



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
BÁSICA

“Estudio de la función de la región carboxilo
terminal de Pet309 en la expresión de Cox1
en mitocondrias de levadura”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

LICENCIADA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

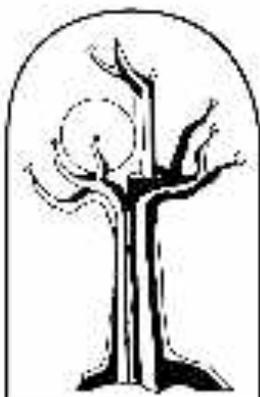
P R E S E N T A :

ANGELICA RAQUEL ZAMUDIO OCHOA

Tutora: DRA. XOCHITL PÉREZ MARTÍNEZ

MÉXICO, D. F.

ENERO, 2009





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA
SECRETARÍA DE ENSEÑANZA

VERDAD NACIONAL
AUTONOMÍA DE
MEXICO

DR. ENRIQUE LUIS GRAUE WIECHERS
DIRECTOR
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
PRESENTE

Estimado Dr. Graue:

Por este medio, me permito informar a usted que el Subcomité Académico de la Licenciatura ha designado Jurado para el examen profesional de la alumna **ANGELICA RAQUEL ZAMUDIO OCHOA**, con número de cuenta **405054495**, quien presenta la tesis: "Estudio de la función de la región carboxilo terminal de Pet309 en la expresión de Cox1 en mitocondrias de levadura" dirigida por la Dra. Xochitl Pérez Martínez.

El jurado está integrado por:

Presidente: Dr. Federico Martínez Montes
Secretario: Dra. Xochitl Pérez Martínez
Vocal: Dr. Alfonso León del Río
Suplente: Dra. Bertha González Pedrajo
Suplente: Dr. Oscar Flores Herrera

Agradezco su atención y aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D.F., octubre 8, 2008
EL SECRETARIO



Dr. J. JAVIER ESPINOSA AGUIRRE
Licenciatura en Investigación
Biomédica Básica
Coordinación

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.

Se reconoce la asesoría técnica de la Dra. Yolanda Margarita Camacho Villasana del Departamento de Bioquímica del Instituto de Fisiología Celular, así como su valiosa participación en este trabajo.

Se agradece al Jurado, conformado por:

Presidente	Dr. Federico Martínez Montes	Facultad de Medicina, UNAM.
Secretario	Dra. Xochitl Pérez Martínez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
Vocal	Dr. Alfonso León del Río	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
Suplente	Dra. Bertha González Pedrajo	Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
Suplente	Dr. Oscar Flores Herrera	Facultad de Medicina, UNAM.

Durante la tesis fui apoyada con una beca de terminación de estudios de licenciatura otorgada por PAPIIT (IN201805) y con una beca de titulación otorgada por el Gobierno Federal.

Agradecimientos

A la Dra. Xochitl Pérez Martínez por toda la asesoría y apoyo, pero sobre todo por esa libertad de expresión que no había encontrado antes.

A mis padres, porque han sido mi mejor ejemplo. A mi papá, por alimentar mi curiosidad por el mundo natural desde que era una niña. A mi mamá, por siempre buscar lo mejor para mi, apoyar todas mis decisiones y llenarme de afecto.

A Nelson, por estar ahí a pesar de todo.

A Yola y Miguel, por su apoyo incondicional tanto personal como académico.

A Itzhel, por recordarme que las amigas verdaderas sí existen.

A Nallely, Enrique, Marilú, y Maru, por las comidas y pláticas que tanto disfruté con ustedes.

A mis compañeros del labo: Aldo, Berna, Favy, Idalia, Juan Pablo, Miguel, Rodolfo, Vicky y Yola. Gracias por hacer del laboratorio un lugar tan agradable.

Contenido

Abreviaturas	1
Resumen	2
Introducción	4
<i>Saccaromyces cerevisiae</i> como modelo de estudio	4
La mitocondria	4
La mitocondria contiene su propio material genético	5
La cadena respiratoria	5
La citocromo <i>c</i> oxidasa	8
La biogénesis de la citocromo <i>c</i> oxidasa	8
Pet309	11
Justificación	14
Hipótesis	15
Objetivos	15
Materiales y métodos	16
Construcción de las mutantes de Pet309	17
Construcción de las quimeras	18
Integración de la mutante <i>pet309</i> Δ <i>760-962</i> en el cromosoma	20
Transformación de las levaduras	22
Obtención de la fracción mitocondrial cruda	22
Obtención de las mitocondrias purificadas en gradiente de Nicodenz	23
Cuantificación de proteínas por Lowry	24
Geles de poliacrilamida desnaturalizantes	25
Réplica en Western Blot	26

Traducción <i>in vivo</i> de proteínas mitocondriales a partir de células completas	28
Fraccionamiento mitocondrial	29
Extracción alcalina de proteínas de membranas mitocondriales	30
Gel desnaturizante de RNA	30
Northern Blot	32
Resultados	33
Localización subcelular de Pet309	33
Fraccionamiento mitocondrial	34
Extracción alcalina de proteínas membranales mitocondriales	35
Fenotipo respiratorio	36
Inmunodetección de Cox1 en las mutantes	38
Síntesis de proteínas mitocondriales <i>in vivo</i>	39
El gen <i>Arg8^m</i> como reportero de la traducción	41
Análisis del RNA mensajero de <i>COXI</i>	43
Quimeras de Pet309 con Pet111 y Pet122	46
Pet309 como proteína multidominio	48
Mutaciones cortas de la región carboxilo terminal	49
Discusión	50
Conclusión	57
Perspectivas	57
Apéndice	58
Artículo publicado durante la realización de este trabajo	65
Bibliografía	73

Abreviaturas

- 3xHA Triple epítoto de hemaglutinina
- 5'UTR Región no traducida en el extremo 5' del RNA mensajero (del inglés untranslated region)
- 5-FoA Acido 5-fluororótico
- Arg8 Acetil ornitín aminotransferasa
- *ATP6* Gen de la subunidad 6 de la ATP sintasa
- *ATP8* Gen de la subunidad 8 de la ATP sintasa
- *ATP9* Gen de la subunidad 9 de la ATP sintasa
- *COB* Gen del citocromo *b*
- Cob Citocromo b
- CcO Citocromo *c* oxidasa
- *COX1* Gen de la subunidad 1 de la CcO
- Cox1 Subunidad 1 de la CcO
- *COX2* Gen de la subunidad 2 de la CcO
- Cox2 Subunidad 2 de la CcO
- *COX3* Gen de la subunidad 3 de la CcO
- Cox3 Subunidad 3 de la CcO
- G6PDH Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
- mRNA Ácido ribonucléico mensajero
- mtDNA DNA mitocondrial
- Nicodenz Siglas en inglés de N,N-'bis-(2,3- dihydroxypropyl)-. 5-[N-(2,3-dihydroxypropyl)acet-amido]-2,4,6-triiodo isophthalamide
- PMSF Siglas en inglés de Phenylmethylsulfonyl fluoride
- Pi Fosfato inorgánico
- PPR Siglas en inglés de Pentatricopeptide repeat
- TEMED Siglas en inglés de N, N, N',N'-tetramethyl-ethano-1,2-diamina
- TLCK Siglas en inglés de Na-Tosyl-Lys Chloromethyl Ketone, Hydrochloride

Resumen

La mitocondria produce energía en forma de ATP gracias al gradiente de protones generado por la cadena respiratoria.

El paso final en la cadena respiratoria es la transferencia de 4 electrones del citocromo *c* al O₂, formando 2H₂O. Esta reacción es catalizada por la citocromo *c* oxidasa (CcO).

En *Saccharomyces cerevisiae* este complejo está formado por 12 subunidades y sólo 3 de ellas están codificadas en el genoma mitocondrial: Cox1, Cox2 y Cox3.

Cox1 es la subunidad más grande de la enzima y la que contiene el sitio catalítico. Cruza 12 veces la membrana interna mitocondrial por lo que es altamente hidrofóbica. Su biogénesis no se comprende del todo bien; sin embargo, se conocen algunos factores nucleares que participan en su transcripción, traducción e inserción en la membrana.

En la levadura, los activadores traduccionales son factores nucleares que participan en la traducción de los RNA mensajeros mitocondriales. Estos actúan sobre el extremo 5'UTR de su mRNA específico y facilitan su traducción e incluso la correcta inserción en la membrana del péptido naciente.

Pet309 es un activador traduccional de 113kDa requerido en la biogénesis de Cox1. Es una proteína periférica de membrana interna mitocondrial que participa en la estabilidad y traducción del RNA mensajero de *COX1*. Analizando su secuencia se han identificado unos dominios llamados PPR, los cuales se cree que pueden unir al RNA mensajero de *COX1* para facilitar su traducción. Estos dominios se localizan en la parte central de la proteína.

Además de estos dominios, Pet309 tiene una región carboxilo terminal de 200 residuos que no tiene motivos predichos en su secuencia. Sin embargo, está altamente conservada entre hongos.

Para este estudio se construyeron dos diferentes mutantes en la región carboxilo terminal. En una de ellas se suprimieron los últimos 300 aminoácidos y en la otra los últimos 200. Ambas construcciones se introdujeron en la levadura en dos diferentes plásmidos: uno de alto y otro de bajo número de copia. Todas las cepas mutantes fueron incapaces de respirar. Las mutaciones no afectaron la localización de Pet309 en la célula, ya que la proteína mutada se encontró como proteína periférica de membrana en las mitocondrias aisladas. La proteína Cox1 sólo se detectó en la cepa silvestre.

La ausencia de la proteína Cox1 en las mutantes se podía deber a la falta de su síntesis o a una alta inestabilidad de la proteína por defectos en su ensamblaje. Para diferenciar el proceso de traducción de *COXI* del proceso de inserción en la membrana de la proteína Cox1 ya traducida, se hizo un ensayo de síntesis *in vivo* de las proteínas mitocondriales. En este ensayo, las proteínas codificadas en el DNA mitocondrial se marcan con [³⁵S]Metionina al ser sintetizadas. Ninguna de las cepas mutantes fue capaz de sintetizar a Cox1 marcada.

Para descartar que se tratara de un proceso de degradación rápida de Cox1, se utilizó el gen reportero *ARG8^m* el cual se encuentra en el DNA mitocondrial flanqueado por los extremos UTR de *COXI*. Ambas cepas mutantes fueron incapaces de crecer en un medio sin arginina y la proteína Arg8 no se detectó en el extracto celular. Esto indica que la región carboxilo terminal de Pet309 se requiere para sintetizar a Cox1.

Pet309 además participa en la estabilidad del mRNA de *COXI*. Los niveles del RNA mensajero de *COXI* se analizaron por Northern blot. En las mutantes de bajo número de copia se observó una disminución en la estabilidad del RNA mensajero comparable a una cepa nula en Pet309. Sin embargo, en la sobreexpresión de Pet309 este efecto fue contrarrestado y se observó una acumulación de más del doble del RNA mensajero de *COXI*, respecto a una cepa silvestre.

De estos resultados se puede concluir que la región carboxilo terminal de Pet309 es necesaria para la síntesis de Cox1 y también participa en la estabilidad del RNA mensajero de *COXI*.

Introducción

***Saccaromyces cerevisiae* como modelo de estudio**

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un organismo facultativo, por lo que ofrece grandes ventajas para los estudios bioquímicos y genéticos de la expresión del genoma mitocondrial y del metabolismo respiratorio.

Las mutantes de proteínas mitocondriales o con disfunciones en la cadena respiratoria pueden perder la capacidad de crecer en fuentes de carbono no fermentables, como el etanol y el glicerol, pero ser capaces de crecer en fuentes de carbono fermentables, como glucosa.

La manipulación genética de esta levadura es relativamente fácil al compararla con otros organismos. Sus genomas nuclear y mitocondrial pueden mutarse eficientemente por recombinación homóloga y el hecho de que se conozca su genoma completo simplifica aún más su estudio (Towpik, 2005).

La mitocondria

La mitocondria es un organelo encontrado en el citoplasma de las células eucariontes cuya función principal es la producción de energía en forma de adenosín trifosfato (ATP).

Este organelo contiene 2 membranas con funciones muy diferentes. La membrana externa delimita al organelo y es permeable a todas las moléculas de 5000 Daltones o menos, incluyendo proteínas pequeñas. La membrana interna presenta un alto número de invaginaciones conocidas como crestas, es impermeable a iones y contiene una gran variedad de proteínas de transporte que la hacen selectivamente permeable a algunas moléculas y proteínas .

Las dos membranas crean dos compartimentos mitocondriales. El espacio intermembranal, delimitado por la membrana externa y la membrana interna, y la matriz mitocondrial, rodeada por la membrana interna (Alberts, 2002).

La matriz mitocondrial contiene una gran cantidad de enzimas solubles que participan en muchos procesos metabólicos tales como el ciclo de Krebs, la β -oxidación de los ácidos grasos, el catabolismo de aminoácidos, la síntesis de urea, etc (Vazquez, 2002).

La mitocondria contiene su propio material genético

La mitocondria surgió por un evento de endosimbiosis en el que una α -proteobacteria fue endocitada por una célula nucleada. La transición de bacteria independiente a organelo controlado por el huésped fue muy importante en la evolución de las células eucariontes (Gray et al., 1999; Martin et al., 2001) ya que la mayoría de los genes bacterianos fueron transferidos al genoma nuclear (Martin and Herrmann, 1998). Sin embargo, unos cuantos genes se mantuvieron dentro de la mitocondria. Por lo tanto, una de las particularidades de la mitocondria es que posee su propio sistema genético con toda la maquinaria necesaria para su expresión, es decir, para replicar, transcribir y traducir la información genética que contiene (Solano A, 2001).

El DNA mitocondrial de *S. cerevisiae* codifica a los RNAs ribosomales 15S y 21S, un conjunto de tRNAs, un RNA que forma parte de la RNAsa RPM2 y ocho proteínas (Figura 1). Siete polipéptidos sintetizados en la mitocondria forman parte de la cadena respiratoria: Cox1, Cox2 y Cox3 son subunidades de la citocromo *c* oxidasa; Cob es una subunidad del complejo citocromo bc₁ y Atp6, Atp8 y Atp9 son subunidades de la ATP sintasa. Todas estas proteínas son hidrofóbicas y cruzan varias veces la membrana interna. La única proteína soluble codificada en este genoma es Var1, la cual forma parte de la subunidad pequeña del ribosoma mitocondrial.

Las demás subunidades de los complejos respiratorios, así como las proteínas necesarias para la expresión de los genes mitocondriales, se sintetizan en el citosol y son importadas a la mitocondria (Towpik, 2005).

La cadena respiratoria

En la matriz mitocondrial se encuentran las enzimas que metabolizan a los ácidos grasos y al piruvato formado en la glucólisis para producir Acetil CoA, así como las que se encargan de oxidar a la Acetil CoA en el ciclo del ácido cítrico. Los productos de esta oxidación son el CO₂ (que es desechado), el GTP, el FADH₂ y el NADH. Los dos últimos son la fuente de electrones de la cadena respiratoria (Alberts, 2002). Los electrones son transferidos del NADH al oxígeno por medio de los complejos respiratorios. Mientras tanto, la energía

liberada es almacenada como un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana interna mitocondrial (Figura 2).

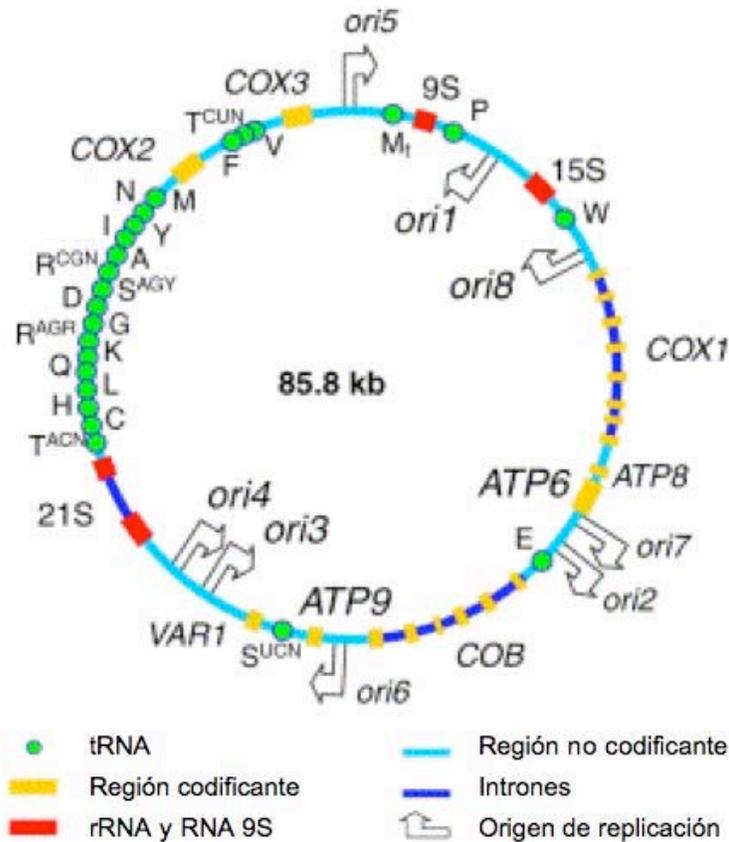


Figura 1. El DNA mitocondrial de *S. cerevisiae* mide 85.5kb y codifica a los RNAs ribosomales 15S y 21S, así como el RNA 9S que forma parte de la RNAsa RPM2 (Cuadros rojos), un conjunto de 24 tRNAs (Círculos verdes) y ocho proteínas (rectángulos amarillos). Los exones se representan en azul claro y los intrones en azul oscuro. Los orígenes de replicación (*ori1-ori8*) están representados por las flechas.

El gradiente de protones le proporciona a la ATP sintasa la energía necesaria para producir ATP a partir de ADP y Pi, proceso conocido como fosforilación oxidativa (Alberts, 2002).

La cadena respiratoria y fosforilación oxidativa de *S. cerevisiae* están constituidas por cuatro complejos: el complejo II o succinato deshidrogenasa, el complejo III o citocromo *bc₁*, el complejo IV o citocromo *c* oxidasa y el complejo V o ATP sintasa. Estos complejos se

encuentran embebidos en la membrana interna mitocondrial y, a excepción del complejo V, contienen grupos prostéticos que se reducen y oxidan (Figura 2).

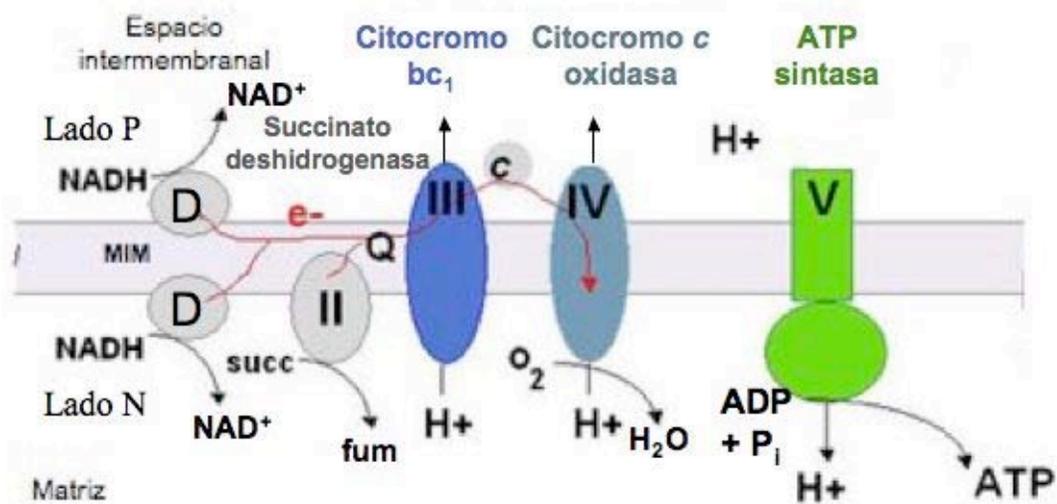


Figura 2. La cadena respiratoria de *S. cerevisiae* consta de 3 complejos respiratorios, los cuales dan lugar a un gradiente de protones que la ATP sintasa utiliza para transformar la energía en ATP. Se indican con números romanos los diferentes complejos respiratorios (II-V). Las NADH deshidrogenasas alternas se indican con la letra D. El lado positivo de la membrana se indica como Lado P y el lado negativo como Lado N. MIM = Membrana interna mitocondrial. Q = Ubiquinona.

A diferencia de otros organismos, *S. cerevisiae* no cuenta con complejo I; en su lugar tiene dos NADH deshidrogenasas, una interna (asociada a la cara interna de la membrana interna) y otra externa (asociada a la cara externa de la membrana interna).

La citocromo *c* oxidasa o complejo IV cataliza la transferencia de 4 electrones del citocromo *c* al O₂ para formar 2H₂O. Además de catalizar esta reacción, la citocromo *c* oxidasa es el segundo sitio de bombeo de protones en *S. cerevisiae* (Alberts, 2002).

La citocromo *c* oxidasa

La citocromo *c* oxidasa (CcO) de *S. cerevisiae* está compuesta por 12 subunidades. Nueve de ellas se encuentran codificadas en el DNA nuclear, son sintetizadas en el citosol e importadas a la mitocondria. La función de las subunidades nucleares no está muy clara, pero se cree que están involucradas en el correcto ensamblaje del complejo y en la regulación de su actividad (Alberts, 2002).

Las 3 subunidades restantes (Cox1, Cox2 y Cox3) forman el núcleo catalítico de la enzima y están codificadas en el DNA mitocondrial.

La subunidad 2 de la CcO (Cox2) contiene dos átomos de cobre unidos a residuos de cisteína. A este sitio se le llama Cu_A y es el aceptor de electrones provenientes del citocromo *c*.

Después de pasar por este sitio los electrones son donados al hemo *a* y de ahí al centro hemo α -Cu_B, los cuales se encuentran en la subunidad 1 (Cox1). Por último, el oxígeno es reducido a 2H₂O con la adición de 4 electrones. Mientras tanto, 4 protones son bombeados al espacio intermembranal (Alberts, 2002).

La biogénesis de la citocromo *c* oxidasa

La biogénesis de la CcO es complicada. Esto se debe a su localización subcelular (embebida en la membrana interna mitocondrial), al origen genético dual de sus componentes (genoma nuclear y mitocondrial), a la naturaleza hidrofóbica de la mayoría de ellos y su alto número de grupos prostéticos (Stiburek et al., 2006). Por lo tanto, un gran número de productos génicos han evolucionado para adaptarse a esos requerimientos. A pesar de que algunos de estos factores actúan en una forma general y participan también en la biogénesis de otros complejos respiratorios, diversos estudios en *S. cerevisiae* han identificado más de 30 factores nucleares esenciales para la biogénesis correcta de la CcO (Stiburek et al., 2006).

Previamente al ensamblaje de la CcO, las tres subunidades codificadas en el DNA mitocondrial son sintetizadas en ribosomas asociados a la membrana interna mitocondrial. Los RNA mensajeros de estas subunidades son reclutados en la membrana interna por una serie de proteínas de membrana. Estas proteínas se unen a secuencias específicas en el 5'UTR del mRNA y podrían ser importantes para el reclutamiento y posición de los ribosomas (Carr and

Winge, 2003). Estos factores son denominados activadores traduccionales y son específicos de cada RNA mensajero mitocondrial (Figura 3).

Se han encontrado activadores traduccionales para los RNA mensajeros de *COX1* (Pet309), *COX2* (Pet111), *COX3* (Pet54, Pet494 y Pet122), *COB* (Cbs1, Cbs2, Cbp1 y Cbp6), *ATP6* (Nca3) y *ATP9* (Aep1 y Aep2). Para *ATP8* y *VARI* no se han encontrado activadores traduccionales (Perez-Martinez et al., 2008).

Los activadores traduccionales son proteínas asociadas a la membrana interna mitocondrial ya sea de forma integral (Pet122, Pet494, Pet111, Cbs1)(Green-Willms et al., 2001; Krause-Buchholz et al., 2000; McMullin and Fox, 1993; Michaelis et al., 1991) o periférica (Pet309, Pet54, Cbs2, Cbp1) (Krause et al., 2004; Krause-Buchholz et al., 2005; Krause-Buchholz et al., 2000; McMullin and Fox, 1993; Tavares-Carreón et al., 2008).

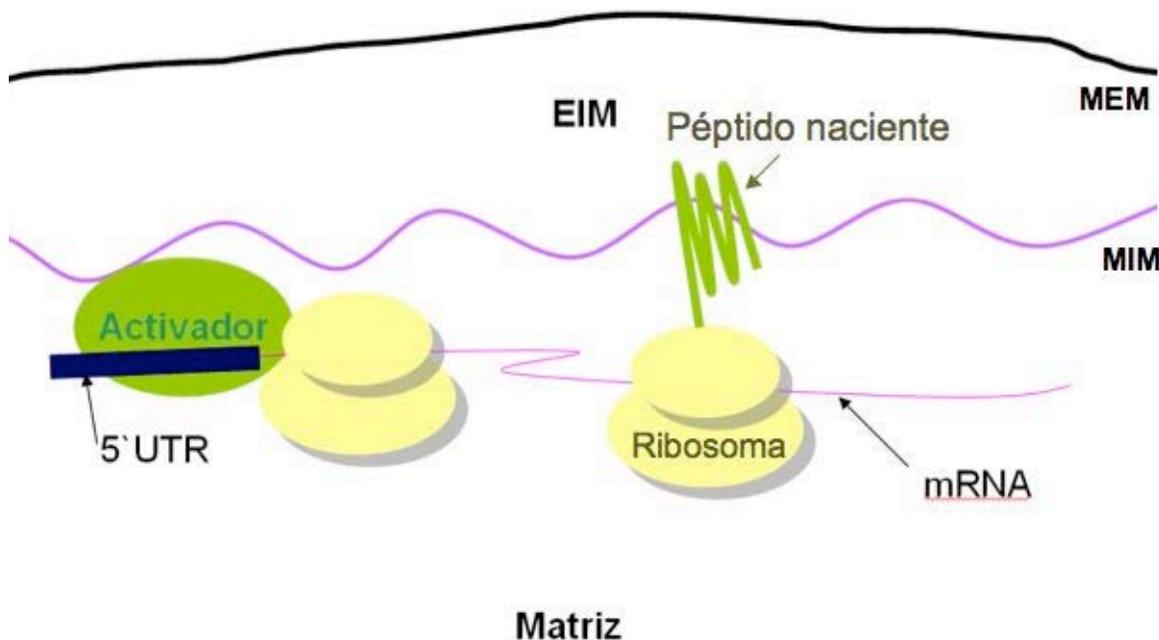


Figura 3. Los activadores traduccionales mitocondriales actúan sobre el 5'UTR de su RNA mensajero blanco para activar su traducción cerca de la membrana interna mitocondrial. EIM = Espacio intermembranal, MEM = Membrana externa mitocondrial, MIM = Membrana interna mitocondrial.

