



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM  
POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE PET309  
CON EL mRNA MITOCONDRIAL *COXI* DE  
*Saccharomyces cerevisiae*

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :  
**DOCTORA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**

**P R E S E N T A:**  
M en C FAVIOLA ISABEL TAVARES CARREÓN

Tutor: DRA. XOCHITL PÉREZ MARTÍNEZ



MÉXICO, D. F.

Enero, 2012



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.

**El presente trabajo se realizó en el laboratorio 204-orientado del departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, Bajo la Dirección de la Dra. Xochitl Pérez Martínez.**

**Se contó con el apoyo de los donativos CONACYT (82505) y PAPIIT-UNAM (215008 y 208711).**

# **Estudio de la interacción de Pet309 con el mRNA mitocondrial *COX1* de *Saccharomyces cerevisiae***

## **RECONOCIMIENTOS**

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

Dra. Xochitl Pérez Martínez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Marina Gavilanes Ruiz	Facultad de Química, UNAM
Dr. Felix Recillas Targa	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

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

Se reconoce la colaboración del Dr. Alfredo Torres Larios, del Departamento de Bioquímica y Biología Estructural del Instituto de Fisiología Celular, por la ayuda otorgada para la elaboración del modelo de los dominios PPR de Pet309.

Se reconoce la asesoría del Dr. Felix Recillas Targa, y de su estudiante David Valle del Departamento Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular, por la ayuda otorgada para la elaboración del modelo de la estructura secundaria del mRNA de *COX1*.

Durante los estudios de doctorado gocé de una beca otorgada por CONACYT (con número de becario 173833) para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Marieta Tuena Sangri	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. José de Jesús García Trejo	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Marina Gavilanes Ruiz	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez	Facultad de Medicina, UNAM
Secretario	Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova	Facultad de Química, UNAM

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Xochitl Pérez Martínez por darme una excelente dirección, constante apoyo durante mi estadía en su laboratorio y sobre todo por la dedicación a mi formación académica

A la Dra. Marina Gavilanez Ruíz y el Dr. Felix Recillas Targa por la orientación y por sus invaluable comentarios para enriquecer este trabajo.

Al jurado de examen de grado: Dra. Marieta Tuena Sangri, Dr. José de Jesús García Trejo, Dra. Marina Gavilanez Ruíz, Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez y Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova por la orientación y por las válidos observaciones, aportaciones y mejoras para este trabajo.

A la Dra. Yolanda Camacho Villasana por la ayuda técnica para el desarrollo del presente trabajo.

A la Dra. Laura Ongay, Biól. Minerva Mora y Biól. Guadalupe Códiz de la unidad de Biología Molecular por la asesoría y apoyo técnico.

Al Ing. Juan Manuel Barbosa Castillo e Ivette Rosas, por su constante asesoría en el área de cómputo.

A mis compañeros Angélica, Aldo, Alicia, Juan Pablo y Rodolfo por hacer del laboratorio un lugar ameno durante las horas de trabajo.

A Leticia García (coordinadora del MDCBQ) por su amabilidad, atención y apoyo para la realización de todos los trámites académicos que llevé a cabo durante el doctorado.

A Rocío Romualdo Martínez (Secretaría del Dep. Bioquímica-IFC) por su disposición y ayuda constante en cualquier trámite durante todo el doctorado.

A Gabriela Valdés Silva (Secretaría del Dep. Biología Molecular-IFC) por la ayuda otorgada en los trámites y procesos para la elaboración de la tesis.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Abajo se presentan los agradecimientos para esas personas que me ayudan a ser un mejor ser humano, que me han brindado su amistad, apoyo incondicional y que me han hecho ser una persona muy feliz.

A mis padres Isabel Carreón y Porfirio Tavares por hacer de mi una persona responsable, independiente y por dejarme volar libremente.

A mis hermanas Paulina y Cinthia con las que comparto mi verdadero yo, me toleran y no me reclaman.

A Angel por su excelente compañía, por el largo camino recorrido, por estar siempre conmigo y porque todo el tiempo está dispuesto ayudarme bajo cualquier circunstancia dondequiera que esté.

A Idalia Rojas por que ser una gran amiga, ser directa y decir las cosas sin tapujos. Por todos sus dichos que ejemplifican claramente la vida (jeje), por todos los momentos compartidos, anécdotas y mucho más...

A Cristian Cárdenas por ser mi amigo y confidente, por el tiempo que dedica a escucharme, por todos los cafés y por la infinidad de subidas de ánimo que me ha dado.

A la banda cachetona Olivier, Fabian y Juan Carlos por las largas y amenas pláticas durante 10 años de amistad... y el conteo sigue.

A los jóvenes y sexys miembros del taller literario Agustin, Idalia, Marco, Rodolfo, Bere, Dafne, Janina, María, Mónica y no podía faltar Memo (que siempre asistió como oyente) por que ha sido muy enriquecedor haberlos conocido, por los talleres gastronómicos, con ustedes conocí muchos lugares interesantes del DF y como observaron, nunca aprendí a escribir cuentos.

A Sandra Pérez y Josué Ramirez por sus sabios consejos pero sobre todo por decirme justo lo que no quiero escuchar.

## INDICE

<b>Abreviaturas</b>	<b>1</b>
<b>Resumen</b>	<b>2</b>
<b>Abstract</b>	<b>4</b>
<b>Introducción</b>	<b>6</b>
1. Las mitocondrias como fuente de energía	7
2. Genoma nuclear y mitocondrial de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
3. Complejo IV respiratorio: La Citocromo c oxidasa	9
4. Expresión y ensamblaje de la proteína Cox1	10
5. Activadores traduccionales	12
6. Pet309 es el activador traduccional de Cox1	16
7. Proteínas con dominios PPR	17
8. Proteínas PPR en levadura	20
9. Interacción de Proteínas PPR con su RNA específico	22
<b>Justificación</b>	<b>25</b>
<b>Hipótesis y Objetivos</b>	<b>26</b>
<b>Material y métodos</b>	<b>27</b>
1. Generación y construcciones plasmídicas	30
2. Purificación de Mitocondrias	33
3. Determinación de proteínas por Lowry	35
4. Analisis de proteínas mitocondriales	36
5. Fraccionamiento mitocondrial	37
6. Extracción de proteínas mitocondriales	38
7. Marcaje radioactivo de proteínas mitocondriales	40
8. Northern blot	42
9. Inmunoprecipitación de RNA	43
10. Inmunoprecipitación de RNA para slot-blot	50
11. Generación del modelo de los motivos PPR	53
12. Búsqueda de supresoras	53
13. Soluciones y amortiguadores	55
<b>Resultados</b>	<b>63</b>
<b>Parte I</b>	
1. La interacción entre los motivos PPR de Pet309 con el mRNA de COX1 es mediado posiblemente por fuerzas electrostáticas	63

2. Interacción física entre Pet309 y el mRNA de <i>COX1</i>	68
3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> requiere la presencia de los 12 motivos PPR para que respire	72
4. Pet309 $\Delta$ 12ppr se localiza en la membrana interna mitocondrial de manera periférica	74
5. Los 12 motivos PPR de Pet309 se requieren para sintetizar a Cox1 pero no para acumular los niveles del mRNA de <i>COX1</i>	76
6. La interacción física entre Pet309 y el mRNA de <i>COX1</i> depende de los 12 dominios PPR	79
7. La interacción entre Pet309 y el mRNA de <i>COX1</i> no depende de la traducción mitocondrial	81
8. Pet309 reconoce la región -140 a -90 nucleótidos río arriba del ATG del mRNA de <i>COX1</i>	83
9. La interacción entre Pet309 y el mRNA de <i>COX1</i> depende de Mss51	86

## **Parte II**

1. Obtención de cepas que suprimen el defecto respiratorio de pet309 $\Delta$ ppr2	91
2. El fenotipo supresor es específico para pet309 $\Delta$ ppr2	95
3. Las supresoras $\Delta$ ppr2-R1, $\Delta$ ppr2-R5 y $\Delta$ ppr2-R8 son de origen nuclear	96

<b>Discusión</b>	<b>99</b>
------------------	-----------

<b>Conclusión</b>	<b>114</b>
-------------------	------------

<b>Perspectivas</b>	<b>115</b>
---------------------	------------

<b>Apéndice 1. Referencias</b>	<b>117</b>
--------------------------------	------------

<b>Apéndice 2. Publicaciones</b>	<b>129</b>
----------------------------------	------------



## Abreviaturas

Arg8 <sup>m</sup>	proteína Arg8 codificada en la mitocondria
ATP	adenosín trifosfato
ATP6	gen de la subunidad 6 de la ATP sintasa F <sub>1</sub> -F <sub>0</sub>
ATP8	gen de la subunidad 8 de la ATP sintasa F <sub>1</sub> -F <sub>0</sub>
ATP9	gen de la subunidad 9 de la ATP sintasa F <sub>1</sub> -F <sub>0</sub>
CAP	cloranfenicol
cDNA	DNA complementario
COB	gen del citocromo <i>b</i>
CcO	Citocromo <i>c</i> oxidasa
COX1	gen de la subunidad 1 de la COX
Cox1	subunidad 1 de la COX
COX2	gen de la subunidad 2 de la COX
Cox2	subunidad 2 de la COX
COX3	gen de la subunidad 3 de la COX
Cox3	subunidad 3 de la COX
CS	citrato sintasa
Cob	Citocromo <i>b</i>
Cyt c1	subunidad del complejo b-c1
DNAmt	DNA mitocondrial
ioTL	<i>in organelo</i> translation - siglas en inglés
ivTL	<i>in vivo</i> translation - siglas en inglés
IP-RNA	inmunoprecipitación de RNA
PM	puromicina
PPR	pentatricopeptide repeat- siglas en inglés
RT	transcriptasa reversa
TPR	tetratricopeptide repeat- siglas en inglés
3'-UTR	región 3' no traducida
5'-UTR	región 5' no traducida
3xHA	triple epítotope de hemaglutinina

## Resumen

Pet309 es una proteína requerida para activar la traducción del mRNA de *COX1* en *Saccharomyces cerevisiae*. La subunidad I de la citocromo *c* oxidasa está codificada por el gen mitocondrial *COX1*, esta subunidad es la más grande e hidrofóbica del complejo respiratorio. Pet309 activa la traducción del mRNA de *COX1* también lo estabiliza y se propone que se une sobre el extremo 5' no traducido (UTR) de este gen. Pet309 pertenece a la familia de las proteínas PPR (de las siglas en inglés –pentatricopeptide repeat–), las cuales son necesarias para la biogénesis de la mitocondria y del cloroplasto, y están involucradas en el metabolismo de RNA. Cada motivo PPR consiste de 35 aminoácidos los cuales forman dos  $\alpha$ -hélices antiparalelas. Se sugiere que el conjunto de motivos PPR forman una superhélice que engloba una cavidad, la cual podría unir RNA de cadena lineal en su parte central. A la fecha se desconoce como las proteínas PPR reconocen su RNA específico y como es su mecanismo de acción.

Pet309 fue el primer activador traduccional reportado que contenía estos dominios estructurales. Para estudiar el papel de estos motivos estructurales en Pet309, se construyó una cepa carente de los 12 motivos PPR que se localizan en la parte central de la proteína. Esta cepa fue incapaz de respirar debido a que Cox1 no se sintetiza, mientras que la acumulación del mRNA no se ve afectada. Se generó un modelo de la región PPR de Pet309 y al cambiar dos residuos básicos del tercer motivo PPR, las mutantes disminuyeron su capacidad respiratoria. Esto indica que Pet309 podría estar interactuando con el mRNA de *COX1* a través de interacciones electrostáticas. Investigamos la interacción física de los dominios PPR de Pet309 con el extremo 5'-UTR del mRNA de *COX1*, realizando ensayos de inmunoprecipitación de RNA (IP-RNA). Observamos que Pet309 interactúa directamente con el mRNA de *COX1*, mientras que Pet309 $\Delta$ 12ppr pierde la interacción. Del mismo modo, quisimos averiguar si la interacción entre Pet309 y el mRNA de *COX1* depende de la traducción mitocondrial. Realizamos ensayos de IP-RNA en presencia de puromicina o cloranfenicol y observamos que la interacción no se afecta en presencia de estos

antibióticos. Esto sugiere que la interacción entre Pet309 y el mRNA de *COX1* es independiente de la traducción. También determinamos que la región específica del 5'-UTR del mRNA de *COX1* reconocida por Pet309 está localizada entre los nucleótidos -140 a -90 río arriba del codón de inicio.

Con estos datos concluimos que Pet309 necesita de los 12 motivos PPR para interactuar con el extremo 5'-UTR de mRNA de *COX1* y que la proteína se sitúa a -140 nucleótidos del ATG del mRNA de *COX1* y esta región puede estar formando una estructura tipo tallo-asa. Proponemos que Pet309 interactúa con el mRNA de *COX1* para ayudar al ribosoma a colocarse en el sitio correcto de inicio de la traducción, y que los dominios PPR de Pet309 funcionan como un adaptador que debe mediar la interacción entre el ribosoma y el mRNA de *COX1*.

## Abstract

Pet309 is required to activate the *COX1* mRNA translation in *Saccharomyces cerevisiae*. The subunit I of cytochrome c oxidase is encoded by the mitochondrial *COX1* gene, this subunit is the largest and most hydrophobic of the respiratory complex. Pet309 acts on the *COX1* mRNA 5'-UTR to activate translation, and it is also involved in stability of the *COX1* mRNA. Pet309 contains 12 PPR motifs located in the central portion of the protein. PPR proteins are necessary for chloroplasts and mitochondria biogenesis, and are involved in RNA metabolism. PPR proteins are defined by tandem arrays of a degenerated 35-aa repeat that is predicted to adopt a helical hairpin structure. How PPR proteins recognize specific RNA and how these interactions influence diverse steps in gene expression are unknown. Little is known about the mechanisms through which they act.

Pet309 was the first reported translational activator containing these structural domains. To study the role of PPR motifs in Pet309, we constructed a strain lacking 12 PPR motifs. This mutant was unable to respire because synthesis of Cox1 was disrupted, while the *COX1* mRNA levels were not affected. We investigated the physical interaction of PPR motifs present in Pet309 with the *COX1* mRNA. Based on a model of the PPR region of Pet309, we changed two basic residues by alanines in the third PPR motif and these mutants decrease the respiratory growth. Probably Pet309 could be interacting with the *COX1* mRNA through electrostatic forces for translation. Immunoprecipitation of RNA assays of Pet309 protein and RT-PCR of the *COX1* mRNA indicated that this interaction depended on the 12 PPR motifs present in Pet309. Similarly, we determined whether the interaction between Pet309 and *COX1* mRNA depends on translational-active ribosomes. We tested IP-RNA in the presence of puromycin or chloramphenicol and found that the interaction was not affected in the presence of these antibiotics. This indicates that the interaction between Pet309 and the *COX1* mRNA is independent of active ribosomes. We also determined the specific region of the *COX1* mRNA 5'-UTR

that was recognized by Pet309, and found to be located between nucleotides -140 to -90 upstream of the start codon.

We concluded that the PPR motifs are necessary for translation of the *COX1* mRNA and that Pet309 mapped in the region around -140 to -90 nucleotides upstream of the *COX1* start codon, a region that could form a stem-loop structure. We propose that the PPR motifs of Pet309 act like an adaptor involved in interaction with the mitochondrial ribosome to activate the translation of *COX1* mRNA.

## Introducción

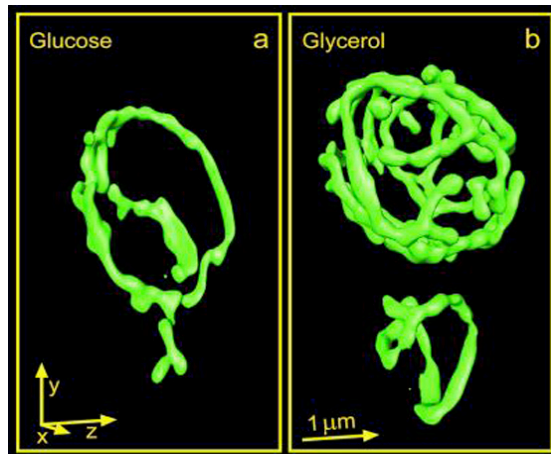
La levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha sido por muchos años un organismo modelo para una gran variedad de estudios celulares, bioquímicos y genéticos, los cuales están muy conservados en organismos eucariotes. El genoma de *S. cerevisiae* está totalmente secuenciado, tiene cerca de 6,000 genes y el cuatro por ciento de su genoma posee intrones (Goffeau y col. 1996).

Existen muchas ventajas para usar a la levadura como modelo experimental: 1) tiene un tiempo generacional corto (menos de 2 h), y se puede obtener material suficiente para llevar a cabo estudios genéticos y bioquímicos; 2) posee un ciclo de vida que incluye una fase sexual, por lo que es posible abordar estudios con las herramientas que provee la genética formal; 3) junto con *Chlamydomonas reinhardtii* es el único organismo en el que se puede llevar a cabo manipulación genética del DNA mitocondrial por transformación del organelo (Bonney y Fox, 2001; Jones y col. 1992).

