de los mRNA mitocondriales se han encontrado secuencias consenso de unión de los activadores traduccionales.

Sin embargo, se han identificado secuencias necesarias para la traducción de los mRNA's mitocondriales. Por ejemplo, en el 5'UTR de *COX2* se ha encontrado una región de 31 pares de bases requerida para la traducción y que está conservada en varias especies de levaduras (Fox, 1996b). En la región 5'UTR de *COX3* se encontró una región de 151 pares de bases entre los nucleótidos -480 y -330 relativos al codón de inicio que contiene secuencias que son suficientes para activar la traducción (Wiesenberger y col., 1995).

No se ha demostrado que los mRNA mitocondriales contengan secuencias de unión a los ribosomas. Ningún mRNA mitocondrial contiene secuencias Shine-Dalgarno (Fox, 1996b).

Datos genéticos indican que los activadores traduccionales interaccionan con los ribosomas mitocondriales. En un análisis de revertantes de mutantes de *pet122* se

encontró un supresor que fue llamado *PET123*. Esta es una proteína nuclear que forma parte de la subunidad pequeña del ribosoma mitocondrial. Mutantes de *PET123* reducen dramáticamente la síntesis de las proteínas codificadas mitocondrialmente. Esto sugiere que Pet123p es esencial para la síntesis general de proteínas en la mitocondria (Figura 5) (Hafter y col., 1990; McMullin y col., 1990). Hay evidencias genéticas que indican que también los activadores traduccionales del mRNA de *COB*, Cbs1p y Cbs2p interaccionan con los ribosomas mitocondriales (Krause-Buchholz y col., 2004; Krause-Buchholz y col., 2005)



**Figura 5.** Modelo de interacción de los activadores traduccionales con el extremo 5'UTR de su mRNA blanco, con la membrana interna mitocondrial y con el ribosoma mitocondrial. Modificado de Fox (1996a).

Dentro de la matriz mitocondrial algunos activadores se unen a la membrana interna mitocondrial. Por ejemplo, los activadores de *COX3*, Pet54p, Pet122p y Pet494p se encuentran asociados a la membrana interna mitocondrial. Pet54p tiene

una asociación membranal débil ya que aproximadamente la mitad de esta proteína se detecta en la fracción soluble después de la extracción alcalina con carbonato de sodio alcalino (Constanzo y *col.*, 1989). Por otro lado, se ha visto que Pet111p, el activador traduccional de Cox2p se encuentra unido a la membrana interna mitocondrial como una proteína integral de membrana (Figura 5) (Green-Willms y *col.*, 2001). Recientemente se han reportado interacciones entre activadores traduccionales de diferentes RNA mensajeros (Krause y *col.*, 2004; Naithani y *col.*, 2003).

En conjunto, estos datos sugieren que la síntesis de las subunidades altamente hidrofóbicas de COX es llevada a cabo de manera localizada en la superficie de la membrana interna mitocondrial, en donde los activadores traduccionales interaccionan con su mRNA blanco y con el ribosoma mitocondrial. Estas proteínas activan la traducción facilitando así el ensamblaje de las subunidades del centro catalítico de COX (Figura 5) (Fox T. 1996a).

## **PET309p**

Esta proteína pertenece a la familia de los activadores traduccionales, es codificada por el gen nuclear *PET309*. Se requiere específicamente para la traducción y estabilización del mRNA de *COX1* (Manthey y McEwen, 1995). El gen de 2895 pb, codifica una proteína de 965 aminoácidos (~106 KDa). Usando los programas Blast, Swissprot y Genpept se predijo que la proteína es muy básica con un pI de 10.1 y que posiblemente presenta un cruce transmembranal (Figura 6), aunque en general es una proteína que se predice hidrofílica. Mutantes de *S. cerevisiae* en esta proteína no pueden procesar el pre-mRNA de *COX1* y tampoco pueden traducir el RNA maduro de *COX1* (Manthey y McEwen, 1995), por lo tanto son mutantes no respiratorias "pet".

```

1  MKRCAPAVLR NYNYKKGIWS TGVPDHIRKL LRDKSTSPIC SQDERNLVSY
51  FMARGSVPLK SVGSGLTKKA TTSITSNSAT TTFEROYLIK YLYRHQAYGN
101 VIKIAQKFLY TTIGSQRLK QDASLPELKK FLLSLLILQR GIQLDQAISD
151 IIQRFLLTQK TMVIDLINSI FSRMVIMNMH EEAVYKWVKW MKLVNGHCEF
201 TNYMENKIVL RNFLSFMROS NVRPDYLSYL KAIQLTOGPA IASQFATTL
251 FLLTYIRKFS SAEAVWNYKC EHNLPVSSD LTCILKTYCH MQKFNLVSSY
301 YWKYPDAQHD QNQFDYLLVA HSRLHNWDAL QQQFNALFGI GKLPSIQHYG
351 ILMYTMARIG ELDSVNKLYT QLLRGMIPT YAVLQSLLYA HYKVGDFAAC
401 FSHFELFKKY DITPSTATHT IMLKVYRGLN DLDGAFRILK RLSEDPSVEI
451 TEGHFALLIQ MCCKTTNHLI AQELFNLMT HYNIQHTGKS ISALMDVYIE
501 SNRPTEAIAL FEKHSKNLSW RDGLISVYNK AIKAYIGLRN ANKCEELFDK
551 ITTSKLAVNS EFKMMIKFL VTLNEDCETA LSIIDQLIKH SVIKVDATHF
601 EIIMEAYDKE GYRDIINLY KTMSQNKVPA NSKILYYILK AVAKKSLQNN
651 EEIKETINMV EDIMENAANG TLDVTYNKLH PSVMAWPMRM IVKHDSPOA
701 LELYNRYNEL FFKKHDWISN NNFVMMRSL LVLLAQIEQW KDFETLFAKY
751 MDRIENIENL PSSTTPNIKL RSIFSGLFPY KVSQLIAMNK IDELPLLWKK
801 LREKGFILDN ISWNSAVEAL FKDPRTLSYG MKIVDDTLIH GYNLIHKFRL
851 LTKLSEDKTQ SSDKSWPTLK MKEKEPNKFQ PRLYLKSDTY NSIMRQLDTY
901 LDGIDDLKTL EDQVRDFISN YKYFMKDYLL MPRSKINKWE QIEMRHLSYF
951 KELRKSKRVL PVSKFREQKL ELHRGGGRIF YPYDVPDYAG YPYDVPDYAGS
1001 YPYDVPDYAT SLEGGPGTQF AL*

```

**Figura 6.** Secuencia de aminoácidos de Pet309p. La punta de flecha indican el probable sitio de corte de la secuencia de importación a la mitocondria. La región de un posible cruce transmembranal se indica subrayada. Los siete dominios PPR se pintan en colores (rojo, amarillo, verde, azul, violeta, gris y café). El triple epítotope de hemaglutinina se esquematiza en letras azules. El asterisco indica el codón de termino. Secuencia tomada de la pagina del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* (<http://www.yeastgenome.org/>)

Datos genéticos indican que Pet309p interacciona específicamente con la región 5'-UTR de *COX1*. Manthey y McEwen (1995) encontraron que una mutante de *pet309* recuperaba su capacidad respiratoria cuando existía un rearrreglo en el gen *COX1*. La región codificante de *COX1* se fusionó con la región 5'-UTR de *COB*. En

estos supresores la traducción del mRNA de *COX1* no requería más de Pet309p sino de los activadores traduccionales de *COB*.

Pet309p es el único activador traduccional de levadura descrito que presenta dominios PPR (Pentatricopeptide Repeat) (Figura 6). Estos dominios fueron descubiertos recientemente en *Arabidopsis thaliana* y son muy abundantes en plantas (Small y Peeters, 2000). Los dominios PPR son unidades que consisten de 35 aminoácidos que usualmente aparecen en repeticiones de 2 a 26 en serie en una proteína. No se conoce la estructura cristalina de ninguna proteína PPR, pero se cree que consisten de dos  $\alpha$ -hélices antiparalelas que forman un surco o túnel, el cual es probablemente un sitio de unión a proteínas o a RNA. Se predice que las proteínas de esta familia se localizan principalmente en mitocondrias y cloroplastos. Las evidencias genéticas sugieren que los motivos PPR se unen a secuencias específicas en el RNA ayudando a la maduración y expresión del RNA en organelos (Shikanai, 2006).

Parece que Pet309p está evolutivamente conservada, ya que se ha reportado que el gen *CYA-5* en *Neurospora crassa* es similar a *PET309*. El producto del gen *CYA-5* es requerido para la expresión post-transcripcional de *COX1*, probablemente para una traducción eficiente del mRNA (Coffin y col., 1997; Manthey y col., 1998). En las bases de datos se encontraron probables homólogos en *Candida glabrata*, *Kluyveromyces lactis* y *Aspergillus fumigatus*. Otro posible homólogo funcional de *PET309* es el gen *LRPPRC* en humanos, el cual es necesario para la expresión de *COX1* y *COX3* (Xu y col. 2004). Se encontró que una mutación en este gen se asocia a la enfermedad neurodegenerativa conocida como síndrome de Leigh, ocasionada por la deficiencia de citocromo *c* oxidasa (Mootha y col., 2003). En estos dos posibles homólogos de Pet309p también se han encontrado dominios PPR.

Los activadores traduccionales se encuentran en bajas concentraciones en la célula (Fox, 1996b). La sobre-expresión de estos activadores traduccionales resulta en fenotipos inesperados. Por ejemplo, Fiori y col. (2005) reportaron que la sobre-expresión del activador traduccional Pet111p del mRNA de *COX2* interfiere fuertemente con la respiración y con la acumulación de la proteína Cox1p. Se propuso que Pet111p, en altas concentraciones, puede interferir con la traducción del

mRNA de *COX1* y también con el ensamblaje post-traducciona de la COX. De igual manera se ha observado que la sobre-expresión de *CBS2*, el activador traduccional específico del mRNA de *COB* tiene efectos negativos en el crecimiento respiratorio y en la acumulación de Cox1p. Este efecto fue atribuido a la agregación de la proteína sobre-expresada, lo que llevó a la disminución de su actividad (Tzschoppe y col., 2000).

Actualmente se desconoce si Pet309p se asocia a la membrana en la mitocondria. En 1998, Manthey y colaboradores reportaron que Pet309p era una proteína integral de membrana con dominios expuestos al espacio intermembranal. Este comportamiento se observó cuando Pet309p estaba en condiciones de sobre-expresión, no fue posible detectar a la proteína cuando se encontraba en copia única.

Por el contrario Krause y col. (2004) reportan que Pet309p es una proteína débilmente asociada a la membrana interna mitocondrial cuando está presente en copia única. Cabe mencionar que en este último trabajo la proteína Pet309p no era el objeto central de estudio sino que la encontraron formando parte de un complejo multiprotéico de aproximadamente 900 KDa. En este trabajo se propone un modelo de interacción entre diferentes activadores traduccionales en el que Pet309p es soluble.



# Justificación

Como se mencionó anteriormente, la biogénesis de la citocromo *c* oxidasa es compleja y muy poco entendida. Una de las subunidades clave en la biogénesis de COX es Cox1p. Cox1p es la subunidad más grande de la COX y es parte central en el ensamblaje y actividad de la enzima.

Recientemente se han identificado muchos factores específicos para la biogénesis de *COX1*, pero sus mecanismos de acción se desconocen. Creemos que la síntesis de Cox1p está altamente coordinada con su inserción en la membrana interna mitocondrial, ya que es una proteína muy hidrofóbica, sin embargo no se sabe cómo ocurre esta coordinación.

A nosotros nos interesa estudiar cómo participa Pet309p en la biogénesis de Cox1p. En particular nos interesa estudiar si Pet309p se asocia a la membrana interna mitocondrial. Lo anterior contribuirá a comprender los mecanismos de síntesis / inserción de Cox1p en la membrana interna mitocondrial.