La localización membranal de los activadores traduccionales sugiere su papel en el acoplamiento de la traducción con la inserción en la membrana (Naithani et al., 2003). Esto permite la inserción co-traduccional de los productos mitocondriales altamente hidrofóbicos recién sintetizados para su ensamblaje en los grandes complejos respiratorios (Chacinska and Boguta, 2000).

La participación que tienen los activadores traduccionales en el acoplamiento del RNA mensajero al ribosoma está respaldada por varios datos experimentales. Se ha demostrado una interacción genética entre el activador traduccional de *COX3*, Pet122, y la subunidad pequeña del ribosoma (Haffter and Fox, 1992; McMullin et al., 1990). También se sabe que Cbs2 interacciona con el ribosoma intacto (Krause-Buchholz et al., 2004; Krause-Buchholz et al., 2005).

Además de la interacción con los ribosomas, también se han descrito interacciones físicas entre los activadores traduccionales. Se ha comprobado que los activadores traduccionales del mRNA de *COX3* (Pet54, Pet122 y Pet494) interactúan entre sí para formar un complejo activador (Brown et al., 1994). También se han descubierto interacciones entre el activador traduccional de *COX1*, Pet309, y los 3 activadores traduccionales de *COX3*. En experimentos de doble híbrido se ha establecido la interacción entre Pet111 y Pet54 (Naithani et al., 2003). La red de interacciones entre los activadores traduccionales indica que la maquinaria traduccional mitocondrial está altamente organizada y regulada. Sin embargo, la asociación física entre los activadores no se requiere para su actividad; ya que la eliminación de un activador no interrumpe las funciones específicas de los demás (Fox, 1996).

La cantidad de activador traduccional disponible podría también controlar los niveles de proteína sintetizada. En el caso de la proteína Cox3, el activador traduccional Pet494 parece ser el paso limitante. Un incremento en la concentración de este activador conduce a un incremento en la cantidad de Cox3. Esto no ocurre cuando se sobreexpresan sus otros activadores (Steele et al., 1996). Pet111 en sobreexpresión también incrementa los niveles de la proteína Cox2 (Green-Willms et al., 2001).

El aumento en la expresión de los activadores traduccionales también puede afectar negativamente la respiración. Si el activador traduccional de *COB* (Cbs2) se sobreexpresa, se observa un fenotipo no respiratorio y una acumulación de Cox1 (Tzschoppe et al., 2000). Un exceso de Pet111 también lleva a un defecto en la respiración debido a la falta de traducción de *COXI* (Fiori et al., 2005). La sobreexpresión de los activadores traduccionales de *COX3* tiene un pequeño efecto negativo en la respiración a 37°C (Wiesenberger et al., 1995).

No se han identificado secuencias consenso entre los 5'UTRs de los RNAs mensajeros mitocondriales, ni se ha establecido la región específica de unión a RNA de ningún activador traduccional. Sólo Pet309, el activador traduccional de Cox1, tiene dominios reconocibles de unión a RNA (Tavares-Carreón et al., 2008).

Los activadores traduccionales no muestran similitud entre ellos y sus secuencias sólo se encuentran conservadas en el reino fungi.

Pet309

Pet309 es una proteína periférica asociada a la cara interna de la membrana interna mitocondrial. Consta de 965 aminoácidos y tiene un peso molecular de 112.6 kDa. Además del papel que tiene como activador traduccional de *COXI* también participa en la estabilización de su RNA mensajero. Se ha observado que las mutantes nulas en *pet309* son incapaces de respirar debido a la ausencia de Cox1 (Manthey and McEwen, 1995).

La proteína ortóloga de Pet309 en humano es LRPPRC. Cuando esta proteína tiene mutaciones es causante del síndrome de Leigh, una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por una deficiencia en la actividad de la CcO (Cooper et al., 2006; Mootha et al., 2003).

Existen evidencias genéticas que indican que Pet309 actúa específicamente en el 5'UTR del mRNA de *COXI*: si el 5'UTR de *COXI* es intercambiado por el 5'UTR de otro gen mitocondrial como *COB*, la expresión de *COXI* será dependiente de los activadores traduccionales de *COB* y no de Pet309 (Manthey and McEwen, 1995).

Pet309 contiene varias repeticiones PPR (del inglés, Pentatricopeptide repeats). Estas repeticiones pertenecen a una familia de proteínas muy grande en plantas, con al menos 442 miembros en *Arabidopsis thaliana* (Small and Peeters, 2000). Sin embargo, existen muy pocos ejemplos de estas proteínas en fungi, animales y protistas (Lurin et al., 2004; Pusnik et al., 2007). Se sabe que estas proteínas participan en diferentes pasos del metabolismo de RNA como la estabilidad, edición y traducción (Coffin et al., 1997; Manthey and McEwen, 1995; Nakamura et al., 2003; Okuda et al., 2007; Schmitz-Linneweber et al., 2005). Pet309 es el único activador traduccional en *S. cerevisiae* en cuya secuencia se predicen dominios PPR y se cree que éstos son los responsables de la unión al RNA mensajero de *COXI* (Tavares-Carreón et al., 2008).

En la secuencia de 965 aminoácidos de Pet309 se predicen 12 repeticiones PPR en serie desde el aminoácido 312 al aminoácido 759 (dominios predichos con el programa TPR pred: <http://toolkit.tuebingen.mpg.de/tprpred>) (Figura 4). Se propone que los dominios PPR son motivos de unión macromoleculares que consisten de dos alfa hélices antiparalelas. El conjunto de estas repeticiones podrían formar una cavidad en cuya base habría un centro cargado positivamente afín al RNA de cadena simple (Small and Peeters, 2000).

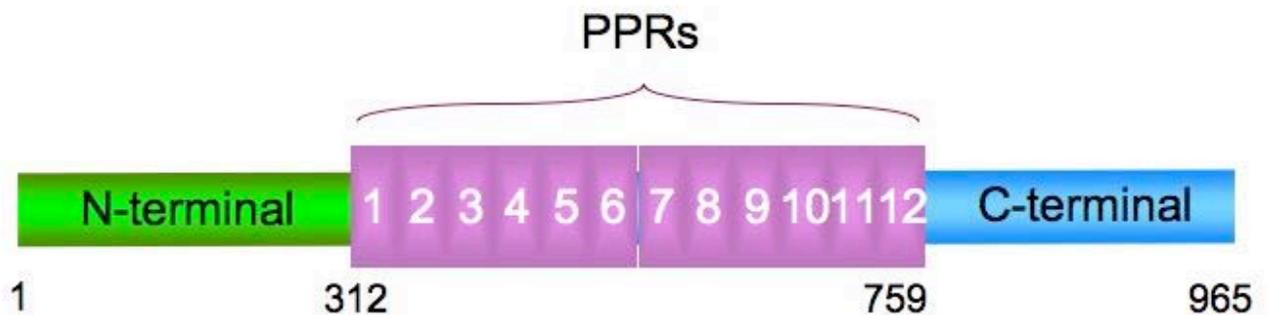


Figura 4. Diagrama general de Pet309. Se indican con números las repeticiones PPR.

En el laboratorio se han hecho algunas mutaciones de los dominios PPR de esta proteína. En un caso se suprimieron 285 aminoácidos. Estos abarcaban los 8 dominios PPR más fuertemente predichos (del PPR1 al PPR8). En la cepa con esta mutación *COXI* no se tradujo, sin embargo, el RNA mensajero de *COXI* presentaba niveles normales. También se suprimieron siete dominios PPR por separado, y se observó el mismo fenotipo. Estos resultados indicaron que los dominios PPR de Pet309 participan en la traducción de *COXI*, sin embargo, no participan en la estabilidad del RNA mensajero de *COXI* (Tavares-Carreón et al., 2008). Por lo tanto, la función de estabilización del mRNA debe de corresponder a otro dominio de esta proteína.

Se ha reportado que, mientras los dominios PPR de algunas proteínas determinan la especificidad por la secuencia de RNA, su región carboxilo terminal es el dominio catalítico de la proteína (Okuda et al., 2007).

Los últimos 206 aminoácidos de Pet309 no tienen ningún dominio predicho en su secuencia. Sin embargo, se sabe que en otros activadores traduccionales la región carboxilo terminal está involucrada en la interacción con los ribosomas.

Como se dijo antes, se ha demostrado la interacción genética de Pet122 con los ribosomas mitocondriales. Esta interacción parece ser mediada por los últimos 67 aminoácidos del activador traduccional y fue descubierta con la aparición de revertantes respiratorias de cepas con mutaciones en la región carboxilo terminal de Pet122. Los genes que suprimían esta mutación codificaban para subunidades estructurales de la subunidad pequeña del ribosoma mitocondrial y al parecer se trataba de mutaciones compensatorias que conferían a dichas proteínas una restitución de su función (Haffter and Fox, 1992; McMullin et al., 1990). Otro estudio reveló que Cbs2, un activador traduccional del mRNA de *COB*, interactúa con los ribosomas mitocondriales a partir de sus últimos 4 aminoácidos (Krause-Buchholz et al., 2004).

Es probable que el mecanismo de acción de todos los activadores traduccionales sea muy parecido entre ellos, sin embargo, no existe similitud alguna entre sus secuencias. Por lo tanto, la región carboxilo terminal de Pet309 podría tener funciones muy diferentes a las descritas para otros activadores. Hasta el momento no se conoce su función.

Justificación

Cox1 cruza 12 veces la membrana interna mitocondrial por lo que es altamente hidrofóbica. Su biogénesis es complicada y no se comprende en su totalidad. Sin embargo, se han descubierto múltiples factores que participan en su correcta transcripción, traducción e inserción en la membrana (Barros et al., 2006; Barrientos et al., 2004; Perez-Martinez et al., 2003; Tavares-Carreón et al., 2008). Pet309 es un activador de la traducción de *COX1* y se caracteriza por tener 12 dominios PPR predichos en su secuencia, los cuales podrían estar uniéndose al RNA mensajero de *COX1*. Estos dominios abarcan 447 aminoácidos ubicados en la parte central de la proteína, dejando a los últimos 206 aminoácidos sin ningún dominio predicho en su secuencia. Estos últimos aminoácidos se encuentran muy conservados en el reino fungi, lo cual apoya su importancia en la función de Pet309.

Hasta el momento, se han caracterizado algunas mutantes de Pet309 que carecen de los dominios PPR. Esto deja a la región carboxilo terminal del activador traduccional como un área inexplorada que podría tener funciones importantes en la traducción del mensajero de *COX1* así como en la estabilización del mismo.

En este estudio nos interesa conocer la función de la región carboxilo terminal de Pet309 sobre la expresión de *COX1* y la estabilización de su mensajero blanco.

Hipótesis

La región carboxilo terminal de Pet309 participa en la traducción y estabilización del RNA mensajero de *COX1*.

Objetivo

Estudiar el papel que tiene la región carboxilo terminal de Pet309 en la estabilización y expresión del RNA mensajero de *COX1*.

Objetivos particulares

- Generar dos diferentes mutantes del extremo carboxilo terminal de Pet309.
- Verificar la localización subcelular de las proteínas mutantes.
- Observar la expresión de Cox1 cuando Pet309 tiene truncada la región carboxilo terminal.
- Evaluar el efecto de la proteína trunca sobre el gen reportero de la traducción *cox1::ARG8^m*.
- Analizar el efecto de la proteína mutada en la estabilidad del RNA mensajero de *COX1*.

Materiales y Métodos

Cepas

Las cepas de *S. cerevisiae* que se usaron son congénicas a la cepa D273-10B. (I^0) representa un DNA mitocondrial que contiene al gen *COX1* sin intrones.

Cepa	Genotipo nuclear [mitocondrial]	Referencia
XPM231	<i>Mata</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>lys2</i> , <i>ura3-52</i> <i>pet309Δ::LEU2[cox1Δ::ARG8m,ρ⁺]</i>	Tavares-Carreón et al.
XPM232	<i>Mata</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>lys2</i> , <i>ura3-52</i> <i>pet309Δ::LEU2[COX1 (I^0), ρ⁺]</i>	Tavares-Carreón et al.
XPM201	<i>Mata</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>lys2</i> , <i>ura3-52</i> [<i>COX1 (I^0), ρ⁺]</i>	Tavares-Carreón et al.
AZO24	<i>Mata</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>lys2</i> , <i>ura3-52</i> <i>pet309ΔC-terminal ::3xHA[COX1 (I^0), ρ⁺]</i>	El presente estudio
YC2	<i>Mata</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>lys2</i> , <i>ura3-52</i> <i>pet309ΔC-terminal ::3xHA[COX1 (I^0), ρ⁺]</i>	Camacho-Villasana, Y
SB4	<i>Mata</i> , <i>ade2</i> , <i>ura3Δ</i> , <i>PET309-3xHA-URA3-3xHA</i> , [<i>ρ⁺</i>]	Sarah Broadley

Las cepas se crecieron en medio rico fermentable con 2% de glucosa (YPD) ó rafinosa (YPRaf) y medio rico no fermentable con 3% etanol, 3% glicerol (YPEG). Para seleccionar crecimiento por auxotrofia, las células se crecieron en medio mínimo suplementado con aminoácidos (ver Apéndice).

Construcción de las mutantes de Pet309

Las mutantes se generaron por PCR. Se utilizó como molde al gen *PET309* silvestre previamente clonado en un vector bacteriano (pXP96) el cual contiene a *PET309* con el triple epítipo de hemaglutinina (3xHA), con el cual puede detectarse inmunológicamente a la proteína. Este epítipo se fusionó al extremo carboxilo terminal, ya que es probable

que el extremo amino terminal de Pet309 contenga a la presecuencia que dirige a la proteína a la mitocondria.

La mutante *pet309Δ632-962* se obtuvo por un PCR con los oligonucleótidos F16 y R4 (Figura 5) (Ver apéndice para las secuencias de los oligonucleótidos). Para obtener a la mutante en un vector de bajo número de copia, el fragmento de 390pb se cortó con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI y se ligó en el plásmido pXP97 igualmente cortado (este plásmido contiene al gen *PET309* silvestre en el vector de bajo número de copia pRS416). A éste plásmido se le nombró pXP106.

Para obtener a la mutante en el vector de alto número de copia, el plásmido pXP106 se cortó con las enzimas de restricción XbaI y XhoI y se ligó en el plásmido pXP104 igualmente cortado (este plásmido contiene al gen *PET309* silvestre ligado en el vector de alto número de copia YEp352).

La mutante *pet309Δ760-962* se obtuvo por PCR de fusión. En el primer PCR se utilizaron los oligonucleótidos F4 y R12 para obtener un fragmento de 410pb. En el segundo PCR se utilizaron los oligonucleótidos F17 y R4 para obtener un fragmento de 400pb. Estos dos PCR se utilizaron para hacer un PCR de fusión con los oligonucleótidos F4 y R4 (Figura 5). Para obtener a la mutante expresada en vector de bajo número de copia, el PCR de fusión se cortó con las enzimas EcoRI y XhoI y el fragmento de 800 pb se ligó en el plásmido pXP97 igualmente cortado. A este plásmido se le nombró pXP107.

Para obtener a la mutante ligada en un plásmido de alto número de copia, el plásmido pXP107 se cortó con las enzimas XbaI y XhoI y se ligó en el plásmido pXP104 igualmente cortado.

La mutante *pet309Δ813-962* se obtuvo por PCR de fusión. En el primer PCR se utilizaron los oligonucleótidos F4 y R23 para obtener un fragmento de 540pb. En el segundo PCR se utilizaron los oligonucleótidos F17 y R4 para obtener un fragmento de 390pb. Estos dos PCR se utilizaron para hacer un PCR de fusión con los oligonucleótidos F4 y R4 (Figura 5). El PCR de fusión se cortó con las enzimas EcoRI y XhoI y el fragmento de

900 pb se ligó en el plásmido pXP97 igualmente cortado. A este plásmido se le nombró pYC41.

La mutante *pet309Δ863-962* se obtuvo por PCR de fusión. En el primer PCR se utilizaron los oligonucleótidos F4 y R24 para obtener un fragmento de 690pb. En el segundo PCR se utilizaron los oligonucleótidos F17 y R4 para obtener un fragmento de 390pb (Figura 5). Estos dos PCR se utilizaron para hacer un PCR de fusión con los oligonucleótidos F4 y R4. El PCR de fusión se cortó con las enzimas EcoRI y XhoI y el fragmento de 1000 pb se ligó en el plásmido pXP97 igualmente cortado. A este plásmido se le nombró pYC42.

La mutante *pet309Δ903-962* se obtuvo por PCR de fusión. En el primer PCR se utilizaron los oligonucleótidos F4 y R25 para obtener un fragmento de 820pb. En el segundo PCR se utilizaron los oligonucleótidos F17 y R4 para obtener un fragmento de 390pb. Estos dos PCR se utilizaron para hacer un PCR de fusión con los oligonucleótidos F4 y R4 (Figura 5). El PCR de fusión se cortó con las enzimas EcoRI y XhoI y el fragmento de 1200 pb se ligó en el plásmido pXP97 igualmente cortado. A este plásmido se le nombró pYC43.

Construcción de las quimeras

La quimera de Pet309 con la región carboxilo terminal de Pet111 se realizó por PCR de fusión. En el primer PCR se amplificaron los 400 pb anteriores al codón 760 de *PET309*. Se tomó como molde a pXP97 y se utilizaron los oligonucleótidos F4 y R22 (Figura 5). En el segundo PCR se amplificaron las últimas 300pb de *PET111* tomando como molde un plásmido que contenía al gen *PET111* en el vector de alto número de copia YEp352 (plásmido pJM20). En este caso se utilizaron los oligonucleótidos Pet111F1 y Pet111R1. Se hizo un tercer PCR en el que se amplificaron las primeras 210pb del 5'UTR de *PET309*, para lo que se utilizaron los oligonucleótidos F25 y R4.

Estos tres PCR se unieron en un PCR de fusión amplificando con los oligonucleótidos F4 y R4. De este PCR se obtuvo un fragmento de 900pb, el cual fue cortado con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI y ligado en el plásmido pXP97 cortado con estas mismas

enzimas, obteniendo así a la quimera expresada en el vector de bajo número de copia. A este plásmido se le nombró pYCV37.

Para obtener a la misma quimera expresada en el vector de alto número de copia, el plásmido pYCV37 se cortó con las enzimas XbaI y XhoI y se ligó en el plásmido pXP104 cortado con las mismas enzimas.

La quimera de Pet309 con la región carboxilo terminal de Pet122 también se realizó por PCR de fusión. En el primer PCR se amplificaron los 400pb anteriores al codón 760 de *PET309*. Se tomó como molde a pXP97 y se utilizaron los oligonucleótidos F4 y R22 (Figura 5). En el segundo PCR se amplificaron las últimas 180pb de *PET122* tomando como molde al DNA genómico total de la cepa YC2. En este caso se utilizaron los oligonucleótidos Pet122F1 y Pet122R1. Se hizo un tercer PCR en el que se amplificaron las primeras 210pb del 5'UTR de *PET309*, para lo que se utilizaron los oligonucleótidos F25 y R4.

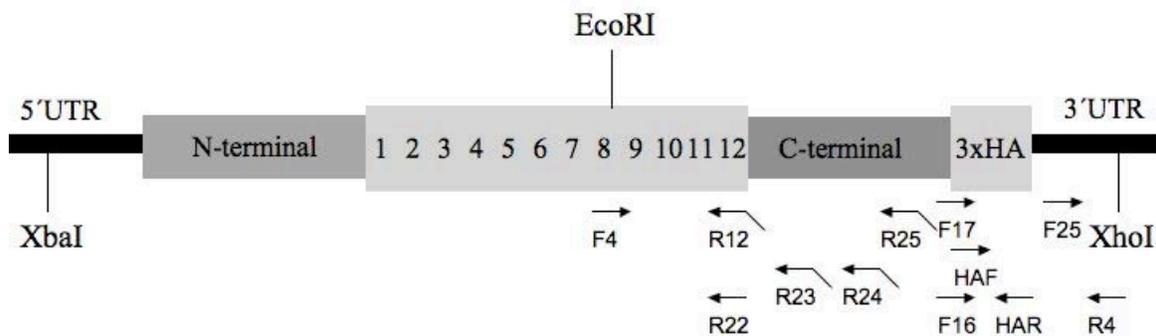


Figura 5. Sitios de corte de las enzimas utilizadas en *PET309*. El sitio de corte XbaI se encuentra a 310pb del codón de inicio. El sitio EcoRI se ubica al final del PPR8. El sitio de corte XhoI se encuentra a 190pb del codón de paro. Se muestra la localización de los oligonucleótidos utilizados. Los oligonucleótidos R12, R23, R24 y R25 tienen un fragmento de secuencia complementaria al oligonucleótido F17. El oligonucleótido F16 incluye un sitio de corte de EcoRI. (Ver apéndice para las secuencias de los oligonucleótidos). Las flechas indican el sentido de los oligonucleótidos y las líneas diagonales unidas a las flechas indican secuencias complementarias a otro oligonucleótido. Los números (1-12) indican las repeticiones PPR.

Estos tres PCR se unieron en un PCR de fusión amplificando con los oligonucleótidos F4 y R4. De este PCR se obtuvo un fragmento de 800pb, el cual fue cortado con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI y ligado en el plásmido pXP97 cortado con estas mismas enzimas, obteniendo a la quimera expresada en el vector de bajo número de copia. A este plásmido se le llamó pYCV38.

Para obtener a esta misma quimera expresada en el vector de alto número de copia, el plásmido pYCV38 se cortó con las enzimas XbaI y XhoI y se ligó en el plásmido pXP104 cortado con las mismas enzimas.

Integración de la mutante $\Delta 760-962$ en el cromosoma

Para integrar la mutación *pet309 Δ 760-962* en el cromosoma se hizo un PCR de fusión. En el primer PCR se amplificaron los últimos 400 pb de la mutante. Se tomó como molde al plásmido de bajo número de copia que contenía a la mutante *pet309 Δ 760-962* y se utilizaron los oligonucleótidos F4 y HAR (Figuras 5 y 6A). Por otro lado, se hizo otro PCR tomando como molde el DNA genómico de la cepa SB4 la cual contiene a Pet309 silvestre seguido por el gen URA3 flanqueado por dos triples epítopes de hemaglutinina (Pet309-3xHA-URA3-3xHA) (Figura 6B). Se utilizaron los oligonucleótidos HAF y R4 para obtener un fragmento de 1360pb. Los dos fragmentos obtenidos se unieron en un PCR de fusión y se amplificó usando los oligonucleótidos F10 y R1 obteniendo un fragmento de 1700pb (Figura 6C).

Esta construcción se transformó en la cepa XPM201 y se seleccionaron las células que lo integraron en medio -URA. Las colonias que crecieron en este medio se dejaron crecer en medio YPD con 0.3% de Acido 5-fluororótico (5-FoA) (Figura 6D). Este reactivo es tóxico para las células que expresan el gen URA3. El objetivo era inducir a las levaduras para que recombinaran de tal forma que el gen *URA3* fuera eliminado y el gen *pet309* mutante se quedara etiquetado con un solo triple epítipo. Por PCR se verificó que la mutación se hubiera insertado en el lugar del gen PET309 silvestre (Figura 6E). A esta cepa se le llamó AZO24.