Al ser un organismo anaerobio facultativo ofrece distintas ventajas para estudiar diversos aspectos bioquímicos y genéticos sobre el metabolismo respiratorio. La función respiratoria es dispensable, por lo que las células pueden crecer por fermentación. Esto significa que se pueden obtener mutantes respiratorias totalmente viables en fuentes de carbono fermentables (Dieckmann y Staples, 1990).

*S. cerevisiae* puede crecer en una amplia variedad de fuentes de carbono, pero las predilectas por este organismo es la glucosa y la fructosa (Leister y Herrmann, 2007). En estas fuentes de carbono la mayor cantidad de ATP es generada en el citosol por medio de la fermentación, y la expresión de enzimas requeridas para la utilización de otras fuentes de carbono es reprimida. Este fenómeno es conocido como represión catabólica (Gancedo J, 1998). En la represión catabólica la expresión de muchas proteínas y factores mitocondriales son reprimidos, tales como enzimas del ciclo de Krebs y de la cadena respiratoria. Cuando se crece a la levadura en un medio que contiene glucosa (fuente fermentable), se puede observar que las redes mitocondriales son

escasas y las conexiones entre ellas están disminuidas (Figura 1 izquierda); mientras que en fuentes de carbono no fermentable como el glicerol o etanol las redes mitocondriales son muy abundantes e interconectadas (Figura 1 derecha) (Westernmann and Neupert, 2000).



**Figura 1.** Represión catabólica en levadura. Las redes mitocondriales incrementan en número y en conexiones cuando se crece a la levadura en fuentes de carbono no fermentables como el glicerol. Las mitocondrias se observaron con GFP dirigida a la mitoconria.

### **1. Las mitocondrias como fuente de energía**

Las mitocondrias son organelos localizados en el citoplasma de casi todas las células eucarióticas. Es un organelo encargado de obtener energía a partir de sustratos energéticos, energía en forma de ATP mediante el proceso de fosforilización oxidativa. Dentro de la mitocondria se llevan a cabo procesos vitales como la biosíntesis de aminoácidos, el ciclo del ácido cítrico, la oxidación de los ácidos grasos, la fosforilación oxidativa, entre otros.

Este organelo presenta una membrana externa y una membrana interna, las cuales definen dos compartimentos internos. Tanto la membrana interna como la externa desempeñan un papel crucial en la actividad mitocondrial.

- La membrana externa participa en numerosas interacciones entre el metabolismo mitocondrial y el sistema genético del resto de la célula eucarionte. Contiene del 8-10 % del total de la proteína de este organelo. Esta membrana tiene un contenido de proteína/fosfolípido alrededor de 1.0- 1.5  $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ , lo que hace una membrana más homogénea en su composición proteína/lípido.
- La membrana interna, está plegada en numerosas crestas, contiene altas concentraciones de cardiolipina y el cociente entre las proteínas y los fosfolípidos es considerablemente alto, entre 5 y 6  $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ . (Vázquez Memije y Tuena de Gómez-Puyou, 2002).

Estas dos membranas definen dos espacios dentro de la mitocondria:

- La matriz, la cual contiene una gran cantidad de enzimas que intervienen en las principales reacciones bioquímicas que tienen lugar en la mitocondria. Además, se encuentran el DNA mitocondrial, ribosomas y la maquinaria necesaria para la expresión de los genes mitocondriales.
- El espacio intermembranal, que contiene varias enzimas que utilizan el ATP procedente de la matriz para fosforilar otros nucleótidos. (Vázquez Memije y Tuena de Gómez-Puyou, 2002).

## **2. Genoma nuclear y mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae*.**

El genoma nuclear de la levadura tiene un tamaño aproximado de 12,000 kilobases (Kb). Una levadura haploide contiene 16 cromosomas que varían en tamaño. El cromosoma I es el más pequeño al tener un tamaño cercano de 230 Kb, mientras que el cromosoma XII es el más grande, su tamaño varía entre 2060 a 3060 Kb. Aproximadamente el 80 % del genoma nuclear es transcrito a RNA, el cual representa cerca de 6000 genes y en promedio, cada 1.5 - 2.0 Kb de DNA hay un gen.



Dentro de la mitocondria se encuentra el DNA mitocondrial (DNAMt), el cual también se considera parte del genoma de la levadura. El DNAMt codifica para algunos de los componentes de la maquinaria traduccional de la mitocondria y aproximadamente el 15% de las proteínas mitocondriales. El DNAMt es una molécula que mide aproximadamente de 75 - 80 Kb. Esta molécula de DNA codifica para siete proteínas hidrofóbicas: citocromo *b* (COB) del complejo *bc<sub>1</sub>*, las subunidades 1, 2 y 3 (COX1, COX2 y COX3) de la citocromo *c* oxidasa, la subunidad 6, 8 y 9 (ATP6, ATP8 y ATP9) de la porción F0 de la ATP sintasa y sólo una proteína hidrofílica: Var1 componente de la subunidad pequeña del mitoribosoma. Además, el DNAMt codifica para el rRNA grande (21S) y el rRNA pequeño (16S), así como para 24 tRNAs y la RNasa P involucrada en el procesamiento de tRNAs (Dieckmann y Staples, 1994).

### **3. Complejo IV respiratorio: La citocromo c oxidasa.**

El complejo IV o citocromo *c* oxidasa (CcO) es una holoenzima localizada en la membrana interna mitocondrial y presente en todos los organismos aerobios. Este complejo enzimático reduce el oxígeno molecular y lo transforma en H<sub>2</sub>O a partir de los electrones que recibe del citocromo *c* soluble. Acoplado a esta reacción los protones son bombeados de la matriz mitocondrial al espacio intermembranal. La energía liberada de esta reacción exergónica es almacenada como un gradiente electroquímico de protones que será utilizado para la síntesis de ATP.

En las levaduras esta holoenzima se compone de 12 subunidades, tres de ellas son subunidades codificadas en el DNAMt, mientras que el resto son codificadas por el genoma nuclear. Algunas de las subunidades nucleares no están conservadas entre los organismos, la mayoría son solubles o pueden presentar un sólo cruce transmembranal. La función específica de las subunidades nucleares no es completamente comprendida, pero se sabe que están involucradas en la estabilidad, ensamblaje y dimerización de la CcO (Taanman y Capaldi, 1993; Fontanesi y col. 2006; Dowhan y col. 1985). También

se propone que estas subunidades desempeñan un papel importante en la protección del núcleo catalítico a especies reactivas de oxígeno (Kadenbach y *col.* 2000).

Por otro lado, las subunidades centrales o que forman parte del núcleo catalítico de la CcO están muy conservadas. En la actualidad ya se conoce la estructura cristalográfica de la CcO de bacteria y de bovino (Iwata y *col.* 1998; Tsukihara y *col.* 1996). En ambos cristales se puede observar que las tres subunidades que forman parte del centro catalítico están organizadas de manera semejante. Esto corrobora que la organización y topología del centro catalítico está altamente conservado en la escala filogenética.

Cox1, Cox2 y Cox3 son las tres subunidades básicas o centrales, las cuales están codificados por los genes mitocondriales *COX1*, *COX2* y *COX3*, respectivamente y son péptidos muy hidrofóbicos. Cox1 es una proteína que presenta 12 cruces transmembranales y está muy conservada entre las especies. Cox2 es una proteína que presenta dos cruces transmembranales y se caracteriza por tener tres regiones definidas: los extremos amino terminal y carboxilo terminal se localizan dentro del espacio intermembranal y dos hélices transmembranales embebidas en la membrana interna mitocondrial. El carboxilo terminal recibe los electrones que provienen del citocromo c soluble hasta los centros metálicos que contiene Cox1. Cox3 presenta siete cruces transmembranales y es la menos conservada entre las especies. No se conoce con certeza la función ya que no posee grupos metálicos que estén involucrados en la reacción redox (Capaldi, 1990).

#### **4. Expresión y ensamblaje de la proteína Cox1.**

La subunidad I o Cox1 es la proteína más grande de la CcO. Esta subunidad contiene los centros metálicos que se encargan de reducir el oxígeno y presenta un hemo tipo a que transfiere los electrones de la subunidad II (Cox2) hacia el centro binuclear hemo  $a_3$ -Cu<sub>B</sub>. Cox1 presenta los canales D y K por los

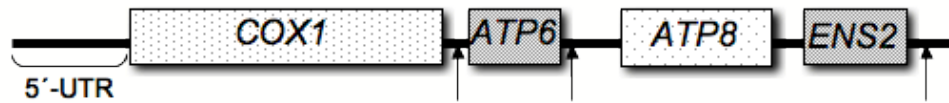
cuales se da la transferencia de protones hacia el espacio intermembranal, el cual contribuye al gradiente electroquímico de protones (Riistama y *col.* 1996).

Cox1 es sintetizada por ribosomas mitocondriales e insertada dentro de la membrana interna mitocondrial. Es una proteína altamente hidrofóbica por lo que su síntesis debe de estar finamente regulada dentro de la mitocondria. Cox1 participa en las primeras etapas de ensamblaje del complejo enzimático de levadura como de humano (Nijtmans y *col.* 1998).

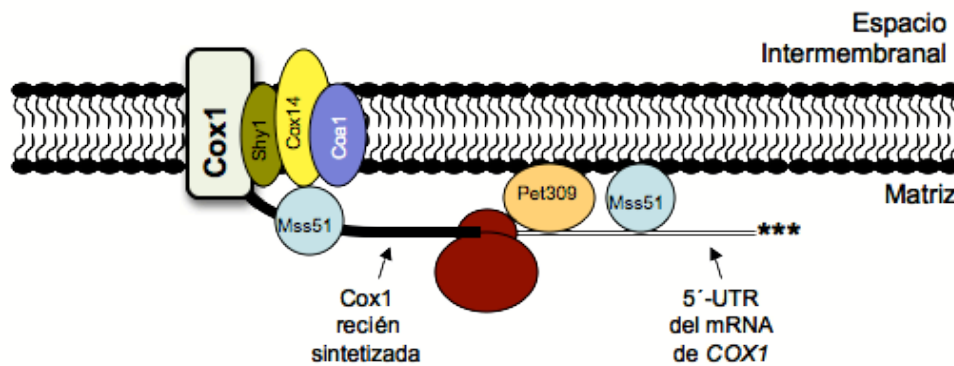
En las levaduras el gen *COX1* está codificado dentro de un policistrón el cual contiene a *COX1*, *ATP8*, *ATP6* y *ESN2* que codifican para la subunidad I de la CcO, las subunidades 8 y 6 de la ATP sintasa y una endonucleasa mitocondrial (Figura 2A). Este policistrón es procesado entre los cistrones *COX1-ATP8* separando a *COX1* del resto de los genes. Dependiendo de la cepa de levadura *COX1* puede contener intrones, los cuales son removidos para que el gen *COX1* se traduzca correctamente.

La expresión de Cox1 dentro de la mitocondria está controlada a nivel traduccional por Mss51 y Pet309 y se sabe que ambas proteínas son limitantes para la expresión de la proteína Cox1 (Perez-Martínez y *col.* 2009). Pet309 reconoce el 5'-UTR del mRNA de *COX1* y se propone que ayuda al ribosoma a posicionarse en el lugar correcto de inicio de la traducción (Fox, 1996b). Mss51 es una proteína periférica de membrana interna requerida para la biogénesis de la CcO. Esta proteína también reconoce el 5'-UTR del mRNA de *COX1* y además funciona como chaperona ya que interacciona con la proteína Cox1 recién sintetizada (Decoster y *col.* 1990; Pérez-Martínez y *col.* 2003). Esta interacción promueve la inserción y ensamblaje de Cox1 dentro de la membrana interna para formar la CcO. Mss51 no sólo interacciona con la proteína Cox1, también se ha detectado asociación con un conjunto de proteínas indispensables para la inserción y ensamblaje de la CcO como Cox14, Coa1 y Shy1 (Figura 2B) (Pierrel y *col.* 2007; Mick y *col.* 2007; Barrientos y *col.* 2002).

A



B



**Figura 2.** Expresión del gen mitocondrial *COX1*. A) Esquema del policistrón que contiene a *COX1*, *ATP6*, *ATP8* y *ENS2*. Los 450 nt del 5'-UTR del gen *COX1* están contenidos en el braquet. Las flechas indican el sitio de procesamiento en el sitio 3'-UTR. B) Modelo de acción de las proteínas implicadas en la expresión de *Cox1*. *Pet309* y *Mss51* activan la traducción del mRNA de *COX1* actuando sobre el extremo 5'-UTR. *Mss51*, *Cox14*, *Shy1* y *Coa1* interaccionan con la proteína *Cox1* recién sintetizada para ayudar en su inserción dentro de la membrana interna mitocondrial. En asteriscos se muestra el 5'-5' trifosfato y en doble línea los 450 nt del 5'-UTR de *COX1*.

### 5. Activadores traduccionales

Los activadores traduccionales son proteínas codificadas por genes nucleares que actúan en *trans*, activando la expresión de los genes mitocondriales. Estas proteínas actúan en el extremo 5' no traducido (5'-UTR) de su mRNA blanco para activar su traducción (Costanzo y Fox, 1990; Fox,

1996). En levadura los extremos 5'-UTR de los mRNA varían en tamaño: el 5'-UTR del mRNA de *COX1* tiene una longitud de 450 nt, el 5'-UTR del mRNA de *COX3* mide 613 nt, mientras que para el 5'-UTR del mRNA de *COX2* es de 54 nt y el 5'-UTR del mRNA de *COB* que es el más grande mide 954 nt. Para otros extremos 5'-UTR no se ha determinado con precisión la longitud de este, tal es el caso del mRNA de *ATP9* y *ATP8* (Fox, 1996).

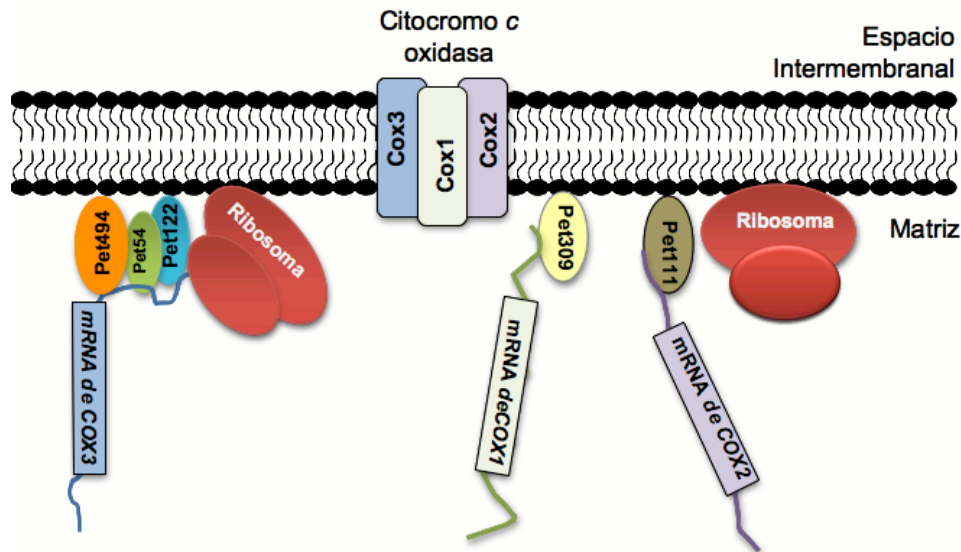
Los mRNA mitocondriales necesitan uno o más activadores traduccionales. Las proteínas Cox1, Cox2 y Cox3 requieren específicamente de los siguientes activadores: Pet309 es el activador traduccional de *COX1*, Pet111 activador traduccional de *COX2* (subunidad 2 de la CcO) y Pet122, Pet494 y Pet54 son los activadores traduccionales de *COX3* (subunidad 3 de la CcO) (Grivell, 1995). La mayoría de los activadores traduccionales están asociados con la membrana interna mitocondrial e interactúan entre sí. Los activadores Pet111, Pet122 y Pet494 son proteínas integrales de membrana (Haffter y col. 1990; McMullin y Fox, 1993) mientras que Pet54 y Pet309 son proteínas periféricas de la membrana interna (McMullin y Fox, 1993; Tavares-Carreón y col. 2008).

Debido a que la mayoría de las proteínas codificadas por el genoma mitocondrial son altamente hidrofóbicas y cruzan varias veces la membrana interna, se ha propuesto que los activadores traduccionales promueven que el inicio de la traducción se lleve a cabo en regiones muy cercanas a la membrana interna mitocondrial (Figura 3) (Naithani y col. 2003; Sanchirico y col. 1998).