# Hipótesis

Siendo Cox1p es una proteína integral de la membrana interna mitocondrial, Pet309p, su activador traduccional debe asociarse con esta membrana para optimizar la expresión de *COX1*.

## Objetivo general

- Estudiar la naturaleza de la asociación de Pet309p con la membrana interna mitocondrial en *S. cerevisiae*.

## Objetivos particulares

- Aislar mitocondrias a partir de cepas de levadura conteniendo una copia única del gen *PET309*. Se usarán cepas en las que Pet309p tiene un triple epítotope de hemaglutinina (3xHA) en su extremo carboxilo terminal.
- Determinar sí Pet309p-3xHA se asocia a la membrana interna mitocondrial.
- Separar de manera diferencial las proteínas periféricas e integrales de membrana para determinar qué tipo de proteína de membrana es Pet309p-3xHA en la mitocondria.
- Determinar la topología de Pet309p-3xHA, por su susceptibilidad a la digestión con proteinasa K.

# Materiales y Métodos

## Cepas

Las cepas de *S. cerevisiae* que se usaron son congénicas a la cepa D273-10B.

Cepa	Genotipo nuclear (mitocondrial)	Referencia
DAU1	<i>Mata<math>\alpha</math>, ade2, ura3<math>\Delta</math> (<math>\rho^+</math>)</i>	Costanzo y Fox, 1988
SB5	<i>Mata<math>\alpha</math>, ade2, ura3<math>\Delta</math>, PET309::3xHA (<math>\rho^+</math>)</i>	Sarah Broadley (Sin publicar)

Medios y amortiguadores (Ver apéndice).

## Obtención de la fracción mitocondrial cruda (Modificado de Glick y Pon, 1995)

1. Crecer una colonia de levadura en 2 ml de medio YPR toda la noche a 30°C.
2. Resembrar en 25 ml de medio YPR e incubar a 30°C hasta una  $A_{600}$  entre 1.2 y 1.4 (fase exponencial de crecimiento).
3. Del cultivo anterior resembrar en 1 l de medio YPR e incubar toda la noche a 30°C hasta una  $A_{600}$  entre 1.4 y 1.6 (fase exponencial de crecimiento).
4. Centrifugar a 4000 rpm por 10 min a 4°C en el rotor GS3.
5. Lavar el botón una vez con agua fría, juntar todo el botón en un tubo de centrifuga previamente pesado.
6. Centrifugar a 4000 rpm por 10 min a 4°C en rotor GS3. Eliminar el sobrenadante y pesar.
7. Resuspender el botón en amortiguador TD (2 ml/g de peso húmedo)
8. Agitar 10 min a 30°C.
9. Centrifugar 5 min a 3300 rpm en rotor GS3.
10. Lavar el botón con amortiguador MP2 (7 ml/g de peso húmedo).

11. Centrifugar 5 min a 3300 rpm en rotor GS3.
12. Resuspender el botón en amortiguador MP2 (7ml/g de peso), adicionar zimoliasa-20T (3mg/g de peso húmedo).
13. Agitar de 30 a 60 min a 30°C, hasta que los esferoplastos se formen (Revisar la formación de esferoplastos a los 30, 45 y 60 min). Para revisar la formación de esferoplastos:

Comparar 2 ml de agua contra 2 ml de sorbitol 1.2 M adicionando a cada una 50  $\mu$ l de células, agitar en vortex. Cuando se hallan formado los esferoplastos el tubo con agua se verá claro comparado con el tubo con sorbitol que se observará turbio esto debido a que con la diferencia de osmolaridad se romperán los esferoplastos.

**A partir de este punto todo se hace a 4°C**

14. Centrifugar a 2500 rpm por 5 min a 4°C en rotor GS3.
15. Resuspender en 1/4 del volumen requerido de amortiguador Dounce (13.4 ml/g).
16. Homogeneizar 10 veces en 40 mL de amortiguador usando un homogenizador y pistilo de vidrio.
17. Centrifugar 5 min a 3300 rpm en rotor GS3 a 4°C. Recuperar el sobrenadante.
18. Centrifugar 5 min a 3300 rpm en rotor GS3 a 4°C. Recuperar el sobrenadante.
19. Centrifugar 12 min a 12000 rpm en rotor SS-34 a 4°C (en el botón se encuentran las mitocondrias crudas).
20. Resuspender el botón en 10 ml de amortiguador SEH (Primero resuspender en 2 ml, con la punta de la micropipeta cortada).
21. Centrifugar 12 min a 12000 rpm en rotor SS-34 a 4°C.
22. Resuspender el botón en 300  $\mu$ l de amortiguador SEH (con la punta de la micropipeta cortada).
23. Cuantificar espectrofotométricamente la proteína de la siguiente manera: llevar 10  $\mu$ l de mitocondrias crudas a 1000  $\mu$ l con SDS al 0.6%, agitar en vortex. Calcular la cantidad de proteína considerando que  $Abs_{280} = 0.21$  corresponde a 10mg/ml.

## **Obtención de las mitocondrias purificadas en gradiente de Nicodenz**

24. Preparar 5 ml de cada una de las siguientes soluciones de Nicodenz en amortiguador SEH 2x.

25% = 2.5 ml de Nicodenz 50% (w/v) + 2.5 ml de SEH 2x.

20% = 2 ml de Nicodenz 50% (w/v) + 2.5 ml de SEH 2x + 0.5 ml de agua.

15% = 1.5 ml de Nicodenz 50% (w/v) + 2.5 ml de SEH 2x + 1 ml de agua.

10% = 1 ml de Nicodenz 50% (w/v) + 2.5 ml de SEH 2x + 1.5 ml de agua.

5% = 0.5 ml de Nicodenz 50% (w/v) + 2.5 ml de SEH 2x + 2 ml de agua.

25. Preparar dos gradientes por cultivo (1l de medio de cultivo), depositando 2 ml de cada solución de Nicodenz en el siguiente orden: 25, 20, 15, 10 y 5%. (Usar punta para micropipeta cortada en el extremo).

26. Depositar 0.5 ml del extracto crudo de mitocondrias en cada gradiente. (Usar punta cortada).

27. Centrifugar a 39000 rpm por 39 min en un rotor SW40Ti (Beckman). Al finalizar la centrifugación se observarán cuatro bandas (Ver esquema de la figura 9).

28. Remover las bandas de mitocondrias y mitoplastos con una aguja y jeringa y colocarlas en tubos diferentes.

29. Diluir las mitocondrias y los mitoplastos con 25 ml de amortiguador SEH.

30. Centrifugar 10 min a 12000 rpm en rotor SS-34.

31. Para eliminar completamente el Nicodenz resuspender el botón en 20 ml de SEH

32. Centrifugar 12 min a 12000 rpm en rotor SS-34 a 4°C.

33. Resuspender el botón en 250  $\mu$ l de amortiguador SEH, con la punta para micropipeta cortada en el extremo.

34. Cuantificar proteínas mitocondriales: llevar 10  $\mu$ l de mitocondrias puras a 1000  $\mu$ l con SDS al 0.6%, agitar en vortex. Calcular la cantidad de proteína considerando que Abs. 0.12 corresponde a 10 mg/ml de proteína a 280nm. Congelar en nitrógeno líquido y guardar a -70°C en alícuotas de 25  $\mu$ l.

## **Cuantificación de proteínas por Lowry modificado** (Markwell, 1978)

### Curva de calibración

Usar una solución de albúmina de 1 mg/ml.

Preparar soluciones de albúmina con 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100  $\mu$ l de la solución de albúmina. Llevar a 1 ml con agua como indica el paso 1.

1. Ajustar la muestra con agua a 1 ml.
2. Adicionar 3 ml de solución C y mezclar en vortex. Incubar 10 min a TA.
3. Adicionar 300  $\mu$ l de solución D y mezclar en vortex e incubar 30 min a TA.
4. Medir absorbancia a 540 nm.

### **Solución A**

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2%
NaOH	0.4%
Na <sub>2</sub> tartrato	0.16%
SDS	1%

### **Solución B**

Cu <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	4%
--	----

### **Solución C**

Mezclar 100 volúmenes de solución A con 1 volumen de solución B (preparar al momento)

## **Solución D**

Mezclar 1 volumen de reactivo de Folin con 1 volumen de agua (preparar al momento)

## **Consumo de oxígeno** (Estabrook, 1967; Uribe y *col.*, 1985)

### **Actividad de la cadena respiratoria**

1. Descongelar la cantidad necesaria de mitocondrias para tener 1.5 mg/ml por ensayo.
2. Poner en la cámara de respiración 1.5 ml del amortiguador para respiración que contiene etanol como donador de electrones para la cadena respiratoria (ver Apéndice). Se usó un oxímetro YSI 5300 equipado con un electrodo Clark, el cual está acoplado a un sistema computarizado para recabar los datos del consumo de oxígeno.
3. Adicionar las mitocondrias a la cámara y monitorear el consumo de oxígeno a 30°C durante 4 min.

### **Actividad de la COX**

1. Descongelar la cantidad necesaria de mitocondrias para tener 1.5 mg/ml por ensayo.
2. Poner en la cámara de respiración 1.5 ml de amortiguador para respiración conteniendo 5 mM de ascorbato de sodio, 50  $\mu$ M de Tetrametil-p-fenilendiamina (TMPD) y 1 $\mu$ g de antimicina A (ver Apéndice).
3. Adicionar las mitocondrias a la cámara y monitorear el consumo de oxígeno a 30°C durante 4 min.

**Fraccionamiento mitocondrial.** Separación de la fracción membranal y la fracción soluble mitocondrial (Modificado de Glick, 1995).

Descongelar mitocondrias en un vaso con agua hirviendo sumergiendo 3 segundos e inmediatamente colocar en hielo. Mantener las mitocondrias en hielo hasta su uso.

Protocolo 1. Congelando en N<sub>2</sub> líquido:

1. Centrifugar 100 µg de mitocondrias 5 min a 12000 rpm a 4°C
2. Resuspender el botón en 400 µl de amortiguador CH, pH 7.4.
3. Incubar en hielo 10 min.
4. Congelar en N<sub>2</sub> líquido.
5. Sonicar en un baño con hielo/agua hasta descongelar usando un sonicador Branson 200 Ultrasonic Cleaner por 5 min. O descongelar en un sonicador Branson Sonifier 450 con seis pulsos, "output" 5 y "duty cycle" al 40%. Repetir 3 veces el ciclo congelar/descongelar sonicando.
6. Centrifugar 30 min a 65000 rpm en un rotor TLA-100.3 (Beckman).
1. Separar el sobrenadante y resuspender el botón en 400 µl de amortiguador CH.
8. Precipitar las proteínas resuspendiendo adicionando 45 µl de ácido tricloroacético al 100% (TCA) (BioChemika).
9. Incubar en hielo 30 min.
10. Centrifugar 10 min a 12000 rpm a 4°C
11. Lavar una vez con 1 ml de acetona a -20°C y secar al aire por 1 minuto.
12. Resuspender en 100 µl de amortiguador de carga 1X y calentar a 65°C por 10 min.
13. Separar las proteínas en SDS-PAGE y analizar por replica Western.