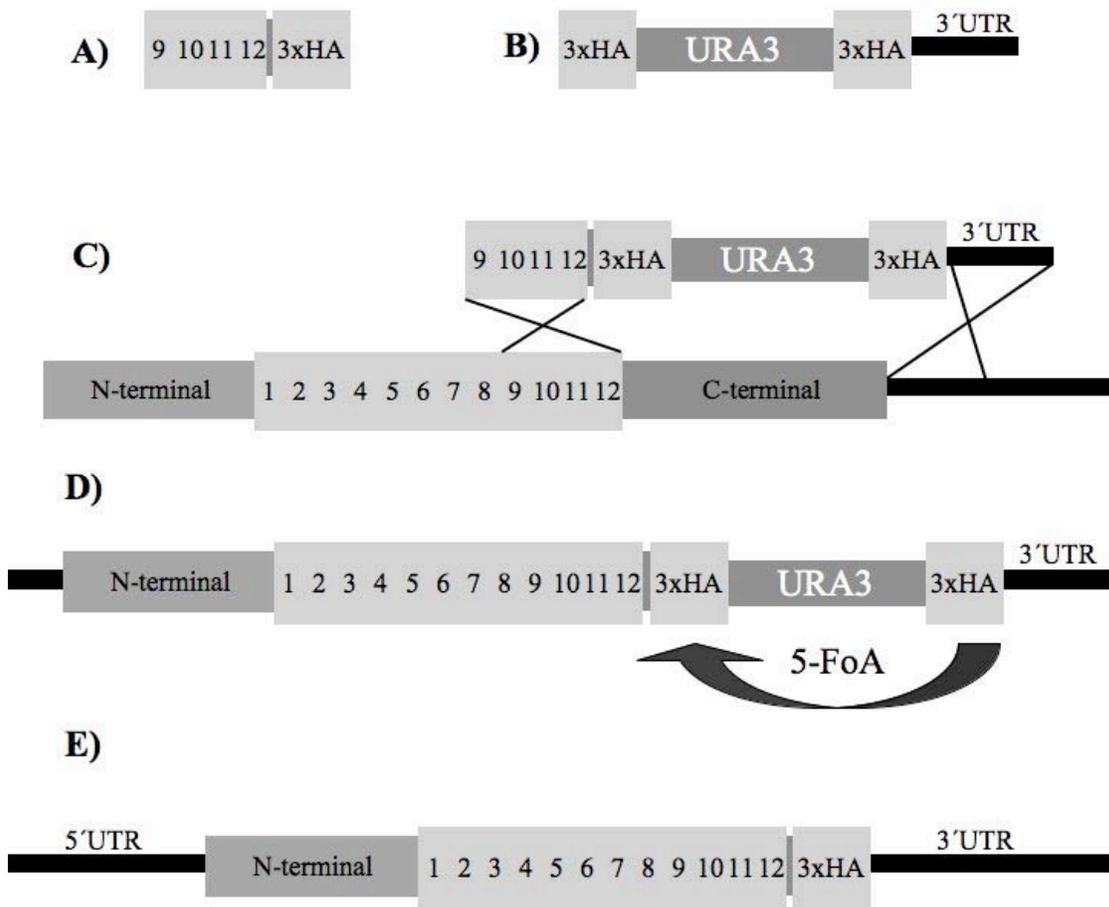


Figura 6. Estrategia para la integración de la mutación *pet309Δ760-962* en el cromosoma. **A)** PCR en el que se amplificaron los últimos 400pb de la mutante *pet309Δ760-962* **B)** Amplificación del cassette que contiene al gen *URA3* flanqueado por dos triples epítopes de hemaglutinina. Se incluyeron las primeras 200pb del 3'UTR de *PET309* **C)** El PCR de fusión resultante de los dos PCR anteriores se transformó en la cepa XPM201 que contiene a *PET309* silvestre. En medio – URA se seleccionaron a las mutantes que integraron la construcción. Las cruces indican el sitio de recombinación. **D)** A las colonias seleccionadas se les cultivó en un medio con 0.3% de 5-FoA para que recombinaran a partir del 3xHA. **E)** Mutación *pet309Δ760-962* integrada en el cromosoma.

Transformación de las levaduras

Las cepas XPM231, XPM232 y AZO24 se transformaron con los vectores que contienen las construcciones de las mutantes mediante el método de Ito (Ito et al., 1983) que se describe a continuación:

1. Crecer en 2 ml de YPD la cepa deseada a 30°C por 16 h.
2. Tomar 500 μ l de las células del cultivo y centrifugar 1 min a 14000 rpm a 4°C en una centrífuga de mesa modelo Eppendorf 5415C. Eliminar el sobrenadante.
3. Resuspender las células en 52.5 μ l de mezcla de transformación:
40 μ l de una solución de PEG-3350 al 50%.
5 μ l de una solución de DTT de 1M.
5 μ l de una solución de acetato de litio 2M.
2.5 μ l de una solución de DNA de espermatozoos de salmón a 10mg/ml (previamente hervido por 10 min y colocado en hielo inmediatamente).
4. Agregar el DNA a emplear para la transformación celular (100 ng).
5. Incubar a 42°C por 30 min agitando en vórtex cada 10 min.
6. Plaquear la mezcla en el medio selectivo.

Obtención de la fracción mitocondrial cruda Modificado de (Diekert et al., 2001)

1. Crecer una colonia de levadura en 4 ml de medio -UraRaf 48h a 30°C con una agitación de 250 rpm.
2. Resembrar en 50 ml de medio -UraRaf e incubar a 30°C con una agitación de 250 rpm hasta alcanzar una A_{600} entre 1.2 y 1.4 u.a. (fase exponencial de crecimiento).
3. Del cultivo anterior resembrar en 2 litros de medio -UraRaf e incubar 16 horas a 30°C con una agitación de 250 rpm hasta alcanzar una A_{600} entre 1 y 1.2 u.a. (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 desionizada, reunir todos los botones 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 el amortiguador TD (2 ml/g de peso húmedo) (Ver apéndice para la composición del amortiguador).
8. Agitar 10 min a 30°C con agitación de 250 rpm.
9. Centrifugar a 3300 rpm durante 5 min a 4°C en rotor GS3.
10. Lavar el botón con el amortiguador MP2 sin zimoliasa (7 ml/g de peso húmedo) (Ver apéndice para la composición del amortiguador).
11. Centrifugar 5 min a 3300 rpm en rotor GS3.
12. Resuspender el botón en amortiguador MP2 (7ml/g de peso húmedo), adicionar zimoliasa-20T (3mg/g de peso húmedo).
13. Agitar 45 min a 30°C.

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 Dounce usando un homogenizador y pistilo de vidrio (Ver apéndice para la composición del amortiguador).
17. Centrifugar 5 min a 3300 rpm en el rotor GS3 a 4°C. Recuperar el sobrenadante.
18. Centrifugar 5 min a 3300 rpm en el rotor GS3 a 4°C. Recuperar el sobrenadante.
19. Centrifugar 12 min a 12000 rpm en el 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) (Ver apéndice para la composición del amortiguador).
21. Centrifugar 12 min a 12000 rpm en el rotor SS-34 a 4°C.
22. Resuspender el botón en 300 µl de amortiguador SEH (con la punta de la micropipeta cortada).

Obtención de las mitocondrias purificadas en gradiente de Nicodenz

23. Preparar 5 ml de cada una de las siguientes soluciones de Nicodenz en amortiguador SEH 2x (Ver apéndice para la composición del amortiguador).

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.

24. Preparar dos gradientes por 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).
25. Depositar 0.5 ml del extracto crudo de mitocondrias en cada gradiente (Usar punta cortada).
26. Centrifugar a 39000 rpm a 4°C por 39 min en un rotor SW40Ti.
27. Remover la banda de mitocondrias con aguja y jeringa (La banda se observará a la altura de Nicodenz al 16%).
28. Diluir las mitocondrias con 25 ml de amortiguador SEH.
29. Centrifugar 10 min a 12000 rpm en el rotor SS-34 a 4°C.
30. Para eliminar completamente el Nicodenz resuspender el botón en 20 ml de SEH frío.
31. Centrifugar 12 min a 12000 rpm en el rotor SS-34 a 4°C.
32. Resuspender el botón en 250 μ l de amortiguador SEH frío, con la punta para micropipeta cortada en el extremo.

Congelar en nitrógeno líquido y guardar hasta su uso a -70°C en alícuotas de 25 μ l.

Cuantificación de proteínas por Lowry modificado (Markwell, 1978)

Solución A

Na₂CO₃ (2%), NaOH (0.4%), Na₂tartrato (0.16%), SDS (1%).

Solución B

Cu₂SO₄.5H₂O (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)

Curva de calibración

Usar una solución de albúmina de 1 mg/ml.

Preparar disoluciones de albúmina con 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 μ 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 vórtex. Incubar 10 min a TA.
3. Adicionar 300 μ l de solución D y mezclar en vórtex e incubar 30 min a TA.
4. Determinar la absorbancia a 540 nm.

Geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

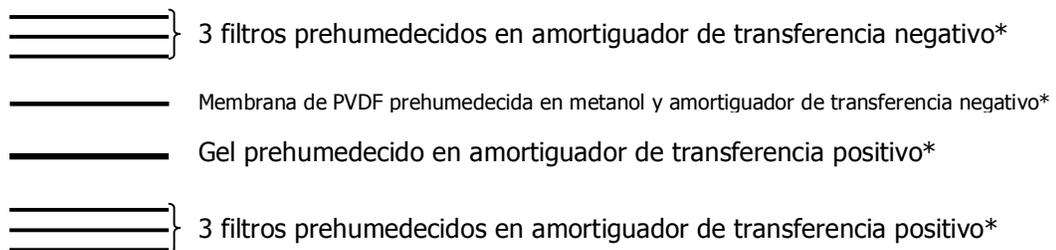
	Gel separador 12 %	Gel concentrador 4 %
Acrilamida 30% Bisacrilamida 0.8%	3.0 ml	0.488 ml
Tris 2M, pH 8.8	1.395 ml	
Tris 2M, pH 6.8		234 μ L
SDS 20%	75 μ l	19 μ L
H ₂ O	3.00 ml	2.96 mL
Persulfato de amonio 10%	38 μ l	38 μ L
TEMED	3.8 μ l	3.8 μ L

Amortiguador de corrida 5X	0.125M	Tris-HCl pH 8.3
	0.96M	Glicina
	0.5%	SDS
Amortiguador de carga 2X	0.0625 M	Tris-HCl, pH 8.3
	10%	Glicerol
	2%	SDS
	5%	β -Mercaptoetanol
	0.02%	azul de bromo fenol

Iniciar la electroforesis a 80V durante 30 min. Posteriormente, aumentar el voltaje a 200V durante 90 min.

Réplica en Western Blot

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



*Ver apéndice para la composición de los amortiguadores

Transferir 2 horas a 1.5 mA/cm², cuidando que no exceda los 10V.

2. La membrana con las proteínas se bloquea toda la noche a 4°C o 2 hr a temperatura ambiente con solución de bloqueo (Ver apéndice para la composición de la solución).

3. Incubar la membrana con solución de réplica, la cual contiene el anticuerpo anti-HA (Roche) acoplado a peroxidasa de rábano, durante 1h a temperatura ambiente.
4. Lavar la membrana con solución de lavado por 10 min (Ver apéndice para la composición de la solución), repetir el lavado 2 veces más.
5. Revelar la presencia del anticuerpo unido a la proteína Pet309-3xHA 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°C (Ver apéndice para la composición de la solución).
8. Bloquear nuevamente durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C.
9. Incubar la membrana con solución de réplica, la cual contiene el anticuerpo contra Cox1, G6PDH, CS o Cit. C₁ 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 réplica, 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.

Traducción *in vivo* (ivTL) de proteínas mitocondriales a partir de células completas

1. Crecer una colonia en 2 ml de –URA Raf a 30°C toda la noche.
2. Inocular 0.1ml en 10 ml de –URA Raf , incubar a 30°C toda la noche.
3. En la mañana adicionar 10 ml de –URA Raf incubar 3 horas a 30°C.
4. Centrifugar alícuotas de 5 ml de cultivo (o 7.5 ml si la cepa no respira) en tubos con tapa de rosca previamente pesados a 3000 g por 5 min a TA.
5. Lavar dos veces con 1 ml de agua estéril. En el último lavado pesar los tubos y eliminar la cantidad de células necesaria para tener 0.1g de células en todos los tubos.
6. Resuspender en 500 µl de medio –Met Raf. Incubar 30 min a 30°C con agitación.
7. Adicionar 5 µl de cicloheximida (10mg/ml, disuelta en etanol). Incubar 5 min a 30°C con agitación.
8. Adicionar 5µCi de ³⁵S-Met. Incubar 10 min a 30°C con agitación.
9. Enfriar inmediatamente en hielo/agua 5 min
10. Centrifugar a velocidad máxima a 4°C por 1 min en una centrífuga de mesa modelo Eppendorf 5415C. Eliminar sobrenadante.
11. Lavar una vez con 500 µl de –Met Raf con 6.5µl de metionina 2.5mM.
12. Centrifugar a velocidad máxima a 4°C por 1 min en una centrífuga de mesa modelo Eppendorf 5415C. Eliminar sobrenadante.

A partir de 0.1g de células:

13. Lavar el pellet con 200 µl de SHP frío (Ver apéndice para la composición de la solución) adicionado con inhibidor de proteasas (3.3µl/10ml) (SIGMA).
14. Resuspender el pellet en 200µl de SHP frío con inhibidor de proteasas (SIGMA).
15. Adicionar un volumen de perlas de vidrio, previamente enfriadas a -20°C.
16. Agitar en vórtex 30 seg a velocidad máxima e incubar 30 seg en hielo.
17. Repetir el paso anterior.
18. Centrifugar a 6000 g por 5 min a 4°C en una centrífuga de mesa modelo Eppendorf 5415C.
19. Tomar el sobrenadante y poner en tubo eppendorf etiquetado en hielo.
20. Adicionar al precipitado 200 µl de SHP frío. Repetir el ciclo vórtex/hielo.

21. Combinar los sobrenadantes y centrifugar a velocidad máxima durante 10 min a 4°C en una centrífuga de mesa modelo Eppendorf 5415C.
22. Eliminar el sobrenadante y adicionar 40 µl de amortiguador de Laemmli 1X. Calentar a 65°C por 5 min.
23. Cargar 10µl en un gel de acrilamida/SDS al 12%, el resto guardar a -70°C. Correr a 27mA a 7cm de la interfase de los geles.
24. Transferir a membrana de PVDF 1.5 horas a 1.5mA/cm². Dejar secar y exponer en una placa de película BioMAX XAR Film (Kodak).

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

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

1. Centrifugar 100 µg de mitocondrias durante 5 min a 12000 rpm a 4°C en una centrífuga de mesa modelo Eppendorf 5415C.
2. Resuspender el botón en 400 µl del amortiguador CH (Ver apéndice para la composición del amortiguador).
3. Incubar en hielo durante 10 min.
4. Sonicar en un baño con hielo/agua usando 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) a 4°C.
6. Separar el sobrenadante y resuspender el botón en 400 µl del amortiguador CH.
7. Precipitar las proteínas del sobrenadante y el botón adicionando 45µl de ácido tricloroacético (TCA) al 100% (BioChemika).
8. Incubar en hielo 30 min.
9. Centrifugar 10 min a 12000 rpm a 4°C en una centrífuga de mesa modelo Eppendorf 5415C.
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 durante 10 min.

12. Separar en un gel de poliacrilamida-SDS y analizar por réplica en Western.

Extracción alcalina de proteínas de membranas mitocondriales. Modificado de (Fujiki et al., 1982).

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

1. Centrifugar 100 µg de mitocondrias durante 5 min a 12000 rpm a 4°C en una centrífuga de mesa modelo Eppendorf 5415C.
2. Resuspender en 200 µl de Na₂CO₃ 100 mM, pH 11.5.
3. Agitar en vórtex 3 seg.
4. Incubar 60 min en hielo.
5. Centrifugar durante 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 adicionando 50 µl de TCA al 100% (BioChemika) a las dos fracciones obtenidas en el paso anterior.
8. Incubar en hielo por 30 min.
9. Centrifugar durante 10 min a 12000 rpm a 4°C en una centrífuga de mesa modelo Eppendorf 5415C.
10. Lavar una vez con 1 ml de acetona a -20°C.
11. Resuspender en 50 µl de amortiguador de carga 1X y calentar a 65°C durante 10 min.
12. Separar en gel de poliacrilamida-SDS y analizar por réplica en Western.

Gel desnaturizante de RNA

1. Inocular 3ml de -URA Raf con las cepas y dejar crecer a 30°C hasta la fase exponencial.
2. Purificar el RNA según las instrucciones del kit RNeasy de Qiagen.
3. Cuantificar en Nanodrop ND-100.
4. Preparación del gel
1.7 g de agarosa

126 ml de H₂O

17.5 ml de MOPS10X (Ver apéndice para la composición del amortiguador)

31.5 ml de formaldehído

5. Preparación de muestras

7.5 µg de RNA

2 µl de MOPS10X

6 µl de formaldehído

20 µl de formamida

6. Calentar las muestras por 15 min a 65°C.

7. Incubar en hielo por 5 min.

8. Agregar 5µl de amortiguador de carga y 1µl de bromuro de etidio a 10mg/ml.

9. Cargar las muestras en el gel y correrlo a 50V por 90 min, posteriormente correr a 100V por 2 horas.

Transferencia de RNA a membrana de Nylon-Hybond

1. Colocar sobre un soporte un papel filtro que toque el amortiguador SSC10X

2. Sobre el papel filtro poner el gel previamente lavado con H₂O DEPC (Diethyl pirocarbonato)

3. Cubrir el gel con una membrana de Nylon-Hybond.

4. Poner sobre la membrana 3 papeles filtro prehumedecidos con SSC10X (Ver apéndice para la composición del amortiguador).

5. Colocar sobre los papeles filtro una torre de papel de aproximadamente 7cm de altura.

6. Sobre la torre, colocar una superficie plana de acrílico y un peso de aproximadamente 1kg de peso.

7. Dejar transfiriendo toda la noche

8. Hecha la transferencia, dejar secar la membrana.

9. Entrecruzar la membrana con irradiación UV a 254/312 nm en un stratalinker de Stratagene.

Northern Blot

1. Marcar la sonda con ^{32}P , para ello seguir las instrucciones del Kit HexaLabel DNA Labeling (Fermentas).
2. Una vez detenida la reacción se limpia la sonda en exceso de nucleótidos radioactivos por Micro-Bio Spin Chromatography Columns (BioRad)
3. La sonda marcada y purificada se desnaturaliza incubando con 1/10 de volumen de solución 1N NaOH, 1mM de EDTA por 5 min a temperatura ambiente.
4. Agregar la sonda a la solución de prehibridación donde se encuentra la membrana.

Hibridación

1. Prehibridar una hora a 65°C en horno rotatorio con la siguiente solución precalentada
 - 5x SSC (Ver apéndice)
 - 5x Denhardt's (Ver apéndice)
 - 0.5% SDS
 - ssDNA 100mg/ml (previamente hervido 10 min y colocado en hielo inmediatamente).
2. Agregar la sonda marcada y desnaturalizada.
3. Hibridar a 65°C toda la noche.

Lavados

1. Desechar la solución de hibridación.
2. Hacer los siguientes lavados (50ml por lavado a 65°C)
 - 1 lavado con 2x SSC, 0.2% SDS por 5 min, temperatura ambiente.
 - 2 lavados con 2x SSC, 0.2% SDS por 15min, 65°C.
 - 1 lavado con 0.2x SSC, 0.2% SDS por 30 min, 65°C.
3. Envolver la membrana en egapack y exponer en pantalla de fósforo.
4. Leer la emisión radioactiva con un TYPHOON 8600 phoshoimager.
5. Cuantificar la señal en el programa ImageQuant versión 5.2.

Resultados

Las mutaciones *pet309* Δ 632-962 y *pet309* Δ 760-962 se obtuvieron por técnicas de PCR (Ver material y métodos). Las proteínas truncas que se generaron se esquematizan en la Figura 7.

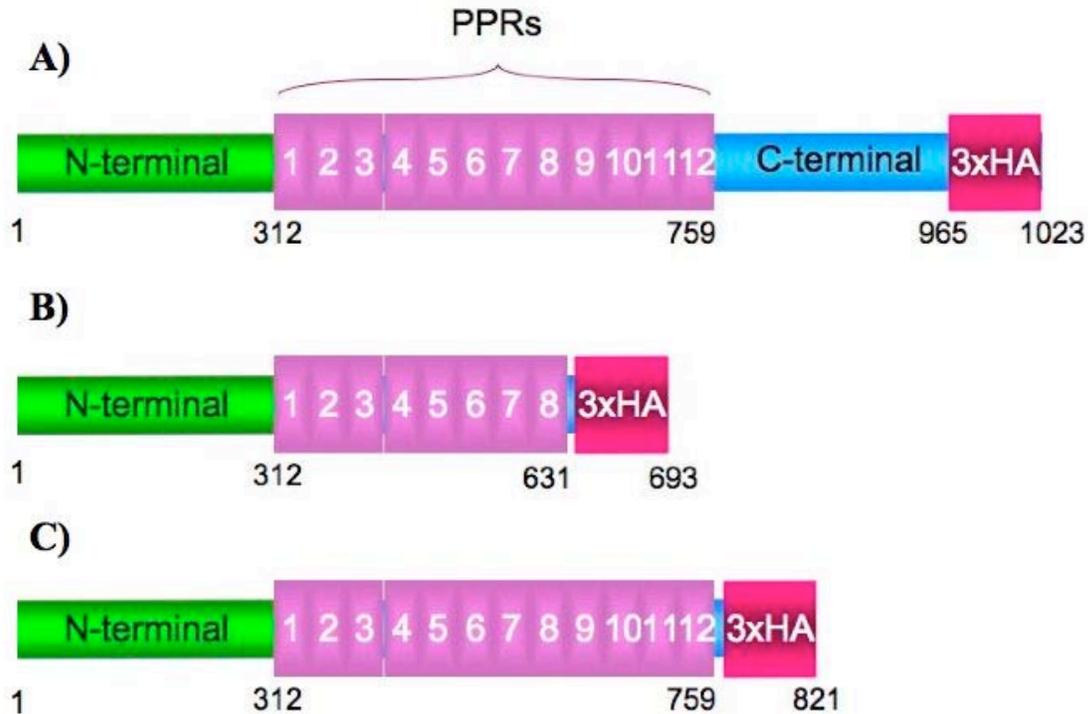


Figura 7. Esquemas de las proteínas que se caracterizarán en el presente trabajo. **A)** Esquema de la proteína Pet309 silvestre etiquetada con el triple epítipo de hemaglutinina. **B)** Esquema de la proteína mutante *pet309* Δ 632-962. **C)** Esquema de la proteína mutante *pet309* Δ 760-962.

Localización subcelular de Pet309

Para demostrar que las mutaciones en Pet309 no afectaron su importación a la mitocondria se realizó un Western Blot en el que se analizaron a las mitocondrias puras de las cepas que expresaban a las diferentes mutantes de *pet309* empleando al vector de bajo número de copias. También se analizaron las fracciones citosólicas obtenidas durante la purificación mitocondrial para asegurarnos de que no hubiera una importación defectuosa.

Utilizando un anticuerpo contra HA, se observó que Pet309 se asocia a las fracciones mitocondriales de las dos mutantes. Como se puede observar, las mutantes *pet309* Δ 632-962 y

pet309Δ760-962 tienen los pesos moleculares esperados de 80 kDa y 95 kDa respectivamente; así como las mitocondrias de la cepa silvestre, con un peso de 120 kDa. En ninguna de las fracciones citosólicas se observó la proteína (Figura 8). Este resultado indica que la región carboxilo terminal de Pet309 no es necesaria para su importación a la mitocondria.

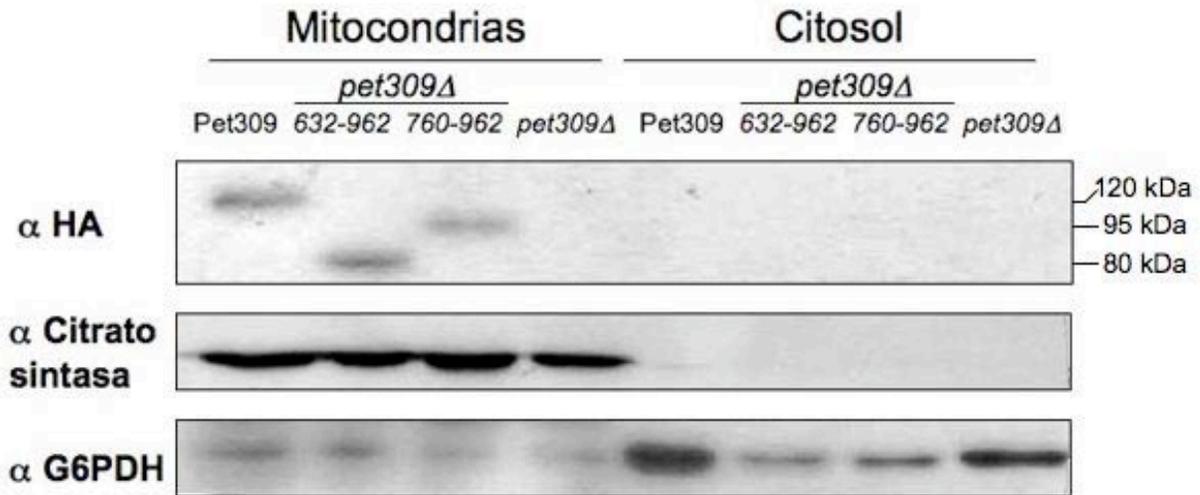


Figura 8. Las mutantes de Pet309 co-purifican con la fracción mitocondrial. Como control se utilizó anticuerpo contra Citrato sintasa (proteína soluble mitocondrial) y anticuerpo contra G6PDH (proteína citosólica). Se cargaron 25µg de proteína en un gel de acrilamida al 12%.

Fraccionamiento mitocondrial

Se sabe que Pet309 es una proteína asociada a la membrana interna mitocondrial (Shingu-Vazquez, 2006; Tavares-Carreón et al., 2008), por lo que se deseaba determinar si las mutaciones afectaban esta característica. Para ello se realizó un fraccionamiento mitocondrial. En este experimento se sonicaron las mitocondrias puras y se separaron las membranas de la fracción soluble por ultracentrifugación. Las proteínas de ambas fracciones se resuelven por medio de SDS-PAGE y se analizan por Western Blot.

En las mutantes, Pet309 apareció en la fracción membranal, al igual que en la cepa silvestre (Figura 9). Por lo tanto, la región carboxilo terminal de Pet309 no es necesaria para su asociación a la membrana.