Existe literatura que indica que los activadores traduccionales interactúan con el ribosoma: i) se observó que una mutante de *pet122* provocó incapacidad respiratoria en la célula. El fenotipo fue restaurado por una mutación localizada en un gen que codifica para una proteína de la subunidad pequeña ribosomal (Haffter y col. 1990). Tal dato sugirió interacción genética entre el activador traduccional Pet122 y el ribosoma.

ii) Un trabajo reciente demostró por inmunoprecipitaciones y cromatografía de afinidad que los activadores traduccionales Cbs1 y Cbs2 interactúan físicamente con el ribosoma mitocondrial para iniciar la traducción

del mRNA de COB (Krause-Buchholz y *col.* 2004 y 2005). Por otra parte, en nuestro laboratorio se ha observado por medio de gradientes con sacarosa que Pet309 interacciona con el ribosoma mitocondrial (Zamudio-Ochoa, datos sin publicar).



**Figura 3.** Los activadores traducciónales. Estas proteínas están asociados a la membrana interna mitocondrial, donde también están localizados la mayor parte de los mitorribosomas. De esta manera los activadores traducciónales posicionan al mRNA cerca de su sitio de ensamblaje dentro de la membrana interna mitocondrial (Brown y *col.* 1994; Haffter y *col.* 1990; McMullin y Fox, 1993).

Los extremos 5'-UTR de los mensajeros contienen secuencias complementarias al extremo 3' terminal del rRNA 15S similar a la caja tipo "Shine-Dalgarno" presente en procariontes. No hay evidencia de que esta interacción sea totalmente funcional, por dos razones. La primera es que la probable secuencia "Shine-Dalgarno" está a una distancia considerablemente alejada del codón de inicio. Segundo, un mensajero quimérico que carece de

esta secuencia “Shine-Dalgarno” es traducido normalmente *in vivo* (Costanzo y Fox, 1988).

A la fecha no existe evidencia de factores o señales que le indiquen al ribosoma cuál es el AUG correcto para dar inicio a la traducción. Se propone que el mecanismo para comenzar la traducción es que el ribosoma haga una búsqueda en la secuencia hasta encontrar el codón de inicio adecuado. Al hacer mutantes en las cuales se cambió el codón AUG (codón de inicio para la traducción) por el de AUA (codón alternativo para metionina en el DNAm<sup>t</sup> de levadura), provocó que la traducción de estos mensajeros mutados fuera ineficaz provocando un fenotipo no respiratorio en las células (Mulero y Fox, 1994). La traducción residual de estas mutantes es iniciada en un codón de inicio alterno y no en el próximo codón AUG. Esto permitió asentar que además del codón AUG, algunas secuencias o información estructural (como la formación de estructura terciarias en el mRNA) puede ser usada para seleccionar el sitio correcto de inicio de traducción. Cuando el codón AUG es cambiado a AUA, los nucleótidos alrededor de éste proveen información necesaria para indicar cuál es el codón de inicio apropiado.

Se sugiere que los activadores traduccionales funcionan como puente entre el 5'-UTR del mRNA y el ribosoma. De esta manera el activador traduccional posiciona al ribosoma en el codón de inicio correcto del mRNA para iniciar la traducción. Al estar los activadores asociados a la membrana, la traducción debería ocurrir en la superficie de la membrana interna mitocondrial (Mulero y Fox, 1993b; Haffter y *col.* 1990). Tal acoplamiento permitiría la inserción co-traduccional de las proteínas mitocondriales. Este mecanismo requiere que cada mRNA posea su propio activador para la traducción, ayudando a tener distinciones topológicas entre los sitios de síntesis para cada proteína mitocondrial. Tal disposición podría promover eficientemente el ensamblaje de los complejos de la cadena transportadora de electrones dentro de la membrana interna mitocondrial.

Las regiones 5'-UTR de los mRNA mitocondriales carecen de secuencias consenso de unión a los activadores traduccionales e igualmente la mayoría de

los activadores traduccionales carecen de dominios de unión a RNA a excepción de los activadores Pet54 (contiene motivos RRM -Recognition RNA motifs-) y Pet309 (contiene dominios PPR - pentatricopeptide repeat-) de los cuales ya se tienen reportes (Kaspar y *col.* 2008; Tavares-Carreón y *col.* 2008). Sin embargo, recientemente se describió que el activador traduccional Pet111 podría contener de 6 a 14 dominios PPR (Lipinski y *col.* 2011).

## **6. Pet309 es el activador traduccional de COX1**

Pet309 es una proteína de origen nuclear compuesta de 965 aminoácidos y localizada en la membrana interna mitocondrial de manera periférica (Tavares-Carreón y *col.* 2008). Pet309 se requiere específicamente para iniciar la traducción del mRNA maduro de *COX1* y para su estabilidad. Se ha visto que mutantes nulas de *pet309* son incapaces de respirar debido a que la proteína Cox1 no es sintetizada (Manthey y McEwen, 1995).

Evidencia genética indica que Pet309 debe actuar sobre la región 5'-UTR de *COX1*. Este dato fue obtenido del análisis de supresoras de la mutante nula de *pet309*, las cuales indicaron que había una sustitución del 5'-UTR del mRNA de *COX1* por la región 5'-UTR del mRNA de *COB*. Tal rearrreglo conferiría capacidad respiratoria a la levadura debido a que la traducción del mRNA de *COX1* estaba bajo el control de los activadores traduccionales de *COB* y no de Pet309 (Manthey y McEwen, 1995).

Se han reportado posibles homólogos de Pet309 en diferentes organismos como Cya5 en *Neurospora crassa* (Coffin y *col.* 1997) y Ppr4 de *Schizosaccharomyces pombe* (Kühl y *col.* 2011). Cya5 y Ppr4 promueven la traducción del mRNA de *COX1*. En humano se reportó la proteína LRPPRC como posible ortólogo de Pet309, la cual está involucrada en la expresión de los genes *COX1* y *COX3*. Mutaciones en LRPPRC se relacionan con el síndrome de Leigh, enfermedad genética caracterizada por la deficiencia en la expresión de Cox1 (Mootha y *col.* 2003).



Otra característica de estas cuatro proteínas es que todas poseen motivos PPR en su estructura. En levadura, Pet309 es una de cuatro proteínas en las que se han estudiado los dominios PPR y es el primer activador traduccional reportado que contiene estos motivos estructurales (Tavares-Carreón y col. 2008).

## **7. Proteínas con dominios PPR**

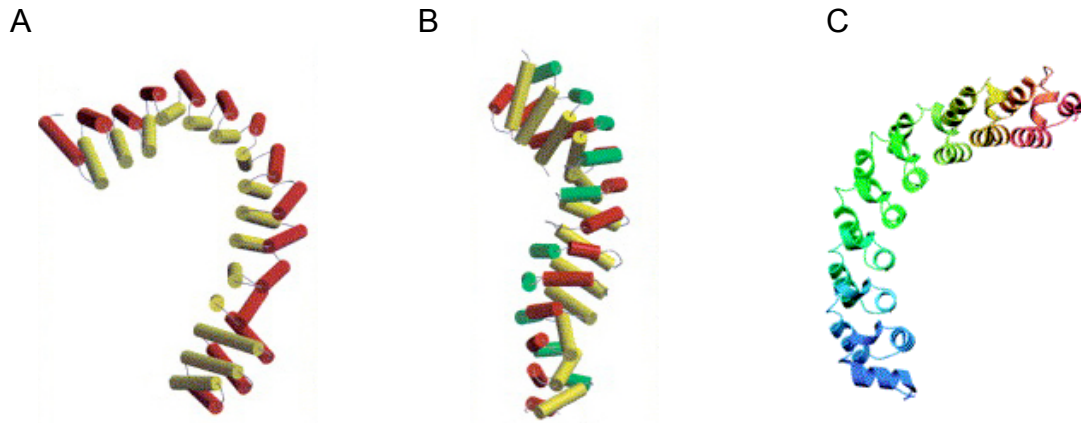
### **a) Estructura.**

Las proteínas PPR (pentatricopeptide repeat) están definidas por tener 35 aminoácidos organizados en serie de dos a 26 repeticiones. Cada repetición adquiere una conformación de dos alfa hélices antiparalelas, de esta manera se propone que el conjunto de todas las repeticiones forman una superhélice (Small y Peeters, 2000). Las proteínas PPR están ampliamente distribuidas en plantas. En *Arabidopsis thaliana* se estima que hay 450 proteínas PPR y cerca de 650 en *Oriza sativa* (Lurin y col. 2004). En contraste, las proteínas PPR en animales y otros eucariotes están considerablemente reducidas. Por ejemplo, en *Trypanosoma brucei* hay ocho proteínas PPR (Mingler y col. 2006; Pusnik y col. 2007). En humano hasta el momento sólo han sido reportadas siete proteínas PPR (Lightowlers y Chrzanowska-Lightowlers, 2008; Davies y col. 2009).

Las proteínas PPR están localizadas principalmente en cloroplastos y mitocondrias. Sin embargo, análisis bioinformáticos no han descrito ninguna proteína PPR en bacterias o archeas. Lo que indica que esta familia de proteínas evolucionó después de la aparición de las células eucariotes.

La conformación estructural de los dominios PPR es inusual, ya que la mayoría de las proteínas con propiedades de unión a RNA son de tipo globular, tal como las proteínas RRM (RNA recognition motif). Sin embargo, existe un conjunto de proteínas con propiedades de unión a RNA como las proteínas HEAT, compuesta de dos alfa hélices y las proteínas armadillo o pumilio, con tres alfa hélices (Groves y Barford, 1999; Messias y Sattler, 2004; Edwards y col.

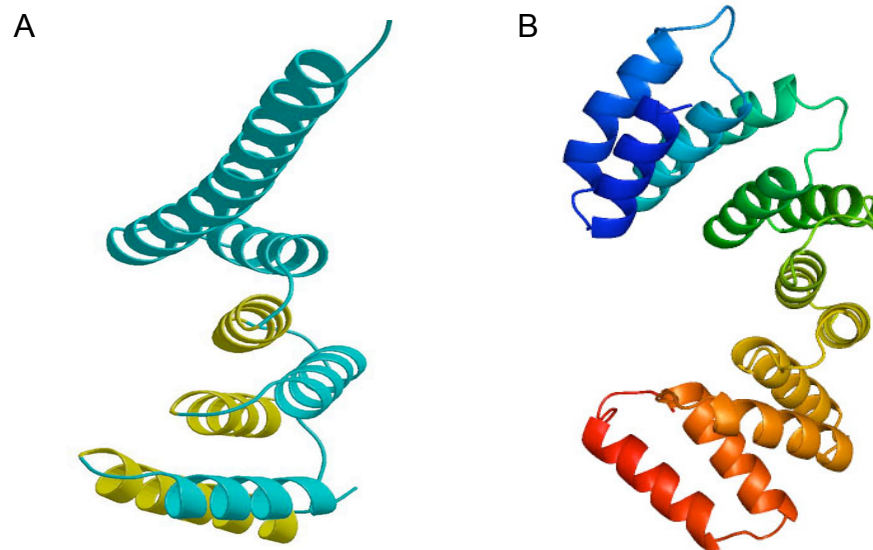
2001; Huber y col. 1997). Estas proteínas presentan estructura helicoidal muy semejante a la propuesta para los motivos PPR (Figura 4).



**Figura 4.** Proteínas de unión a RNA con estructura helicoidal. A) Subunidad PR65/A de la Fosfatasa 2A que presenta motivos HEAT. B) B-catenina con motivos armadillo en su estructura y C) Proteína pumilio con motivos Puf estructurales.

Actualmente no hay estructura cristalográfica de ninguna proteína PPR, sin embargo todos los modelos estructurales de los dominios PPR elaborados hasta ahora están basados en proteínas TPR (tetratricopetide repeat). Las proteínas TPR presentan motivos de 34 aminoácidos y generalmente funcionan como proteínas de andamiaje para interacciones proteína-proteína (D'Andrea y Regan, 2003). Cada repetición TPR está formada por dos alfa hélices antiparalelas y la consecutiva repetición de los motivos genera una superficie helicoidal involucrada en la unión proteína-proteína. Las proteínas PPR son muy similares a las TPR estructuralmente, tanto que las proteínas PPR pueden ser modeladas a partir de cristales de proteínas TPR (Delannoy y col. 2007). Los datos estructurales más cercanos de las proteínas PPR son de dicróismo circular, los cuales apoyan la idea de que la estructura formada por las

repeticiones PPR adoptan una estructura helicoidal conformadas únicamente por alfa hélices igual que las proteínas TPR (Williams-Carrier, 2008) (Figura 5).



**Figura 5.** Comparación entre las proteínas TPR y PPR. En ambos modelos se observa la similitud estructural, la cual forma una superhélice compuesta exclusivamente por alfa hélices antiparalelas. A) Cristal de la proteína fosfatasa 5 (PP5) la cual presenta tres motivos TPR (Das y *col.* 2006). B) Modelo de seis dominios PPR de Pet309, basado en la estructura cristalográfica de la proteína PilF (Tavares-Carreón y *col.* 2008).

### **b) Función.**

Las proteínas PPR en general están involucradas en diferentes pasos del metabolismo de RNA como el procesamiento, estabilidad, splicing, edición y traducción (Schmitz-Linneweber y Small 2008).

Muchas proteínas PPR están involucradas en diversos pasos de la expresión de subunidades de los complejos respiratorios o fotosintéticos (Cofin, y *col.* 1997; Manthey y McEwen, 1995; Schmitz-Linneweber y *col.* 2005; Meierhoff y *col.* 2003; Nakamura y *col.* 2003; Kotera y *col.* 2005). Se han reportado otras funciones igualmente relacionadas con proteínas PPR. Por ejemplo en maíz, la proteína Emp4 está involucrada en el desarrollo de las semillas (Gutierrez-Marcos y *col.* 2007); la proteína PPR2 está vinculada con la

acumulación de ribosomas cloroplásticos (Williams y Barkan, 2003). En arroz, la proteína OsPPR1 es esencial para la biogénesis del cloroplasto (Gothandam y col. 2005). Rf-1 igual que la proteína Rf de petunia y Rfo de rábano están involucradas en la restauración de la fertilidad (Akagi y col. 2004; Bentolilla y col. 2002; Desloire y col. 2003). En *Trypanosoma brucei* la proteína TbPPR1 está relacionada con el procesamiento del maxicírculo mitocondrial (Mingler y col. 2006).

Los miembros de la familia PPR son proteínas de unión a RNA secuencia-específica, dado que su secuencia es altamente degenerada y se ha observado que no reconocen más de 2 RNA blancos. Esto quizá sea debido a la baja conservación que presentan los aminoácidos de cada motivo PPR (Delannoy y col. 2007; Lahmy y col. 2000). Se propone que los dominios PPR son motivos de unión a RNA de cadena sencilla (Small y Peeters, 2000) y la conformación estructural que adquieren es de una superhélice la cual engloba un túnel o cavidad. En esta cavidad se propone que existe una base de residuos cargada positivamente la cual ayudaría a la interacción con la cadena fosfatada del RNA. Tal unión podría permitir el splicing, la edición, la estabilidad y la traducción de los RNA mensajeros. Sin embargo, a las proteínas PPR no se les ha encontrado actividad catalítica y es posible que actúen como adaptadores que median la interacción entre el RNA y otras proteínas. Este complejo puede estar trabajando en conjunto para el proceso que debe de sufrir el RNA (Schmitz-Linneweber y Small, 2008).