Protocolo 2. Sin congelar en N<sub>2</sub>:

1. Centrifugar 100 µg de mitocondrias 5 min a 12000 rpm a 4°C.
2. Resuspender el botón en 400 µl de amortiguador CH, pH 7.4.
3. Incubar en hielo 10 min.
4. Sonicar en un baño con hielo/agua usando un sonicador Branson 200 Ultrasonic Cleaner por 5 min, repetir tres veces, hasta que sean 15 min. O en un sonicador Branson Sonifier 450 con seis pulsos, "output" 5 y "duty cycle" al 40%. Repetir 3 veces.
5. Centrifugar 30 min a 65000 rpm en un rotor TLA-100.3 (Beckman).
6. Separar el sobrenadante y resuspender el botón en 400 µl de amortiguador CH.
7. Precipitar las proteínas del sobrenadante y el botón adicionando 45µl de ácido tricloroacético al 100% (TCA) (BioChemika).
8. Incubar en hielo 30 min.
9. Centrifugar 10 min a 12000 rpm a 4°C
10. Lavar una vez con 1ml de acetona a -20°C
11. Resuspender en 100 µl de amortiguador de carga 1X y calentar a 65°C 10 por min.
12. Separar en un gel de poliacrilamida-SDS y analizar por replica en Western.

## **Extracción alcalina de proteínas de membranas mitocondriales**

(Modificado de Fujiki y col., 1982).

Descongelar mitocondrias con agua hirviendo sumergiendo 3 segundos e inmediatamente colocar en hielo. Mantener la mitocondrias en hielo hasta su uso.

### Protocolo 1.

1. Centrifugar 100  $\mu$ g de mitocondrias 5 min a 12000 rpm a 4°C.
2. Resuspender en 200  $\mu$ l de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100 mM, pH 11.5.
3. Agitar en vortex 3 seg.
4. Incubar 60 min en hielo.
5. Centrifugar 30 min a 65000 rpm en un rotor TLA-100.3 (Beckman).
6. Separar el sobrenadante y resuspender el botón en 400  $\mu$ l de amortiguador CH.
7. Precipitar las proteínas adicionando 50  $\mu$ l de ácido tricloroacético al 100 % (TCA) (BioChemika) a las dos fracciones obtenidas en el paso anterior.
8. Incubar en hielo 30 min
9. Centrifugar 10 min a 12000 rpm a 4°C
10. Lavar una vez con 1 ml de acetona a -20°C
11. Resuspender en 50  $\mu$ l de amortiguador de carga 1X y calentar a 65°C durante 10 min.
12. Separar en gel de poliacrilamida-SDS y analizar por replica en Western.

### Protocolo 2.

1. Centrifugar 100  $\mu$ g de mitocondrias 5 min a 12000 rpm a 4°C.
2. Resuspender en 100  $\mu$ l de HEPES 20 mM. Incubar en hielo por 20 min.
3. Adicionar 100  $\mu$ l de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 200 mM pH 11.5. Incubar en hielo 10 min.
4. Agitar en vortex 3 segundos
5. Incubar 30 min en hielo.

6. Centrifugar 30 min a 65000 rpm en un rotor TLA-100.3 (Beckman).
7. Separar el sobrenadante y resuspender el botón en 400  $\mu$ l de amortiguador CH.
8. Precipitar las proteínas adicionando 50  $\mu$ l de ácido tricloroacético al 100 % (TCA) (BioChemika) a las dos fracciones obtenidas en el paso anterior.
9. Incubar en hielo 30 min.
10. Centrifugar 10 min a 12000 rpm a 4°C.
11. Lavar el botón una vez con 1 ml de acetona a -20°C.
12. Resuspender en 50  $\mu$ l de amortiguador de carga 1X y calentar a 65°C por 10 min.
13. Separar en gel de poliacrilamida-SDS y analizar por replica en Western.

### **Protección a la digestión con proteinasa K en mitocondrias**

(Modificado de Fujiki y col., 1982).

Descongelar mitocondrias en un vaso con agua hirviendo sumergiendo 3 segundos e inmediatamente colocar en hielo.

1. Adicionar la cantidad necesaria de amortiguador Sorbitol-HEPES para tener 800  $\mu$ l de mitocondrias con una concentración de 400  $\mu$ g/ml.
2. Repartir la suspensión anterior en 4 tubos, adicionando 195  $\mu$ l de la solución a cada tubo.
3. Centrifugar a 11,400 rpm 4 min a 4°C.
4. Desechar sobrenadante.
5. Adicionar 20  $\mu$ l de Sorbitol-HEPES.

Se incluyeron muestras con los respectivos tratamientos:

Mitocondrias	Mitocondrias Proteinasa K	Mitoplastos	Mitoplastos Proteinasa K
180 $\mu$ l Sorbitol- HEPES	180 $\mu$ l Sorbitol- HEPES /PK	180 $\mu$ l Hepes	180 $\mu$ l Hepes/PK

6. Resuspender con la punta para micropipeta cortada en un extremo subiendo y bajando 2 veces el contenido.
7. Incubar en hielo 30 min.
8. Agregar 2  $\mu$ l de PMSF, invertir el tubo una vez.
9. Centrifugar a 11400 rpm 4 min a 4<sup>0</sup>C.
10. Guardar los sobrenadantes\*.
11. Resuspender el botón en 500  $\mu$ l de Sorbitol-HEPES con PMSF 2 mM subiendo y bajando con la punta para micropipeta cortada en un extremo dos veces.
12. Centrifugar a 11400rpm 4 min a 4<sup>0</sup>C.
13. Resuspender pastilla en 20  $\mu$ l de amortiguador de carga con PMSF 2 mM.
14. Calentar a 65<sup>0</sup>C por 5 min.
15. Cargar en un gel de poliacrilamida-SDS al 12%.

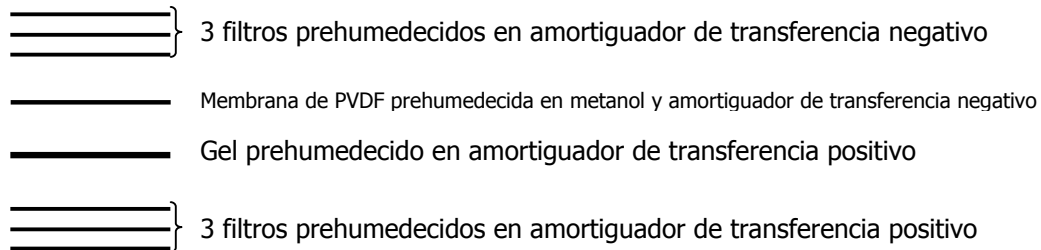
Por otro lado, tratamiento de los sobrenadantes del paso 10:

16. Adicionar TCA al 100% a una concentración final del 11%.
17. Incubar 30 min en hielo.
18. Centrifugar a 12000 rpm en frío.
19. Lavar dos veces con acetona 100% a -20<sup>0</sup>C.
20. Resuspender en 20  $\mu$ l de amortiguador de carga con PMSF 2mM.
21. Calentar a 65<sup>0</sup>C 5 min, agitar en vortex y centrifugar a 14000 rpm por 1 min.
22. Cargar en un gel de poliacrilamida-SDS.



## Replica en Western Blot

1. Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore) mediante un método semi-seco, de la siguiente manera:



Transferir de 1 a 2 horas a  $1.5 \text{ mA/cm}^2$ , cuidando que no pase de 10V.

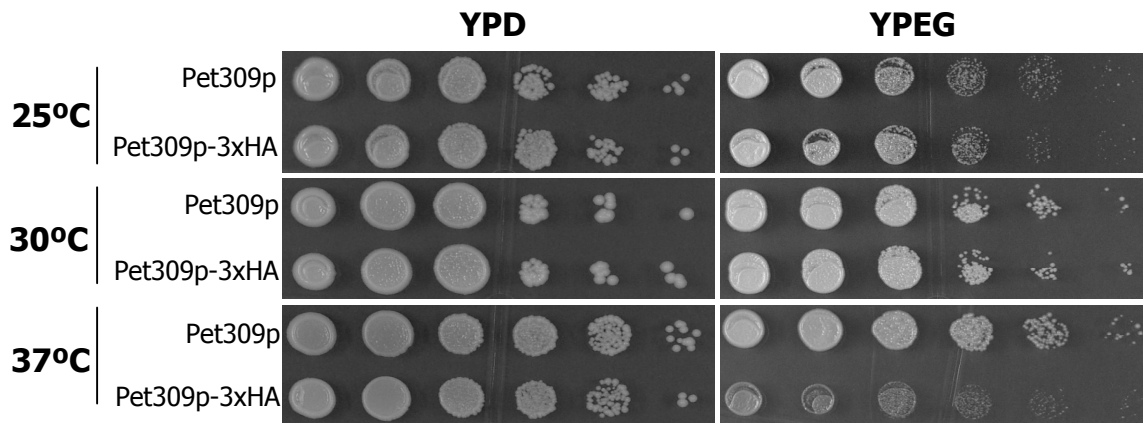
2. La membrana con las proteínas se bloquea toda la noche a  $4^\circ\text{C}$  o 2 hr a temperatura ambiente con solución de bloqueo.
3. Incubar la membrana con solución de replica, la cual contiene el anticuerpo anti-HA (Roche) acoplado a peroxidasa de rábano, durante 1 h a temperatura ambiente.
4. Lavar la membrana con solución de lavado por 10 min, repetir el lavado 2 veces más.
5. Revelar la presencia del anticuerpo unido a la proteína Pet309p-3xHA siguiendo las indicaciones del kit ECL plus (Amersham).
6. Tomar autoradiografía con la película BioMAX XAR Film (Kodak) exponiendo durante 10 minutos.
7. Eliminar el anticuerpo unido a las proteínas de la membrana incubando con la solución de eliminación de anticuerpo por 30 min a  $50^\circ\text{C}$ .
8. Bloquear nuevamente con durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a  $4^\circ\text{C}$ .
9. Incubar la membrana con solución bloqueadora, la cual contenga el anticuerpo contra Arg8p, CS, Cox2p o Cytb<sub>2</sub>, durante 1 h a temperatura ambiente.

10. Lavar la membrana con solución de lavado por 10 minutos, repetir el lavado 2 veces más.
11. Incubar la membrana con solución de replica, la cual contiene el anticuerpo secundario anti-ratón (BioRad) o anti-Conejo (Sigma) acoplados a peroxidasa de rábano, durante 1 h a temperatura ambiente.
12. Lavar la membrana con solución de lavado por 10 minutos, repetir el lavado 2 veces más.
13. Revelar la presencia del anticuerpo siguiendo las indicaciones del kit ECL (Amersham).
14. Tomar autoradiografía con la película BioMAX XAR Film (Kodak). Exponiendo durante 5 a 30 seg dependiendo del anticuerpo.  
Repetir con los anticuerpos necesarios.

# Resultados

## Efecto del epítotope 3xHA fusionado al carboxilo terminal de Pet309p sobre la respiración.

Debido a que no contamos con anticuerpos contra Pet309p usamos una construcción donde se fusionó un triple epítotope de hemaglutinina (3xHA) en el extremo carboxilo de Pet309p (Pet309p-3xHA). En el laboratorio contamos con una cepa (SB5) en la que Pet309p-3xHA se encuentra integrada al cromosoma en el locus original en copia única, bajo el control de su propio promotor. Se observó el crecimiento de ambas cepas en una fuente de carbono fermentable (YPD) y en una fuente de carbono no fermentable de etanol-glicerol (YPEG) a 25, 30 y 37°C. (Figura 6).



**Figura 7.** Efecto de la adición del epítotope de hemaglutinina al carboxilo terminal de Pet309p en el crecimiento de las cepas con Pet309p (DAU1) y Pet309p-3xHA (SB5) a diferentes temperaturas incubadas por 48 horas en YPD (fermentable) y 72 horas en YPEG (no fermentable). Se presentan diluciones seriales (1:10) incubadas a las temperaturas indicadas.