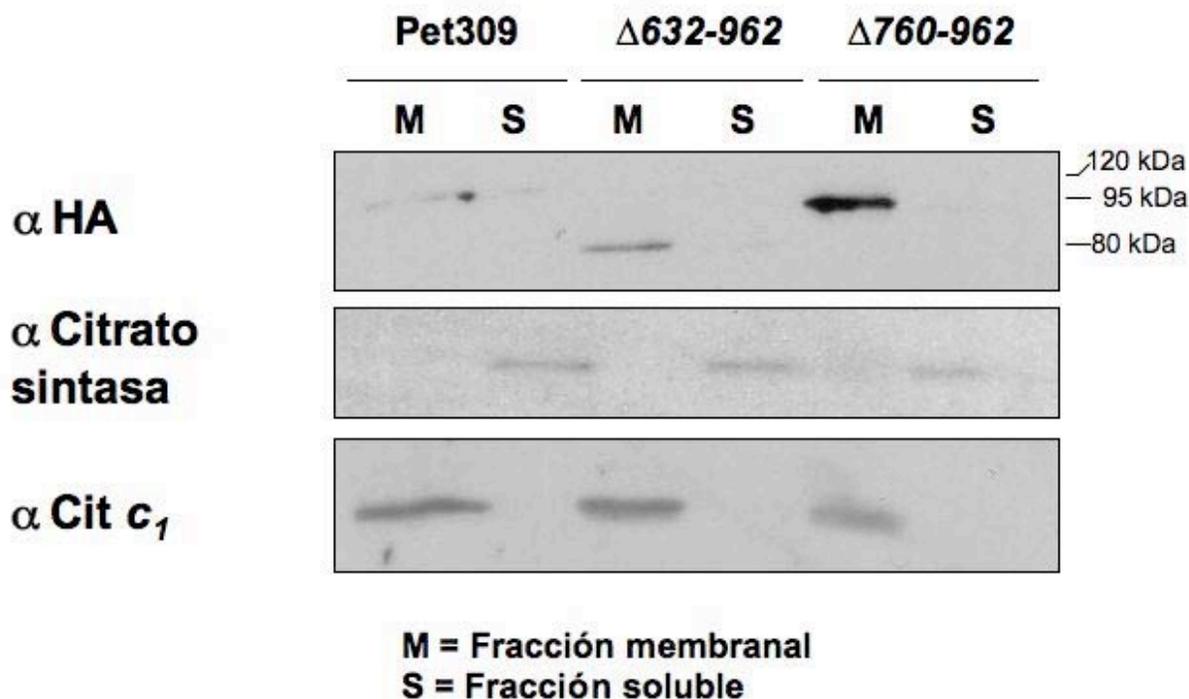


Figura 9. Localización de las mutantes de Pet309 en las fracciones mitocondriales. 200 μ g de proteína mitocondrial se analizaron en un gel de acrilamida al 12%. Se utilizó anticuerpo contra citrato sintasa como control de proteína soluble. Como control membranal se utilizó anticuerpo contra citocromo *c*₁ (Cit *c*₁, subunidad del Complejo III).

Extracción alcalina de las proteínas membranales mitocondriales

En el laboratorio se ha demostrado que Pet309 no tiene ningún cruce transmembranal, es decir, es una proteína periférica de membrana (Shingu-Vazquez, 2006; Tavares-Carreón et al., 2008). Para comprobar que la asociación a la membrana no se hubiera modificado con las mutaciones, se realizó el experimento de extracción alcalina.

En este experimento se incuban a las mitocondrias con carbonato de sodio, el cual compite con los sitios electrostáticos de asociación de las proteínas a la membrana, liberando a las proteínas periféricas. La fase membranal y la fase soluble se separan por ultracentrifugación y las muestras se analizan en un gel desnaturizante. Por último, las proteínas se transfieren y se analizan por Western Blot.

Las proteínas mutantes se comportaron como la proteína silvestre, detectándose en las fracciones solubles (Figura 10).

Este experimento demostró que las mutantes en la región carboxilo terminal son proteínas periféricas de membrana.

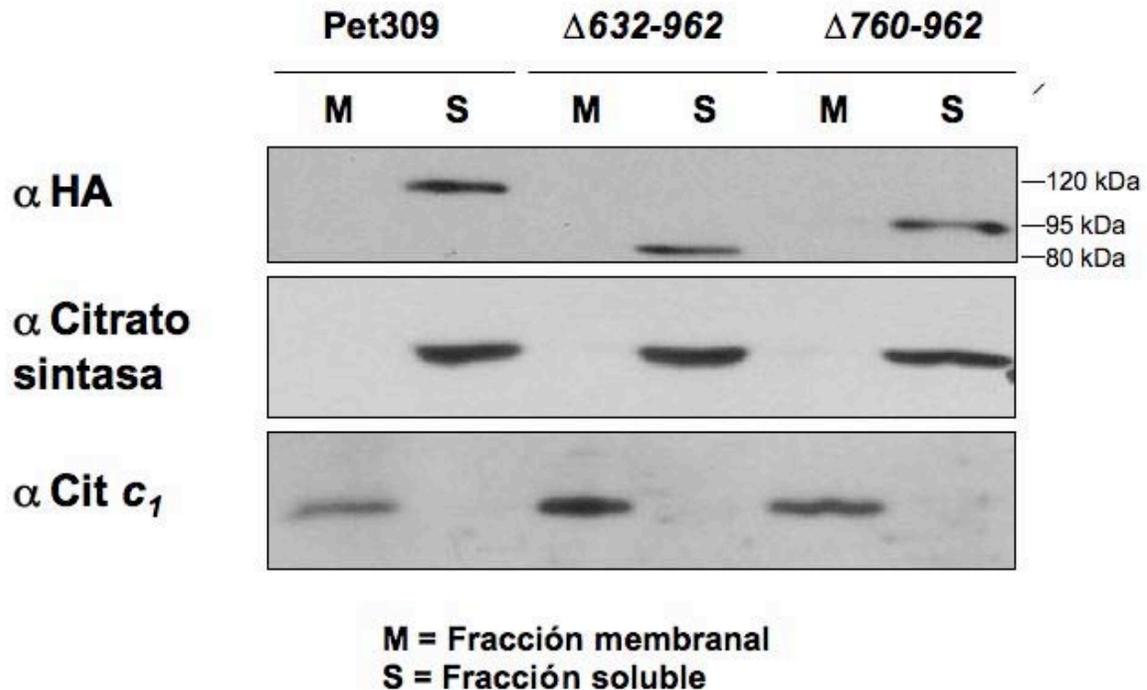


Figura 10. Análisis de la separación de las proteínas mitocondriales por su extracción alcalina. Se utilizó anti citrato sintasa como control de proteína soluble. Se utilizó anti citocromo c_1 (cit c_1 , subunidad del complejo III) como control de proteína integral de membrana. Se analizaron 200 μ g de proteína mitocondrial, por SDS-PAGE al 12%.

Fenotipo respiratorio

Una vez conocida la ubicación subcelular de las mutantes, se quiso saber si la ausencia de la región carboxilo terminal de Pet309 estaba afectando la función respiratoria debido a la participación que esta proteína tiene en el inicio de la traducción de Cox1. Se hicieron diluciones seriadas de las cepas que contenían al gen *pet309* mutante en plásmidos de alto y bajo número de copia en medio selectivo sin uracilo y con glucosa. Para conocer su crecimiento respiratorio se crecieron en medio sin uracilo a base de etanol y glicerol. Las células portadoras de los plásmidos con Pet309 mutada crecieron en medio fermentable (Figuras 11A y 12A). Sin embargo, no fueron capaces de crecer en medio no fermentable a ninguna de las tres temperaturas probadas (Figuras 11B y 12B). En experimentos hechos

previamente en el laboratorio (Shingu-Vazquez, 2006), se ha observado que la presencia del triple epítipo de HA en Pet309 inhibe el crecimiento respiratorio a 37°C. Este resultado fue igual al observado con las diluciones seriadas de estos experimentos (Figura 11B).

Esta falta de crecimiento respiratorio se compensa cuando Pet309, unida al triple epítipo de HA, se sobreexpresa (Figura 12B).

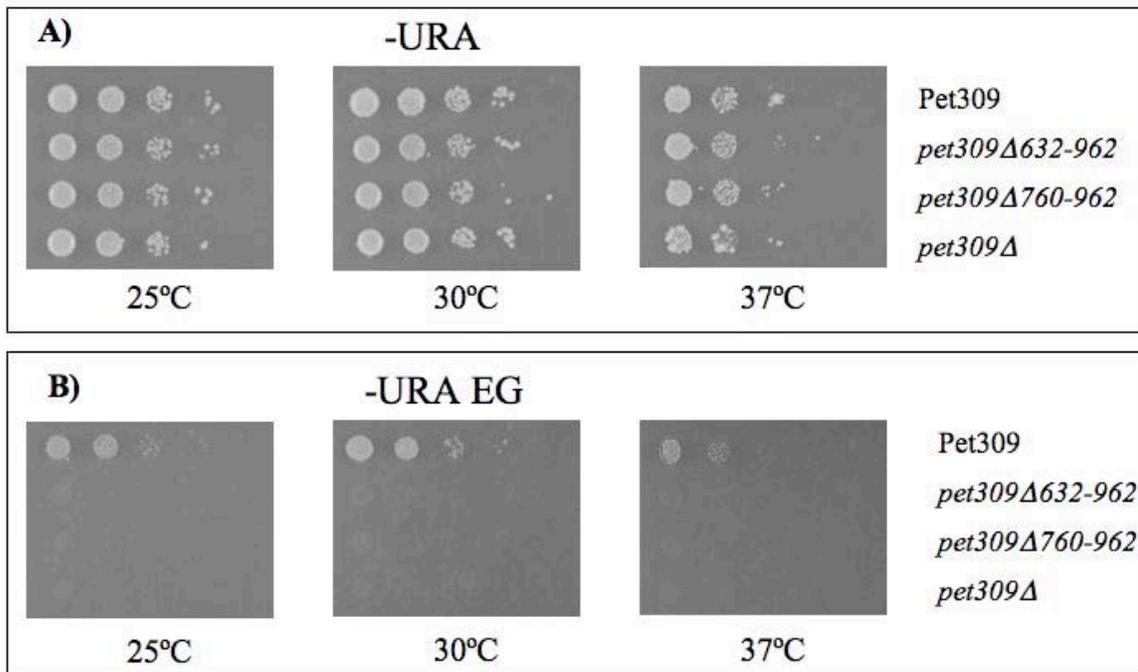


Figura 11. Diluciones seriadas de las mutantes expresadas en plásmido de bajo número de copia. **A)** Crecimiento de las cepas en medio fermentable a base de glucosa sin uracilo (-URA). **B)** Crecimiento de las cepas en medio no fermentable a base de etanol y glicerol sin uracilo (-URAEG). Las cepas se incubaron durante 4 días a 25°C, 30°C y 37°C.

Estos resultados indican que la región eliminada de Pet309 es necesaria para la capacidad respiratoria de *S. cerevisiae*, y que la sobreexpresión de las mutantes que carecen de estas regiones no compensa su función. Debido a las funciones previamente reportadas de Pet309 (Manthey and McEwen, 1995; Tavares-Carreón et al., 2008), la incapacidad respiratoria de las cepas puede deberse a una falla en el funcionamiento del complejo IV.

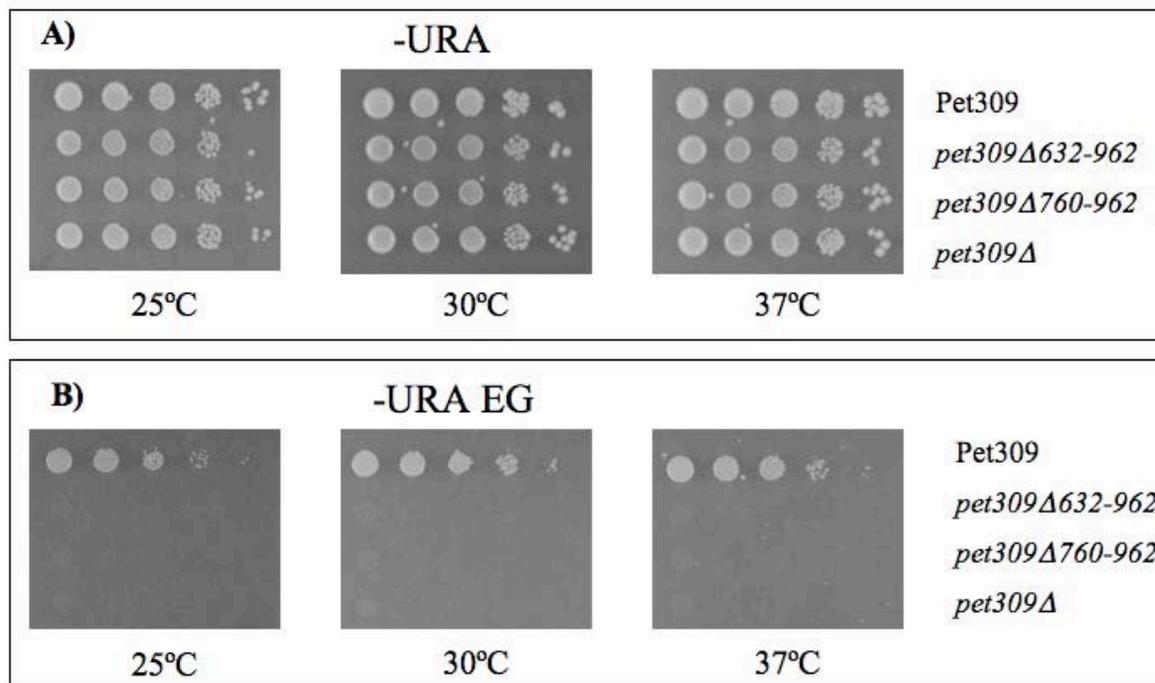


Figura 12. Diluciones seriadas de las mutantes expresadas en plásmido de alto número de copia. **A)** Crecimiento de las cepas en medio fermentable a base de glucosa sin uracilo (-URA). **B)** Crecimiento de las cepas en medio no fermentable a base de etanol y glicerol sin uracilo (-URAEG). Las cepas se incubaron durante 4 días a 25°C, 30°C y 37°C.

Inmunodetección de Cox1 en las mutantes

Se sabe que Pet309 es el activador traduccional de *COX1*, por lo tanto, la causa del fenotipo no respiratorio en las cepas mutantes podría deberse a la ausencia de Cox1. Para probar esta hipótesis, se purificaron mitocondrias de las cepas transformadas con las dos construcciones en los plásmidos de alto y bajo número de copia. También se purificaron mitocondrias de la cepa transformada con los plásmidos que contenían a Pet309 silvestre y de la que contenía a los plásmidos vacíos. Las proteínas mitocondriales se resolvieron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana para su análisis con anticuerpos específicos (Figura 13).

Pet309 se inmunodetectó con anticuerpo anti HA. Se puede observar que en las cepas transformadas con las construcciones en los plásmidos de alto número de copia, Pet309 se

sobreexpresa. Sin embargo, Cox1 sólo se detectó en las cepas transformadas con plásmidos que contenían a Pet309 silvestre.

La acumulación de la proteína Cox1 fue similar entre las cepas que contenían a Pet309 silvestre en los plásmidos de alto y bajo número de copia. Este resultado indica que la acumulación de la proteína Cox1 no es dependiente de la cantidad de Pet309 disponible y que mayores cantidades de Pet309 no conllevan a una mayor acumulación de Cox1. Además se demostró que la región carboxilo terminal de Pet309 es necesaria para la acumulación de la proteína Cox1.

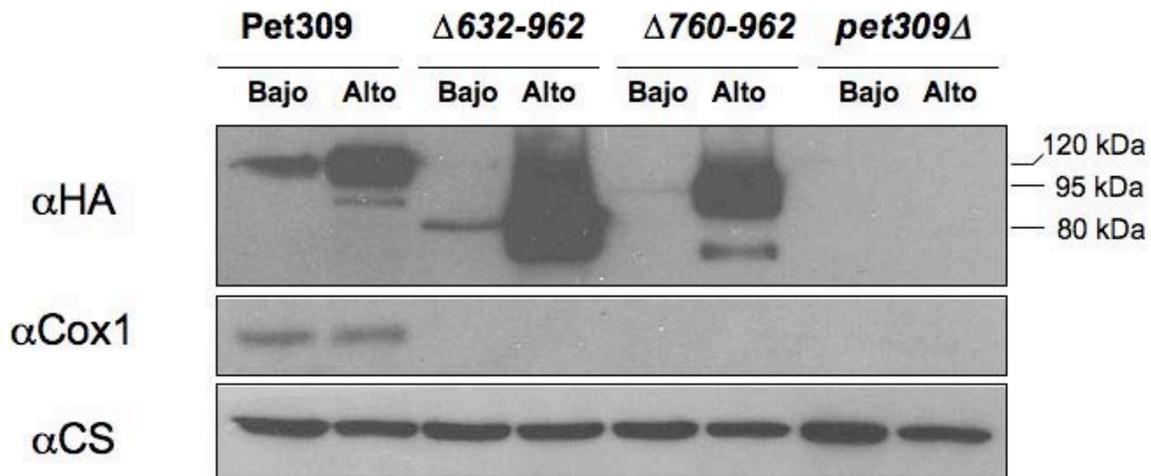


Figura 13. Inmunodetección de Cox1 en las cepas con Pet309 silvestre y mutante en vectores de expresión de alto y bajo número de copias. Como control de carga se utilizó anti citrato sintasa (CS). 50 μ g de proteína mitocondrial se separaron por SDS-PAGE al 12% de acrilamida. Bajo = Cepas con plásmidos de bajo número de copia. Alto = Cepas con plásmidos de alto número de copia.

Síntesis de proteínas mitocondriales *in vivo*

Para descartar que Cox1 se estuviera sintetizando correctamente pero que se degradara por una falla en su inserción, se realizó un experimento de síntesis de proteínas mitocondriales *in vivo*. Este experimento consiste en marcar las proteínas sintetizadas en la mitocondria con metionina radioactiva. Las células completas se incuban con cicloheximida, la cual inhibe a los ribosomas citosólicos; por lo tanto, sólo se llevará a cabo la síntesis de proteínas

codificadas en el DNA mitocondrial. En la mezcla de reacción se agrega también metionina marcada radiactivamente con ^{35}S con el propósito de que todas las proteínas sintetizadas *de novo* incorporen la marca. A continuación se purifican las mitocondrias y las proteínas se separan por SDS-PAGE. Por autorradiografía se analizan las proteínas marcadas.

Todas las proteínas codificadas en el DNA mitocondrial se marcaron en las cepas probadas, exceptuando Cox1, la cual únicamente se marcó en las cepas que contenían a Pet309 silvestre en alto y bajo número de copia (Figura 14). La cantidad de Cox1 marcada fue notablemente mayor en la cepa con Pet309 sobreexpresada que en la cepa transformada con el plásmido de bajo número de copia.

Estos resultados indicaron que la región carboxilo terminal de Pet309 es necesaria para la traducción de *COX1*, y que la sobreexpresión de Pet309 mutante no compensa el defecto en la síntesis de Cox1.

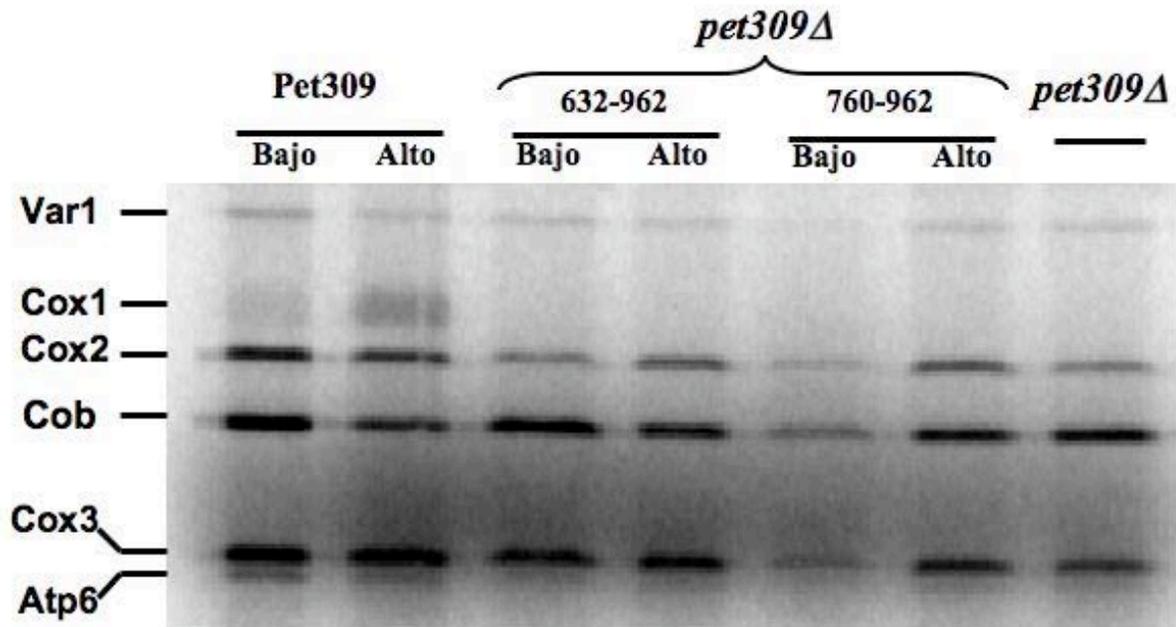


Figura 14. Síntesis de proteínas mitocondriales *in vivo*. Las proteínas fueron marcadas con [^{35}S] Metionina y analizadas por SDS-PAGE y autorradiografía. Se indican las proteínas: Var1, subunidad ribosomal; Cox1, subunidad 1 de la Citocromo *c* oxidasa; Cox2, subunidad 2 de la Citocromo *c* oxidasa; Cob, citocromo *b*; Cox3, subunidad 3 de la Citocromo *c* oxidasa; Atp6, subunidad 6 de la ATPasa. Bajo y alto indican plásmidos de bajo y alto número de copias respectivamente.

El gen *Arg8^m* como reportero de la traducción

El experimento de síntesis de las proteínas mitocondriales *in vivo* sugiere que la razón de la falta de crecimiento respiratorio es el defecto en la traducción de Cox1. Sin embargo, es posible que el efecto observado se debiera a una muy rápida degradación de la proteína, la cual pudiera ocurrir dentro de los 10 min que dura el experimento. Esto impediría detectar a la proteína Cox1 marcada radiactivamente a pesar de que hubiera sido sintetizada.

Para saber si el defecto respiratorio en las cepas portadoras de las mutaciones se debía a la falta de traducción o a una rápida degradación de Cox1, se utilizó una cepa en la cual la región codificante de *COXI* en el DNA mitocondrial está intercambiada por el gen *ARG8^m*. Arg8 es una proteína soluble mitocondrial que participa en la síntesis de arginina. Se codifica en el DNA nuclear, es traducida en el citosol e importada a la mitocondria.

En la cepa utilizada para este experimento, el gen *ARG8* se eliminó del núcleo y se recodificó para expresarse desde el DNA mitocondrial. En este DNA, *ARG8^m* se encuentra flanqueado por los UTRs de *COXI*, por lo que su traducción es dependiente de Pet309 (Perez-Martinez et al., 2003). Por lo tanto, sólo las cepas que cuenten con una proteína Pet309 funcional expresarán el gen *ARG8^m* y serán capaces de vivir en un medio que no contenga arginina.

Esta cepa fue transformada con las dos construcciones de *pet309* trunca en la región carboxilo terminal, en los plásmidos de alto y bajo número de copia previamente mencionados.

Ninguna de las cepas mutantes fue capaz de vivir en un medio sin arginina. Esto se aplicó a bajo (Figura 15) y a alto número de copia (Figura 16), lo cual indica que la región carboxilo terminal de Pet309 es necesaria para la traducción de su mRNA blanco, y que la ausencia del fenotipo respiratorio se debe a la falta de traducción de *COXI*.

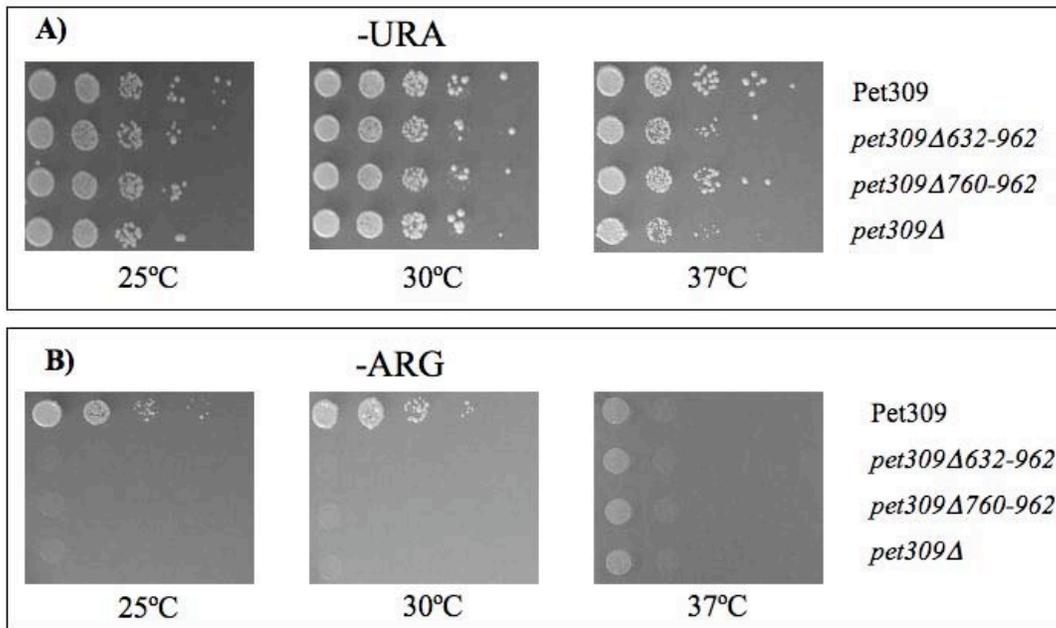


Figura 15. Diluciones seriadas de las mutantes expresadas en plásmido de bajo número de copia en la cepa que contiene al gen reportero de la traducción *cox1::ARG8^m*. **A)** Crecimiento de las cepas en medio fermentable sin uracilo (-URA). **B)** Crecimiento de las cepas en medio sin arginina (-ARG). Las cepas se incubaron durante 4 días a 25°C, 30°C y 37°C.