## **8. Proteínas PPR en levadura**

Recientemente se creó el software SCIPHER para detectar proteínas PPR en hongos y levaduras (Lipinski y col. 2011). Con este programa se detectaron 15 proteínas PPR en *S cerevisiae*, sin embargo de las 15 proteínas sólo a cuatro de ellas se les ha estudiado de manera directa la función de los dominios PPR. Estas proteínas son Pet309, Aep3, Dmr1/Ccm1 y Rmd9 (Figura 6). Todas están localizadas en la mitocondria y se pueden clasificar en dos

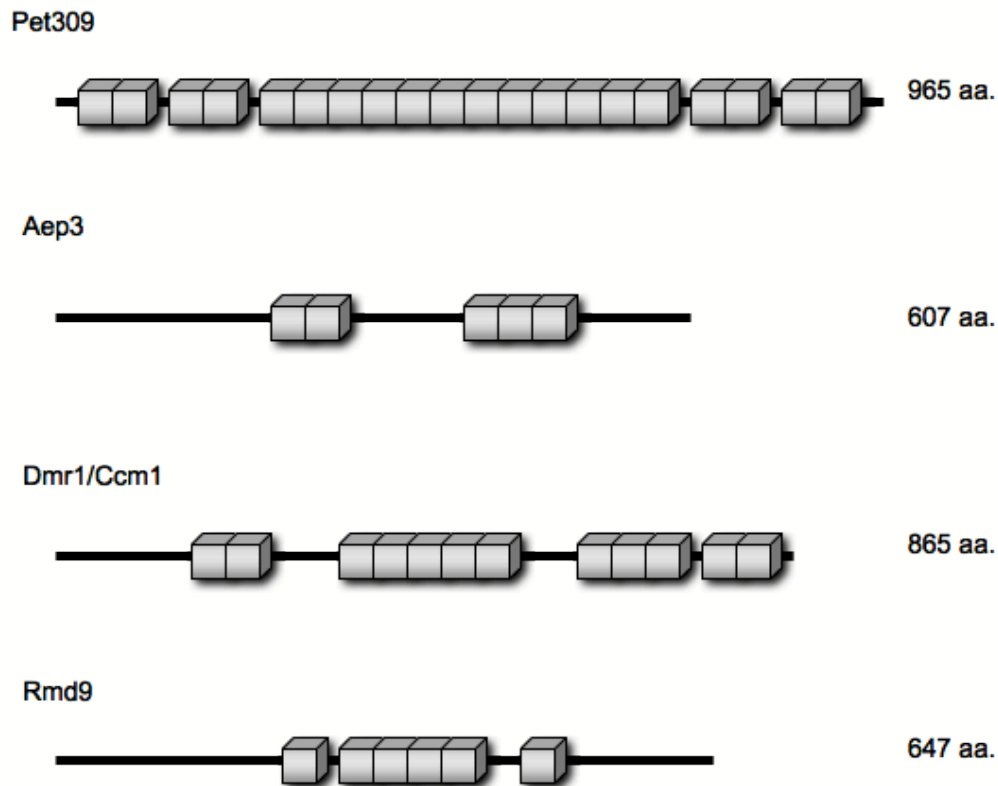
grupos: 1) factores que controlan la estabilidad de un solo mRNA (Pet309 y Aep3) y 2) factores que controlan la estabilidad o procesamiento de varios mRNA (Ccm1 y Rmd9).

**Pet309** fue la primera proteína PPR descrita en levadura. Como se describió previamente es específica para el mRNA de *COX1* (Manthey y McEwen,1995). Su gen se localiza en el cromosoma XII, el tamaño de la proteína es de 965 aminoácidos y contiene 19 posibles dominios PPR (Lipinski y col. 2011).

**Aep3** es requerida para la estabilidad del mRNA bicistrónico *ATP6-ATP8*, que codifica para las subunidades 6 y 8 de la ATP sintasa. Esta proteína se localiza en la membrana interna mitocondrial de manera periférica y mirando hacia la matriz mitocondrial (Ellis y col. 2004). También se observó que funciona como un factor de inicio de la traducción mitocondrial e interacciona físicamente con mIF2 (Factor de inicio mitocondrial 2) (Lee y col. 2009). Su gen está ubicado en el cromosoma XVI, la proteína tiene 607 aminoácidos y posee cinco dominios PPR

**Dmr1/Ccm1** es una proteína involucrada en la estabilidad de pequeños RNAs del mitorribosoma y por lo tanto en la traducción de proteínas mitocondriales. Se une al rRNA 15s y remueve intrones de los pre-mRNA de *COX1* y *COB* para su maduración. Su gen está localizado en el cromosoma VII, el tamaño de la proteína es de 865 aminoácidos y contiene 12 dominios PPR (Moreno y col. 2009; Puchta y col. 2010).

**Rmd9** es proteína descrita como un factor general que acarrea mRNA mitocondriales a la membrana interna mitocondrial para su traducción y está asociada a ribosomas mitocondriales. Se localiza en la membrana interna mitocondrial mirando hacia la matriz. La ubicación de su gen se encuentra en el cromosoma VII, la longitud de la proteína es de 647 aminoácidos y posee seis motivos PPR. (Williams y col. 2007; Nouet y col. 2007).



**Figura 6.** *S. cerevisiae* tiene cuatro proteínas PPR descritas. Pet309 es la proteína más grande y contiene más motivos PPR en comparación con el resto de las proteínas PPR de levadura (Modificado de Lipinski y *col.* 2011). Los motivos PPR se representan en cuadros grises.

### **9. Interacción de proteínas PPR con su RNA específico.**

A la fecha existen pocos reportes donde se demuestre la interacción de las proteínas PPR con su ácido nucleico *in vivo*. CRP1 fue la primer proteína PPR reportada que mostró interacción directa con la región 5' no traducida de los mRNAs *petA* y *psaC* en cloroplasto de *Arabidopsis thaliana* (Schmitz-Linneweber y *col.* 2005). Otro ejemplo es la proteína PPR5 de maíz, la cual se une *in vivo* al transcrito *trnG-UCC* para estabilizarlo y promover su splicing (Beick y *col.* 2008).

Estudios *in vitro* sobre los mecanismos de reconocimiento del RNA por proteínas PPR van en aumento. La mayoría de los datos están enfocados a la edición de transcritos mitocondriales de plantas, ya que es un proceso importante en la expresión de proteínas de cloroplasto (Robbins y col. 2009; Verbitskiy y col. 2010; Tang y col. 2010; Hammani y col. 2009). Por citar algunos ejemplos, la proteína OTP87 de *Arabidopsis thaliana* se requiere para editar los RNA mensajeros *nad7* y *atp1*. OTP87 se une a 30 y 10 nucleótidos río arriba del sitio que será editado en los genes *nad7* y *atp1* respectivamente (Hammani y col. 2011). En el musgo *Physcomitrella patens*, la proteína PpPPR\_71 reconoce 46 nucleótidos alrededor de la secuencia a editar en el transcrito *ccmF-2*, el cual codifica para una proteína necesaria para la maduración del citocromo *c* (Tasaki y col. 2010). CCR4 se requiere para editar el codón de inicio del transcrito *ndhD* en *A. thaliana*, uniéndose específicamente a la región -25/+10 que abarca el sitio de edición (Okuda y col. 2007). Estos ejemplos apoyan la idea de que las proteínas PPR desempeñan un papel como factores de reconocimiento específico en la edición del RNA.

Sin embargo, son muy escasos los reportes de la función de las proteínas PPR sobre la traducción, la mayoría de los datos obtenidos son sobre proteínas PPR de plantas. Un reporte reciente demostró que la proteína de maíz PPR10 reconoce 17 nucleótidos de la región intergénica de *atpI-atpH* para remodelar la estructura del RNA, haciendo accesible el reconocimiento de esta región por el ribosoma e incrementando su traducción (Prikryl y col. 2011). La proteína PGR3 de *A. thaliana* se asocia a polisomas de cloroplasto junto con los transcritos que serán traducidos. En una mutante de *pgr3* la asociación de los transcritos a los polisomas se ve afectada (Cai y col. 2011).

En levadura, no se han observado interacciones *in vivo* de las proteínas PPR reportadas. La proteína Dmr1/Ccm1 es la única proteína PPR para la cual se detectó *in vitro* su asociación con RNA ribosomal. Para el resto de las proteínas no se ha determinado de manera directa asociación con sus RNA blancos. A la fecha no hay reporte de interacción física entre los activadores traduccionales con los RNA mensajeros mitocondriales.

Para activar la traducción del mRNA de *COX1* es necesaria la presencia de Pet309 (Manthey y McEwen, 1995). Pet309 no contiene otros dominios funcionales, solo presenta casi en su totalidad dominios PPR. Previamente observamos que al eliminar los dominios PPR fuertemente predichos (ocho motivos PPR) los cuales cubren los aminoácidos 346 al 632 en Pet309, se abatía la síntesis de Cox1, sin alterar la estabilidad del mRNA de *COX1* (Tavares-Carreón y col. 2008). Sin embargo, aún no se ha demostrado la asociación de Pet309 con el RNA mensajero de *COX1* y tampoco se han logrado establecer ensayos *in vitro* para determinar dicha asociación.



## Justificación

Cox1 es la subunidad más grande de la citocromo c oxidasa, juega un papel fundamental en el centro catalítico de la enzima, así como en las primeras etapas de su ensamblaje. En *S. cerevisiae* la expresión del gen *COX1* es muy compleja y poco comprendida. Se han identificado y caracterizado un gran número de proteínas que facilitan la expresión del gen *COX1*, entre ellas Pet309 y Mss51. Ambas proteínas activan la traducción del gen *COX1*. Nos interesa estudiar como actuaría Pet309 en conjunto con Mss51 para activar la traducción de *COX1*, ya que se desconoce como funcionan estas proteínas en conjunto para activar la traducción.

Por otro lado, Pet309 es de las pocas proteínas PPR de levadura, por lo que nos interesa estudiar la asociación entre Pet309 con el 5'-UTR del mensajero de *COX1*, y si los dominios PPR de Pet309 están involucrados en dicha asociación. Actualmente se han elevado considerablemente el número de reportes donde describen la función e interacción de proteínas PPR *in vitro*. La levadura ofrece la ventaja de estudiar la interacción de Pet309 con el RNA *in vivo*, lo que nos permitirá analizar con detalle esta asociación. Además, este trabajo contribuye a comprender mejor cómo se lleva a cabo la activación traduccional en la mitocondria de levadura (punto esencial de regulación de la expresión del DNAm). También ayuda a entender cómo funcionan las proteínas de la familia PPR, que a pesar de haberse identificado hace 10 años aún no se comprende el mecanismo de acción.

## **Hipótesis**

Pet309 es un activador traduccional que presenta dominios de unión a RNA, los cuales deben de estar interaccionando con el mRNA de *COX1*. Se sabe que los motivos PPR son secuencia específica, por lo que podrían estar reconociendo una región específica de este mRNA. Además, la interacción entre Pet309 y el mRNA de *COX1* puede estar regulada por Mss51.

## **Objetivo**

Estudiar la interacción física de Pet309 con *COX1* y analizar la participación de los dominios PPRs en dicha interacción.

## **Objetivos específicos**

1. Generar mutantes puntuales de aminoácidos básicos de los dominios PPR.
2. Estudiar la interacción de los dominios PPR con el extremo 5'-UTR de *COX1*.
3. Estudiar si la interacción de los dominios PPR con el extremo 5'-UTR de *COX1* depende de otros factores como el mitoribosoma y/o proteínas involucradas en la biogénesis de Cox1.
4. Buscar y caracterizar supresoras respiratorias de mutantes carentes de algún dominio PPR.

## Materiales y Métodos

Las cepas utilizadas en este estudio se describen en la tabla 1. Todas las levaduras fueran crecidas a 30 °C en YPD o YPRaf (1 % de extracto de levadura, 2 % de bactopectona, 2 % de glucosa o rafinosa), medio sintético carente de uracilo (0.6 % base nitrogenada de levadura sin aminoácidos, 2 % de glucosa o rafinosa, 770 mg de -uracilo) y YPEG (1 % de extracto de levadura, 2 % de bactopectona, 2 % de etanol, 3 % de glicerol).

<b>Tabla 1. Cepas empleadas en este estudio</b>		
Todas las cepas de <i>S. cerevisiae</i> son isogénicas con D273-10B y entre corchetes se presenta el genotipo mitocondrial.		
<b>Cepas</b>	<b>Genotipo Nuclear y [mitocondrial]</b>	<b>Referencia</b>
FTC25	<i>Mat α ura3Δ ade2 PET309::3xHA nuc1ΔKanMX4 [ρ+]</i>	Este trabajo
FTC26	<i>Mat α ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG pet309Δ::LEU2 nuc1ΔKanMX4 [ρ+, ΔΣai]</i>	Este trabajo
YC122	<i>Mat α ura3Δ ade2 PET309::3xHA mss51ΔURA3 [ρ+]</i>	Este trabajo
SB5	<i>Matα, ade2, ura3Δ, PET309::3xHA [ ρ<sup>+</sup>]</i>	Tavares-Carreón y col. 2008
SB7	<i>Mat α ura3Δ ade2 MSS51::3xHA [ρ+]</i>	Peréz-Martínez y col. 2003
XPM201	<i>Mat α ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG [ρ+, ΔΣai]</i>	Tavares-Carreón y col. 2008
XPM231	<i>Mat α ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG pet309Δ::LEU2 [ρ+, cox1Δ::ARG8<sup>m</sup>]</i>	Tavares-Carreón y col. 2008
XPM232	<i>Mat α ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG pet309Δ::LEU2 [ρ+, ΔΣai]</i>	Tavares-Carreón y col. 2008
YC10	<i>Mat α ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG</i>	Este trabajo

	<i>pet309Δppr2</i> [ $\rho^+$ , $\Delta\Sigma ai$ ]	
YC11	<i>Mat</i> $\alpha$ <i>ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG</i> <i>pet309Δppr3</i> [ $\rho^+$ , $\Delta\Sigma ai$ ]	Este trabajo
YC12	<i>Mat</i> $\alpha$ <i>ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG</i> <i>pet309Δppr4</i> [ $\rho^+$ , $\Delta\Sigma ai$ ]	Este trabajo
YC13	<i>Mat</i> $\alpha$ <i>ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG</i> <i>pet309Δppr5</i> [ $\rho^+$ , $\Delta\Sigma ai$ ]	Este trabajo
YC14	<i>Mat</i> $\alpha$ <i>ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG</i> <i>pet309Δppr7</i> [ $\rho^+$ , $\Delta\Sigma ai$ ]	Este trabajo
YC21	<i>Mat</i> $\alpha$ <i>ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG</i> <i>pet309pprΔ2</i> [ $\rho^+$ , <i>cox1Δ::ARG8<sup>m</sup></i> ]	Este trabajo
YC22	<i>Mat</i> $\alpha$ <i>ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG</i> <i>pet309pprΔ3</i> [ $\rho^+$ , <i>cox1Δ::ARG8<sup>m</sup></i> ]	Este trabajo
YC23	<i>Mat</i> $\alpha$ <i>ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG</i> <i>pet309pprΔ4</i> [ $\rho^+$ , <i>cox1Δ::ARG8<sup>m</sup></i> ]	Este trabajo
YC24	<i>Mat</i> $\alpha$ <i>ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG</i> <i>pet309pprΔ5</i> [ $\rho^+$ , <i>cox1Δ::ARG8<sup>m</sup></i> ]	Este trabajo
YC25	<i>Mat</i> $\alpha$ <i>ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG</i> <i>pet309pprΔ6</i> [ $\rho^+$ , <i>cox1Δ::ARG8<sup>m</sup></i> ]	Este trabajo
YC36	<i>Mat</i> $\alpha$ <i>ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG</i> <i>pet309pprΔ8</i> [ $\rho^+$ , <i>cox1Δ::ARG8<sup>m</sup></i> ]	Este trabajo
YC37	<i>Mat</i> $\alpha$ <i>ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG</i> <i>pet309Δppr6</i> [ $\rho^+$ , $\Delta\Sigma ai$ ]	Este trabajo
YC38	<i>Mat</i> $\alpha$ <i>ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG</i> <i>pet309Δppr8</i> [ $\rho^+$ , $\Delta\Sigma ai$ ]	Este trabajo
FTC13	<i>Mat</i> $\alpha$ <i>ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG</i> <i>pet309Δ::LEU2</i> + <i>pXP124</i> [ $\rho^+$ , <i>cox1Δ::ARG8<sup>m</sup></i> ]	Este trabajo
FTC14	<i>Mat</i> $\alpha$ <i>ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG</i> <i>pet309Δ::LEU2</i> + <i>pXP125</i> [ $\rho^+$ , <i>cox1Δ::ARG8<sup>m</sup></i> ]	Este trabajo

FTC15	<i>Mat α ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG pet309Δ::LEU2 + pXP126 [ρ+, cox1Δ::ARG8<sup>m</sup>]</i>	Este trabajo
FTC16	<i>Mat α ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG pet309Δ::LEU2 + pXP127 [ρ+, cox1Δ::ARG8<sup>m</sup>]</i>	Este trabajo
FTC17	<i>Mat α ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG pet309Δ::LEU2 + pXP128 [ρ+, cox1Δ::ARG8<sup>m</sup>]</i>	Este trabajo
FTC18	<i>Mat α ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG pet309Δ::LEU2 + pXP129 [ρ+, cox1Δ::ARG8<sup>m</sup>]</i>	Este trabajo
FTC19	<i>Mat α ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG pet309Δ::LEU2 + pXP124 [ρ+, ΔΣai]</i>	Este trabajo
FTC20	<i>Mat α ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG pet309Δ::LEU2 + pXP125 [ρ+, ΔΣai]</i>	Este trabajo
FTC21	<i>Mat α ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG pet309Δ::LEU2 + pXP126 [ρ+, ΔΣai]</i>	Este trabajo
FTC22	<i>Mat α ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG pet309Δ::LEU2 + pXP127 [ρ+, ΔΣai]</i>	Este trabajo
FTC23	<i>Mat α ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG pet309Δ::LEU2 + pXP128 [ρ+, ΔΣai]</i>	Este trabajo
FTC24	<i>Mat α ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG pet309Δ::LEU2 + pXP129 [ρ+, ΔΣai]</i>	Este trabajo
FTC40	<i>Mat α ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG pet309Δppr2 [ρ+, ΔΣai]</i>	Este trabajo
FTC40-R1	<i>Mat α ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG pet309Δppr2 [ρ+, ΔΣai] (supresora recesiva)</i>	Este trabajo
FTC40-R5	<i>Mat α ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG pet309Δppr2 [ρ+, ΔΣai] (supresora dominante)</i>	Este trabajo
FTC40-R8	<i>Mat α ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG pet309Δppr2 [ρ+, ΔΣai] (supresora dominante)</i>	Este trabajo

## 1. Generación de construcciones plásmicas.

Los vectores de clonación utilizados y plásmidos generados en este estudio se enlistan en la tabla 2. Las bacterias que contienen estos plásmidos se cultivaron a 37 °C en medio Luria Bertani (LB, 10 g de bactopectona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl). El medio se suplementó con ampicilina (100 mg/ml concentración final 100 µg/ml).