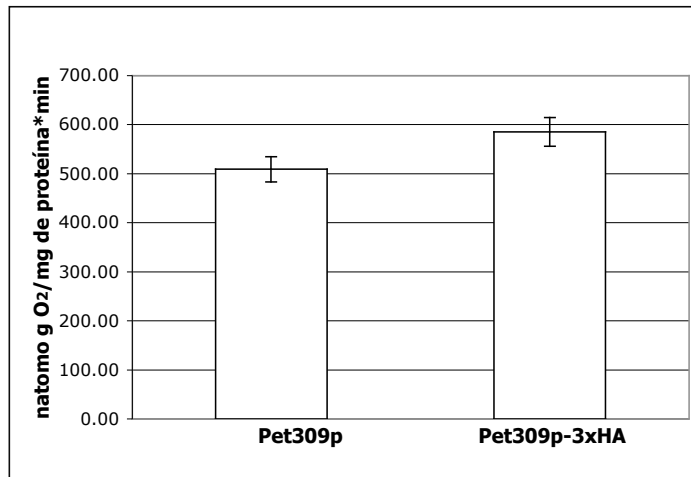


Como se observa en la figura 7, la cepa con el epítoto creció de manera semejante a la cepa silvestre cuando se incubaba a 25 y 30° C, tanto en medio con glucosa (YPD), como con etanol-glicerol (YPEG). En este trabajo las cepas se incubaron a 30 °C para la obtención de mitocondrias. En estas condiciones la presencia del epítoto 3xHA no afectó el crecimiento respiratorio de las levaduras. Cabe mencionar que el crecimiento en YPEG de la cepa con el epítoto se ve afectado a 37 °C, sin embargo desconocemos la razón del fenotipo observado a esta temperatura.

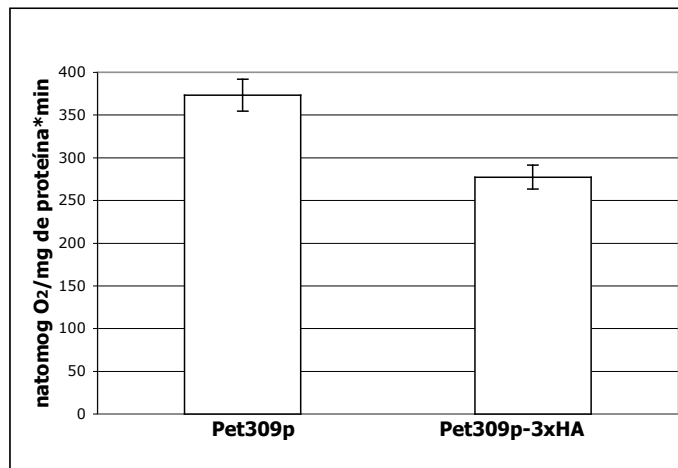
Para corroborar que la presencia del 3xHA en Pet309p no afectaba su actividad, se determinó la velocidad de consumo de oxígeno en mitocondrias. Se midió la velocidad de toda la cadena al utilizar como sustrato etanol (Figura 8a). De igual manera se midió la actividad de la COX en presencia de Tetrametil-p-fenilendiamina (TMPD)/ascorbato como donadores de electrones de la COX (Figura 8b).

Se observó que la presencia del triple epítoto en Pet309p no disminuye la velocidad de consumo de oxígeno de la cadena respiratoria (Figura 8a), por el contrario se observa un incremento la respiración en la cepa que contiene a Pet309p-3xHA. Por otro lado se observa una ligera reducción en la actividad de la citocromo c oxidasa (Figura 8b) en mitocondrias con Pet309p-3xHA.

Estos resultados indican que la síntesis y/o ensamblaje de Cox1p no se alteran significativamente a 30 °C por la presencia del epítoto en el extremo carboxilo de Pet309p. Estos resultados concuerdan el fenotipo de crecimiento observado a 30 °C en la figura 7.



a)



b)

**Figura 8.** Efecto del epítipo fusionado al carboxilo terminal de Pet309p sobre la respiración **a)** Consumo de oxígeno de la cadena respiratoria usando etanol como donador de electrones. **b)** Actividad de la citocromo c oxidasa usando ascorbato/TMPD como donador de electrones a la COX. El ensayo se realizó en presencia de 1 $\mu$ g antimicina A como inhibidor del complejo III. Los valores representan el promedio de tres determinaciones experimentales independientes.

## **Curvas de crecimiento**

Los medios de cultivo con galactosa (YPG) y rafinosa (YPR), al igual que el medio con glucosa (YPD) son medios fermentables, sin embargo, la glucosa del medio YPD inhibe la expresión de genes mitocondriales (Baldacci, 1982). Por el contrario, los medios YPG y YPR no presentan esta inhibición, lo que los hace adecuados para estudiar el comportamiento de genes mitocondriales.

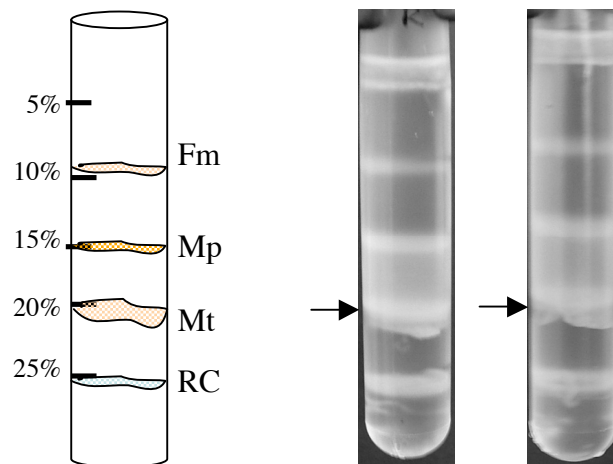
Para purificar mitocondrias, las células se deben cosechar en fase exponencial de crecimiento (Glick y Pon, 1995). Se realizaron curvas de crecimiento para determinar el tiempo en que las diferentes cepas alcanzan la fase exponencial de crecimiento en los medios YPG y YPR a 30°C (no se muestran las curvas). Para ello se determinó la absorbancia a 600 nm de los cultivos a diferentes tiempos. Se decidió cosechar las células entre las 14 y 15 horas de crecimiento, llegando a una absorbancia de 1.4 a 600 nm.

Se observa que las cepas DAU1 (Pet309p) y SB5 (Pet309p-3xHA) crecen más lentamente en medio con rafinosa que en medio con galactosa como fuente de carbono. Sin embargo, no fue posible detectar a la proteína Pet309p-3XHA en mitocondrias de cultivos en presencia de galactosa (resultados no mostrados). Por lo tanto, todos los ensayos se realizaron con mitocondrias de levaduras crecidas en medio con rafinosa.

## **Purificación de mitocondrias**

La purificación de mitocondrias se realizó según el protocolo descrito en materiales y métodos. Las mitocondrias crudas se purificaron por ultracentrifugación en un gradiente diferencial de Nicodenz. En el esquema de la figura 9 se muestra la posición de las diferentes fracciones celulares en el gradiente. Las fotografías muestran diferentes gradientes de purificación de mitocondrias obtenidas de células cultivadas en medio con rafinosa.

De acuerdo a la literatura (Glick y Pon, 1995), las mitocondrias migran en la región de 20% de Nicodenz, mientras que los mitoplastos (mitocondrias sin membrana externa) migran en 15% de Nicodenz. Se obtuvo aproximadamente 60% de mitocondrias y 40% de mitoplastos.



**Figura 9.** Gradientes diferenciales de Nicodenz para purificación de mitocondrias de la cepa SB5 que tiene a Pet309p-3xHA. En la izquierda se muestra un esquema de las diferentes fracciones. En la derecha se muestran fotografías de dos gradientes de purificación realizados en días diferentes. Las flechas indican la posición de las mitocondrias en cada caso. Fm = fragmentos mitocondriales, Mp = mitoplastos, Mt = mitocondrias y Rc = restos celulares

## Detección de Pet309p-3xHA

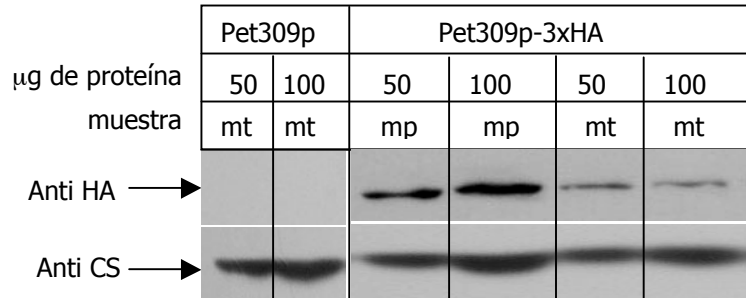
La detección de los activadores traduccionales ha sido muy difícil debido a que éstos se encuentran en concentraciones muy bajas, entre 2 y 60 moléculas por célula, dependiendo de las condiciones de crecimiento (Fox, 1996-b). En el trabajo de Manthey (1998) no fue posible detectar a la proteína Pet309p fusionada al epítipo Myc (Pet309p-Myc) cuando ésta se expresó en un vector centromérico de bajo número de copias. Sólo fue posible detectar a Pet309p-Myc cuando se empleó un vector de sobre-expresión (Manthey y col., 1998).

Como se mencionó con anterioridad, debido a que no contamos con anticuerpos contra Pet309p usamos una construcción donde se fusionó un triple epítoto de hemaglutinina (3xHA) en el extremo carboxilo terminal de Pet309p (Pet309p-3xHA). Para la detección de Pet309p-3xHA usamos un anticuerpo anti-HA de alta afinidad acoplado a peroxidasa de rábano (Roche).

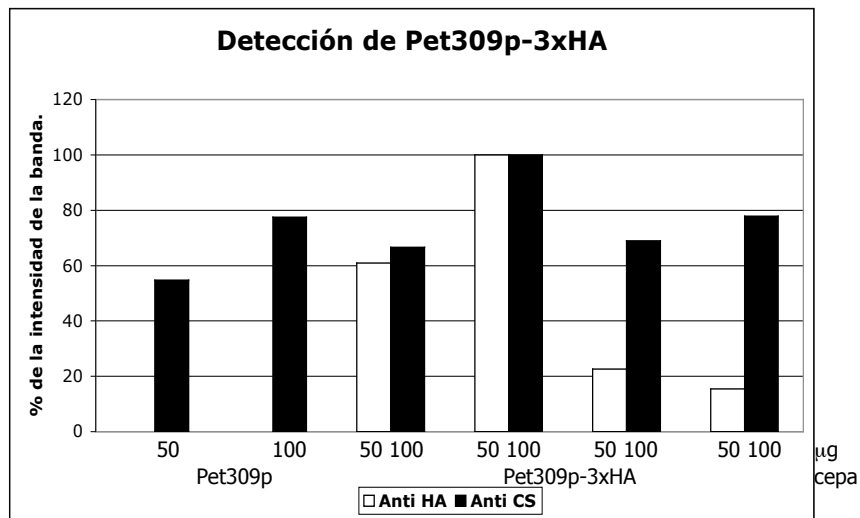
Para determinar la presencia de la proteína Pet309p en mitocondrias y mitoplastos obtenidos del gradiente de Nicodenz, éstas se resolvieron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante. La cepa SB5 tiene la proteína Pet309p-3xHA, lo que permitió la detección de Pet309p en mitocondrias y mitoplastos. La cepa DAU1 tiene a Pet309p sin el epítoto 3xHA, por lo que se utilizó como control negativo, (Figura 10a). La proteína Pet309p-3xHA se detectó con una masa molecular de aproximadamente 113 kDa, que es la esperada.

La intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría (Figura 10b). Se observó que respecto al control de carga (Anti citrato sintasa) la señal de Pet309p-3xHA es de 3 a 5 veces menor en la fracción de mitocondrias que en la fracción que de acuerdo a Glick y Pon (1995) corresponde a mitoplastos. Esto puede deberse a un efecto de dilución en las mitocondrias, ya que en todos los casos se cargaron 50 y 100  $\mu$ g de proteínas mitocondriales. Los mitoplastos no contienen la membrana externa y por lo tanto han perdido proteínas presentes en esta membrana así como las proteínas solubles del espacio intermembranal. En cambio, las mitocondrias conservan las proteínas de la membrana externa así como las del espacio intermembranal.