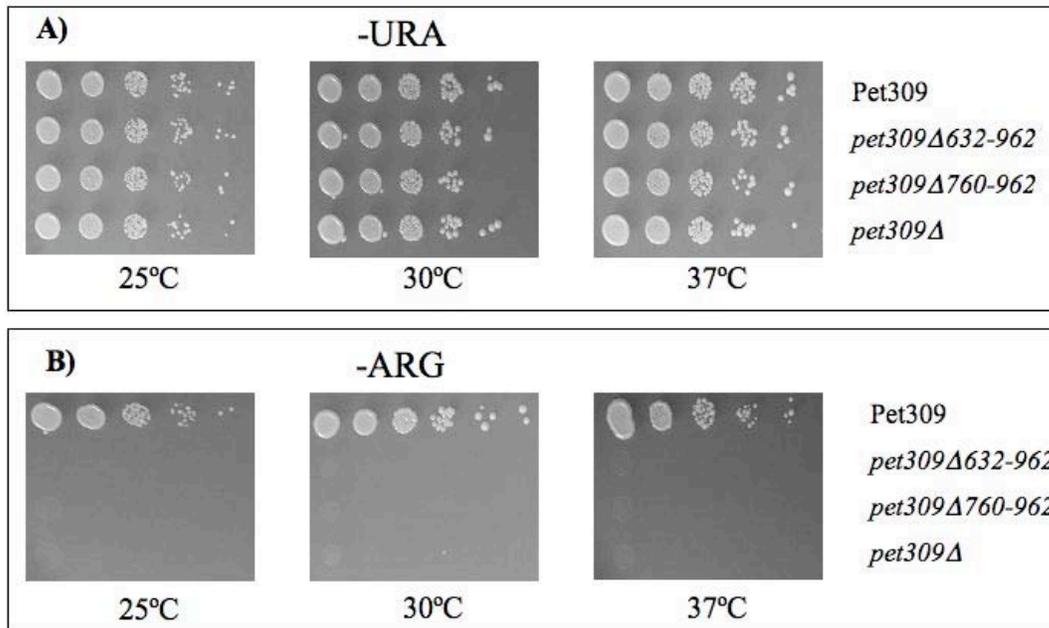


Figura 16. Diluciones seriadas de las mutantes expresadas en plásmido de alto número de copia en la cepa que contiene al gen reportero de la traducción *cox1::ARG8^m*. **A)** Crecimiento de las cepas en medio fermentable sin uracilo (-URA). **B)** Crecimiento de las cepas en medio sin arginina (-ARG) Las cepas se incubaron durante 4 días a 25°C, 30°C y 37°C.

Análisis del RNA mensajero de *COX1*

Se sabe que Pet309 participa en la estabilidad del RNA mensajero de *COX1* (Manthey and McEwen, 1995). En experimentos previos, hemos observado que los dominios PPR de Pet309 no son los responsables de esta estabilidad (Tavares-Carreón et al., 2008). Esta función podría ser realizada por la región carboxilo terminal. Para probarlo, se realizó un experimento de Northern Blot (Figura 17). Se purificó el RNA total de las cepas mutantes en alto y bajo número de copia, así como de las cepas con plásmidos que contenían a Pet309 silvestre y a las cepas transformadas con los dos plásmidos vacíos. Los RNA totales se resolvieron en un gel desnaturante en presencia de formaldehído y se transfirieron a una membrana de Nylon-Hybond. Esta membrana se hibridó con las sondas de 3 genes mitocondriales diferentes, las cuales estaban marcadas radioactivamente con ^{32}P . La membrana hibridada se expuso en una pantalla de fósforo y se analizó en un escáner Typhoon 9400 (Figura 17A)

La cuantificación de las bandas (Figura 17B) indicó que la sobreexpresión de Pet309 silvestre lleva a una acumulación de más del doble del RNA mensajero de *COX1*. Este efecto también se observó en las cepas que sobreexpresaban a *pet309* mutante. El resultado de acumulación del mensajero no se observó en presencia del plásmido vacío de alto número de copia, indicando que la acumulación del mRNA de *COX1* es un efecto dependiente de Pet309.

Sin embargo, en las cepas que contenían a *pet309* mutada en bajo número de copia se observó una disminución de aproximadamente 50% en la cantidad de RNA mensajero de *COX1* respecto a la cepa con Pet309 silvestre en plásmido de bajo número de copia. Esta disminución fue similar a la observada en las cepas que carecían de Pet309, lo cual coincide con reportes previos de mutantes nulas en *PET309* en las que bajan los niveles del mRNA de *COX1* (Manthey and McEwen, 1995).

Estos cambios en la acumulación del mensajero fueron específicos de *COX1*, ya que la cuantificación de las bandas obtenidas con la sonda de *COX2* demostró que este gen no presenta cambio alguno en su transcripción.

Este resultado indica que la región carboxilo terminal de Pet309 es necesaria para la estabilidad del RNA mensajero de *COX1*. Sin embargo, la función de este dominio puede ser compensada por la sobreexpresión de la proteína trunca, la cual tiene un comportamiento similar al de la proteína Pet309 silvestre en sobreexpresión.

Con este experimento podemos afirmar que la falta de traducción de *COX1* no se debe a la falta de estabilidad del mensajero, ya que las cepas con Pet309 trunca en sobreexpresión muestran un fenotipo no respiratorio a pesar de que existe una mayor acumulación del RNA mensajero de *COX1*.

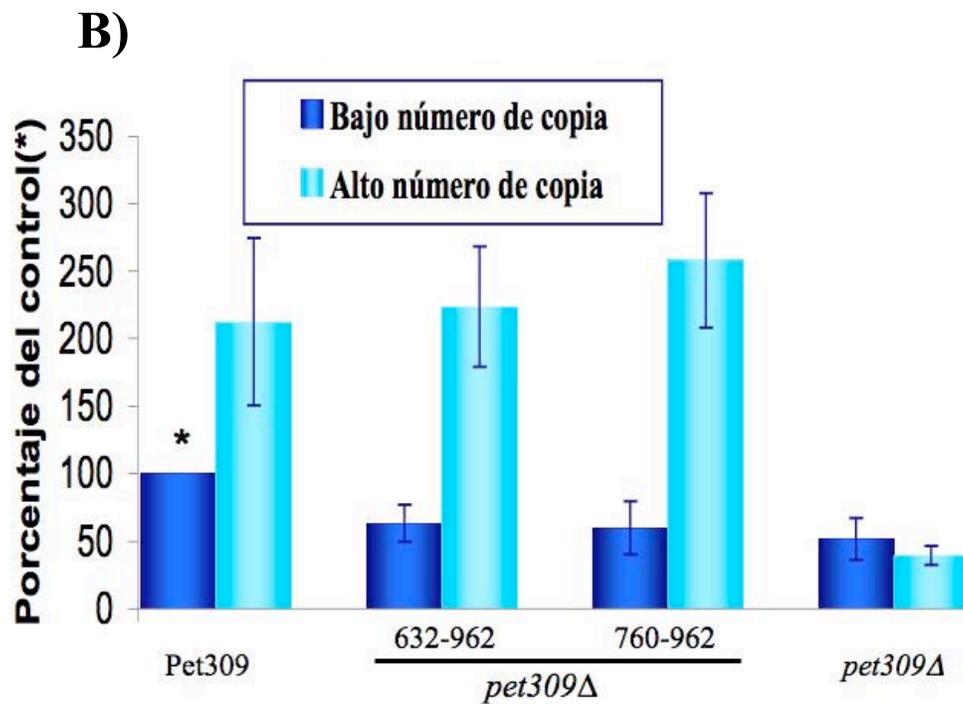
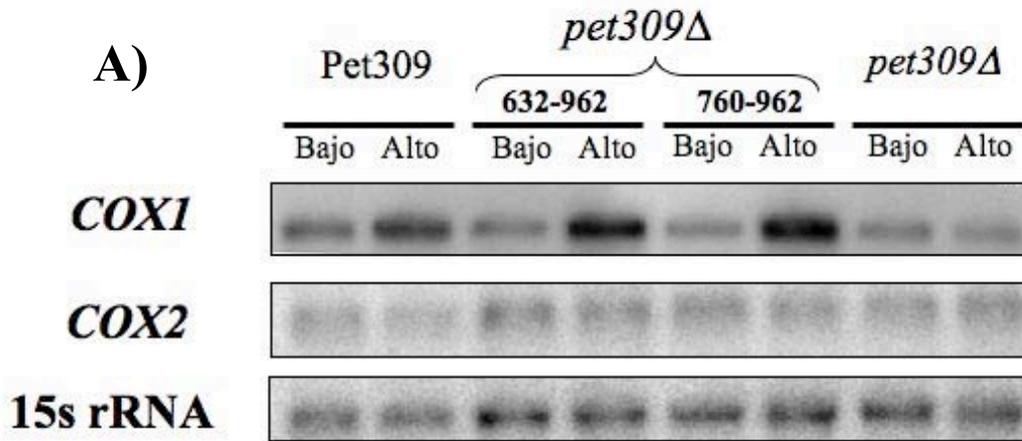


Figura 17. Análisis del RNA mensajero de *COX1* en las mutantes. **A)** Northern Blot a partir de RNA total. Se hibridó con sondas anti *COX1*, anti *COX2* y 15S rRNA como control de carga. Bajo=Cepas con plásmidos de bajo número de copias. Alto=Cepas con plásmidos de alto número de copias. **B)** Gráfica cuantitativa en porcentaje de los niveles de RNA mensajero de *COX1* en las distintas cepas. La cantidad de RNA se normalizó contra los niveles de rRNA 15S. Los porcentajes se calcularon considerando los niveles de RNA de *COX1* de la cepa silvestre en bajo número de copia como 100% (*).

Quimeras de Pet309 con Pet111 y Pet122

Los resultados hasta el momento indican que la región carboxilo terminal de Pet309 participa directamente en la traducción de *COXI*. Sin embargo, no se conoce el mecanismo mediante el cual ejercía su función.

Se ha propuesto que los dominios PPR de Pet309 son los responsables de la unión al RNA mensajero de *COXI* (Tavares-Carreón et al., 2008). Si ésta es la función de los dominios, la región carboxilo terminal podría estar interactuando con el ribosoma para aproximar al RNA mensajero de *COXI* que está por traducirse. Si este fuera el caso, Pet309 no sería el primer activador traduccional con dominios de unión a los ribosomas, ya que se ha comprobado que Pet122, un activador traduccional de *COX3*, interactúa con los ribosomas mitocondriales a través de sus últimos 67 aminoácidos (McMullin et al., 1990).

Valiéndose de la asociación previamente descrita del extremo carboxilo terminal de Pet122 con los ribosomas, se diseñó una quimera que contenía a Pet309 trunca en sus últimos 200 aminoácidos unida a los 67 aminoácidos de Pet122. Si la función del extremo carboxilo terminal de Pet309 es la unión al mitorribosoma, probablemente la adición de estos nuevos aminoácidos la compensará.

También se diseñó una quimera que contuviera los últimos 100 aminoácidos del activador traduccional de *COX2*, Pet111. No existen datos que apoyen que este activador se une al ribosoma, sin embargo, esta construcción se incluyó para investigar el posible papel que podrían tener en común la región carboxilo terminal de todos los activadores traduccionales mitocondriales.

Las construcciones se obtuvieron por PCR y se ligaron en los plásmidos de bajo y alto número de copia. Las células transformadas con las construcciones quiméricas no lograron sobrevivir en un medio no fermentable a base de etanol y glicerol (Figura 18).

Las mismas construcciones en los dos tipos de plásmido se transformaron en la cepa que contiene al gen reportero de la traducción *Arg8^m* en el lugar del gen *COXI*. Este experimento se realizó con la intención de verificar que la razón de la falta de crecimiento respiratorio en presencia de las dos quimeras se debía a la falta de traducción de Cox1. Las cepas que contenían a las quimeras no fueron capaces de sobrevivir en un medio sin arginina.

Los resultados pueden indicar que la función del extremo carboxilo terminal de Pet309 no es la unión al ribosoma. Sin embargo, existen explicaciones alternas como que el sitio de unión a

ribosoma de Pet122 no es compartido por Pet309 o que la combinación quimérica probada interrumpió la estructura proteica, impidiendo su función.

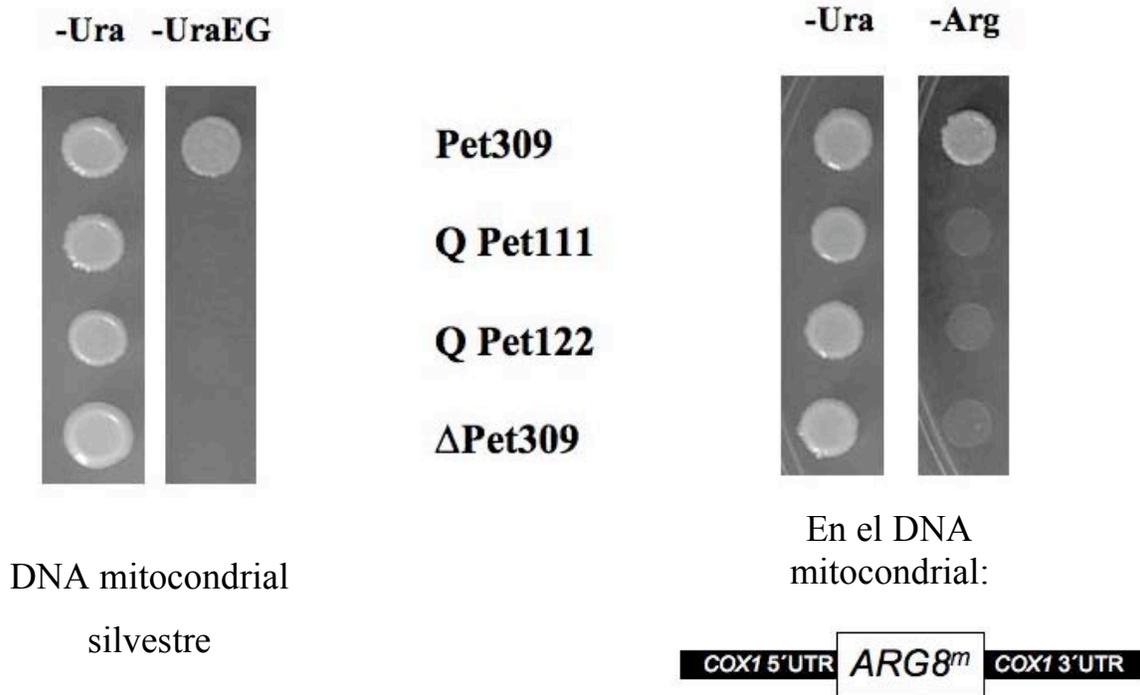


Figura 18. Crecimiento fermentativo y respiratorio de las quimeras de Pet309 con Pet111 y Pet122 en bajo número de copia. Q Pet111 = Se fusionaron los primeros 759 aminoácidos de Pet309 con los últimos 100 aminoácidos de Pet111. Q Pet122 = Se fusionaron los primeros 759 aminoácidos de Pet309 con los últimos 67 aminoácidos de Pet122. Las cepas fueron crecidas en medio sin uracilo y con glucosa(-Ura), medio sin uracilo con etanol/glicerol(-UraEG) y medio sin arginina (-Arg). Las cajas fueron incubadas a 30°C por 4 días. *COX1* 5'UTR = Región 5' no traducida del mRNA de *COX1*. *COX1* 3'UTR = Región 3' no traducida del mRNA de *COX1*. *ARG8^m* = Gen que codifica a la proteína Arg8 ubicado en el DNA mitocondrial.

Pet309 como proteína multidominio

Pet309 podría ser una proteína multidominio donde cada uno de ellos es capaz de trabajar por separado, ya que los dominios PPR predichos se encuentran bien localizados en la parte central, mientras que en la región carboxilo terminal no se predice ningún indicio de ellos. Por lo tanto, este extremo carboxilo podría tener una función diferente que pudiera llevarse a cabo independientemente del resto de la proteína.

Para probar esta hipótesis se utilizó una cepa que contiene la mutación *pet309* Δ 760-962 integrada en el cromosoma, a la cual se le introdujo un plásmido de alto número de copia que contenía a Pet309 sin los 8 dominios PPR más fuertemente predichos. En un trabajo anterior se caracterizó esta mutante trunca en los dominios PPR y se observó que la mutación no afecta su localización submitocondrial (Tavares-Carreón et al., 2008).

Las células que contenían a las dos mutaciones truncas (dominios PPR y región carboxilo terminal), mostraron un fenotipo no respiratorio (Figura 19).

Este resultado indica que los dominios PPR y la región carboxilo terminal de Pet309 no pueden trabajar por separado para cumplir su función en la traducción de *COXI*.

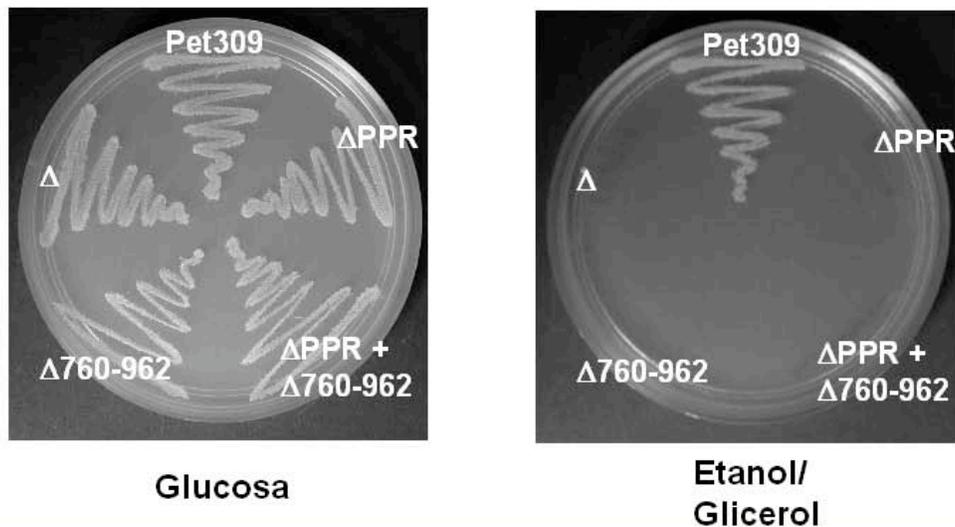


Figura 19. Comparación del crecimiento respiratorio y fermentativo de la mutante *pet309* Δ 760-962 transformada con el plásmido que contiene a la mutante *pet309* Δ PPR. La cepa nula en *pet309* se indica con Δ . Las células se dejaron crecer a 30°C por 2 días.

Mutaciones cortas de la región carboxilo terminal

Debido a la ausencia de respiración de las cepas portadoras de las mutaciones en *PET309*, se intentó identificar el número mínimo de aminoácidos necesarios para que Pet309 fuera funcional. Para ello se crearon 3 mutantes que suprimían 150, 100 y 50 aminoácidos del extremo carboxilo terminal: *pet309Δ813-962*, *pet309Δ863-962* y *pet309Δ913-962*.

Al transformar levaduras nulas en *pet309* con estas construcciones, ninguna de las tres fue capaz de recobrar la capacidad respiratoria (Figura 20).

Concluimos de este experimento que los últimos 50 aminoácidos de Pet309 son necesarios para la respiración en *S. cerevisiae*. Sin embargo, continuaremos haciendo supresiones más cortas en la región carboxilo terminal de Pet309 para identificar el número mínimo de aminoácidos necesarios para obtener una proteína funcional.

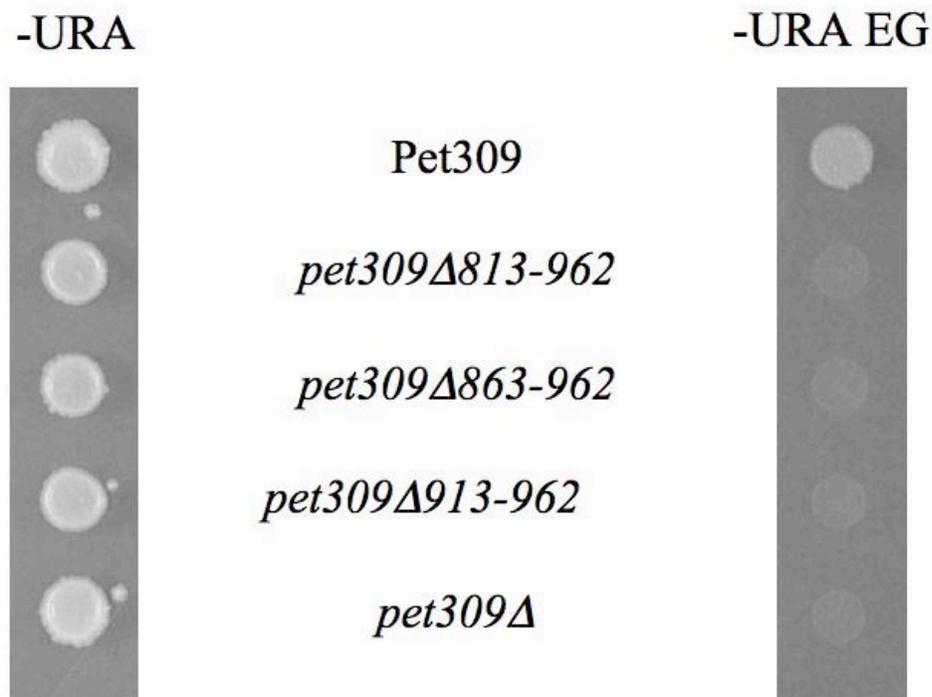


Figura 20. Crecimiento fermentativo y respiratorio de las supresiones de 150, 100 y 50 amino ácidos de la región carboxilo terminal de Pet309 en bajo número de copia. Las células se dejaron crecer a 30°C por 4 días.

Discusión

En este estudio se deseaba estudiar el papel del extremo carboxilo terminal de Pet309 sobre la estabilidad y traducción del RNA mensajero de *COXI*. Para ello se crearon dos mutantes que suprimían esa región. La mutante *pet309Δ632-962* se diseñó tomando en cuenta los 8 dominios PPR predichos más fuertemente, suprimiendo los 330 aminoácidos que les seguían. En la otra mutante, *pet309Δ760-962*, se suprimieron los últimos 202 aminoácidos en los cuales no se predice ningún dominio PPR.

Dos experimentos demostraron directamente la falta de traducción de *COXI* en las dos mutantes de la región carboxilo terminal: la falta de expresión del gen reportero de la traducción *ARG8^m* y la ausencia de la proteína Cox1 marcada radioactivamente en el experimento de la traducción *in vivo* de las proteínas mitocondriales. Estos resultados indican que los últimos 202 aminoácidos de Pet309 son necesarios para la traducción de *COXI*.

Debido a que estos 330 y 202 aminoácidos son aproximadamente el 30% y el 20% de Pet309 respectivamente, era necesario comprobar que la supresión de éstos no hubiera interrumpido por completo la estructura de la proteína. Si este fuera el caso, el efecto observado en la traducción del mRNA de *COXI* no se debería directamente a la falta del carboxilo terminal, si no que sería consecuencia de que los otros dominios no estuvieran funcionando o de que *pet309* mutante no estuviera bien localizada en la mitocondria.

Sin embargo, no parece ser este el caso, ya que los experimentos de localización subcelular indican que las mutantes de *pet309* siguen dirigiéndose a la mitocondria y que se comportan como proteínas periféricas de la membrana mitocondrial, por lo que la falta de traducción no se debe a un defecto en la importación o ubicación subcelular de Pet309.

Los experimentos de ubicación subcelular (fraccionamiento mitocondrial y extracción alcalina de proteínas mitocondriales) demuestran que Pet309 es una proteína periférica de membrana mitocondrial (Figuras 9 y 10) (Tavares-Carreón et al., 2008); contrario a lo que Manthey y col. reportaron en 1998, donde sugieren que Pet309 es una proteína integral de membrana

interna mitocondrial (Manthey et al., 1998). Sin embargo, el grupo de Manthey realizó los experimentos de ubicación submitocondrial en una cepa que sobreexpresaba a Pet309. Se ha reportado que la sobreexpresión de los activadores traduccionales puede llevar a alteraciones en el funcionamiento mitocondrial (Fiori et al., 2005). En este sentido, nuestros experimentos de ubicación subcelular de Pet309 se realizaron en cepas portadoras de los plásmidos de bajo número de copia (Figuras 9 y 10).

El experimento de Northern Blot es la mejor evidencia de que existen dominios de Pet309 que siguen siendo funcionales. Se ha reportado que además de su función en el inicio de la traducción, Pet309 también participa en la estabilización del mRNA de *COXI* (Manthey and McEwen, 1995). Esta función es evidente al sobreexpresar a Pet309 silvestre, ya que la cantidad de mensajero de *COXI* en esta cepa aumenta considerablemente al compararla con una cepa que expresa a Pet309 a niveles fisiológicos (Figura 17).

Cuando las mutantes de *pet309* se sobreexpresaron, se observó una mayor acumulación del RNA mensajero de *COXI* similar al observado con la sobreexpresión de Pet309 silvestre. Este fenómeno no se observó en la cepa que contenía al plásmido vacío de alto número de copia (Figura 17).

Este fenómeno demuestra que Pet309 trunca en la región carboxilo terminal sigue conservando un grado de funcionalidad.

El fenómeno de acumulación del RNA mensajero se había observado previamente en mutantes de Pet309 que carecen de los 8 dominios PPR más fuertemente predichos. En este caso, el RNA mensajero de *COXI* también mostraba altos niveles cuando la mutante era sobreexpresada (Tavares-Carreón et al., 2008).

Pet309 no es el único activador traduccional cuya sobreexpresión conlleva a una mayor acumulación de mRNA: cuando Pet111, el activador traduccional de *COX2*, se sobreexpresa, se observa un incremento del mRNA de *COX2* de aproximadamente 3.3 veces respecto a la cantidad observada a niveles fisiológicos de Pet111. Asimismo, si Pet111 es suprimido, los

niveles de mRNA de *COX2* disminuyen. Estos resultados indican que, al igual que Pet309, Pet111 participa en la estabilización de su RNA mensajero blanco y que la sobreexpresión de estos activadores conlleva a una mayor estabilización del mismo (Fiori et al., 2005).