<b>Nombre</b>	<b>Descripción</b>	<b>Referencia</b>
pXP97	<i>pet309-3xHA</i> clonado en el vector pRS416	Tavares-Carreón y col. 2008
pXP104	<i>pet309-3xHA</i> clonado en el vector YEp352	Tavares-Carreón y col. 2008
pFT10	<i>pet309Δ12ppr</i> clonado en el vector pRS416	Este trabajo
pFT11	<i>pet309Δ12ppr</i> clonado en el vector YEp352	Este trabajo
pYCV15	<i>pet309Δppr2</i> clonado en el vector pRS416	Este trabajo
pYCV16	<i>pet309Δppr3</i> clonado en el vector pRS416	Este trabajo
pYCV17	<i>pet309Δppr4</i> clonado en el vector pRS416	Este trabajo
pYCV19	<i>pet309Δppr5</i> clonado en el vector pRS416	Este trabajo
pYCV20	<i>pet309Δppr6</i> clonado en el vector pRS416	Este trabajo
pYCV28	<i>pet309Δppr7</i> clonado en el vector pRS416	Este trabajo
pYCV29	<i>pet309Δppr8</i> clonado en el vector pRS416	Este trabajo
pYCV25	<i>pet309</i> con la mutación puntual Y354F, clonado en el vector YEp352	Este trabajo
pYCV26	<i>pet309</i> con la mutación puntual R358A, clonado en el vector YEp352	Este trabajo
pYCV27	<i>pet309</i> con la mutación puntual K393A, clonado en el vector YEp352	Este trabajo

pYCV30	<i>pet309</i> con la mutación puntual K393A, clonado en el vector pRS416	Este trabajo
pYCV31	<i>pet309</i> con la mutación puntual R358A, clonado en el vector pRS416	Este trabajo
pYCV32	<i>pet309</i> con la mutación puntual Y354F, clonado en el vector pRS416	Este trabajo
pYCV34	<i>pet309</i> con la doble mutación puntual R358A - K393A, clonado en el vector pRS416	Este trabajo
pYCV35	<i>pet309</i> con la doble mutación puntual R358A - K393A, clonado en el vector YEp352	Este trabajo
pXP124	<i>pet309</i> con la mutación puntual K424A, clonado en el vector pRS416	Este trabajo
pXP125	<i>pet309</i> con la mutación puntual K424A, clonado en el vector YEp352	Este trabajo
pXP126	<i>pet309</i> con la mutación puntual R427A, clonado en el vector pRS416	Este trabajo
pXP127	<i>pet309</i> con la mutación puntual R427A, clonado en el vector YEp352	Este trabajo
pXP128	<i>pet309</i> con la doble mutación puntual K424A - R427A, clonado en el vector pRS416	Este trabajo
pXP129	<i>pet309</i> con la doble mutación puntual K424A - R427A, clonado en el vector YEp352	Este trabajo
pFT19	<i>pet309</i> con eliminación del PPR2 sin el epítotope 3xHA clonado en el vector pRS416	Este trabajo
pFT20	<i>pet309</i> con eliminación del PPR4 sin el epítotope 3xHA clonado en el vector pRS416	Este trabajo
pFT21	<i>pet309</i> con eliminación del PPR9 sin el epítotope 3xHA clonado en el vector pRS416	Este trabajo

La mutante de *pet309Δ12ppr* se generó por PCR, empleando como templado el gen *PET309* silvestre previamente clonado en un vector bacteriano (pXP96). Este plásmido contiene a *PET309* flanqueado por 305 y 205 nucleótidos de su región 5'-UTR y 3'-UTR. Al final de extremo carboxilo terminal de *Pet309* se adicionó un triple epítipo de hemaglutinina (3xHA), para detectar a la proteína inmunológicamente. Los productos de PCR se clonaron en dos vectores de expresión en levadura: pRS416 (vector centromérico de bajo número de copias) y en YEp352 (vector de alto número de copias), los cuales poseen el marcador de auxotrofia URA3 (Sikorski y Hieter, 1989; Hill y col. 1993).

Para el PCR se utilizaron los oligonucleótidos PET309-F12, PET309-F33, PET309-R4 y PET309-R33 (ver apéndice 1). Estos oligonucleótidos flanquean la zona PPR y abarcan los sitios de restricción *Pst*I y *Xho*I de *PET309*. El oligonucleótido PET309F12 (sentido) ubicado en la posición 580 nt río abajo del codón de inicio de *PET309* abarca el sitio *Pst*I. El oligonucleótido PET309-R4 (anti-sentido) ubicado al final de *PET309* incluye el sitio *Xho*I. El producto de PCR obtenido se digirió con las enzimas de restricción *Pst*I y *Xho*I. Posteriormente se ligó en pXP96 digerido con las mismas enzimas de restricción con el objetivo de eliminar a los 12 dominios PPR presentes en *PET309*.

Una vez clonada la mutante *pet309Δ12ppr* en pXP96, se hizo una segunda digestión con las enzimas *Xba*I y *Xho*I (localizadas en el 5'-UTR y 3'-UTR de *PET309*) para liberar todo el gen de *pet309* con la mutación incluida y ligarla a los vectores de expresión de levadura pRS416 y YEp352, los cuales también se digirieron con las mismas enzimas de restricción, así se generaron los plásmidos pFT10 y pFT11.

Para generar las mutantes puntuales de los aminoácidos básicos localizados en la cavidad central de los dominios PPR, se diseñaron oligonucleótidos (listados en el apéndice 1) para hacer PCR de fusión y sustituir los aminoácidos arginina 358, lisina 393, lisina 424 y arginina 427 por alanina en todos los casos. Cada versión mutante se clonó en el vector pRS416 (de bajo número de copias) generando los plásmidos pXP124, pXP126 y pXP128 o en el



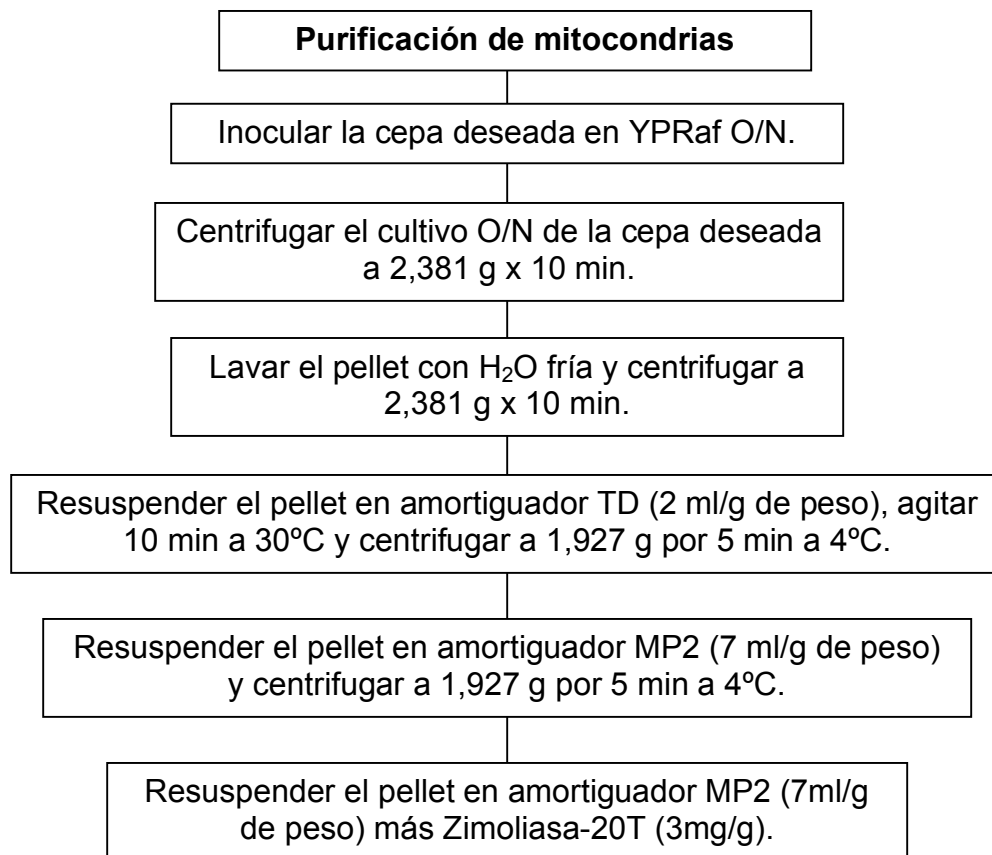
vector YEp352 (alto número de copias) generando los plásmidos pXP125, pXP127 y pXP129.

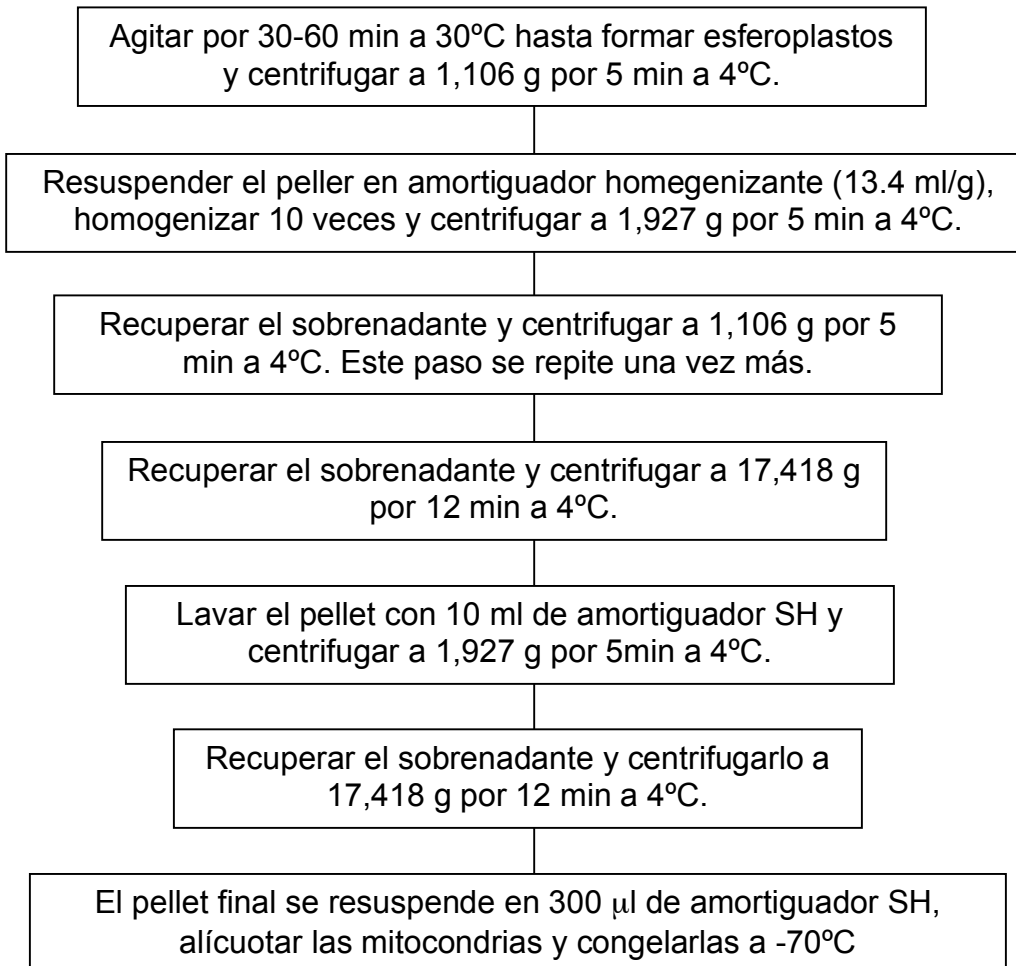
Con las construcciones plasmídicas generadas de *pet309* se transformaron las cepas XPM231 y XPM232 con el método previamente descrito por Ito (1983), para analizar su fenotipo.

## **2. Purificación de mitocondrias** (Modificado de Diekert, 1999).

Se crecieron las levaduras en 2 ml de medio mínimo -uraRaf por 48 hrs a 30 °C. Este cultivo se transfirió a 50 ml de -uraRaf y se incubó a 30 °C. Todo el cultivo anterior se usó para resembrar 2 l de medio -uraRaf y se incubó toda la noche a 30°C hasta una  $A_{600}$  de 1 (fase exponencial de crecimiento). Se cosechó el cultivo con una centrifugación de 2,831 g por 10 min a 4 °C (rotor JA10 Beckman). Las células centrifugadas se lavaron con agua fría (volumen 1/10) y se centrifugaron a 2,831 g por 10 min a 4 °C (rotor JA10 Beckman), se eliminó el sobrenadante y se pesó el frasco que contiene las células cosechadas. Posteriormente las células se resuspendieron en amortiguador TD (2 ml/g de peso húmedo) y se agitaron por 10 min a a 30°C y luego se centrifugaron a 1,927 g (rotor JA10 Beckman). Luego el pellet se lavó con amortiguador MP2 (7 ml/g de peso húmedo) y se centrifugó por 5 min a 1,927 g (rotor JA10 Beckman). Después el pellet se resuspendió en amortiguador MP2 (7 ml/g de peso) y se adicionó zimoliasa-20T (3 mg/g de peso húmedo). Se agitó de 30 a 60 min a 30 °C, hasta que los esferoplastos se formaron (se revisó la presencia de esferoplastos a los 30, 45 y 60 min). Se confirmaron los esferoplastos de la siguiente manera: en un tubo de ensayo se agregaron 2 ml de agua y en otro tubo de ensayo 2 ml de sorbitol 1.2 M. A cada tubo se le agregaron 50  $\mu$ l de células, se agitó en vortex y se compararon los dos tubos. Cuando se formaron los esferoplastos el tubo con agua se vió claro debido a que la diferencia de osmolaridad rompió las células, mientras que el tubo con sorbitol se observó turbio. Una vez obtenidos los esferoplastos se centrifugaron por 5 min a 1,106 g a 4 °C (rotor JA10 Beckman). Posteriormente se resuspendió el

pellet en un cuarto del volumen de amortiguador homogeneizante (13.4 ml/g) y se homogenizó en homogenizador de vidrio 10 veces. Posteriormente se centrifugó por 5 min a 1,927 g a 4 °C (rotor JA10 Beckman). Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó por 5 min a 1,106 g a 4 °C (rotor JA10 Beckman). Se recuperó el sobrenadante y se volvió a centrifugar a 1,106 g a 4°C. Nuevamente se recuperó el sobrenadante y se centrifugó por 12 min a 17,418 g a 4 °C (rotor JA25.50 Beckman), en el pellet se encuentran las mitocondrias crudas. Posteriormente se resuspende el pellet en 10 ml de amortiguador SH (toda la solución SH se preparó con H<sub>2</sub>O-DEPC) y se centrifugó por 5 min a 1,927 g a 4 °C (rotor JA25.50 Beckman). Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó por 12 min a 17,418 g a 4 °C (rotor JA25.50 Beckman). Se desecha el sobrenadante y el pellet final se resuspendió en 300 µl de amortiguador SH. Finalmente se tomaron alícuotas de las mitocondrias y se congelaron con nitrógeno líquido.





### **3. Determinación de proteínas por Lowry (Markwell y col. 1978)**

La cuantificación de proteínas mitocondriales se realizó por el método de Lowry (Markwell y col. 1978). Para ello se hizo una curva de calibración de albúmina (1mg/ml). La curva se realizó con 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 µl de la solución de albúmina en tubos de ensayo. La muestra mitocondrial y el de la curva se ajustaron con 1 ml de agua. Posteriormente se adicionaron 3 ml de solución C, se mezcló en vortex e incubó por 10 min. Transcurrido el tiempo se agregó 300 µl de solución D, se mezcló e incubó por 30 min a temperatura ambiente y la absorbencia se midió a 740 nm ( $A_{740}$ ).

#### *Solución A*

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

#### *Solución B*

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

#### *Solución C*

Se mezclaron 100 volúmenes de solución A con 1 volumen de solución B (preparar al momento).

#### *Solución D*

Se preparó 1 volumen de reactivo de Folin con 1 volumen de agua (preparar al momento).