El hecho de que haya sido posible detectar a Pet309p-3xHA sin haber sido sobre-expresada es de gran importancia, ya que es la primera vez que se estudia a Pet309p expresada en copia única utilizando el anticuerpo anti-HA.



a)

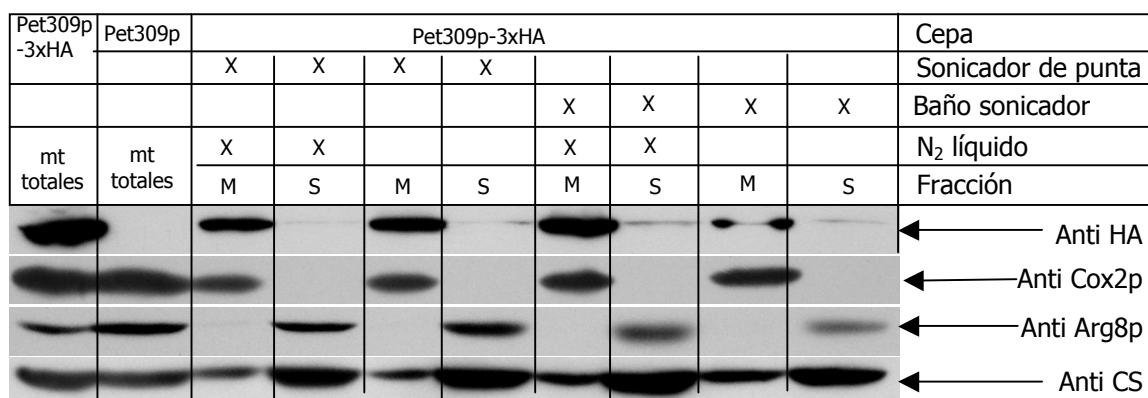


b)

**Figura 10.** Identificación por western de Pet309p-3xHA. **a)** Inmunodetección de Pet309p-3xHA en mitocondrias (mt) y mitoplastos (mp), usando el anticuerpo anti-HA. Los dos primeros carriles son la cepa DAU1 la cual carece del triple epítipo. Se usó un anticuerpo contra citrato sintasa (CS) (proteína de matriz mitocondrial) como control de carga. **b)** Histograma que muestra la intensidad de la bandas en el western blot como porcentajes cuantificadas usando el programa Image J. La banda correspondiente a los mitoplastos en donde se cargaron 100 μg de proteína fue tomada como el 100%.

## Localización de Pet309p-3xHA en las fracciones mitocondriales.

Una vez que se comprobó que Pet309p-3xHA se podía detectar en mitocondrias purificadas, se procedió a localizarla en las diferentes subfracciones mitocondriales (fracción membranal o fracción soluble). Para obtener las fracciones membranal y soluble se probaron cuatro condiciones diferentes: Las mitocondrias se congelaron en N<sub>2</sub> líquido y posteriormente se descongelaron sonicando en 1) un baño sonicador o 2) en un sonicador de punta. Por otro lado, 3) las mitocondrias se sonicaron directamente en un baño sonicador o 4) en un sonicador de punta, omitiendo la congelación con N<sub>2</sub> líquido. Las fracciones membranal y soluble obtenidas se separaron por ultracentrifugación. Las proteínas de estas fracciones se separaron por SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de PVDF y se probaron con diferentes anticuerpos: anti-HA, anti-Cox2p (una proteína de membrana interna) y anti-Citrato sintasa (CS) y anti-Arg8p (proteínas solubles de matriz mitocondrial) (Figura 11).



**Figura 11.** Localización de Pet309-3xHA en las diferentes fracciones mitocondriales. Se emplearon 100 µg de proteína en cada tratamiento. M= fracción membranal y S=Fracción soluble. Los dos primeros carriles son mitocondrias sin tratar, que corresponden a los controles positivo y negativo respectivamente.

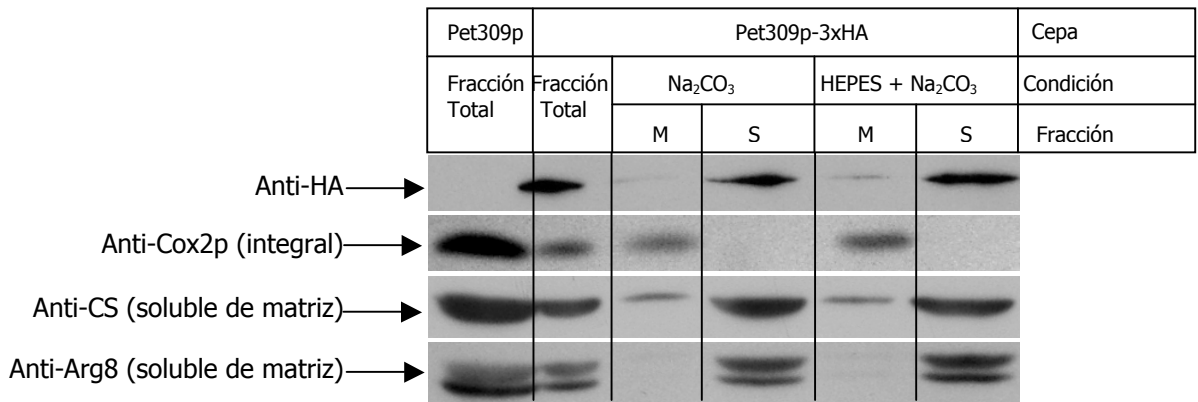
Al comparar el comportamiento de la proteína Pet309p-3xHA con los controles se observó que esta proteína se comportó como Cox2p, es decir, como proteína unida a la membrana interna mitocondrial, en las cuatro condiciones ensayadas. Este ensayo se repitió 4 veces y en promedio se observó que en las cuatro condiciones de separación de las fracciones mitocondriales se obtuvo una buena separación. Sin embargo la condición en la que la separación fue menos eficiente fue la condición 2), de sonicación de las mitocondrias por un sonicador de punta y sin congelar con N<sub>2</sub>.

### **Extracción alcalina de proteínas mitocondriales.**

Para determinar si Pet309p-3xHA era una proteína periférica o integral de membrana, las mitocondrias purificadas se trataron con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> para extraer proteínas periféricas de membrana. En este experimento se probaron dos tratamientos diferentes: 1) Las mitocondrias se incubaron directamente con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100 mM por una h o 2) Las mitocondrias se incubaron 20 min con HEPES 20mM, posteriormente se adicionó Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 100 mM y se incubaron por 40 min más. Posteriormente las fracciones se separaron por ultracentrifugación a 65000 rpm por 30 min. En el botón se encuentran las membranas mitocondriales y con ellas las proteínas integrales de membrana, mientras que en la fracción soluble se encuentran las proteínas solubles y periféricas de membrana (Figura 12).

Como se observa en la figura 12, en las dos condiciones ensayadas, el tratamiento con carbonato de sodio solubiliza a Pet309p-3xHA, lo que indica que se comporta como una proteína periférica de membrana.





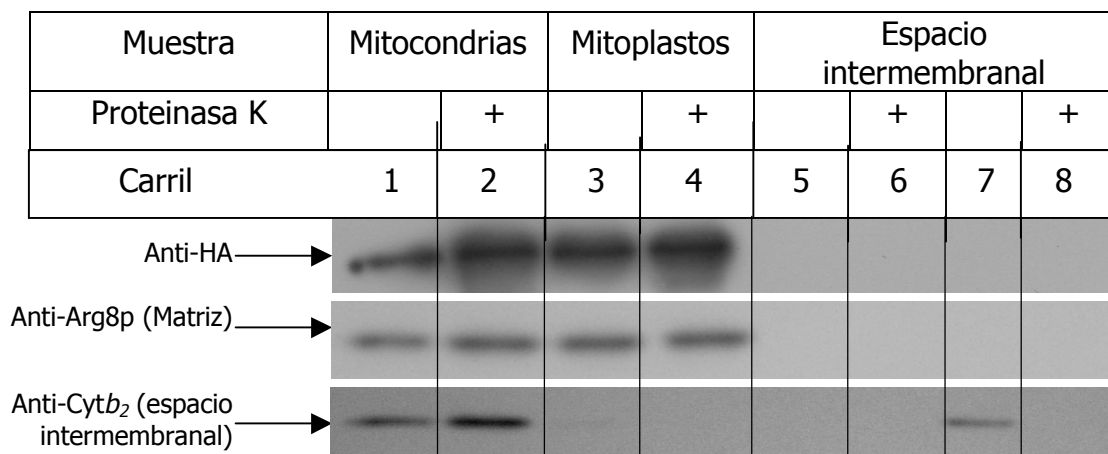
**Figura 12.** Extracción de mitocondrias con una solución de carbonato de sodio. El ensayo se realizó con 100  $\mu$ g de proteína mitocondrial las cuales se separaron por SDS-PAGE. Pet309p-3xHA se detectó con el anticuerpo anti-HA. Como controles se usaron Cox2p, una proteína integral de membrana, así como Citrato sintasa (CS) y Arg8p, dos proteínas solubles. Los dos primeros carriles son mitocondrias sin tratamiento que corresponden a los controles negativo y positivo respectivamente.

## Topología de Pet309p-3xHA.

Para determinar la ubicación de Pet309p-3xHA en la mitocondria se realizó un ensayo de protección a la digestión con proteinasa K. En este ensayo las mitocondrias se someten a choque osmótico para generar mitoplastos (mitocondrias sin membrana externa). Las proteínas o las regiones de proteína localizadas del lado de la matriz mitocondrial se protegen a la digestión con proteinasa K, mientras que las proteínas o las regiones de proteína localizadas en el espacio intermembranal son degradadas.

En este ensayo, las mitocondrias se centrifugaron y se resuspendieron en un amortiguador con sorbitol/HEPES, lo que deja intactas a las mitocondrias, o se resuspendieron únicamente en HEPES, que por choque osmótico genera mitoplastos. Las mitocondrias y mitoplastos se incubaron con o sin proteinasa K (100  $\mu$ g/ml) en hielo por 30 min. Posteriormente las muestras se centrifugaron, en el botón están las mitocondrias o los mitoplastos (Figura 13, carriles 1 a 4), mientras en los carriles 5 y 6 se muestran el sobrenadante de las mitocondrias y en los carriles 7 y 8 se muestra

el sobrenadante de los mitoplastos (espacio intermembranal). Las proteínas de los últimos 4 carriles se precipitaron adicionando TCA. Todas las fracciones se separaron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante y se analizaron por replica en western.



**Figura 13.** Protección de Pet309p-3xHA a la digestión por proteinasa K en mitocondrias y mitoplastos. El ensayo se realizó con 100  $\mu$ g de proteínas mitocondriales por muestra, las cuales se separaron por SDS-PAGE. Pet309p-3xHA se detectó con el anticuerpo anti-HA. Como controles se usaron Arg8p, una proteína de la matriz mitocondrial y el citocromo  $b_2$  (Cytb<sub>2</sub>), una proteína de el espacio intermembranal.

Este ensayo se repitió 4 veces, usando como controles anticuerpos anti-Arg8p, una proteína de matriz mitocondrial y anti-Cytb<sub>2</sub>, una proteína de espacio intermembranal. Se observó que Pet309p-3xHA se comporta como Arg8p, ya que es resistente a la digestión con proteinasa K en mitoplastos, por lo tanto Pet309p es una proteína expuesta hacia la matriz mitocondrial (Figura 13). Después del tratamiento con la proteinasa K, las fracciones se centrifugaron y se colectó el sobrenadante (carriles 5 a 8). El citocromo  $b_2$  que se pierde en los mitoplastos (tercer carril) se observa en la fracción del espacio intermembranal (carril 7). Mientras que la

presencia de la proteinasa K en este sobrenadante degradó al citocromo  $b_2$  (carril 8), lo que demostró que la proteinasa K funcionó correctamente. Por otro, lado en los sobrenadantes de las mitocondrias (carriles 5 y 6) no se detectó el citocromo  $b_2$ , lo que indica que la membrana externa estaba intacta.