La estabilización del mRNA blanco por parte de sus activadores traduccionales podría ser una estrategia para la regulación de su síntesis. Se ha demostrado que estos activadores se encuentran en muy bajas concentraciones en la célula (Marykwas and Fox, 1989) . Por lo tanto, su baja expresión podría limitar la estabilidad del mRNA restringiendo a su vez los niveles de traducción.

La expresión de Pet309 en vectores de bajo número de copia es la condición más semejante a lo que ocurre en condiciones fisiológicas. Las dos mutantes de la región carboxilo terminal expresadas en estos plásmidos mostraron una disminución en la acumulación de RNA mensajero de *COX1* de aproximadamente el 50% respecto a la silvestre (Figura 17). Esta disminución fue muy similar a la observada en la cepa nula en Pet309 que contenía al plásmido vacío.

En la mutante que carece de 8 dominios PPR el resultado no fue el mismo. Al expresar a *pet309* sin estos dominios en vectores de bajo número de copia, la acumulación del RNA mensajero de *COX1* fue muy similar a la observada en la cepa con Pet309 silvestre expresada en vector de bajo número de copia (Tavares-Carreón et al., 2008).

Estos resultados indican que la región carboxilo terminal de Pet309 participa en la estabilización del RNA mensajero de *COX1*, no así los dominios PPR.

Se ha propuesto que los dominios PPR de Pet309 interactúan con el RNA de *COX1*, mientras que la región carboxilo terminal de la proteína podría estar uniéndose al ribosoma o a alguna otra proteína que regulara su función. Sin embargo, no se sabe cómo es que la región carboxilo terminal de Pet309 participa en la estabilización del RNA mensajero de *COX1*. Una posible explicación es que la región carboxilo terminal también interactúa con el RNA en un sitio de unión diferente al de los dominios PPR, estabilizándolo. Esta función de

estabilización podría ser cumplida también por otra proteína que se asociara al extremo carboxilo terminal de Pet309 y que interaccionara directamente con el mRNA de *COXI*.

A pesar de que la región carboxilo terminal de Pet309 participa en la estabilidad del RNA mensajero de *COXI*, la evidencia no sugiere que ésta sea la razón de la falta de traducción de la proteína Cox1. La sobreexpresión de las mutantes llevó a una acumulación del RNA mensajero mucho mayor a la observada en la cepa que contenía a Pet309 silvestre en bajo número de copia. Sin embargo, esta acumulación no llevó a la traducción del mRNA de *COXI* indicando que la región carboxilo terminal de Pet309 tiene otro papel además de la estabilización del RNA mensajero de *COXI*.

La observación de que no toda la proteína se encarga de la estabilización del mRNA nos llevó a pensar que Pet309 puede ser una proteína con al menos dos dominios diferenciados (dominios PPR y región carboxilo terminal) y que cada dominio podría trabajar por separado. Sin embargo, la coexpresión de las proteínas *pet309ΔPPR* y *pet309Δcarboxilo terminal* no le devolvió a la levadura la capacidad respiratoria.

Estas dos mutaciones ya se han estudiado por separado y se sabe que en ambas la proteína trunca sigue teniendo la misma ubicación submitocondrial que la proteína silvestre; asimismo se ha observado el fenómeno de acumulación del RNA mensajero cuando son sobreexpresadas (Tavares-Carreón et al., 2008). Esto indica que las dos proteínas siguen teniendo algún grado de funcionalidad. La ausencia de respiración de la cepa cotransformada demuestra que estos dos segmentos de la proteína deben de mantenerse muy cercanos uno al otro para cumplir su función (Figura 19).

La sobreexpresión de Pet309 silvestre conlleva a una acumulación del transcrito de *COXI*. Los resultados obtenidos de la traducción de proteínas mitocondriales *in vivo* indicaron que la sobreexpresión de Pet309 silvestre también lleva a una mayor traducción del mRNA de *COXI* (Figura 14). Sin embargo, el Western blot (Figura 13) mostró cantidades iguales de Cox1 en las mitocondrias, lo cual indica que el exceso de proteína traducida es degradada. Este efecto puede deberse a que el resto de las subunidades siguen expresándose normalmente, por lo que

el exceso de Cox1 no encuentra otras subunidades con las cuales asociarse para formar el complejo de la CcO y se degradará.

Estudios de las proteínas PPR en las plantas han identificado dominios carboxilo terminal conservados en estas proteínas. Estas regiones se clasifican en tres grupos: E, E+ y DYW. Estos motivos se han implicado en el reclutamiento de factores catalíticos. Es decir, mientras que los dominios PPR dan la especificidad por el RNA, los dominios carboxilo terminal podrían estar reclutando a los factores que catalizarán la reacción sobre éste (Saha et al., 2007). Esta hipótesis podría indicar que el carboxilo terminal de una proteína PPR, al no dar especificidad por el sustrato, puede tener una función común con el de otra proteína PPR.

Existen reportes en *Arabidopsis thaliana* que prueban esta hipótesis. Para esto, se utilizaron 2 proteínas PPR que participan en la edición de RNA en cloroplasto: Crr21 y Crr4. Ambas proteínas contienen en su región carboxilo terminal a los dominios E y E+. Los carboxilos terminales de estas dos proteínas se intercambiaron y la función se conservó en ambos casos. Esta función no se mantuvo cuando las dos proteínas carecían de su región carboxilo terminal (Okuda et al., 2007).

Basándonos en este reporte, se hizo lo mismo con la proteína Pet309. Pet309 no muestra ningún dominio E, E+ ni DYW. Sin embargo, la función de la región carboxilo terminal de Pet309 bien podría ser la misma que la de otro activador traduccional. El inconveniente en este caso es que no existe otro activador traduccional que contenga dominios PPR, por lo que optamos por los últimos 67 aminoácidos de la proteína Pet122, activador traduccional de *COX3*. Se sabe que esta región interactúa genéticamente con algunas proteínas ribosomales, y era probable que compartiera la función con el extremo carboxilo terminal de Pet309.

Además de esta quimera, también se fusionaron los últimos 100 aminoácidos de Pet111, activador traduccional de *COX2*, a nuestra mutante de Pet309. No existen datos de la función de esta región, pero podría ser similar a la de Pet309.

Ambas quimeras mostraron un fenotipo no respiratorio. Sin embargo, este resultado no prueba que la región carboxilo terminal de Pet309 no interactúe con los ribosomas. La adición de 100 ó 67 aminoácidos diferentes a los originales pudo afectar la estructura general de Pet309 y por lo tanto su función. Incluso si este no fuera el caso, el sitio de unión de Pet122 o Pet111 al ribosoma puede ser diferente al sitio de unión de Pet309.

El triple epítotope de hemaglutinina fusionado al extremo carboxilo terminal de la proteína también podría tener un efecto negativo en la función de Pet309. En el medio no fermentable a 37°C, el crecimiento de la cepa silvestre con el triple epítotope fue muy pobre (Figura 11). Esta observación ya se había hecho en el laboratorio, al comparar a las cepas con Pet309 silvestre con o sin el triple epítotope a esta misma temperatura (Shingu-Vazquez, 2006). No se sabe la causa de esta diferencia en el crecimiento. Sin embargo, este defecto en el crecimiento a 37°C no se observa cuando Pet309-3xHA se sobreexpresa (Figura 12). Esto indica que el exceso de Pet309 con epítotope es capaz de compensar la falta de actividad de Pet309-3xHA a niveles fisiológicos. El defecto en la actividad de Pet309-3xHA podría deberse a que el epítotope dificulta la interacción con alguna otra proteína que es necesaria para su actividad. A niveles de sobreexpresión, el exceso de Pet309 compensaría esta interacción incompleta.

Esta hipótesis podría probarse buscando levaduras revertantes, es decir, que una célula portadora del triple epítotope fusionado a Pet309 mutara espontáneamente algún gen relacionado que pudiera suprimir el defecto en el crecimiento respiratorio a 37°C. Esta mutación podría dar información del papel que está teniendo el triple epítotope y, por lo tanto, de las funciones y relaciones de Pet309 con otras proteínas.

En la figura 21 se ilustra un posible modelo de acción de la proteína Pet309.

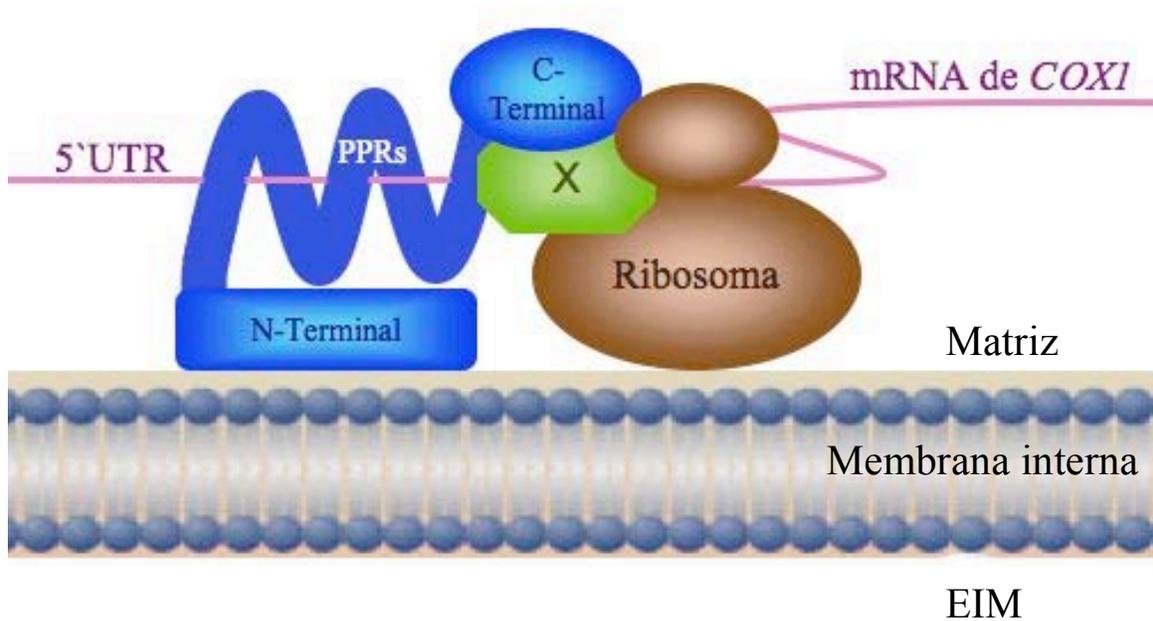


Figura 21. Modelo de acción de Pet309. La región amino terminal está unida a la membrana interna mitocondrial. Los dominios PPR unen el 5'UTR del mRNA de *COXI*. La región carboxilo terminal une al ribosoma y a una proteína estabilizadora del mRNA (proteína "X"). EIM = Espacio intermembranal.

Conclusión

La región carboxilo terminal de Pet309 es necesaria para la estabilidad y la traducción del RNA mensajero de *COXI*.

Perspectivas

- Comprobar la asociación de Pet309 con el ribosoma.
- Estudiar si la asociación de Pet309 con el ribosoma se da a partir de su región carboxilo terminal.
- Estudiar la asociación de Pet309 con otras proteínas a partir del extremo carboxilo terminal.
- Investigar el mecanismo por el cual Pet309 estabiliza al RNA mensajero de *COXI*.

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
Adenina	0.03 g

-URA*

Base nitrogenada sin aminoácidos	6.7g
Dextrosa	20g
Medio drop out sin uracilo	770mg

-URA EG*

Base nitrogenada sin aminoácidos	6.7g
Medio dropout sin uracilo	770mg
Glicerol	30ml
Etanol	30ml

-URA Raf*

Base nitrogenada sin aminoácidos	6.7g
Rafinosa	20g
Medio dropout sin uracilo	770mg

-Met Raf*

Base nitrogenada sin aminoácidos	6.7g
Rafinosa	20g
Medio dropout sin metionina	750mg

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-SO ₄ pH 9.4	0.1 M
DTT	10 mM

MP2

Sorbitol	1.2 M
Amortiguador de fosfatos (pH 7.4)	20 mM

Zimoliasa-20T (Accurate Chemical and Scientific Corporation) 3mg/g peso húmedo

Homogenización (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

Medio SEH

	1X	2X
HEPES pH 7.4	20 mM	40mM
Sorbitol	0.6 M	1.2 M
EDTA	1mM	2 mM

Nicodenz (Accurate Chemical and Scientific Corporation)

Hacer una solución al 50% en agua.

Amortiguadores para el fraccionamiento mitocondrial

Solución CH

NaCl	100mM
HEPES pH 7.4	20mM

Amortiguadores para la extracción alcalina de mitocondrias

Solución de Na₂CO₃, pH 11.5.

Preparar una solución 200 mM de Na₂CO₃. No ajustar pH.

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

Amortiguador de transferencia negativo.

Ácido ϵ -amino- <i>n</i> -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 réplica en Western

Solución de bloqueo

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

Solución de réplica*

Leche en polvo descremada	0.1 g
Tris 1M, pH 7.6	100 μ l
NaCl 5M	200 μ l
EDTA 500mM	20 μ l
Tween-20 al 50%	200 μ l
H ₂ 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 ₂ O	a 1 l

Solución de eliminación

β-mercaptoetanol	700 μl
Tris 1M, pH 6.8	6.25 ml
SDS 10%	20 ml
H ₂ O	a 100 ml

Diluciones usadas para los anticuerpos

Anti HA/peroxidasa (clona 3F10)	1:500 (Roche)
Anti C1	1:2000 (Donado por Diego Gonzáles)
Anti Cox1	1:200 (Mitosciences)
Anti CS	1:1000 (Donado por Thomas D. Fox)
Anti G6PDH	1:10,000 (Sigma)
Anti conejo/peroxidasa	1:5000 (Sigma)
Anti ratón/peroxidasa	1:3000 (BioRad)

Amortiguador SHP para la traducción *in vivo* de proteínas mitocondriales

Sorbitol	0.6M
HEPES	20mM
Inhibidor de proteasas (Sigma)	3.3μl/10ml de amortiguador

Amortiguadores para el gel desnaturalizante de RNA

Amortiguador MOPS 10X para electroforesis de RNA

MOPS	41.8g
Acetato de Sodio	6.8g
EDTA	3.7g

Amortiguador de corrida

Diluir el MOPS10X a 1X con H₂O DEPC.

Amortiguador de muestra para RNA

Glicerol	5ml
EDTA pH8	200ml
Azul de bromofenol	25mg
Xylene cianol	25mg
H ₂ O	a 10ml

Amortiguador SSC 10x para transferencia de RNA

NaCl	175.3g
Citrato de Sodio	88.2g
Ajustar a 1litro con H ₂ O	
Ajustar pH a 7.0 con HCl	

Solución Denhardt's 50X

1% BSA
1% Ficoll
1% PVP

Filtrar con membrana de 0.45mm

Secuencias de los oligonucleótidos

Nombre	Secuencia	Comentarios
F4	GTCACAGAATAAGGTACCAGCGAATTCC	
F16	gccgaattctAAATTCAGGGAACAAAAGCTGGAGCT	La secuencia en minúsculas incluye un sitio de corte ECORI
F17	AGTAAATTCAGGGAACAAAAGCTGGAGC	
F25	TAGAAATGCATATATCATATTGTATAATC	
HAF	AGGGAACAAAAGCTGGAGCTCC	
HAR	GGAGCTCCAGCTTTTGTCC	
PET111F1	gtattgaaaacattgaaaacAATCATAGGGCAAGCCTGAT	La secuencia en minúsculas es complementaria al oligonucleótido R22
PET111 R1	caaatgatatatgcatttCTACTCCTCCTCTTTTATTCT	La secuencia en minúsculas es complementaria al oligonucleótido F25
PET122 F1	gtattgaaaacattgaaaacGCTGCCCTGGCGTTGTTGG	La secuencia en minúsculas es complementaria al oligonucleótido R22
PET122 R1	acaatatgatatatgcatttCTATGTGTGATTTCAAATCC	La secuencia en minúsculas es complementaria al oligonucleótido F25
R4	CCGAACTCGAGGATTTGGTTTTCAAGTTACAC	
R12	gtccctgaatttactGTTTTCAATGTTTTCAATACGATCC	La secuencia en minúsculas es complementaria al oligonucleótido F17
R22	GTTTTCAATGTTTTCAATACGATCC	
R23	gtccctgaatttactCGATATATTATCTAAAATAAAACC	La secuencia en minúsculas es complementaria al oligonucleótido F17
R24	gtccctgaatttactACTGGACTGCGTCTTATCCTCGG	La secuencia en minúsculas es complementaria al oligonucleótido F17
R25	gtccctgaatttactAATACCGTCCAAATATGTGTCTAA	La secuencia en minúsculas es complementaria al oligonucleótido F17

The Pentatricopeptide Repeats Present in Pet309 Are Necessary for Translation but Not for Stability of the Mitochondrial COX1 mRNA in Yeast*

Received for publication, October 10, 2007, and in revised form, November 21, 2007. Published, JBC Papers in Press, November 26, 2007, DOI 10.1074/jbc.M708437200

Faviola Tavares-Carreón, Yolanda Camacho-Villasana, Angélica Zamudio-Ochoa, Miguel Shingú-Vázquez, Alfredo Torres-Larios, and Xochitl Pérez-Martínez¹

From the Departamento de Bioquímica, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, Apartado postal 70-243, Mexico City 04510, Mexico

Pet309 is a protein essential for respiratory growth. It is involved in translation of the yeast mitochondrial COX1 gene, which encodes subunit I of the cytochrome *c* oxidase. Pet309 is also involved in stabilization of the COX1 mRNA. Mutations in a similar human protein, Lrp130, are associated with Leigh syndrome, where cytochrome *c* oxidase activity is affected. The sequence of Pet309 reveals the presence of at least seven pentatricopeptide repeats (PPRs) located in tandem in the central portion of the protein. Proteins containing PPR motifs are present in mitochondria and chloroplasts and are in general involved in RNA metabolism. Despite the increasing number of proteins from this family found to play essential roles in mitochondria and chloroplasts, little is understood about the mechanism of action of the PPR domains present in these proteins. In a series of *in vivo* analyses we constructed a *pet309* mutant lacking the PPR motifs. Although the stability of the COX1 mRNA was not affected, synthesis of Cox1 was abolished. The deletion of one PPR motif at a time showed that all the PPR motifs are required for COX1 mRNA translation and respiratory growth. Mutations of basic residues in PPR3 caused reduced respiratory growth. According to a molecular model, these residues are facing a central cavity that could be involved in mRNA-binding activity, forming a possible path for this molecule on Pet309. Our results show that the RNA metabolism function of Pet309 is found in at least two separate domains of the protein.

encoded in the mitochondrial DNA. Expression of the mitochondrial-encoded subunits is highly regulated by proteins involved in transcription, transcript stability and processing, translation, and assembly into the mitochondrial inner membrane (3–5).

In humans, deficiency in COX assembly is associated with mitochondrial disorders. The majority of these are caused by autosomal recessive mutations that affect COX assembly factors (6, 7). An example of such a factor is the mRNA-binding protein Lrp130 (8, 9). Mutations in the *LRP130* gene have been associated with the neurodegenerative disorder Leigh syndrome of the French Canadian type (10). These patients lack fully functional COX activity, associated with defects in the COX1 and COX3 transcripts (9).

It has been proposed that *PET309* is the yeast homologue of *LRP130* (10), with 37% of similarity over 300 amino acids. Both genes seem to participate in mRNA processing and may have similar functions in mitochondria. Pet309 is a translational activator necessary for Cox1 synthesis. It specifically acts on the 5'-UTR of the COX1 mRNA to activate translation. In addition, it is required to stabilize the pre-COX1 transcript (11). It has been observed that translational activators specific for the COX1, COX2, and COX3 mRNAs interact with each other and with the mitochondrial inner membrane (12–15), suggesting that the activators promote that translation initiation takes place close to the insertion and assembly sites of the three COX subunits in the mitochondrial inner membrane (15, 16).

Both Lrp130 and Pet309 contain several pentatricopeptide repeats (PPRs). These repeats belong to a protein family that is very large in plants, with at least 442 members in *Arabidopsis thaliana*. However, there are fewer examples of these proteins in fungi, animals, and protists (17, 18). Pet309 is the only yeast translational activator that has been found to contain PPR motifs. In general, PPR proteins are usually found to localize in mitochondria and chloroplasts. It is known from the small set of PPR proteins studied to date that they participate mostly in different steps of sequence-specific RNA metabolism. They are implicated in precursor transcript stability and processing (which includes splicing and editing) (19–23), as well as in translation (11, 19, 24, 25). However, in a few examples specific RNA-binding activity or their natural RNA targets has been demonstrated (21, 26). These proteins play essential roles in plant embryogenesis, cytoplasmic male sterility restoration,

Biogenesis of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase (COX)² complex depends on a large set of proteins. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae* more than 20 nuclear genes have been found to be necessary for assembly and maintenance of the functional COX (1–3). The enzyme in mammals and yeast is composed of 13 and 12 subunits, respectively. The core of the enzyme is formed by subunits Cox1, Cox2, and Cox3, which are

* This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Grant 47514), Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Universidad Nacional Autónoma de México (Grants IN201805 and IN200507). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 52-55-5622-5662; Fax: 52-55-5622-5630; E-mail: xperez@ifc.unam.mx.

² The abbreviations used are: COX, cytochrome *c* oxidase; UTR, untranslated region; PPR, pentatricopeptide repeat; TPR, tetratricopeptide repeat; HA, hemagglutinin.

TABLE 1

S. cerevisiae strains used in this study

Strain name	Nuclear (mitochondrial) genotype	Reference
XPM232	<i>Mata ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG pet309Δ::LEU2 (ρ+, ΔΣai)</i>	This study
XPM231	<i>Mata ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG pet309Δ::LEU2 (ρ+, cox1Δ::ARG8^m)</i>	This study
XPM201	<i>Mata ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG (ρ+, ΔΣai)</i>	This study
XPM10b	<i>Mata ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG (ρ+, cox1Δ::ARG8^m)</i>	52
SB5	<i>Mata ura3Δ ade2 PET309::3xHA (ρ+)</i>	S. A. Broadley

and chloroplast to nucleus retrograde signaling (for examples see Refs. 17, 27, 28).

PPRs are degenerated 35-amino acid motifs proposed to consist of two antiparallel α helices. There is no structural information about PPR proteins, but models based on the closely related TPR (tetratricopeptide repeat) proteins suggest that the tandem repeats of these domains form a solenoid-like structure with a hydrophilic cavity where the phosphate skeletons of RNA might interact (29).

Despite the growing number of PPR proteins discovered and characterized to date, very little is understood about the specific role of the PPR motifs present in these proteins. Yeast Pet309 provides a useful model of a PPR protein to elucidate the mechanism of action of the PPR motifs. Pet309 is predicted to contain at least seven PPR motifs located in the central portion of the protein. To test the function of the repeats present in Pet309, a set of deletions of the PPR motifs was constructed and analyzed. A model of the Pet309 PPR region was generated, and site-directed mutagenesis was carried out on residues that are predicted to be necessary for mRNA binding. It was shown that all the seven PPR repeats present in Pet309 are necessary for *COX1* mRNA translation, and that mutation of basic residues that could be facing the inner cavity of the PPR structure decrease Pet309 activity. Surprisingly, the *COX1* mRNA levels were not affected by the PPR deletions, showing that the mRNA stability function of Pet309 is independent of the PPR domains.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Strains, Media, and Genetic Methods—The *S. cerevisiae* strains used in this study are listed in Table 1. All strains are derived from strain D273-10B. Genetic manipulation and standard media recipes were as previously described (30). Yeast were cultured in complete fermentable media (1% yeast extract, 2% Bacto-peptone) or synthetic complete media (0.67% yeast nitrogen base, supplemented with the appropriate amino acids), containing 2% glucose, 2% raffinose or 3% ethanol-3% glycerol. The *pet309Δ::LEU2* deletion construct was obtained by PCR. Strains XPM201 and XPM10b were transformed with the PCR product (31), and correct integration of the *pet309Δ::LEU2* construct was confirmed by PCR.

Plasmid Constructs—Total DNA from the strain SB5 was used to amplify the PET309::HA sequence, including 310 and 205 bp of the PET309 5'- and 3'-UTR, respectively. This product was ligated into XbaI-XhoI sites of pBluescript to generate plasmid pXP96. In addition, the product was subcloned into the XbaI-XhoI sites of yeast expression vectors pRS416 (32) and YE352 (33) to generate pXP97 and pXP104, respectively. All pet309 mutant sequences were generated by fusion PCR (34), using Accuzyme DNA polymerase (Biolone) and pXP96 as the DNA template. The PCR products obtained from the PPR

region of *pet309* were ligated into PstI-EcoRI pXP96. After sequencing the constructs the complete *pet309* genes were subcloned into XbaI-XhoI pXP97 or pXP104 to generate yeast expression plasmids.

Analysis of Mitochondrial Proteins—Mitochondria were isolated from late logarithmic phase cells grown on synthetic complete media without uracil, containing 2% raffinose. Crude mitochondria were isolated and purified by centrifugation on 5–25% Nycodenz gradients (35).

Mitochondria separation into membrane and soluble fractions, and alkaline carbonate extractions of membranes were as described (36–38). Mitoplasting and proteinase K treatment were carried out as previously described (38). Total cellular extracts were isolated from cells grown to mid-log phase on synthetic complete media without uracil, containing 2% raffinose (39).

Proteins were separated by SDS-PAGE on a 12.5% gel (40). Western blots were probed with anti-HA-horseradish peroxidase (Roche Biochemicals), anti-Cox1 (Molecular probes), anti-citrate synthase, anti-Arg8p, anti-Yme1p (the three provided by T. D. Fox), anti-cytochrome *c1* (provided by D. González-Halphen) or anti-glucose-6-phosphate dehydrogenase (Sigma) antibodies. Secondary goat anti-rabbit or anti-mouse IgG conjugated to horseradish peroxidase (Sigma or Bio-Rad) was detected with the ECL or ECL+ kits (GE Healthcare).