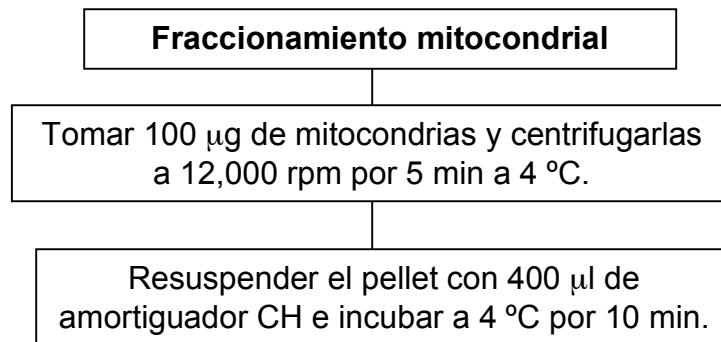
### **4. Análisis de proteínas mitocondriales**

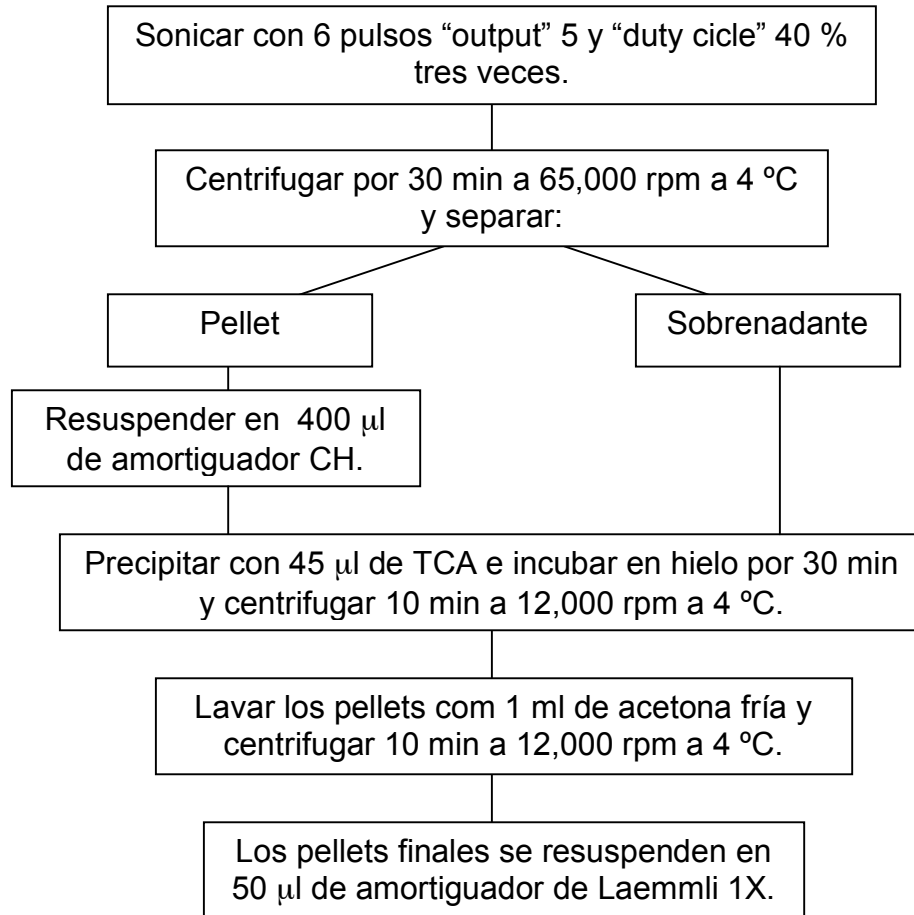
Las proteínas mitocondriales se separaron en geles de SDS-PAGE al 12 % y se transfirieron a membranas de PVDF para analizarlas por Western blot. Las inmunodetecciones fueron hechas con anticuerpos anti-HA acoplado a peroxidasa (ROCHE), anti-Cox1 (Molecular probes), anti-citrato sintasa (donado por el Dr. Thomas D. Fox), anti- ARG8m (donado por el Dr. Thomas D. Fox) y anti-citocromo c1 (donado por el Dr. Diego González Halphen). Todos los anticuerpos primarios se incubaron por 1 hora y se lavó la membrana tres veces con solución de lavado (ver abajo sección de soluciones y amortiguadores) durante 30 min. Los anticuerpos secundarios fueron anti-conejo o anti-ratón acoplados a peroxidasa (ROCHE o BioRad). Estos anticuerpos también se incubaron y lavaron por 1 hr durante 30 min respectivamente. Todos los anticuerpos se detectaron con el kit de ECL (Pierce) o ECL plus (GE healthcare) de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes. La luminiscencia del anticuerpo HA acoplado a peroxidasa y de anti-Cox1 se detectaron con películas

BioMax Light Film (Kodak). La luminiscencia para el resto de los anticuerpos se detectó con las películas Medical X Ray (Kodak).

### **5. Fraccionamiento mitocondrial** (Modificado de Glick, 1995)

Se tomarón 100  $\mu\text{g}$  de mitocondria purificadas ó 200  $\mu\text{g}$  de mitocondrias provenientes de las cepas mutantes. Se centrifugaron (centrifuga Eppendorf 5415D) por 5 min a 12,000 rpm a 4 °C. Posteriormente se resuspendió el pellet de mitocondrias agregándoles 400  $\mu\text{l}$  de amortiguador CH (NaCl + HEPES 200 mM) pH 7.4 y se incubaron en hielo por 10 min. Después fueron sonicadas (Sonicador Branson. Sonifier 450) con 6 pulsos, “output” 5 y “duty cycle” 40% tres veces. Se centrifugaron por 30 min a 65,000 rpm en un rotor TLA-100.3 (Beckman). Los sobrenadantes se transfirieron a un tubo nuevo y el pellet obtenido de la centrifugación se resuspendió agregandoles 400  $\mu\text{l}$  de CH. Posteriormente los sobrenadantes y los pellets se precipitaron agregando 45  $\mu\text{l}$  de ácido tricloroacético (TCA) al 100 % (BioChemika). Se incubaron en hielo por 30 min y luego fueron centrifugados 10 min a 12,000 rpm a 4 °C. Se lavaron las proteínas precipitadas con 1 ml de acetona fría y finalmente los pellets se resuspendieron en 50  $\mu\text{l}$  amortiguador de Laemmli 1X. La mezcla fue calentada a 65 °C 10 min y se cargaron 20  $\mu\text{l}$  en gel de poliacrilamida al 12 % para analizarlo por inmunodetección tipo Western blot.

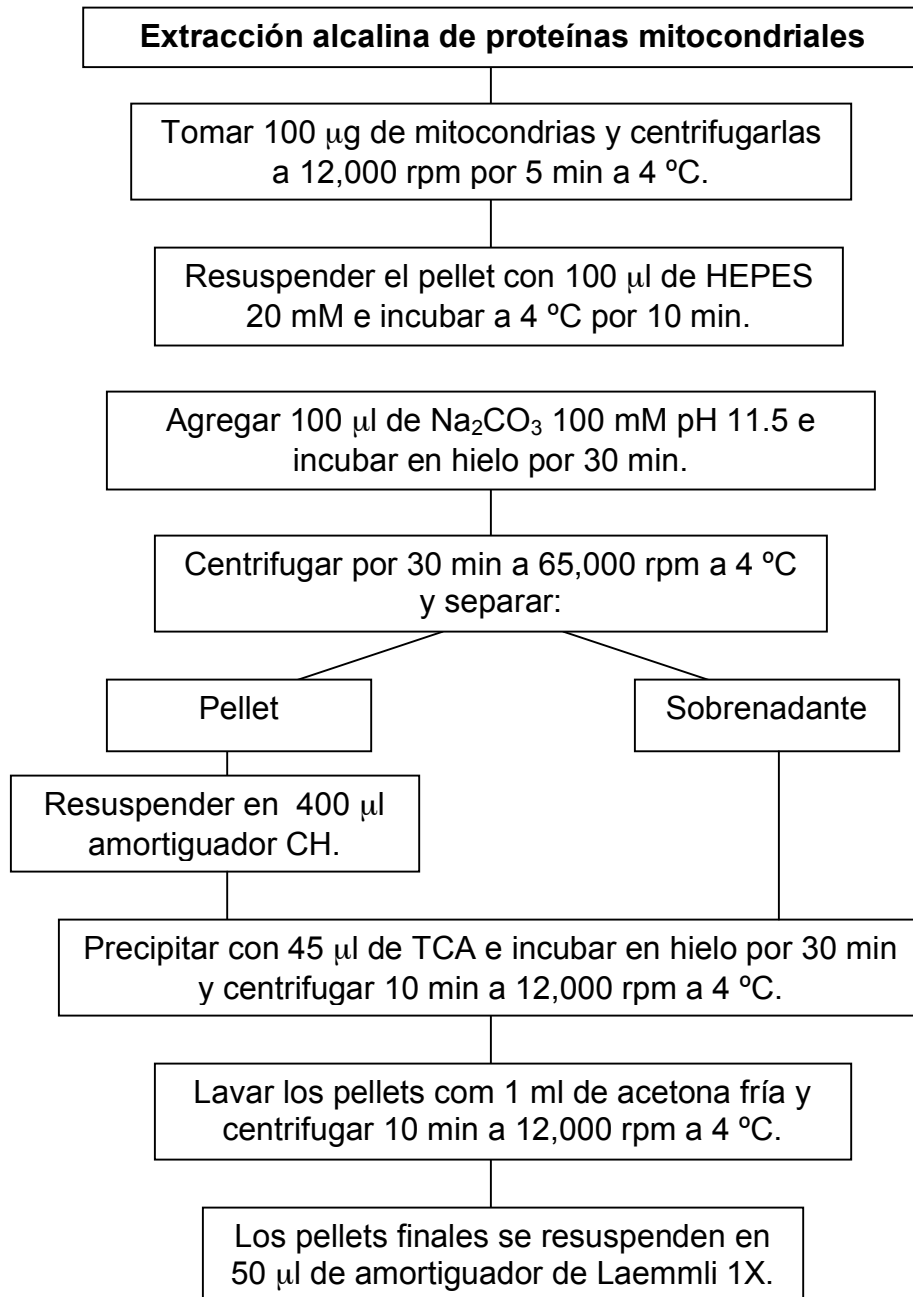




**6. Extracción alcalina de proteínas mitocondriales** (Modificado de Fujiki y col. 1982)

Se tomarón 100 µg de mitocondria purificadas o 200 µg para mitocondrias provenientes de las cepas mutantes. Se centrifugaron (centrifuga Eppendorf 5415D) por 5 min a 12,000 rpm a 4 °C. Posteriormente se resuspendió el pellet de mitocondrias agregándoles 100 µl de HEPES 20 mM y se incubaron en hielo por 20 min. Después se les agregó 100 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100 mM pH 11.5 y se incubaron en hielo por 10 min. En seguida, se centrifugaron por 30 min a 65, 000 rpm en un rotor TLA-100.3 (Beckman). Los sobrenadantes se transfirieron a un tubo nuevo y el pellet obtenido de la centrifugación se resuspendió agregándoles 400 µl de CH. Posteriormente los sobrenadantes y los pellets se precipitaron agregando 45 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 100 % (BioChemika). Se

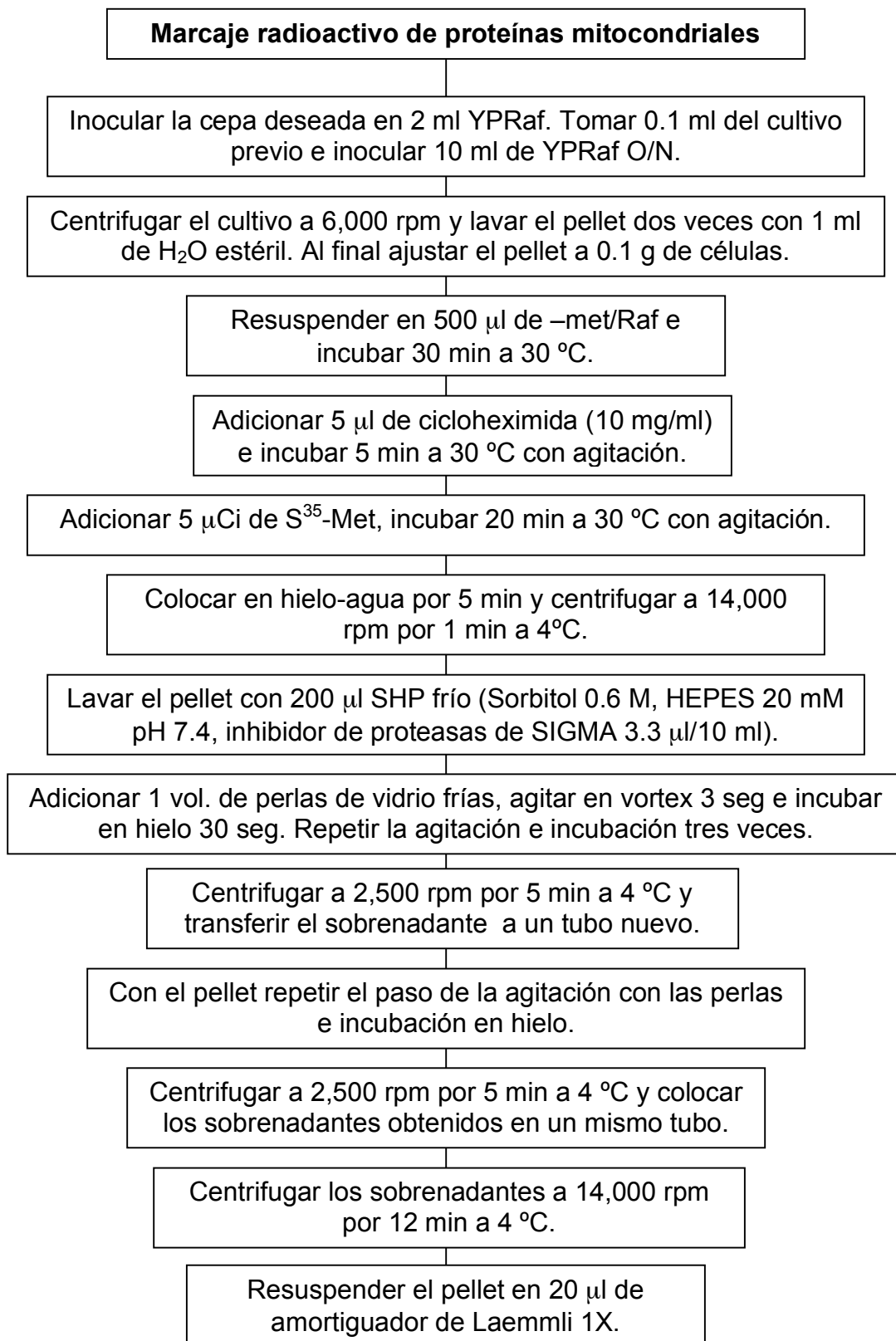
incubarón en hielo por 30 min y luego fueron centrifugados 10 min a 12,000 rpm a 4 °C. Se lavaron las proteínas precipitadas con 1 ml de acetona fría y finalmente los pellets se resuspendieron en amortiguador de Laemmli 1X. La mezcla fue calentada a 65 °C 10 min y se cargaron 20 µl en gel de poliacrilamida al 12 % para analizarlo por inmunodetección tipo Western blot.



## **7. Marcaje radioactivo de proteínas mitocondriales**

Traducción In vivo. Las cepas de levadura se crecieron en 2 ml de YPRaf o -uraRaf a 30 °C toda la noche. Se tomó 0.1 ml del cultivo anterior para inocularse en 10 ml de YPRaf o -uraRaf y se incubó a 30 °C toda la noche o hasta que alcance una  $A_{600}$  de 1 (fase exponencial de crecimiento). Posteriormente se colectó el cultivo centrifugando (centrifuga Eppendorf 5415D) a 6,000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. El pellet se lavó dos veces con 1 ml de H<sub>2</sub>O estéril, al final se debe tener un pellet de 0.1 g de células. El pellet de células se resuspendió en 500  $\mu$ l de medio YPRaf sin metionina y se incubó por 30 min a 30 °C con agitación constante. Se adicionó 5  $\mu$ l de cicloheximida (10 mg/ml, disuelta en etanol) y se incubaron las muestras por 5 min a 30°C con agitación. Después se agregó 5  $\mu$ Ci de <sup>35</sup>S-Metionina y se incubó por 20 min a 30 °C con agitación. Una vez completado el tiempo, las muestras se colocaron en agua/hielo por 5 min y se centrifugaron a 14,000 rpm por 1 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se lavó con 200  $\mu$ l de SHP frío (Sorbitol 0.6 M, HEPES 20 mM pH 7.4, inhibidor de proteasas de SIGMA 3.3  $\mu$ l/10 ml). Se adicionó un volumen de perlas de vidrio previamente enfriadas, se agitó en vortex por 30 seg. y se incubó en hielo por 30 seg. Este paso se repitió una vez más. Se centrifugó el tubo a 2,500 rpm por 5 min a 4 °C. Se colectó el sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo. Se repitió el paso del vortex/hielo una vez más. Al final los sobrendantes se colocaron en un mismo tubo y se centrifugaron a 14,000 rpm por 12 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 20  $\mu$ l amortiguador de Laemmli 1X. Las muestras se calentaron a 65 °C por 5 min y se cargaron 10  $\mu$ l de muestra en un gel SDS-PAGE al 16 %/0.15 %, el resto se conserva a -70 °C. El gel se corrió a 27 mA. Las proteínas del gel se transfirieron a una membrana de PVDF por 2 horas a 1.5 mA/cm<sup>2</sup>.