# Discusión

## Detección de Pet309p-3xHA

Para poder realizar nuestro estudio era fundamental demostrar que podíamos detectar a la proteína Pet309p-3xHA expresada en copia única cromosomal en nuestras preparaciones mitocondriales, ya que al igual que otros activadores traducionales, Pet309p se encuentra en niveles muy bajos en la célula.

La baja concentración de los activadores traducionales se ha determinado estudiando la expresión del gen nuclear *PET494* (activador traducional de Cox3p). Para ello se monitorearon los niveles de  $\beta$ -galactosidasa en células que contenían la construcción *pet494::lacZ* integrada en el locus original de *PET494* (Marykwas y Fox, 1989). En este estudio se determinó que el nivel de expresión de *PET494* era muy bajo, y varía entre 2 y 60 moléculas por célula, dependiendo de las condiciones de crecimiento. Sin embargo, probablemente el número es menor debido a que la  $\beta$ -galactosidasa es muy estable por lo que se acumula a diferencia de Pet494p (McMullin y Fox, 1993).

La activación traducional es un paso limitante en la expresión genética mitocondrial. La acumulación de las proteínas codificadas por el genoma mitocondrial podría ser modulada en respuesta a condiciones ambientales que alteran los niveles de enzimas de la cadena respiratoria. Esta modulación en la expresión genética mitocondrial fue demostrada por Green-Willms y colaboradores (2001). Ellos emplearon una construcción con el gen reportero *ARG8m*, el cual sustituía a la región codificante del gen mitocondrial *COX2*, pero portaba los extremos 5' y 3' UTR de *COX2* (*cox2::ARG8<sup>m</sup>*). Una cepa diploide heterocigota *pet111/PET111* portando la construcción anterior expresaba aproximadamente la mitad de Arg8p en comparación con los niveles de la cepa silvestre *PET111/PET111*. Por otro lado, una cepa con un plásmido de alto número de copias portando a *PET111* presentaba un aumento en Arg8p de aproximadamente 2.8 veces con respecto a la cepa con el plásmido vacío. Esta variación en la cantidad de Arg8p en respuesta a la dosis génica de Pet111p,

demuestra que la acumulación de las subunidades de origen mitocondrial es controlada por los activadores traduccionales (Green-Willms y col., 2001).

Un estudio similar al reportado por Green-Willms y col. (2001) se hizo usando la construcción *cox1::ARG8<sup>m</sup>*. Se encontró que Pet309p también tiene un papel limitante en la expresión del gen reportero *ARG8<sup>m</sup>* (Pérez-Martínez y Fox, datos no publicados).

Debido a la baja abundancia de los activadores traduccionales, en el trabajo de Manthey (1998) no fue posible estudiar a Pet309p-Myc cuando se expresaba en bajo número de copias. En este trabajo nos interesaba saber si Pet309p se podía detectar en copia única cromosomal en mitocondrias aisladas de una cepa que porta la proteína Pet309p-3xHA, usando anticuerpos contra el epítotope de hemaglutinina (HA). Esto es importante porque se ha visto que la sobre-expresión de los activadores lleva a fenotipos respiratorios defectuosos (Tzschoppe y col., 2000; Fiori y col., 2005). También se ha demostrado que la asociación de Pet122p y Pet494p con la membrana interna mitocondrial es más fuerte cuando se estudian en condiciones de sobre-expresión (McMullin y Fox, 1993)

En la figura 10 se observa que Pet309p-3xHA se pudo detectar en mitocondrias y mitoplastos (mitocondrias sin membrana externa) cuando ésta se expresa en copia única desde el locus original de la proteína y utilizando su propio promotor. Este resultado es importante ya que es la primera vez que se logra detectar este activador traduccional cuando se expresa en copia única, es decir, sin sobre-expresarla. Pet309p-3xHA se había estudiado cuando se expresaba en copia única cromosomal, pero con problemas de degradación, lo que dificultó su estudio (Krause y col., 2004).

### **Localización de Pet309p-3xHA en la mitocondria.**

Pet309p-3xHA se comporta como una proteína periférica de membrana interna, unida del lado de la matriz mitocondrial. Los ensayos de fraccionamiento mitocondrial demostraron que Pet309p-3xHA se encuentra en la fracción membranal. Al someter las mitocondrias a extracción alcalina con carbonato de sodio se demostró

que Pet309p-3xHA se une de manera periférica a la membrana. Finalmente, el ensayo de protección a proteinasa K en mitocondrias y mitoplastos demostró que Pet309p-3xHA se encuentra del lado de la matriz mitocondrial.

Estos resultados difieren de los reportados por Manthey y col. (1998) ya que ellos reportan que Pet309p-myc es una proteína integral de membrana y que es sensible a la digestión con proteinasa K en mitoplastos. Esta diferencia puede ser debida a que la sobre-expresión de los activadores traduccionales lleva a fenotipos pet (Fiori y col., 2005). Además se propone que la sobre-expresión produce agregados inactivos de los activadores traduccionales y se observan fuertemente asociados a la fracción membranal (McMullin y Fox, 1993).

Se sabe que muchos de estos activadores traduccionales se unen a la membrana interna mitocondrial. Por ejemplo, los activadores traduccionales Pet54p, Pet122p y Pet494p (*COX3*), se encuentran asociados a la membrana interna, como proteínas periféricas (Pet54p) o integrales (Pet122p y Pet494p) (McMullin y Fox, 1993). Pet111p (*COX2*) se encuentra unida a la membrana interna mitocondrial como una proteína integral de membrana (Green-Willms y col., 2001). También Cbs1p y Cbs2p (*COB*) se comportan como proteínas integral y periférica de membrana respectivamente (Rödel, 1986).

La importancia de la unión de los activadores traduccionales a la membrana interna para localizar la síntesis de proteínas mitocondriales hidrofóbicas es apoyada por un estudio en donde la región codificante del gen mitocondrial *VAR1* es sustituida por la región codificante de los genes *COX2* (*var1::COX2*) y *COX3* (*var1::COX3*). Var1p es una proteína mitocondrial soluble que forma parte de la subunidad pequeña ribosomal. Las proteínas Cox2p y Cox3p traducidas a partir de estos mRNA quiméricos fueron sintetizadas normalmente, sin embargo, debido a que fueron sintetizadas en la matriz mitocondrial, se degradaron rápidamente y no se detectó una COX activa (Sanchirico y col., 1998).

Se han reportado interacciones entre los activadores traduccionales. Por ejemplo, Pet309p (activador de *COX1*) interacciona con Pet45p, Pet122p y Pet494p (activadores de *COX3*); mientras que Pet111p (activador de *COX2*) interacciona con

Pet54p (Naithani *y col.*, 2003). Estas interacciones sugieren que los activadores traduccionales están organizados en la superficie de la membrana interna, de tal manera que promueven la síntesis localizada en la membrana interna mitocondrial de los mRNA de *COX1*, *COX2* y *COX3*, facilitando así el ensamble del centro catalítico de la citocromo *c* oxidasa. En el trabajo de Naithani *y col.* (2003), se ve que Pet309p interacciona con Nam1p, una proteína involucrada en el procesamiento y traducción de los mRNA mitocondriales. Nam1p interacciona con Rpo1p, la RNA polimerasa. Esto sugiere que no sólo la maquinaria de traducción se asocia a la membrana interna, sino también que la transcripción se realiza de manera localizada en la membrana interna.

Los activadores traduccionales podrían ayudar a que el inicio de la síntesis se localice cerca del sitio de inserción en la membrana. Nuestros datos apoyan esta idea, ya que si Pet309p se asocia a la membrana interna mitocondrial ayuda a que el inicio de la síntesis de Cox1p (proteína muy hidrofóbica) se lleve a cabo cerca de su sitio de inserción.

Las bases moleculares del acoplamiento de síntesis e inserción a la membrana no se entiende bien, debido a que en mitocondrias no hay un sistema de síntesis de proteínas mitocondriales *in vitro* como existe para bacterias o cloroplastos.

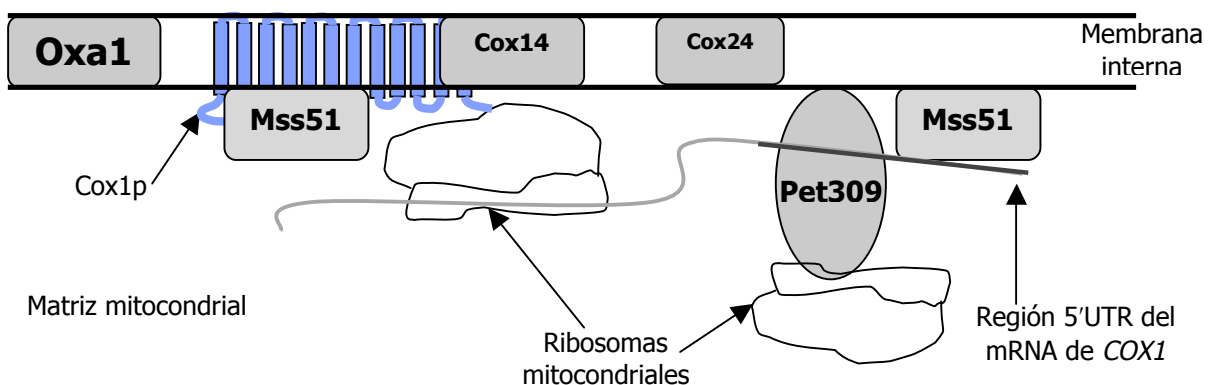
Sin embargo, existen datos experimentales que apoyan la síntesis localizada de proteínas de origen mitocondrial. Más del 40% de los ribosomas mitocondriales se asocian a la membrana interna mitocondrial tanto en levaduras como en células de mamífero (Liu *y Spemulli*, 2000; Ott *y col.*, 2006).

En la síntesis localizada de las subunidades que forman el núcleo de COX participan proteínas que forman parte de la maquinaria general de inserción de proteínas a la membrana interna mitocondrial. Por ejemplo, se ha observado que Oxa1p, una translocasa de membrana interna mitocondrial interacciona físicamente con la subunidad grande ribosomal posiblemente cerca del canal de salida del péptido recién sintetizado (Jia *y col.*, 2003; Szyrach *y col.*, 2003).

Recientemente, se ha reportado que la proteína Mba1p, una proteína de origen nuclear funciona como un receptor de unión de los ribosomas mitocondriales a

la membrana interna mitocondrial. Esta interacción no requiere de Oxa1p, ni de los polipéptidos recién sintetizados. Mba1p coopera con el dominio del carboxilo terminal de Oxa1p en su función de unión a los ribosomas. Estos resultados sugieren que los ribosomas mitocondriales están asociados con la membrana interna mediante interacciones con varios factores de anclaje, los cuales coordinan la inserción cotraduccional en la mitocondria (Ott y col., 2006).

Proponemos un modelo de (Figura 14), en el que Pet309p es una proteína periférica de membrana que interacciona con el 5'UTR del mRNA de *COX1* y posiblemente también interacciona con los ribosomas mitocondriales. Esto facilitaría la síntesis localizada de Cox1p en la membrana interna mitocondrial. En conjunto con Pet309p podría estar actuando la proteína Mss51p, que también se sabe actúa sobre la región 5' UTL del mRNA de *COX1* (Pérez y Fox, datos no publicados). Una vez iniciada la traducción, la inserción cotraduccional de Cox1p se podría llevar a cabo por diversos factores ya identificados: Mss51p (Pérez-Martínez y col., 2003; Barrientos y col., 2004); Cox14p (Fiory y col., 2000; Barrientos y col., 2004) y Cox24p (Barros y col., 2006) (factores específicos de *COX1*), Mba1p (Preuss y col., 2001) así como Oxa1p (Hell y col., 2001) (factores generales de inserción en la mitocondria).