Synthesis of Mitochondrial Proteins—Translation in isolated mitochondria in the presence of [³⁵S]methionine was performed as described (41). After translation, mitochondria were washed with 0.6 M sorbitol, 20 mM HEPES, pH 7.4, and the radiolabeled proteins were separated on a SDS-PAGE gel, blotted into protran nitrocellulose membrane, and analyzed with a Typhoon 8600 PhosphorImager (Amersham Biosciences).

Northern Blot Analyses—Total RNA was prepared using the TRIzol reagent (Invitrogen) from yeast cultures grown to late log phase on raffinose-synthetic complete media lacking uracil. RNA was blotted to Hybond XL membrane (GE Healthcare). Blots were probed sequentially with the radioactively labeled *COX1* exon 4, *COX2* and with the 15S rRNA gene (42) to standardize the loading. Blots were analyzed with a Typhoon 8600 PhosphorImager and quantitated with ImageQuANT 5.1 software.

Modeling for the PPR Region in Pet309—A search using the TPRpred server (43) against the whole Pet309 sequence revealed the presence of 11 putative PPR motifs located between residues 312 and 759. The six motifs with the lowest *p* value ($\sim 1e-07$ – $1e-06$, which indicates 1×10^{-7} to 1×10^{-6}) correspond to one segment of the protein comprising residues 347–560. Using this fragment of the sequence, the HHpred server (44) revealed an alignment with the six tandem TPRs of

PPR Domains of Pet309 Are Required for COX1 Translation

the crystal structure of PiIF (45) (PDB code 2ho1) from *Pseudomonas aeruginosa*, with 10% identity extending over 213 residues. Only five residue insertions of one residue each occur in

the alignment, all at the level of the junctions between the repeats. The three-dimensional model of the PPR repeats was constructed using SWISSMODEL (46) alignment interface mode. Fig. 6 was created with PyMOL, and the electrostatic potentials were calculated with the program APBS (47).

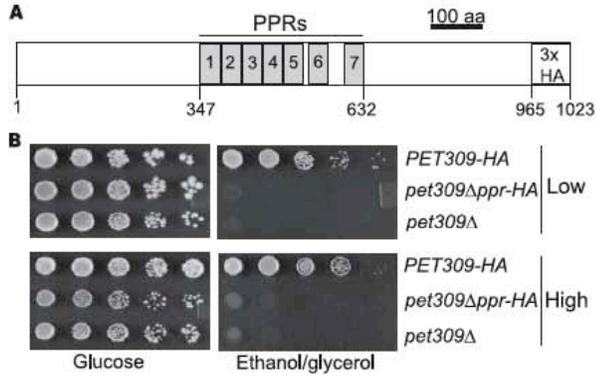


FIGURE 1. The PPR motifs present in Pet309 are necessary for respiratory growth. A, diagram showing the seven predicted PPR motifs (gray boxes) to be present in the central region of Pet309. Residue numbers are as indicated. B, the strain XPM232 was transformed with low copy number plasmids (Low) or high copy plasmids (High) bearing the wild-type *PET309-HA* gene, the *pet309Δppr-HA* gene, or empty vector (*pet309Δ*). 10-fold serial dilutions of the transformants were spotted on synthetic complete medium lacking uracil with either glucose or ethanol/glycerol, and incubated for 4 days at 30 °C.

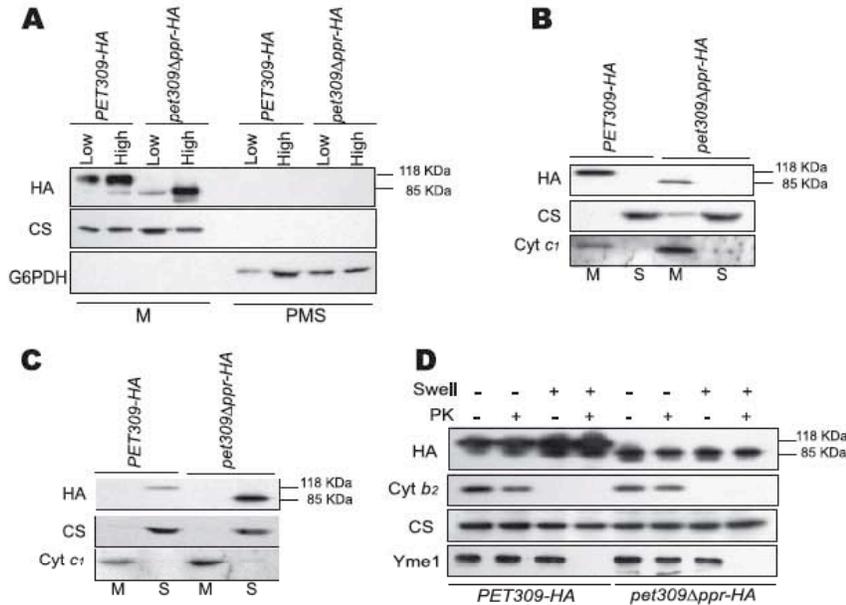


FIGURE 2. Localization of the Pet309Δppr-HA protein in mitochondria. Mitochondria were prepared from strains expressing the wild-type *PET309-HA* or the *pet309Δppr-HA* constructs, in a low copy (Low) or high copy plasmid (High). A, 10 μg of protein from mitochondria (M) and post-mitochondrial supernatant (PMS) were analyzed by SDS-PAGE, and the Western blot was probed with the antibodies anti-HA to detect Pet309, anti-citrate synthase (CS) as marker for a mitochondrial protein and glucose-6-phosphate dehydrogenase as marker for a cytosolic protein. B, 100 μg of mitochondria from strains bearing low copy plasmids were sonicated and separated into a membrane pellet (M) and a soluble supernatant (S) by centrifugation. The Western blot was decorated with the antibodies anti-HA, anti-CS as a soluble protein marker and anti-cytochrome *c*₁ (Cyt *c*₁) as an integral membrane protein marker. C, 100 μg of mitochondria from strains expressing the *pet309-HA* alleles on low copy plasmids were subjected to alkaline Na₂CO₃ extraction. Integral membrane pellets (M) were separated from solubilized proteins (S) by centrifugation. After SDS-PAGE, the Western blot was probed with the indicated antibodies. D, 100 μg of mitochondria from strains bearing low copy plasmids were converted to mitoplasts by osmotic shock in the absence or presence of proteinase K (PK) (100 μg/ml). Samples were resolved by SDS-PAGE, immunoblotted, and probed with anti-HA, anti-cytochrome *b*₂ (Cyt *b*₂) as an intermembrane space marker, anti-CS as a matrix marker and anti-Yme1, which is an inner membrane protein with a large domain facing the intermembrane space.

RESULTS

The PPR Region of Pet309 Is Necessary for Respiratory Growth—

A comparison of the Pet309 sequence against the TPRpred server reveals the presence of 11 PPR motifs in the central portion of the protein. To understand the role of the PPR domain we created a deletion from residues 347 to 632 (*pet309Δppr*), which corresponds to the 7 most strongly predicted PPR motifs (having the lowest *p* values) (Fig. 1A). To facilitate detection of Pet309, the protein was tagged at its C terminus with three tandem copies of an HA epitope. The presence of the triple-epitope in wild-type Pet309 did not interfere with the respiratory growth of cells as judged by the ability of *PET309-HA* to fully complement the *pet*⁻ phenotype of a *pet309Δ::LEU2* mutant. Both the wild-type *PET309-HA* and the *pet309Δppr-HA* genes were cloned in the vectors pRS416 and YEep352 to allow expression in yeast in low copy or multiple copy plasmids, respectively. The plasmids were transformed into a yeast *pet309Δ::LEU2* mutant, and the respiratory growth of the resulting strains was examined (Fig. 1B). The wild-type *PET309-HA* supported normal growth on non-fermentable carbon sources, whereas the *pet309Δppr-HA* strain could not grow on a non-fermentable carbon source. A similar phenotype was observed in cells expressing the single copy or multiple copy expression plasmids, suggesting that overexpression of the mutant protein did not compensate for the absence of the PPR domain of Pet309.

To investigate the basis of the non-respiratory phenotype of the *pet309Δppr-HA* strain we first looked to see if the mutant protein was localized in mitochondria. Mitochondrial and post-mitochondrial supernatant fractions were obtained from strains transformed with the low copy and high copy plasmids bearing the wild-type *PET309-HA* or the mutant *pet309Δppr-HA* genes (Fig. 2A). The protein Pet309 was specifically recognized by the anti-HA antibody as a 118-kDa band for the wild-type *PET309-HA* or 85-kDa band for the *pet309Δppr-HA* strain. These polypeptides were not detectable in mitochondria bearing the untagged *PET309* gene or the empty plasmids

to see if the mutant protein was localized in mitochondria. Mitochondrial and post-mitochondrial supernatant fractions were obtained from strains transformed with the low copy and high copy plasmids bearing the wild-type *PET309-HA* or the mutant *pet309Δppr-HA* genes (Fig. 2A). The protein Pet309 was specifically recognized by the anti-HA antibody as a 118-kDa band for the wild-type *PET309-HA* or 85-kDa band for the *pet309Δppr-HA* strain. These polypeptides were not detectable in mitochondria bearing the untagged *PET309* gene or the empty plasmids

PPR Domains of Pet309 Are Required for COX1 Translation

(data not shown). Greater accumulation of the Pet309 polypeptides was observed under multiple copy expression. These polypeptides were not detectable in the post-mitochondrial supernatant fractions, indicating that the Pet309 Δ ppr-HA protein co-purified with mitochondria.

Next, we investigated whether the Pet309 Δ ppr-HA protein was membrane-bound or soluble. Mitochondria from strains bearing the *PET309-HA* or the *pet309 Δ ppr-HA*, low copy plasmids were sonicated and centrifuged. Both the wild-type Pet309-HA and the mutant Pet309 Δ ppr-HA proteins were present in the membrane pellet (Fig. 2B) and absent from the soluble supernatant. Alkaline Na₂CO₃ extraction of the mitochondrial membranes solubilized the wild-type Pet309-HA and the Pet309 Δ ppr-HA proteins (Fig. 2C), indicating that both behave as peripheral membrane proteins.

To examine the submitochondrial location of the Pet309 proteins, purified mitochondria were converted to mitoplasts by osmotic shock treatment and were subjected to protease digestion. Both Pet309-HA and Pet309 Δ ppr-HA proteins were protected from proteinase K treatment in mitochondria and in mitoplasts (Fig. 2D). This result indicates that both proteins are facing the matrix side of the inner membrane. These results are different from what was observed by Manthey (13), who reported that Pet309-c-Myc was an integral inner membrane protein. However, in that work, a high copy plasmid was used to overexpress the Pet309-c-Myc protein. Overexpression of translational activators has been associated with problems in mitochondrial gene expression (48, 49) and could affect their interaction with the mitochondrial inner membrane. For this reason we analyzed the Pet309-HA proteins expressed from low copy plasmids.

Taken together, these results indicate that the respiratory defect of *pet309 Δ ppr-HA* mutants is not due to a mitochondrial mislocalization of the protein. The association of the mutant protein to the mitochondrial inner membrane and its submitochondrial localization were not altered by the absence of the PPR domains. These observations, together with the capacity of the mutated protein to stabilize the *COX1* mRNA (see below) strongly suggest that the Pet309 Δ ppr-HA protein is not misfolded.

The PPR Motifs in Pet309 Are Required for Translation of the *COX1* mRNA—Pet309 had been previously demonstrated to be necessary for the translation and stability of the *COX1* mRNA (11). We investigated the effect of the PPR domain deletion on expression of the *COX1* gene. Western blot analysis of mitochondrial protein extracts showed no accumulation of the Cox1 protein in the *pet309 Δ ppr-HA* mutant (Fig. 3A). The mutant did not accumulate Cox1 even in *pet309 Δ ppr-HA* high copy expression. Interestingly, overexpression of the wild-type Pet309-HA led to a substantial decrease in the Cox1 accumulation (3.5-fold). This observation is in agreement with the idea that overexpression of translational activators can lead to defects on the biogenesis of their target genes (49). Overexpression of Pet309 could lead to formation of inactive Pet309 aggregates that could affect accumulation of Cox1 (48).

To investigate the effect of the *pet309 Δ ppr-HA* mutation on *COX1* translation, we first analyzed [³⁵S]methionine-labeled proteins from mitochondria carrying the *pet309 Δ ppr-HA*

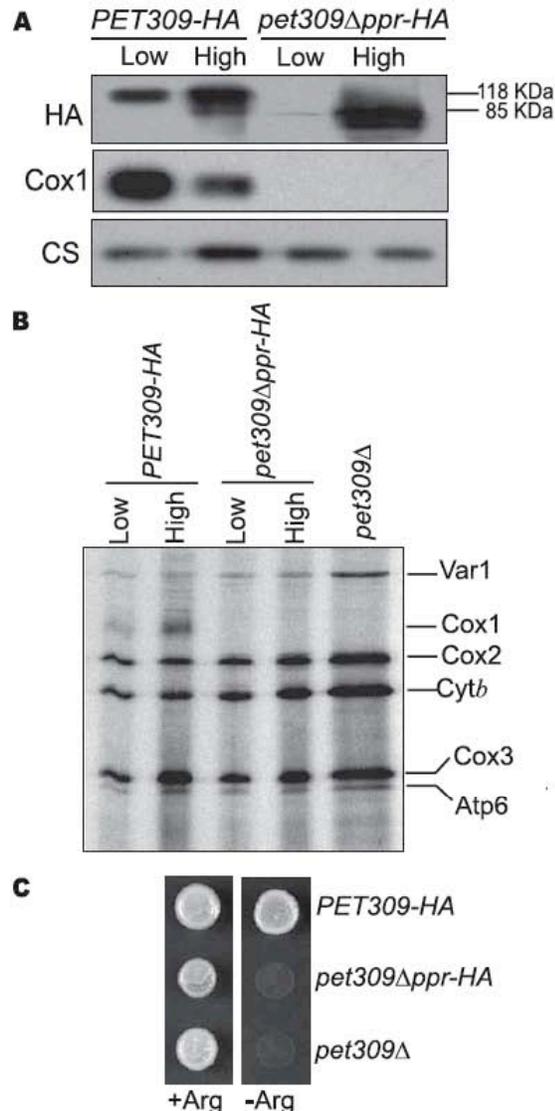


FIGURE 3. The PPR domains present in Pet309 are required for *COX1* mRNA translation. **A**, mitochondria from strains expressing the wild-type *PET309-HA*, the *pet309 Δ ppr-HA*, or empty vector (*pet309 Δ*), in low copy (*Low*) or high copy plasmids (*High*) were separated by SDS-PAGE. Western blot was probed with antibodies anti-HA to detect Pet309, anti-Cox1, and anti-citrate synthase (CS) as loading control. **B**, translation in mitochondria (10 mg/ml) in the presence of [³⁵S]methionine was performed at 30 °C for 20 min. Translation products were analyzed as described under "Experimental Procedures." Cytochrome c oxidase subunit 1, *Cox1*; subunit 2, *Cox2*; subunit 3, *Cox3*; cytochrome b, *Cytb*; subunit 6 of ATPase, *Atp6*; ribosomal protein, *Var1*. **C**, growth phenotypes of strains carrying the *cox1 Δ ::ARG8^m* mitochondrial gene. Cells from strain XPM231 bearing the high copy plasmids were grown on liquid minimal media lacking uracil and spotted on glucose minimal media lacking uracil (+Arg) or arginine (-Arg), and incubated for 3 days at 30 °C.

mutation in low copy or high copy expression plasmids (Fig. 3B). Labeling of Cox1 was reduced to undetectable levels by the *pet309 Δ ppr-HA* mutation even in overexpression conditions. As expected, labeling of Cox1 in strains with the wild-type *PET309-HA* was normal, whereas a null mutation (*pet309 Δ*) completely prevented Cox1 labeling. These results suggest that

PPR Domains of Pet309 Are Required for COX1 Translation

the PPR domain of Pet309 is necessary for the *COX1* mRNA translation. To corroborate this, we created a *pet309Δ::LEU2* strain in which the mitochondrial reporter gene *ARG8^m* replaced the *COX1* coding sequence (*cox1Δ::ARG8^m*). The *ARG8^m* product is a matrix-soluble protein involved in arginine biosynthesis (50). This reporter has been widely used to analyze translation of mitochondrial genes (49, 51–53). Translation of *cox1Δ::ARG8^m* has been demonstrated to be dependent upon Pet309 (52). In cells carrying the wild-type *PET309-HA*, the *cox1Δ::ARG8^m* gene supported growth in Arg[−] medium (Fig. 3C). In contrast, cells bearing the high copy or low copy (data not shown) *pet309Δppr-HA* gene required arginine to grow, confirming that the PPR domain present in Pet309 is necessary for the *COX1* mRNA translation.

The PPR Motifs in Pet309 Are Not Required for Stabilization of the COX1 mRNA—Pet309 is also involved in the *COX1* mRNA stability, as null mutants show a reduced accumulation of the mature *COX1* mRNA (11). This effect is particularly strong when the *COX1* gene has introns, but it is also observed with the intronless *COX1* gene (11). We analyzed whether deletion of the PPR repeats present in Pet309 could affect the *COX1* mRNA accumulation.

Levels of the *COX1* mRNA in cells bearing the intronless *COX1* gene were analyzed by Northern blot and normalized to the mitochondrial 15S rRNA (Fig. 4). In wild-type cells expressing the high copy *PET309-HA* gene, the *COX1* mRNA signal was increased 2-fold as compared with the low copy *PET309-HA* cells. A similar pattern was obtained for the *pet309Δppr-HA* cells. This effect was specific for *COX1*, because the *COX2* mRNA levels were not affected in any sample. It has been suggested that high levels of translational activators could stabilize their target mRNAs (49). This result indicates that Pet309 lacking the PPR repeats still has the capacity to stabilize the *COX1* mRNA. In contrast, the null *pet309* mutant showed a reduced accumulation of the *COX1* mRNA as compared with the *PET309-HA* or the *pet309Δppr-HA* cells.

We conclude that the PPR domains present in Pet309 are necessary for translation of the *COX1* mRNA. However, the absence of these repeats does not affect the *COX1* mRNA stability. Moreover, high expression of the *pet309Δppr-HA* protein caused accumulation of the *COX1* mRNA, as observed for the wild-type Pet309-HA protein.

Each One of the Seven PPR Repeats of Pet309 Is Necessary for Cox1 Synthesis—We next asked whether deletion of single PPR repeats could affect translation of the *COX1* mRNA. A *pet309Δ::LEU2* strain was transformed with high copy plasmids carrying single deletions of each PPR (*pet309Δppr₁₋₇-HA*). Western blot analysis of total cell extracts revealed the presence of a 114-kDa band whose migration in our SDS-PAGE system was indistinguishable from the wild-type Pet309-HA protein (Fig. 5A).

None of the seven PPR mutants were able to grow on the non-fermentable carbon source ethanol/glycerol (Fig. 5B), suggesting that translation of the *COX1* mRNA was affected. To evaluate this hypothesis we tested the Arg growth of cells carrying the *cox1Δ::ARG8^m* gene in the mitochondrial DNA (Fig. 5C). None of the seven mutants supported Arg growth in a media lacking arginine, indicating that each one of the PPR

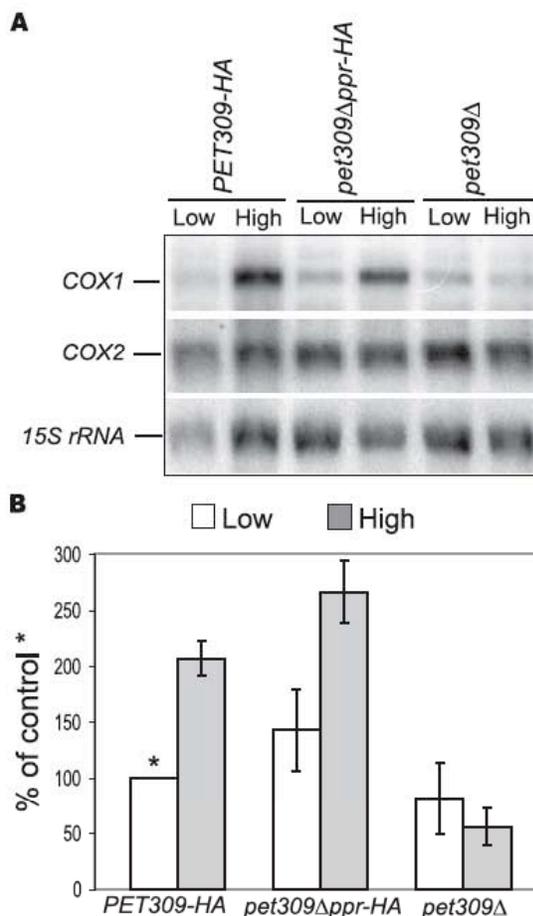


FIGURE 4. The PPR region of Pet309 is not necessary to stabilize the *COX1* mRNA. A, 10 μ g of total RNA from strains bearing the wild-type *PET309-HA*, the *pet309Δppr-HA* gene or empty vector (*pet309Δ*), in low copy (Low) or high copy plasmids (High) were analyzed by Northern blot hybridization and phosphorimaging. The blot was probed with the indicated probes. Cells carry the intronless *COX1* gene. B, quantification of the *COX1* signal normalized to the 15S rRNA signal was performed using the ImageQuANT software. An asterisk indicates the 100% value of the control sample. Values are the mean of four independent experiments.

repeats present in Pet309 is necessary for *COX1* mRNA translation.

Similar Pet[−] and Arg[−] phenotypes were obtained with cells carrying the low copy plasmids (data not shown). Deletion of each PPR did not affect *COX1* mRNA levels, whereas overexpression of the mutant proteins led to increased accumulation of the *COX1* mRNA (data not shown). This strongly suggests that the translational activation and the mRNA stabilization activities of Pet309 are located on two different functional regions of the protein.

Mutagenesis of Basic Residues Inside the PPR Central Groove Affect the COX1 mRNA Translation—Based on similarities with the TPR motifs, PPR motifs are predicted to consist of two α helices (named A and B). Tandem PPR motifs are predicted to form a superhelix enclosing a groove, which is positively charged. This charge could be involved in nucleic acid binding. The side chains that face the inner groove are predicted to come

PPR Domains of Pet309 Are Required for COX1 Translation

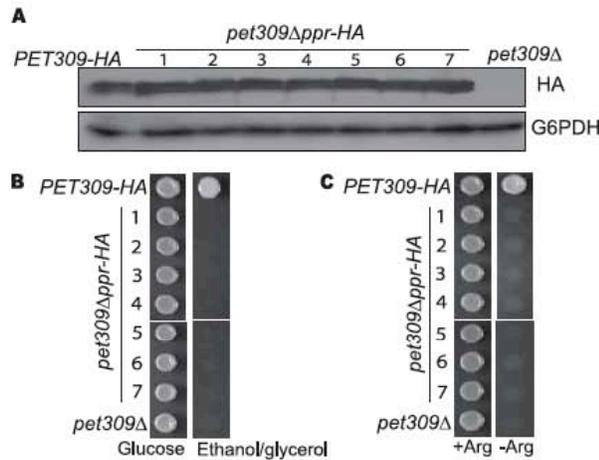


FIGURE 5. Each PPR repeat present in Pet309 is necessary for translation of the COX1 mRNA. Strains expressing the wild-type *PET309-HA*, the *pet309Δppr_n* constructs bearing single deletions of each PPR, or empty plasmid (*pet309Δ*) were grown on synthetic complete liquid media lacking uracil. Strains bear the high copy plasmids. Each deleted repeat in Pet309 is indicated by numbers. **A**, total cell extracts were obtained. A sample of 50 μ g of proteins was analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting. Western blot was probed with anti-HA antibody to detect Pet309-HA and with anti-glucose-6-phosphate dehydrogenase antibody as loading control. **B**, cells were grown on liquid synthetic complete medium lacking uracil and spotted in the same medium with either glucose or ethanol/glycerol, and incubated for 3 days at 30 °C. **C**, cells carrying the *cox1Δ::ARG8^m* mitochondrial gene were spotted on synthetic complete medium lacking uracil (+Arg) or lacking arginine (–Arg), and incubated for 4 days at 30 °C.

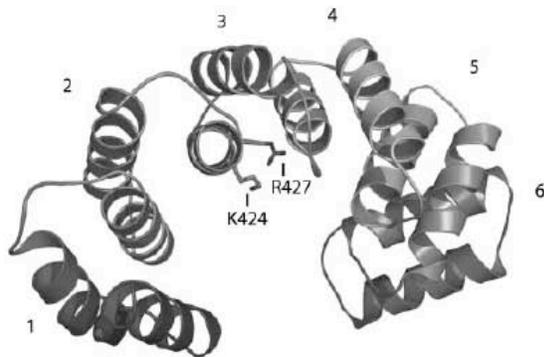


FIGURE 6. Model of six PPR motifs present in Pet309. The structure prediction was generated based on the crystal structure of the TPR protein PiIF (45). The mutated residues are indicated by arrows, and each PPR is indicated by numbers.

from helix A (29). Based on the crystal structure of the TPR protein PiIF (45), a model for six PPR repeats present in Pet309 was generated (Fig. 6). The model suggested that several side chains of basic residues are facing the central groove. This contributes to the calculated groove's highly positive electrostatic potential (data not shown) and is in agreement with the proposed structural model of PPR proteins (29). If the prediction is correct, lowering the positive charges within the central groove of Pet309 should affect the function of the protein.

To test this hypothesis, selected arginines or lysines from PPR3 were mutagenized to alanines (Fig. 6). The mutations were: K424A, R427A, and K424A/R427A. All these residues are presumably present in helix A of the PPR3 and are facing the

inner groove of the PPR region. The *pet309-HA* mutants were cloned in single copy or high copy expression vectors and transformed into a *pet309Δ::LEU2* strain. When expressed on low copy plasmids, the mutants K424A and R427A failed to grow robustly on non-fermentable carbon sources (Fig. 7A); however, under high copy expression the mutants showed normal respiratory growth compared with the wild-type *PET309-HA* strain. Thus, overexpression of the mutant proteins could compensate for the respiratory defect observed under low expression of the Pet309 mutants. As expected, the double mutant K424A/R427A showed a stronger respiratory defect, compared with the single mutants. This defect could not be bypassed by overproduction of the mutant Pet309 protein.