Traducción In organelo. Para la realización de este ensayo se partió de mitocondrias aisladas (10 mg/ml), se les agregaron 22  $\mu$ l de amortiguador ioTL (este amortiguador está descrito en soluciones y amortiguadores) y se resuspendió suavemente. Se incubaron las muestras a 30 °C por 5 min, posteriormente se le adicionaron 2  $\mu$ l de  $^{35}$ S-Metionina (10  $\mu$ Ci/reacción) y se incubaron a 30 °C por 20 min. Luego se transfirieron a hielo para agregarles 1 ml de SH 4 °C (Sorbitol 0.6 M, HEPES 20 mM, pH 7.4). Se centrifugaron (centrifuga Eppendorf 5415D) a 14,000 rpm por 10 min a 4 °C. Se eliminó todo el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 64  $\mu$ l de amortiguador de Laemmli, se agitó en vortex por 1 min. Se cargaron 20  $\mu$ l en gel SDS-PAGE al 16 %/0.15 % para luego transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa.

## **8. Northern blot**

Las cepas de levadura se crecieron en 10 ml de medio –uraRaf a fase exponencial ( $OD_{600} = 1.0$ ). Todas las muestras de RNA se obtuvieron mediante el kit RNeasy de Qiagen. Para preparar el gel desnaturizante de RNA, se adicionó por cada 5  $\mu$ l de RNA, 2  $\mu$ l de MOPS 10X, 6.6  $\mu$ l de formaldehído y 20  $\mu$ l de formamida (Sambrook y Russell, 2001). Se mezcló bien la muestra y se calentó por 15 min a 65°C. Después se incubó en hielo por 5 min y antes de cargar en el gel se agregaron 5  $\mu$ l de amortiguador de carga + 1  $\mu$ l de bromuro de etidio 10 mg/ml. Se cargó en el gel toda la muestra y se corrió a 50 V por 1 hr 30 min y posteriormente a 100 V por 2 hrs. Para transferir el RNA del gel se usó una membrana de Nylon-Hybond, SSC 10X como amortiguador y se transfirió durante toda la noche. Ya transferido el RNA del gel, la membrana fue entrecruzada con irradiación UV a 254/312 nm en un stratalinker de Stratagene.

Para el marcaje radioactivo de las sondas con  $^{32}$ P se siguieron las instrucciones del Kit DodecaLabel<sup>TM</sup> DNA labeling (Fermentas). La reacción se detuvo con EDTA (proporcionado por el Kit). Una vez parada la reacción se limpió la sonda del exceso de nucleótidos radioactivos por medio de columnas de Micro Bio-Spin Chromatography (BioRad). La sonda marcada y purificada se

desnaturalizó incubando con 1/10 de vol. de solución 1 N NaOH, 1 mM EDTA por 5 min. Antes de hibridar la membrana con las sondas, la membrana de Nylon se incubó por 1 hora a 65 °C en horno rotatorio con solución de prehibridación (5X SSC, 5X Denhardt's, 0.5 % SDS y ssDNA 100 µg/ml previamente hervido). Transcurrida la hora se agregó la sonda marcada y desnaturalizada, se hibridó a 65°C toda la noche. Al día siguiente la membrana se lavó 1X con 50 ml de solución de lavado (2X SSC, 0.2 % SDS) durante 5 min. Después se lavó dos veces con 50 ml de solución de lavado por 15 min y un último lavado con 50 ml de solución de lavado durante 30 min. Una vez lavada la membrana se envolvió en ega pack y se expuso en la pantalla de fósforo. Se leyó la emisión radioactiva con un TYPHOON 8600 phosphoimager y la señal se cuantificó con el programa ImageQuant versión 5.2. Las sondas empleadas fueron para COX1, COX2 y 15S rRNA.

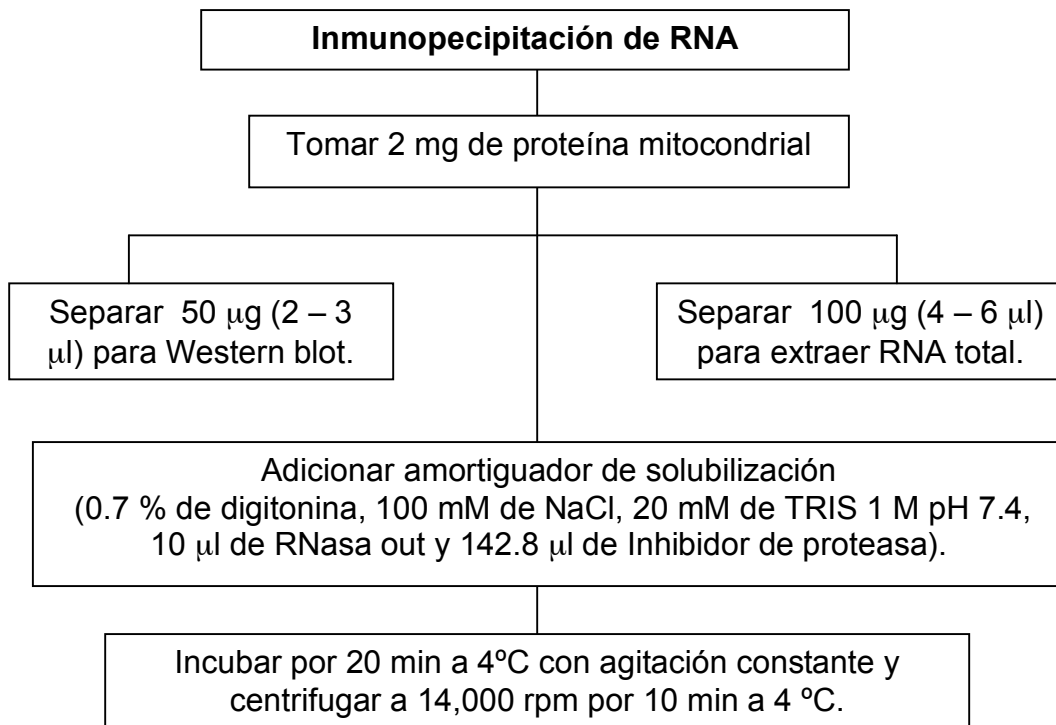
### **9. Inmunoprecipitación de RNA (IP-RNA)**

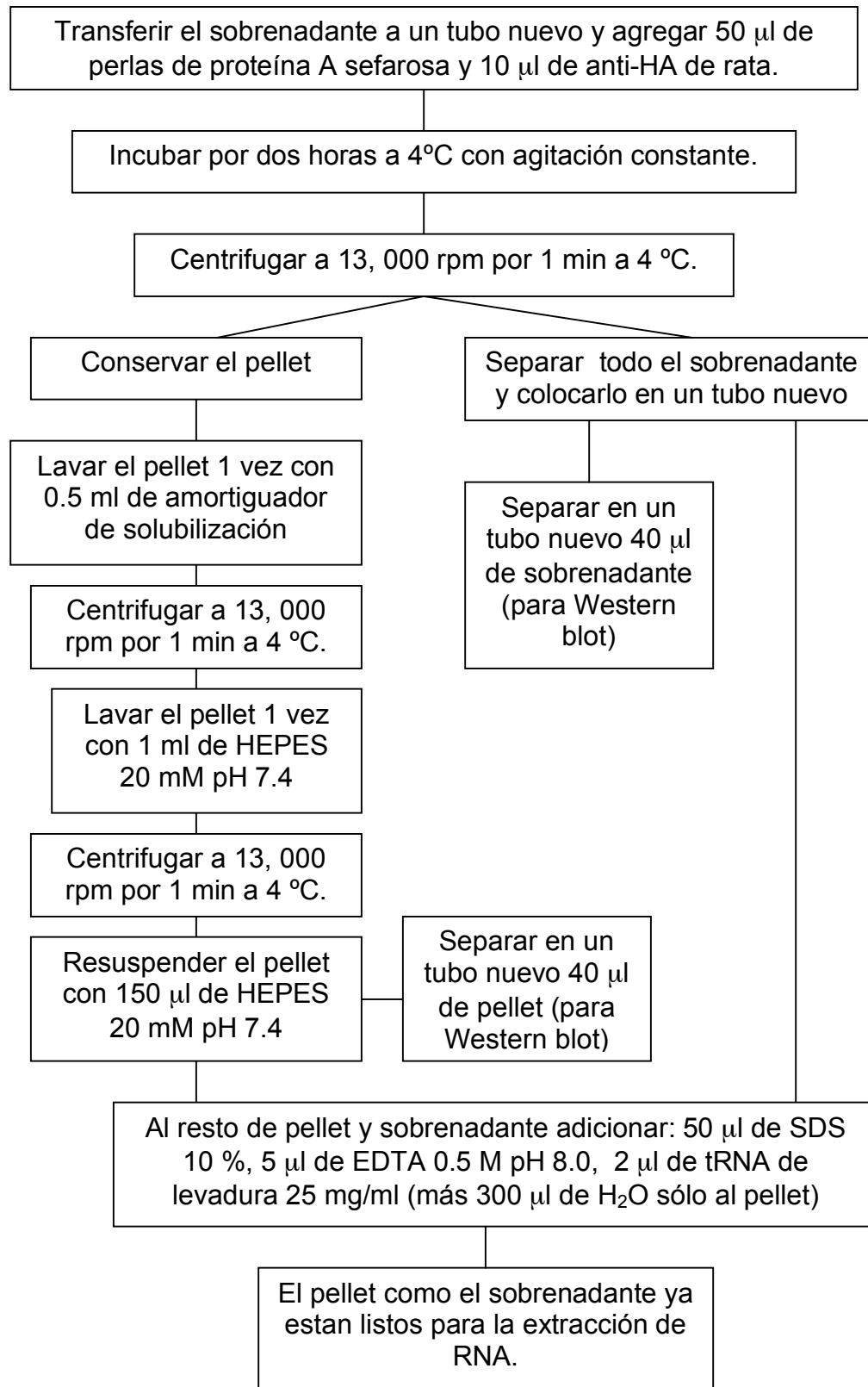
Todos los pasos se hicieron a 4 °C, se utilizaron puntas con filtro y guantes. Las soluciones se prepararon con H<sub>2</sub>O-DEPC.

Este protocolo fue adaptado de la versión reportada de IP-RNA para cloroplasto de *Ostheimer y col.* (2003). La versión modificada se dividió en cuatro pasos:

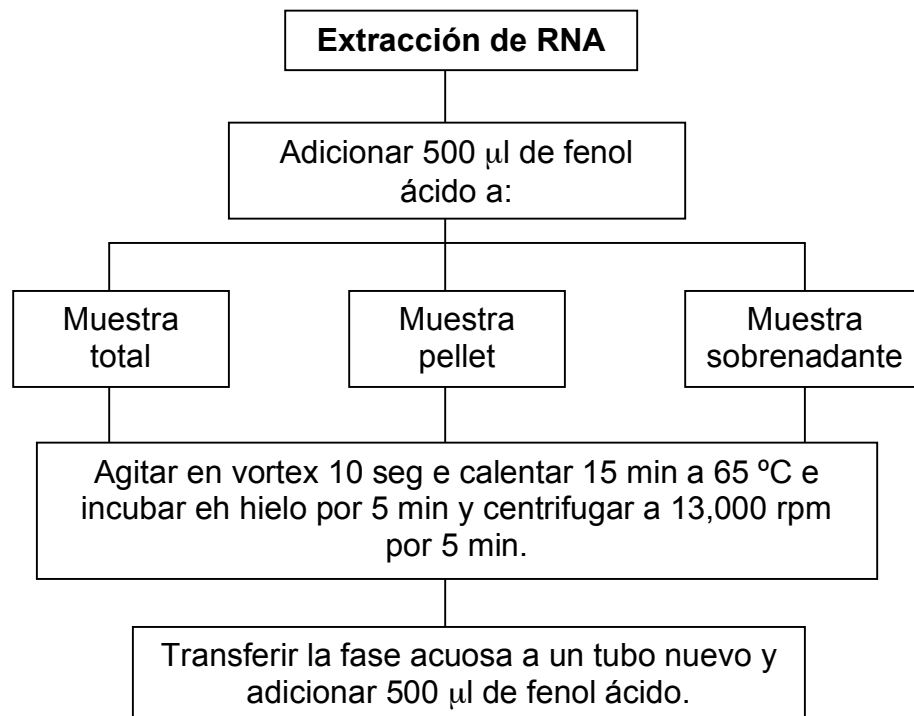
*1) Inmunoprecipitación.* Se tomaron 2 mg (de un stock de aproximadamente 25 mg/ml y equivalente a un volumen de 80 µl) de mitocondrias resuspendidas en amortiguador SH, de estos 2 mg se apartaron 50 µg (2 – 3 µl) para hacer Western blot de proteína total y 100 µg (4 – 6 µl) para la extracción de RNA total. El resto de las mitocondrias se solubilizó agregando 500 µl de amortiguador de solubilización (0.7 % de digitonina, 100 mM de NaCl, 20 mM de TRIS 1 M pH 7.4, 10 µl de RNasa out (5,000 U, Invitrogen) y 142.8 µl de Inhibidor de proteasa de Roche). Se incubó por 20 min a 4°C en rotación constante y posteriormente se centrifugó (centrifuga Eppendorf 5415D) a 13,000rpm por 10 min. El

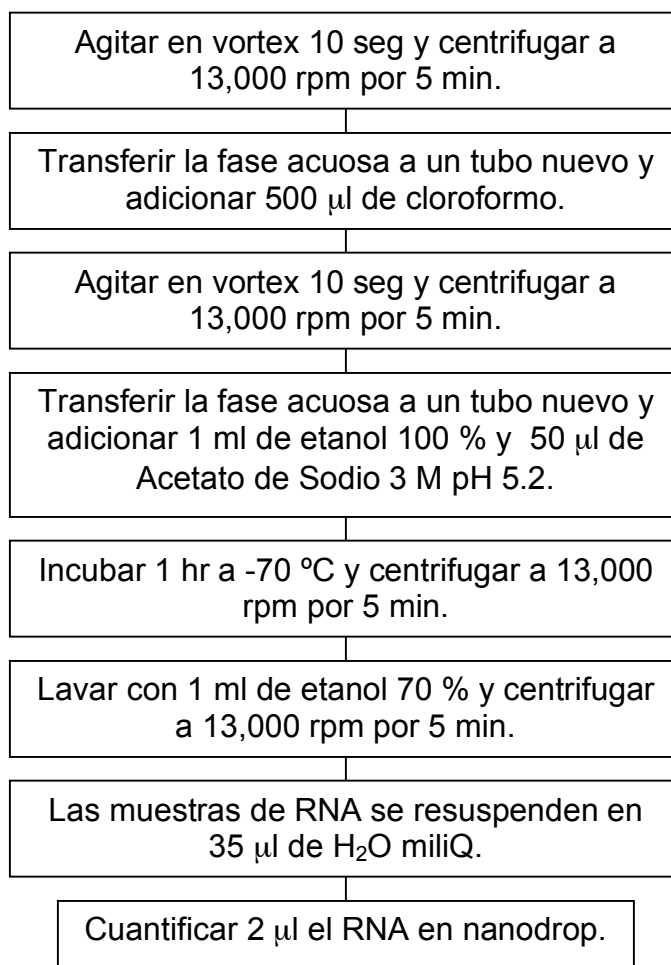
sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se le agregaron 50  $\mu$ l de Perlas de proteína A sefarosa (GE Healthcare, Pierce) y 10  $\mu$ l de anti-HA de rata (ROCHE). Se incubó por 2 hr a 4 °C en rotación constante. Posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min. Se tomó el sobrenadante (sin llevarse el pellet) y se colocó en un tubo nuevo (muestra que se empleó para extraer RNA). De este sobrenadante se apartaron 40  $\mu$ l para Western blot. El pellet se lavó una vez con 500  $\mu$ l de amortiguador de solubilización, se agitó por inversión durante 30 seg sin hacer burbujas y se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min a 4 °C. Se eliminó todo el sobrenadante del pellet y se le dió un segundo lavado con 1 ml de HEPES 20 mM pH 7.4, se agitó por inversión durante 30 seg sin hacer burbujas y se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min. Al final, el pellet se resuspendió en 150  $\mu$ l de HEPES 20mM pH 7.4. De los 150  $\mu$ l de pellet se tomaron 40  $\mu$ l para Western blot, el resto se empleó para extraer RNA. A las muestras de sobrenadante como de pellet se le agregaron 50  $\mu$ l de SDS 10 %, 5  $\mu$ l de EDTA 0.5 M pH 8.0, 2  $\mu$ l de tRNA de levadura 25 mg/ml (Invitrogen) y 300  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O (solo al pellet) y se mezcló bien.