**Figura 14.** Modelo de acción de Pet309p en la biogénesis de Cox1p en la membrana interna mitocondrial. Se muestran factores requeridos específicamente para la biogénesis de Cox1p. También se muestra Oxa1p, un factor general de inserción a la membrana. Ver texto para detalles y referencias.



## **Conclusión**

Pet309p-3xHA es el activador traduccional de Cox1p que se encuentra unido a la cara interna de la membrana interna mitocondrial como una proteína periférica para facilitar la traducción/inserción de Cox1p en dicha membrana.

# Apéndice

## Medios de cultivo

Para 1L de:

### YPD\*

Extracto de levadura	10 g
Peptona	20 g
Dextrosa	20 g
Adenina	0.03 g

### YPEG\*

Extracto de levadura	10 g
Peptona	20 g
Glicerol	30 mL
Etanol	30 mL (adicionar después de esterilizar y cuando el medio este a una T= 50°C)
Adenina	0.03 g

### YPGal\*

Extracto de levadura	10 g
Peptona	20 g
Galactosa	20 g
Adenina	0.03 g

### YPRaf\*

Extracto de levadura	10 g
Peptona	20 g
Rafinosa	20 g
Adenina	0.03 g

\*Para medio sólido agregar 20 g de agar. Esterilizar en autoclave.

## Amortiguadores para la purificación de mitocondrias

### **TD (Tris-DTT)**

Tris-SO4 pH 9.4	0.1 M
DTT	10 mM

### **MP2**

Sorbitol	1.2 M
Amortiguador de fosfatos (pH 7.4)	20 mM
<b>Zimoliasa-20T</b> (Accurate Chemical and Scientific Corporation)	3 mg/g peso húmedo

### **Homogeneización (Dounce)**

Tris pH 7.4	10 mM
EDTA	1 mM
BSA (libre de ácidos grasos)	0.2%
PMSF (preparar al momento en Etanol)	1 mM
TLCK	50 µg/ml
Sorbitol	0.6 M

### **Sorbitol/EDTA/HEPES**

	<b>1X</b>	<b>2X</b>
HEPES pH 7.4	20 mM	40mM
Sorbitol	0.6 M	1.2 M
EDTA	1m M	1 mM

### **Nicodenz** (Accurate Chemical and Scientific Corporation)

Hacer una solución al 50% en agua.

### Consumo de oxígeno

#### Amortiguador de respiración para oximetrías\*

Etanol	7%
Cloruro de Potasio	20 mM
Cloruro de Magnesio	10 mM
Ác. Fosfórico (Fosfato), pH 7.6	4 mM
Sorbitol	0.6 M
Hepes pH 7.4	20 mM

#### Amortiguador de respiración para medir la actividad de la COX\*

Cloruro de Potasio	20 mM
Cloruro de Magnesio	10 mM
Ác. Fosfórico (Fosfato) pH 7.6	4 mM
Sorbitol	0.6 M
Hepes pH 7.4	20 mM
Ascorbato de sodio	5 mM
Antimicina A	1 $\mu$ g
Tetrametil-p-fenilendiamina (TMPD)	50 $\mu$ M

\*Todos los reactivos se obtuvieron en Sigma

#### Amortiguadores para el fraccionamiento mitocondrial

##### **Solución CH**

NaCl	100mM
HEPES pH 7.4	20mM

Amortiguadores para la extracción alcalina de mitocondrias.

**Solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 11.5.**

Preparar una solución 200 mM de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. No ajustar pH.

Amortiguadores para la digestión con proteinasa K.

**Sorbitol/HEPES**

Sorbitol 0.6 M

Hepes 20 mM

**Hepes** 20mM, diluir del stock 1M con agua destilada

**Proteinasa K** 10mg/ml disolver en SH

**Sorbitol/HEPES/PK** amortiguador Sorbitol-HEPES con 100 µg/ml de proteinasa K.

Amortiguadores para la transferencia de proteínas a la membrana de PVDF.

**Amortiguador de transferencia negativo.**

Ácido ε-amino-n-caproico (Sigma)      39.4 g/l, pH 8.5-8.7 (ajustar con Tris)

SDS 0.05%      0.5 g/l

**Amortiguador de transferencia positivo.**

Tris      18.2 g/l

Tricina      9 g/l

Metanol      20 %

## Amortiguadores para la replica en Western.

### **Solución de bloqueo**

Leche en polvo	5 g
Tris 1M, pH 7.6	2.5 ml
NaCl 5M	1.5 ml
H <sub>2</sub> O	a 50 ml

### **Solución de replica**

Leche en polvo	0.1 g
Tris 1M, pH 7.6	100 $\mu$ l
NaCl 5M	200 $\mu$ l
EDTA 500mM	20 $\mu$ l
Tween-20 al 50%	200 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	a 10 ml

\* Adicionar el anticuerpo indicado a la dilución apropiada.

### **Solución de lavado**

Tris 1M, pH 7.6	10 ml
NaCl 5M	20 ml
EDTA 500mM	2 ml
Tween-20	1 ml
H <sub>2</sub> O	a 1 l

### **Solución de eliminación**

$\beta$ -mercaptoetanol	700 $\mu$ l
Tris 1M, pH 6.8	6.25 ml
SDS 10%	20 ml
H <sub>2</sub> O	a 100 ml

**\* Diluciones usadas para los anticuerpos**

Anti HA/peroxidasa (clona 3F10)	1:500	(Roche)
Anti CS	1:1000	(Donado por Thomas D. Fox)
Anti conejo/peroxidasa	1:5000	(Sigma)
Anti Cox2p	1:5000	(Donado por Thomas Mason)
Anti ratón/peroxidasa	1:3000	(BioRad)
Anti Arg8p	1:3000	(Donado por Thomas D. Fox)
Anti Cyt b <sub>2</sub>	1:2000	(Donado por Thomas D. Fox)

# Bibliografía

- Bakker B., Overcamp K., van Maris A., Kötter P., Luttik M., van Dilken J., and Pronk J. (2001) Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol. Reviews. 25:15-37.
- Baldacci G., and Zennaro E. (1982) Mitochondrial transcripts in glucose-repressed cells of *Saccharomyces cerevisiae*. Eur. J. Biochem. 127:411-416.
- Barrientos A., Zambrano A., and Tzagoloff A. (2004) Mss51p and Cox14p jointly regulate mitochondrial Cox1p expresión in *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J. 23:3472-3482.
- Barros M., Johnson A., and Tzagoloff A. (2004) *COX23*, a homologue of *COX17*, is required for cytochrome oxidase assembly. J. Biol. Chem. 279:31943-31947.
- Barros M., Myers A., Van Driesche S., and Tzagoloff A. (2006) *COX24* codes for a mitochondrial protein required for processing of the *COX1* transcript. J. Biol. Chem. 281-6:3743-3751.
- Ben E., Groudinsky O., Dujardin G., Altamura N., Kermorgant M., and Slominski P. (1989) Novel class of nuclear genes involved in both mRNA splicing and protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. Mol. Gen. Genet. 215:517-528.
- Bonnefoy N., and Fox T. (2002) Genetic transformation of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. Methods Enzymol. 350:97-111.
- Broadley S., Demlow C., and Fox T. (2001) Peripheral mitochondrial inner membrane protein. Mss2p, required for export of the mitochondrially coded Cox2p C tail in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 21:7663-7672.
- Brown N., Constanzo M., and Fox T. (1994). Interactions among three proteins that specifically activate translation of the mitochondrial COX3 mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 14:1045-1053.



- Burger G., Gray M., and Lang F. (2003) Mitochondrial genomes: anything goes. *TRENDS in Genetics*. 19(12):709-716.
- Cabral F., and Schatz G. (1978) Identification of cytochrome *c* oxidase subunits in nuclear yeast mutants lacking the functional enzyme. *J. Biol. Chem.* 253:4396-4401.
- Capaldi R. (1990) Structure and function of cytochrome *c* oxidase. *Annu. Rev. Biochem.* 59:569-596.
- Church C., Chapon C., and Poyton R. (1996) Cloning and characterization of PET100, a gene required for the assembly of yeast cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem.* 271:18499-18507.
- Church C., Goehring B., Forsha D., Wazny P., and Poyton R. (2005) A role for Pet100p in the assembly of yeast cytochrome *c* oxidase: interaction with a subassembly that accumulates in a *pet100* mutant. *J. Biol. Chem.* 280:1854-1863.
- Coffin J., Dhillon R., Gary R., and Nargang F. (1997) The *Neurospora crassa cya-5* nuclear gene encodes a protein with a region of homology to the *Saccharomyces cerevisiae* PET309 protein and is required in a post-transcriptional step for the expression of the mitochondrially encoded COX1 protein. *Curr. Genet.* 32:273-280.
- Constanzo M., and Fox T. (1988) Specific translational activation by nuclear gene products occurs in the 5' untranslated leader of a yeast mitochondrial mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2677-2681.
- Constanzo M., and Fox T. (1990) Control of mitochondrial gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* 24:91-113.
- Constanzo M., Seaver E., and Fox T. (1989) The PET54 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: characterization of a nuclear gene encoding a mitochondrial translation activator and subcellular localization of its product. *Genetics*. 122:297-305.

- Decoster E., Simon M., Hatat D., and Faye G. (1990) The MSS51 gene product is required for the translation of the COX1 mRNA in yeast mitochondria. *Mol. Gen. Genet.* 224:111-118.
- Dieckmann C., and Staples R. (1994) Regulation of mitochondrial gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. Rev. Cytol.* 152:145-181.
- Dujon B. (1981) Mitochondrial genetics and functions. P. 505-635. In J. N. Strathern, E. W. Jones and J. R. Broach (ed). *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Estabrook R. (1967) Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement ADP:O ratios. *Methods Enzymol.* 10:41-47.
- Fiori A., Saliola M., Goffrini P., and Falcone C. (2000) Isolation and molecular characterization of KICOX14, a gene of *Kluyveromyces lactis* encoding a protein necessary for the assembly of the cytochrome oxidase complex. *Yeast.* 16:307-314.
- Fiori A., Perez-Martinez., and Fox T.(2005) Overexpression of the COX2 translational activator, Pet111p, prevents translation of COX1 mRNA and cytochrome c oxidase assembly in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 56: 1689-1704.
- Foury F., and Kucej M. (2001) Yeast mitochondrial biogenesis: a model system for humans? *Curr. Op. Chem. Biol.* 6:106.111.
- Foury F., Roganti T., Lecrenier N., and Purnelle B. (1998) The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters.* 440:325-331.
- Fox T. (1996-a) *Genetics of Mitochondrial Translation. Translational Control.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. 25:733-758.
- Fox T. (1996-b) Translational control of endogenous and recorded nuclear genes in yeast mitochondria: regulation and membrane targeting. *Experientia (Basel).* 52:1130-1135.