The respiratory growth defect observed for the mutants was related to a defect in the *COX1* mRNA translation. Arg growth of the mutants was analyzed in strains bearing the *cox1Δ::ARG8^m* gene (Fig. 7B). The Arg phenotype of these strains followed the same pattern: the single mutants supported weak growth in media lacking arginine when expressed in single copy plasmids, whereas in high copy plasmids they showed wild-type Arg⁺ growth. The double mutant showed a weaker Arg growth than the single mutants, and its overexpression didn't compensate for the Arg growth defect.

These results indicate that basic residues that presumably are facing the PPR inner groove of Pet309 are important for translation of the *COX1* mRNA. These residues could directly be involved in the specific interaction of Pet309 with the *COX1* mRNA.

DISCUSSION

It is well established that a set of proteins from the PPR family are involved in mRNA translation in chloroplasts (25, 54, 55) and mitochondria (11, 24). Pet309 from yeast was the first PPR protein described to be essential for translation and stability of the *COX1* mRNA. In this work, we have demonstrated that the PPR domains present in Pet309 are necessary for translation of the *COX1* mRNA. Genetic evidence demonstrates that Pet309 associates with the 5'-untranslated region of the *COX1* mRNA to activate translation (11). Although biochemical evidence for this is still lacking, the PPR domains of Pet309 might be involved in this interaction. PPR proteins are predicted to bind RNA sequences (29), and this prediction has been confirmed in several cases (8, 19, 25, 56, 57). The mutant Pet309 lacking seven PPR domains lost the capacity for translation but not the capacity for stabilization of the *COX1* mRNA. This protein might have other domains that are important for either direct mRNA binding or RNA interaction through other factors, because Pet309 has been found to be part of a large protein complex in mitochondria (58).

As observed for the wild-type Pet309, the mutant protein was found to be associated with the mitochondrial inner membrane as a peripheral protein, and facing the matrix side. This indicates that deletion of the seven PPRs did not abolish the proper import of Pet309 Δ ppr into mitochondria. As observed for the wild-type Pet309, overexpression of Pet309 Δ ppr led to an increased accumulation of the *COX1* mRNA. Together these observations indicate that the mutant Pet309 protein conserves

PPR Domains of Pet309 Are Required for COX1 Translation

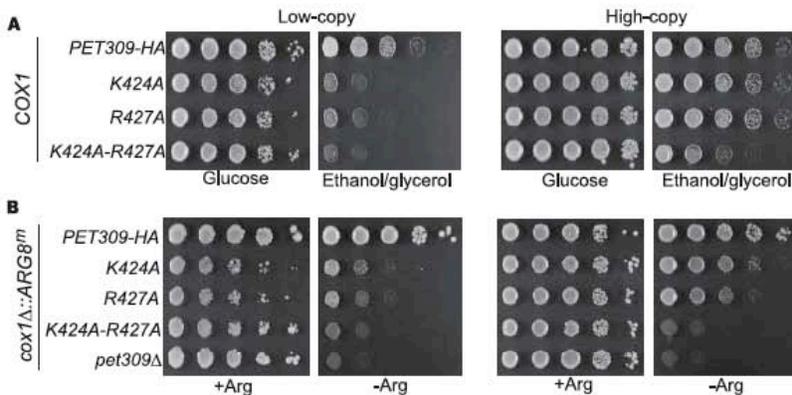


FIGURE 7. Basic residues facing the PPR groove are important for the function of Pet309. A, 10-fold serial dilutions of strains bearing the wild-type *PET309-HA*, the point mutations on Pet309 or empty vector (*pet309Δ*), in low copy or high copy plasmids were spotted on synthetic complete medium lacking uracil with either glucose or ethanol/glycerol, and incubated for 4 days at 30 °C. B, the same plasmids were transformed in a strain bearing the *cox1Δ::ARG8^m* gene. 10-fold serial dilutions were spotted on synthetic complete medium lacking uracil (+Arg) or arginine (–Arg) and incubated for 4 days at 30 °C.

some of its native properties and suggest that Pet309 can behave as a modular protein.

A series of deletions of one PPR motif at a time were generated. We found that *in vivo* each one of the seven PPR domains present in the central portion of Pet309 was necessary for *COX1* mRNA translation. This is not the case for other PPR proteins. The *Arabidopsis* HCF152 protein is composed of 12 PPR motifs. Only two PPR domains were found to be required for RNA binding but had low affinity. The affinity increased in the presence of more PPR motifs, and the highest affinity was obtained with the full-length protein (19). The human protein LRP130 was found to preferentially bind polypyrimidines, and this RNA-binding activity required only 2 of the 11 predicted PPR motifs (8). It should be noted, however, that these experiments were made in *in vitro* conditions and in the absence of the physiological RNA substrate. It is not known whether HCF152 or LRP130 require the complete set of PPR motifs to be active *in vivo*.

Deletion of any of the PPR motifs in Pet309 abolished respiratory growth even when the mutant proteins were overproduced. This suggests that in the absence of any of the PPR domains no residual activity is present that could be compensated for by overexpression of the mutant Pet309 proteins. PPR proteins belong to a large family of helical repeat proteins that include the RNA-binding protein Pumilio (29, 59, 60). The Puf domain of Pumilio binds RNA in an extended single-stranded conformation (59, 61). A similar model for the PPR domains was suggested, where RNA would be bound as an extended strand inside the cavity formed by the PPR motifs in tandem (29). Deletion of one of the PPR domains in Pet309 might interfere with the affinity and strength of binding for the rest of PPRs. Each PPR motif could bind a specific sequence of nucleotides in the *COX1* mRNA. Deletion of one of these motifs would leave a portion of the extended RNA “naked.” This could affect the structure of the PPR-RNA complexes surrounding the deletion, leading to failed PPR-RNA interactions.

A structural model for PPR 1–6 of Pet309 was generated. In this model the repeats formed a superhelix enclosing a groove.

The majority of residues projecting into this cavity are hydrophilic, with positively charged amino acids facing the bottom of each repeat. These residues could be involved in RNA binding. The Pet309 model is in agreement with the proposed model for PPR proteins (29). When two basic residues from PPR 3 that are facing the inner groove were mutagenized to alanines we found that efficiency of translation of *COX1* was considerably affected. This effect was more pronounced in the double mutant. It is possible that the loss of these positive charges at the bottom of the PPR 3 could interfere with the strength of binding of the RNA phosphate backbone. A similar effect was observed

when basic amino acids facing the concave surface of the Puf domain of Pumilio were mutagenized (59). In this work, a single point mutation (R1127A) abolished RNA binding. In addition to basic residues within the inner cavity of the Puf domain, side chains from polar and hydrophobic residues are facing the groove. Some of the polar residues at conserved positions interact with specific RNA bases, and solvent-exposed hydrophobic and basic residues stack against the bases in RNA (61). Similarly, the model of the PPR domains of Pet309 suggests that some polar and aromatic amino acids are facing the inner groove and could also be involved in the RNA sequence-specific binding of Pet309.

A common feature of proteins from the PPR family studied so far is that they are sequence-specific. This applies to Pet309, which functionally interacts with the *COX1* 5'-UTR and does not affect other mitochondrial mRNAs (11). The target for Pet309 in the *COX1* 5'-UTR remains to be elucidated. The sequence and length among the mitochondrial mRNAs are not conserved. This has hampered the identification of shared sequence or structural features that translational activators could recognize.

In addition to the PPR motifs, Pet309 has N-terminal and C-terminal regions of 346 and 333 amino acids, respectively. We propose that the PPR motifs present in Pet309 are necessary for sequence-specific binding to the 5'-untranslated leader of *COX1*, whereas other portions of the protein could be involved in the regulation of *COX1* translation. This regulation could be achieved by interaction with the mitochondrial ribosomes, because some PPR proteins in kinetoplasts have been found to be associated with ribosomes (18, 62). Alternatively, the N- and/or C-terminal ends of Pet309 could interact with other factors involved in the translation regulation of *COX1*. This could be the case for Mss51p, which acts on the *COX1* 5'-UTR, but in contrast to Pet309, it also interacts with newly made Cox1 (52, 63).

Acknowledgments—We thank T. D. Fox for the kind gifts of yeast strains and D. González-Halphen and T. D. Fox for giving antisera. We are also indebted to R. Coria, D. W. Krogmann, and T. D. Fox for critical review of the manuscript.

REFERENCES

- Barrientos, A., Korr, D., and Tzagoloff, A. (2002) *EMBO J.* 21, 43–52
- Tzagoloff, A., and Dieckmann, C. L. (1990) *Microbiol. Rev.* 54, 211–225
- Herrmann, J. M., and Funes, S. (2005) *Gene (Amst.)* 354, 43–52
- Costanzo, M. C., and Fox, T. D. (1990) *Annu. Rev. Genet.* 24, 91–113
- Dieckmann, C. L., and Staples, R. R. (1994) *Int. Rev. Cytol.* 152, 145–181
- Barrientos, A., Barros, M. H., Valnot, I., Rotig, A., Rustin, P., and Tzagoloff, A. (2002) *Gene* 286, 53–63
- Shoubridge, E. A. (2001) *Hum. Mol. Genet.* 10, 2277–2284
- Mili, S., and Pinol-Roma, S. (2003) *Mol. Cell Biol.* 23, 4972–4982
- Xu, F., Morin, C., Mitchell, G., Ackerley, C., and Robinson, B. H. (2004) *Biochem. J.* 382, 331–336
- Mootha, V. K., Lepage, P., Miller, K., Bunkenborg, J., Reich, M., Hjerrild, M., Delmonte, T., Villeneuve, A., Sladek, R., Xu, F., Mitchell, G. A., Morin, C., Mann, M., Hudson, T. J., Robinson, B., Rioux, J. D., and Lander, E. S. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 605–610
- Manthey, G. M., and McEwen, J. E. (1995) *EMBO J.* 14, 4031–4043
- Brown, N. G., Costanzo, M. C., and Fox, T. D. (1994) *Mol. Cell Biol.* 14, 1045–1053
- Manthey, G. M., Przybyla-Zawislak, B. D., and McEwen, J. E. (1998) *Eur. J. Biochem.* 255, 156–161
- Green-Willms, N. S., Butler, C. A., Dunstan, H. M., and Fox, T. D. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 6392–6397
- Naithani, S., Saracco, S. A., Butler, C. A., and Fox, T. D. (2003) *Mol. Biol. Cell* 14, 324–333
- Sanchez, M. E., Fox, T. D., and Mason, T. L. (1998) *EMBO J.* 17, 5796–5804
- Lurin, C., Andres, C., Aubourg, S., Bellaoui, M., Bitton, F., Bruyere, C., Caboche, M., Debast, C., Gualberto, J., Hoffmann, B., Lecharny, A., Le Ret, M., Martin-Magniette, M. L., Mireau, H., Peeters, N., Renou, J. P., Szurek, B., Taconnat, L., and Small, I. (2004) *Plant Cell* 16, 2089–2103
- Pusnik, M., Small, I., Read, L. K., Fabbro, T., and Schneider, A. (2007) *Mol. Cell Biol.* 27, 6876–6888
- Nakamura, T., Meierhoff, K., Westhoff, P., and Schuster, G. (2003) *Eur. J. Biochem.* 270, 4070–4081
- Yamazaki, H., Tasaka, M., and Shikanai, T. (2004) *Plant J.* 38, 152–163
- Schmitz-Linneweber, C., Williams-Carrier, R. E., Williams-Voelker, P. M., Kroeger, T. S., Vichas, A., and Barkan, A. (2006) *Plant Cell* 18, 2650–2663
- Hattori, M., Miyake, H., and Sugita, M. (2007) *J. Biol. Chem.* 282, 10773–10782
- Okuda, K., Myouga, F., Motohashi, R., Shinozaki, K., and Shikanai, T. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 8178–8183
- Coffin, J. W., Dhillon, R., Ritzel, R. G., and Nargang, F. E. (1997) *Curr. Genet.* 32, 273–280
- Schmitz-Linneweber, C., Williams-Carrier, R., and Barkan, A. (2005) *Plant Cell* 17, 2791–2804
- Gillman, J. D., Bentolila, S., and Hanson, M. R. (2007) *Plant J.* 49, 217–227
- Bentolila, S., Alfonso, A. A., and Hanson, M. R. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 10887–10892
- Koussevitzky, S., Nott, A., Mockler, T. C., Hong, F., Sachetto-Martins, G., Surpin, M., Lim, J., Mittler, R., and Chory, J. (2007) *Science* 316, 715–719
- Small, I. D., and Peeters, N. (2000) *Trends Biochem. Sci.* 25, 46–47
- Rose, M. D., Winston, F., and Hieter, P. (1988) *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983) *J. Bacteriol.* 153, 163–168
- Sikorski, R. S., and Hieter, P. (1989) *Genetics* 122, 19–27
- Hill, J. E., Myers, A. M., Koerner, T. J., and Tzagoloff, A. (1986) *Yeast* 2, 163–167
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Pease, L. R. (1989) *Gene (Amst.)* 77, 51–59
- Glick, B. S., and Pon, L. A. (1995) *Methods Enzymol.* 260, 213–223
- Glick, B. S. (1995) *Methods Enzymol.* 260, 224–231
- Fujiki, Y., Hubbard, A. L., Fowler, S., and Lazarow, P. B. (1982) *J. Cell Biol.* 93, 97–102
- Diekert, K., de Kroon, A. I., Kispal, G., and Lill, R. (2001) *Methods Cell Biol.* 65, 37–51
- Yaffe, M. P. (1991) *Methods Enzymol.* 194, 627–643
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature* 227, 680–685
- Westermann, B., Herrmann, J. M., and Neupert, W. (2001) *Methods Cell Biol.* 65, 429–438
- Shen, Z. H., and Fox, T. D. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17, 4535–4539
- Karpenahalli, M. R., Lupas, A. N., and Soding, J. (2007) *BMC Bioinformatics* 8, 2
- Soding, J., Biegert, A., and Lupas, A. N. (2005) *Nucleic Acids Res.* 33, W244–W248, web server issue
- Kim, K., Oh, J., Han, D., Kim, E. E., Lee, B., and Kim, Y. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340, 1028–1038
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., and Peitsch, M. C. (2003) *Nucleic Acids Res.* 31, 3381–3385
- Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J., and McCammon, J. A. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 10037–10041
- Tzschoppe, K., Kohlwein, S. D., and Rodel, G. (2000) *Biol. Chem.* 381, 1175–1183
- Fiori, A., Perez-Martinez, X., and Fox, T. D. (2005) *Mol. Microbiol.* 56, 1689–1704
- Steele, D. F., Butler, C. A., and Fox, T. D. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 5253–5257
- Bonnefoy, N., Bsat, N., and Fox, T. D. (2001) *Mol. Cell Biol.* 21, 2359–2372
- Perez-Martinez, X., Broadley, S. A., and Fox, T. D. (2003) *EMBO J.* 22, 5951–5961
- Williams, E. H., and Fox, T. D. (2003) *RNA* 9, 419–431
- Fisk, D. G., Walker, M. B., and Barkan, A. (1999) *EMBO J.* 18, 2621–2630
- Williams, P. M., and Barkan, A. (2003) *Plant J.* 36, 675–686
- Lahmy, S., Barneche, F., Derancourt, J., Filipowicz, W., Delseny, M., and Echeverria, M. (2000) *FEBS Lett.* 480, 255–260
- Meierhoff, K., Felder, S., Nakamura, T., Bechtold, N., and Schuster, G. (2003) *Plant Cell* 15, 1480–1495
- Krause, K., Lopes de Souza, R., Roberts, D. G., and Dieckmann, C. L. (2004) *Mol. Biol. Cell* 15, 2674–2683
- Edwards, T. A., Pyle, S. E., Wharton, R. P., and Aggarwal, A. K. (2001) *Cell* 105, 281–289
- Groves, M. R., and Barford, D. (1999) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9, 383–389
- Wang, X., McLachlan, J., Zamore, P. D., and Hall, T. M. (2002) *Cell* 110, 501–512
- Maslov, D. A., Spremulli, L. L., Sharma, M. R., Bhargava, K., Grasso, D., Falick, A. M., Agrawal, R. K., Parker, C. E., and Simpson, L. (2007) *Mol. Biochem. Parasitol* 152, 203–212
- Barrientos, A., Zambrano, A., and Tzagoloff, A. (2004) *EMBO J.* 23, 3472–3482

Bibliografia

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002) *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science.
- Barrientos, A., Zambrano, A. and Tzagoloff, A. (2004) Mss51p and Cox14p jointly regulate mitochondrial Cox1p expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J*, **23**, 3472-3482.
- Barros, M.H., Myers, A.M., Van Driesche, S. and Tzagoloff, A. (2006) COX24 codes for a mitochondrial protein required for processing of the COX1 transcript. *J Biol Chem*, **281**, 3743-3751.
- Brown, N.G., Costanzo, M.C. and Fox, T.D. (1994) Interactions among three proteins that specifically activate translation of the mitochondrial COX3 mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **14**, 1045-1053.
- Carr, H.S. and Winge, D.R. (2003) Assembly of cytochrome c oxidase within the mitochondrion. *Acc Chem Res*, **36**, 309-316.
- Chacinska, A. and Boguta, M. (2000) Coupling of mitochondrial translation with the formation of respiratory complexes in yeast mitochondria. *Acta Biochim Pol*, **47**, 973-991.
- Coffin, J.W., Dhillon, R., Ritzel, R.G. and Nargang, F.E. (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 COXI protein. *Curr Genet*, **32**, 273-280.
- Cooper, M.P., Qu, L., Rohas, L.M., Lin, J., Yang, W., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Spiegelman, B.M. (2006) Defects in energy homeostasis in Leigh syndrome French Canadian variant through PGC-1alpha/LRP130 complex. *Genes Dev*, **20**, 2996-3009.
- Diekert, K., de Kroon, A.I., Kispal, G. and Lill, R. (2001) Isolation and subfractionation of mitochondria from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Cell Biol*, **65**, 37-51.

- Fiori, A., Perez-Martinez, X. and Fox, T.D. (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.
- Fox, T.D. (1996) Translational control of endogenous and recoded nuclear genes in yeast mitochondria: regulation and membrane targeting. *Experientia*, **52**, 1130-1135.
- Fujiki, Y., Hubbard, A.L., Fowler, S. and Lazarow, P.B. (1982) Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, **93**, 97-102.
- Glick, B.S. and Pon, L.A. (1995) Isolation of highly purified mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol*, **260**, 213-223.
- Gray, M.W., Burger, G. and Lang, B.F. (1999) Mitochondrial evolution. *Science*, **283**, 1476-1481.
- Green-Willms, N.S., Butler, C.A., Dunstan, H.M. and Fox, T.D. (2001) Pet111p, an inner membrane-bound translational activator that limits expression of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial gene COX2. *J Biol Chem*, **276**, 6392-6397.
- Haffter, P. and Fox, T.D. (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.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol*, **153**, 163-168.
- Krause, K., Lopes de Souza, R., Roberts, D.G. and Dieckmann, C.L. (2004) The mitochondrial message-specific mRNA protectors Cbp1 and Pet309 are associated in a high-molecular weight complex. *Mol Biol Cell*, **15**, 2674-2683.
- Krause-Buchholz, U., Barth, K., Dombrowski, C. and Rodel, 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 Rodel, G. (2005) *Saccharomyces cerevisiae* translational activator Cbs1p is associated with translationally active mitochondrial ribosomes. *Biol Chem*, **386**, 407-415.

- Krause-Buchholz, U., Tzschoppe, K., Paret, C., Ostermann, K. and Rodel, G. (2000) Identification of functionally important regions of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial translational activator Cbs1p. *Yeast*, **16**, 353-363.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lurin, C., Andres, C., Aubourg, S., Bellaoui, M., Bitton, F., Bruyere, C., Caboche, M., Debast, C., Gualberto, J., Hoffmann, B., Lecharny, A., Le Ret, M., Martin-Magniette, M.L., Mireau, H., Peeters, N., Renou, J.P., Szurek, B., Taconnat, L. and Small, I. (2004) Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell*, **16**, 2089-2103.
- Manthey, G.M. and McEwen, J.E. (1995) The product of the nuclear gene PET309 is required for translation of mature mRNA and stability or production of intron-containing RNAs derived from the mitochondrial COX1 locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J*, **14**, 4031-4043.
- Manthey, G.M., Przybyla-Zawislak, B.D. and McEwen, J.E. (1998) The *Saccharomyces cerevisiae* Pet309 protein is embedded in the mitochondrial inner membrane. *Eur J Biochem*, **255**, 156-161.
- Martin, W. and Herrmann, R.G. (1998) Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and Why? *Plant Physiol*, **118**, 9-17.
- Martin, W., Hoffmeister, M., Rotte, C. and Henze, K. (2001) An overview of endosymbiotic models for the origins of eukaryotes, their ATP-producing organelles (mitochondria and hydrogenosomes), and their heterotrophic lifestyle. *Biol Chem*, **382**, 1521-1539.
- Marykwas, D.L. and Fox, T.D. (1989) Control of the *Saccharomyces cerevisiae* regulatory gene PET494: transcriptional repression by glucose and translational induction by oxygen. *Mol Cell Biol*, **9**, 484-491.
- McMullin, T.W. and Fox, T.D. (1993) COX3 mRNA-specific translational activator proteins are associated with the inner mitochondrial membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **268**, 11737-11741.

- McMullin, T.W., Haffter, P. and Fox, T.D. (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.
- Michaelis, U., Korte, A. and Rodel, G. (1991) Association of cytochrome b translational activator proteins with the mitochondrial membrane: implications for cytochrome b expression in yeast. *Mol Gen Genet*, **230**, 177-185.
- Mootha, V.K., Lepage, P., Miller, K., Bunkenborg, J., Reich, M., Hjerrild, M., Delmonte, T., Villeneuve, A., Sladek, R., Xu, F., Mitchell, G.A., Morin, C., Mann, M., Hudson, T.J., Robinson, B., Rioux, J.D. and Lander, E.S. (2003) Identification of a gene causing human cytochrome c oxidase deficiency by integrative genomics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 605-610.
- Naithani, S., Saracco, S.A., Butler, C.A. and Fox, T.D. (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.
- Nakamura, T., Meierhoff, K., Westhoff, P. and Schuster, G. (2003) RNA-binding properties of HCF152, an Arabidopsis PPR protein involved in the processing of chloroplast RNA. *Eur J Biochem*, **270**, 4070-4081.
- Okuda, K., Myouga, F., Motohashi, R., Shinozaki, K. and Shikanai, T. (2007) Conserved domain structure of pentatricopeptide repeat proteins involved in chloroplast RNA editing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 8178-8183.
- Perez-Martinez, X., Broadley, S.A. and Fox, T.D. (2003) Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. *Embo J*, **22**, 5951-5961.
- Perez-Martinez, X., Funes, S., Camacho-Villasana, Y., Marjavaara, S., Tavares-Carreon, F. and Shingu-Vazquez, M. (2008) Protein synthesis and assembly in mitochondrial disorders. *Curr Top Med Chem*, **8**, 1335-1350.
- Pusnik, M., Small, I., Read, L.K., Fabbro, T. and Schneider, A. (2007) Pentatricopeptide repeat proteins in *Trypanosoma brucei* function in mitochondrial ribosomes. *Mol Cell Biol*, **27**, 6876-6888.

- Saha, D., Prasad, A.M. and Srinivasan, R. (2007) Pentatricopeptide repeat proteins and their emerging roles in plants. *Plant Physiol Biochem*, **45**, 521-534.
- Schmitz-Linneweber, C., Williams-Carrier, R. and Barkan, A. (2005) RNA immunoprecipitation and microarray analysis show a chloroplast Pentatricopeptide repeat protein to be associated with the 5' region of mRNAs whose translation it activates. *Plant Cell*, **17**, 2791-2804.
- Shingu-Vazquez, M. (2006) Análisis de la asociación de la proteína Pet309p a la membrana interna mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae*. UNAM, Vol. Maestría.
- Small, I.D. and Peeters, N. (2000) The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem Sci*, **25**, 46-47.
- Solano A, P.A., Lopez-Pérez MJ, Montoya J. (2001) Enfermedades genéticas del ADN mitocondrial humano. *Salud Pública Mex*, **43**, 151-161.
- Steele, D.F., Butler, C.A. and Fox, T.D. (1996) Expression of a recoded nuclear gene inserted into yeast mitochondrial DNA is limited by mRNA-specific translational activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 5253-5257.
- Stiburek, L., Hansikova, H., Tesarova, M., Cerna, L. and Zeman, J. (2006) Biogenesis of eukaryotic cytochrome c oxidase. *Physiol Res*, **55 Suppl 2**, S27-41.
- Tavares-Carreón, F., Camacho-Villasana, Y., Zamudio-Ochoa, A., Shingu-Vazquez, M., Torres-Larios, A. and Perez-Martinez, X. (2008) The pentatricopeptide repeats present in Pet309 are necessary for translation but not for stability of the mitochondrial COX1 mRNA in yeast. *J Biol Chem*, **283**, 1472-1479.
- Towpik, J. (2005) Regulation of mitochondrial translation in yeast. *Cell Mol Biol Lett*, **10**, 571-594.
- Tzschoppe, K., Kohlwein, S.D. and Rodel, G. (2000) Yeast translational activator Cbs2p: mitochondrial targeting and effect of overexpression. *Biol Chem*, **381**, 1175-1183.
- Vazquez, M., Tuena, M. (2002) *Mitocondria, una mirada a la evolución de los conceptos básicos y modernos*. Ed. Prado, México.
- Wiesenberger, G., Costanzo, M.C. and Fox, T.D. (1995) Analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial COX3 mRNA 5' untranslated leader: translational activation and mRNA processing. *Mol Cell Biol*, **15**, 3291-3300.