- Frey T., and Murray J. (1994) Electron microscopy of cytochrome *c* oxidase crystals. Monomer-dimer relationship and cytochrome *c* binding site. *J. Mol. Biol.* 237:275-297.
- Fujiki Y., Hubbard A., Fowler S., and Lazarow P. (1982) Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.* 93(1):97-102.
- Glick B. (1995) Pathways and energetics of mitochondrial protein import in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzimol.* 260:224-231.
- Glick B., and Pon L. (1995) Isolation of highly purified mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzimol.* 260:213-223.
- Green-Willms N., Butler C., Dunstan H., and Fox T. (2001) Pet111p, an inner membrane-bound translational activator that limits expression of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial gene *COX2*. *J. Biol. Chem.* 276:6392-6397.
- Grivell L. (1995) Nucleo-mitochondria interactions in mitochondrial gene expression. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30:121-164.
- Hafter P., McMullin T., and Fox T. (1990) A genetic link between an mRNA-specific translational activator and the translation system in yeast mitochondria. *Genetics* 125:495-503.
- Hafter P., and Fox T. (1992) Suppression of carboxy-terminal truncations of the yeast mitochondrial mRNA-specific translational activator *PET122* by mutations in two new genes, *MRP17* and *PET127*. *Mol. Gen. Genet.* 235:64-73.
- Hatefi Y. (1985) The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Ann. Rev. Biochem.* 54:1015-1069.
- He S., and Fox T. (1999) Mutations affecting a yeast mitochondrial inner membrane protein, Pnt1p, block export of a mitochondrially synthesized fusion protein from the matrix. *Mol. Cell. Biol.* 19:6598-6607.
- Hell K., Neupert W., and Stuart R. (2001) Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. *EMBO J.* 20:1281-1288.

- Hudspeth M., Ainley W., Shumard D., Butow R., and Grossman L. (1982) Location and structure of the *VAR1* gene on yeast mitochondrial DNA: nucleotide sequence of the *40.0* allele. *Cell*. 30:617-626.
- Jia L., Dienhart M., Schramp M., McCauley M., Hell K., and Sturat R. (2003) Yeast Oxa1 interacts with mitochondrial ribosomes: the importance of the C-terminal region of Oxa1. *EMBO J*. 22:6438, 6447.
- Khalimonchuk O., and Rödel G. (2005) Biogenesis of cytochrome *c* oxidase. *Mitochondrion* 5:363-388.
- Kirichenko A., Vygodina T., Mkrtchyan H., and Konstantinov A. (1998) Specific cation binding site in mammalian cytochrome oxidase. *FEBS Lett*. 423:329-333.
- Kloeckener-Gruissem B., McEwen J., and Poyton R. (1987) Nuclear functions required for cytochrome *c* oxidase biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: multiple trans-acting nuclear genes exert specific effects on expression of each of the cytochrome *c* oxidase subunits encoded on mitochondrial DNA. *Curr. Genet*. 12:311-322.
- Krause K., Lopez R., Douglas G. and Dieckmann. (2004) The mitochondrial message-specific mRNA protectors Cbp1 and Pet309 are associated in a high-molecular weight complex. *Mol. Biol. Cel*. 15:2674-2683.
- Krause-Buchholz U., Barth K., Dombrowski C., and Rödel G. (2004) *Saccharomyces cerevisiae* translational activator Cbs2p is associated with mitochondrial ribosomes. *Curr. Genet*. 46:20-28.
- Krause-Buchholz U., Schobel K. Lauffer S., and Rödel G. (2005) *Saccharomyces cerevisiae* translational activator Cbs1p is associated with translationally active mitochondrial ribosomes. *Biol. Chem*. 386:407-415.
- Laemmli U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Lemaire C., Robineau S., and Netter P. (1998) Molecular and biochemical analysis of *Saccharomyces cerevisiae* *cox1* mutants. *Curr. Genet*. 34:138-145.
- Liu M., and Spremulli L. (2000) Interaction of mammalian mitochondrial ribosomes with the inner membrane. *J. Biol. Chem*. 275 (38):29400-29406.

- Manthey G., and McEwen J. (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 Journal. 14:5951-5961.
- Manthey G., Przybyla-Zawislak B., and Mc ewen J. (1998) The *Saccharomyces cerevisiae* Pet309 protein is embedded in the mitochondrial inner membrane. Eur. J. Biochem. 255:156-161.
- Markwell M., Haas S., Bieber L., and Tolbert N. (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. Anal. Biochem. 87:206-210.
- Marykwas D., and Fox T. (1989) Control of the *Saccharomyces cerevisiae* regulatory gene PET494: transcriptional repression by glucose and translational induction by oxygen. Mol. Cell. Biol. 9:484-491.
- Mashkevich G., Repetto B., Glerum D., Jin C., and Tzagoloff A. (1997) SHY1, the yeast homolog of the mammalian SURF-1 gene, encodes a mitochondrial protein required for respiration. J. Biol. Chem. 272:14356-14364.
- Mazourek M., Torello A., and Cameron V. (1999) Analysis of strains of *Saccharomyces cerevisiae* with aminoacid substitutions in the CuA-binding region of subunit II of cytochrome c oxidase. Curr. Genet. 36:249-255.
- McMullin T., Haffter P., and Fox T. (1990) A novel small-subunit ribosomal protein of yeast mitochondria that interacts functionally with an mRNA-Specific translational activator. Mol. Cell. Biol. 10:4590-4595.
- McMullin T., and Fox T. (1993) COX3 mRNA-specific translational activator proteins are associated with the inner mitochondrial membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 268:11737-11741.
- Michel H., Behr J., Harrenga A., and Kannt A. (1998) Cytochrome c oxidase: structure and spectroscopy. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 27:329-356.
- Miyakawa I., Sando N., Kawano K., Nakamura S., and Kuroiwa T. (1987) Isolation of morphologically intact mitochondrial nucleoids from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. J. Cell. Sci. 88:431-439.

- Mootha V., Lepage P., Miller K., Bunkenborg J., Reich M., Hjerrild M., Delmonte T., Villeneuve A., Sladek R., Xu F., Mitchell G., Morin C., Mann M., Hudson T., Robinson B., Rioux J., and Lander E. (2003) Identification of a gene causing human cytochrome c oxidase deficiency by integrative genomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 605-610.
- Mulero J., and Fox T. (1993a). Alteration of the *Saccharomyces cerevisiae* COX2 mRNA 5'-untranslated leader by mitochondrial gene replacement and functional interaction with the translational activator protein PET111. *Mol. Biol. Cell* 4:1327-1335
- Mulero J., and Fox T. (1993b). PET111 acts in the 5'-leader of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial COX2 mRNA to promote its translation. *Genetics* 133:509-516.
- Naithani S., Saracco S., Butler C., and Fox T. (2003) Interactions among COX1, COX2, and COX3 mRNA specific translational activator proteins on the inner surface of the mitochondrial inner membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* 14:324-333.
- Nelson D., and Cox M. (2004) Lehninger. Principles of Biochemistry. Fourth edition. W. H. Freeman and Company. New York.
- Nijtmans L., Taanman J., Muijsers A., Speijer D., and Van den Boget C. (1998) Assembly of cytochrome c oxidase in cultured human cells. *Eur. J. Biochem.* 254:389-394.
- Nobrega M., Nobrega F., and Tzagoloff A. (1990) COX10 codes for a protein homologous to the ORF product of *Paracoccus denitrificans* and is required for the synthesis of yeast cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem.* 265:14220-14226.
- Nobrega M., Bandeira S., Beers J., and Tzagoloff A. (2002) Characterization of COX19, a widely distributed gene required for expresión of mitochondrial cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem.* 277:40206-40211.
- Ott M., Prestele M., Bauerschmitt H., Funes S., Bonnefoy N., and Herrmann J. (2006) Mba1, a membrane-associated ribosome receptor in mitochondria. *EMBO J.* 25:1603-1610.

- Pel H., Tzagoloff A., and Grivell L. (1992) The identification of 18 nuclear genes required for the expression of the yeast mitochondrial gene encoding cytochrome *c* oxidase subunit 1. *Curr. Genet.* 21:139-146.
- Pereira M., Santana M., and Teixeira M. (2001) A novel scenario for the evolution of haem-cooper oxygen reductases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1505:185-208.
- Pérez-Martínez X., Broadley S., and Fox T.D. (2003). Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. *EMBO Journal* 22:5951-5961.
- Preuss M., Leonhard K., Heel K., Stuart R., Neupert W., and Herrman J. (2001) Mba1, a novel component of the mitochondrial protein export machinery of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Biol.* 153:1085-1096.
- Rödel G. (1986) Two yeast nuclear genes, CBS1 and CBS2, are required for translation of mitochondrial transcripts bearing the 5' untranslated *COB* leader. *Curr. Genet.* 11:41-45.
- Roman H. (1981) Development of a yeast as an experimental organism. P. 1-9. In J. N. Strathern, E. W. Jones and J. R. Broach (ed). *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Rosenfeld E., and Beauvoit B. (2003) Role of the non-respiratory pathways in the utilization of molecular oxygen by *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 20:1115-1144.
- Sanchirico M., Fox T., and Mason T. (1998) Accumulation of mitochondrially synthesized *Saccharomyces cerevisiae* Cox2p and Cox3p depends on targeting information in unstralated portions of their mRNAs. *EMBO J.* 17:5796-5804.
- Saracco S., and Fox T. (2002) Cox18p is required for the export of the mitochondrially encoded *Saccharomyces cerevisiae* COX2p C-tail and interacts with Pnt1p and Mss2p in the inner membrane. *Mol. Biol. Cell* 13:1122-1131.
- Saraste M. (1999) Oxidative Phosphorylation at the *fin de siecle*. *Science.* 283:1488-1493.

- Séraphin B., Simon M., Boulet A., and Faye G. (1989) Mitochondrial splicing requires a protein from a novel helicase family. *Nature*. 337:84-87.
- Schulze M., and Rödel G. (1988) *SCO1*, a yeast nuclear gene essential for accumulation of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit II. *Mol. Gen. Genet.* 211:492-498.
- Schulze M., and Rödel G. (1989) Accumulation of the cytochrome *c* oxidase subunits I and II in yeast requires a mitochondrial membrane-associated protein, encoded by the nuclear *SCO1* gene. *Mol. Gen. Genet.* 216:37-43.
- Shikanai T. (2006) RNA editing in plant organelles: machinery, physiological function and evolution. *Cell. Mol. Life Sci.* 63:698-708.
- Sickmann A., Reinders J., Wagner Y., Joppich C., Zahedi R., Meyer H., Schonfisch B., Perschil I., Chacinska A., Guiard B., Rehling P., Pfanner N., and Meisinger C. (2003) The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:13207-13212.
- Small I., and Peeters N. (2000) The PPR motif –a TPR- related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem. Sci.* 25(2):46-47.
- Szyrach G., Ott M., Bonnefoy N., Neupert W., and Herrmann J. (2003) Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria. *EMBO J.* 22:6448-6457.
- Tsukihara T., Aoyama H., Yamashita E., Tomizaki T., Yamaguchi H., Shinzawa R., Nakashima R., Yaono R., and Yoshikawa S. (1995) Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome *c* oxidase at 2.8Å. *Science.* 269:1069-1074.
- Tzschoppe K., Kohlwein S., and Rödel G. (2000) Yeast translational activator Cbs2p:mitochondrial targeting and effect of over-expression. *Biol. Chem.* 381:1175-1183.
- Tzagoloff A., Capitanio N., Nobrega M., and Gatti D. (1990) Cytochrome oxidase assembly in yeast requires the product of COX11, a homolog of the *P. denitrificans* protein encoded by ORF3. *EMBO J.* 9:2759-2764.
- Tzagoloff A., and Dieckmann C. (1990) PET genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* Vol. 54:211-225.



- Uribe S., Ramirez J., and Peña A. (1985) Effects of  $\beta$ -Pinene on yeast membrane functions. *J. Bacteriol.* 161:1195-1200.
- Weisenberger G., Constanzo M., and Fox T. (1995) Analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial *COX3* mRNA 5'-Untranslated leader: translational activation and mRNA processing. *Mol. Cell. Biol.* 15-6:3291-3300.
- Xu F., Morin C., Mitchell G., Ackerley C., and Robinson B (2004) The role of the *LRPPRC* (leucine-rich pentatricopeptide repeat cassette) gene in cytochrome oxidase assembly: mutation causes lowered levels of COX (cytochrome *c* oxidase) I and III mRNA. *Biochem J.* 382:331-336.