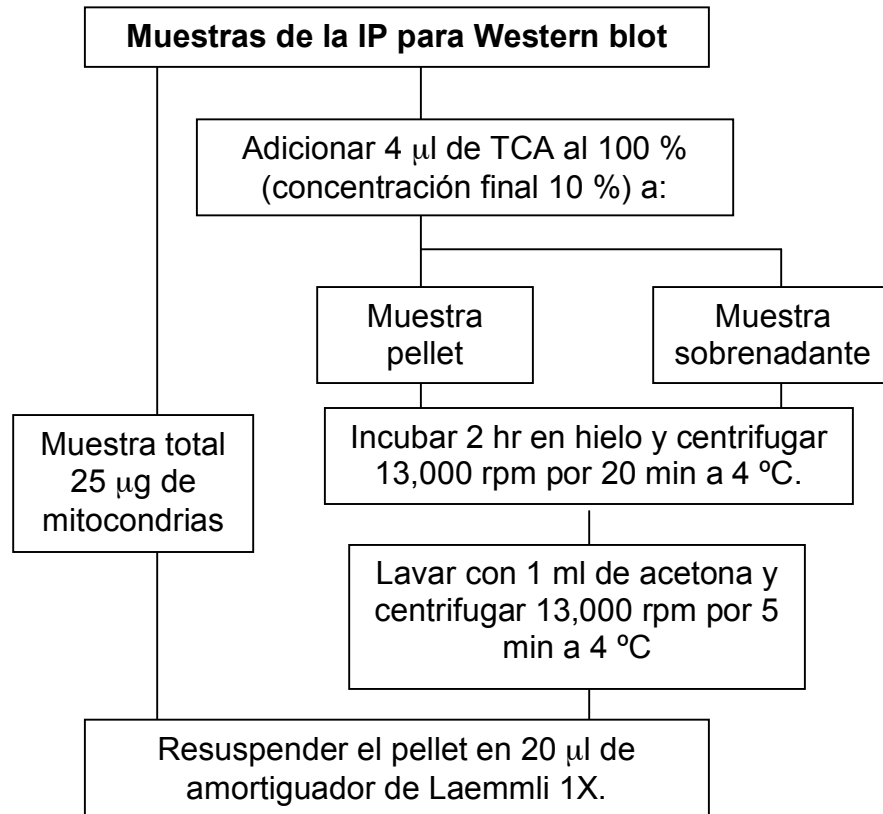
II) Extracción de RNA. Las muestras de pellet, sobrenadante y total se les adicionaron 500  $\mu$ l de fenol ácido (SIGMA). Se agitó en vortex durante 10 seg y luego se calentaron a 65 °C durante 15 min. Se dió una segunda agitación en vortex por 10 seg a los 7.5 min. Transcurridos los 15 min de incubación, los tubos se colocaron en hielo por 5 min y se centrifugaron (centrifuga Eppendorf 5415D) a 13,000 rpm durante 5 min a 4 °C. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se agregaron 500  $\mu$ l de fenol ácido, se mezcló en vortex y se centrifugaron a 13,000 rpm por 5 min. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se le adicionó 500  $\mu$ l de cloroformo, se agitó durante 10 seg y se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min. Nuevamente, los sobrenadantes se transfirieron a un tubo nuevo y se les agregó 1 ml de etanol al 100 % más 50  $\mu$ l de acetato de sodio 3 M pH 5.3. Se incubaron por 1 hr a -70 °C. Las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm por 20 min, se lavaron con 1 ml de etanol al 70 % y luego se centrifugaron a 13,000 rpm por 5 min. Las muestras de RNA se resuspendieron en 35  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O miliQ y posteriormente se cuantificaron 2  $\mu$ l del RNA purificado utilizando el nanodrop 2000 (Thermo Scientific).





III) Tratamiento de las muestras para Western blot. A Los 40 µl tomados de las muestras del pellet y sobrenadante se les adicionó 4 µl TCA al 100 % (concentración final 10 %). Se incubaron por 2 hr en hielo y luego fueron centrifugadas a 13,000 rpm por 20 min. Se eliminó el sobrenadante de las muestras (para la muestras del pellet tener cuidado de no llevarse las perlas) y se lavaron una vez con 1 ml de acetona fría, se agitaron en vortex unos segundos y se centrifugaron (centrifuga Eppendorf 5415D) a 13,000 rpm por 5 min. Posteriormente se resuspendió en 20 µl de amortiguador de Laemmli 1X (si la muestra se torna amarilla neutralizarla adicionando Tris saturado en una relación 1:9). Para la muestra de proteína total sólo se le adicionaron 20 µl de

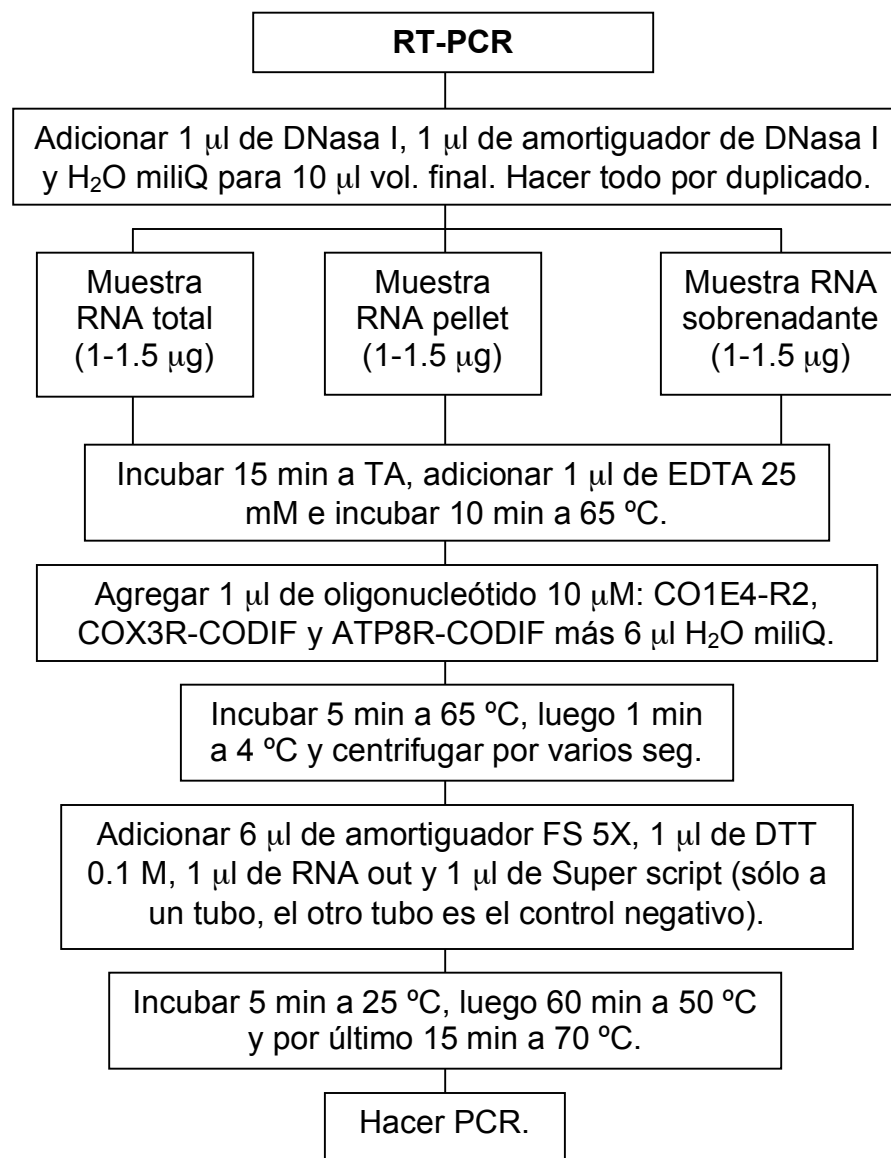
amortiguador de Laemmli. Las muestras se calentaron por 10 min a 65 °C y se cargaron en un gel de SDS-PAGE al 12 %.



IV) RT-PCR. El RNA obtenido de la inmunoprecipitación se trató con DNasa I de Invitrogene para eliminar la contaminación de DNA que tengan las muestras de RNA. Para ello todas las muestras se hicieron por duplicado: 1 tubo fue el experimento y el otro tubo fue el control negativo. Se tomó entre 1 a 1.5 µg de RNA y se le adicionó 1 µl de amortiguador de la DNasa I al 10X, 1 µl de DNasa (Invitrogen) y H<sub>2</sub>O-DEPC para llevar la reacción a un volumen final de 10 µl. Se incubaron los tubos durante 15 min a temperatura ambiente y luego se inactivó la DNasa I agregando 1 µl de EDTA 25 mM, se mezcló bien y se calentó a 65 °C por 10 min. Posteriormente se le agregó a cada muestra 1 µl de oligonucleótido CO1E4-R2 10 µM, 1 µl de oligonucleótido COX3R-CODIF 10 µM, 1 µl de oligonucleótido ATP8R-CODIF 10 µM, 1 µl de dNTPs 10 mM y 6 µl de H<sub>2</sub>O-



DEPC para generar el cDNA. Se calentaron las muestras a 65 °C por 5 min y luego 1 min a 4 °C. Posteriormente se centrifugaron los tubos por unos segundos y se adicionó a cada muestra: 6 µl de amortiguador FS al 5X, 1 µl DTT 0.1 M, 1 µl de RNasa out y 1 µl de Super script (sólo al tubo con el experimento, no al control negativo). Se mezcló bien y se incubó 5 min a 25 °C, luego 60 min a 50 °C y por último 15 min a 70 °C. Finalizado el ciclo se tomaron 4 µl del cDNA para hacer la PCR utilizando el programa y los oligonucleótidos descritos en soluciones y amortiguadores.



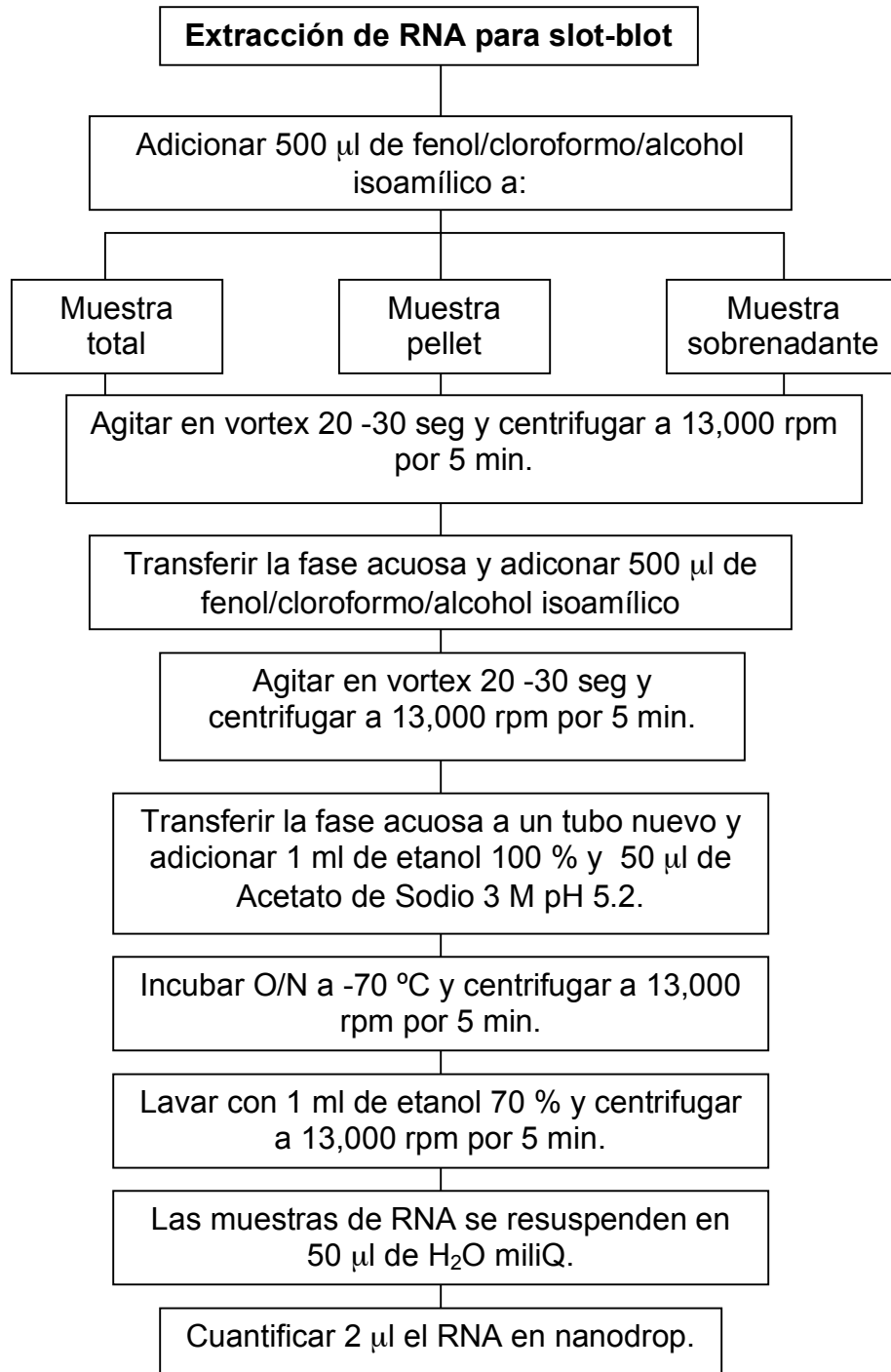
## **10. Inmunoprecipitación de RNA (IP-RNA) para slot-blot.**

Todos los pasos se hicieron a 4 °C, se utilizaron puntas con filtro y guantes. Las soluciones se prepararon con H<sub>2</sub>O-DEPC.

**Nota importante:** El protocolo de IP-RNA para slot-blot es básicamente el mismo que se describe arriba, sólo con unas diferencias: no se agregó inhibidor de RNasas y el tRNA fue sustituido por Glicoblue, ya que el tRNA interfiere con la cuantificación del RNA y con la especificidad en la hibridación de los slot-blots.

I) Inmunoprecipitación. Previo a extraer RNA se les agregó a la muestra pellet y sobrenadante: 50 µl de SDS 10 %, 5 µl de EDTA 0.5 M pH 8.0, 1 µl de Glicoblue 5 mg/ml (Ambion) (se usa en lugar de tRNA de levadura) y 300 µl de H<sub>2</sub>O (sólo al pellet) y se mezcló bien.

II) Extracción de RNA. A las muestras de pellet, sobrenadante y total se les adicionaron 500 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico. Se mezcló en vortex durante 10 seg y se centrifugaron (centrifuga Eppendorf 5415D) por 5 min a 13,000 rpm a 4 °C. La fase acuosa se transfirió a un tubo limpio y se repitió el paso de la extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se adicionó 1 ml de etanol al 100 % más 50 µl de Acetato de sodio 3 M pH 5.3 y se incubó toda la noche a -70 °C. Posteriormente se centrifugaron los tubos a 13,000 rpm por 20 min (aquí el pellet de RNA se torna de color azul por el Glicoblue). Se lavó el pellet de todas las muestras con 1 ml de etanol al 70 % y se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min. Al final se resuspendió el pellet en 50 µl de H<sub>2</sub>O miliQ y el RNA se cuantificó con el nanodrop (se usaron 2 µl por muestra).



III) Slot-blot. Las muestras de RNA y la membrana se prepararon como se describe:

a) Preparación de las muestras de RNA:

<u>RNA del Pellet</u>	<u>RNA del total y sobrenadante</u>
50 µl RNA	50 µl RNA
300 µl TE	600 µl TE
100 µl de 5X SSC	200 µl de 5X SSC

b) Preparación de la membrana de Nylon

La membrana de Nylon se humedeció en H<sub>2</sub>O, luego en SSC 5X por algunos segundos. Se colocó en el slot-blot y se activó el vacío para eliminar el exceso de agua y SSC (esto se hace antes de fijar el RNA) por 1-2 min. Colocar en el slot 200 µl del RNA de la muestra pellet y sobrenadante y 100 µl de la muestra total. Con vacío se fijaron las muestras a la membrana. Ya fijado el RNA se entrecruzó la membrana con UV 254/312 nm en un stratalinker de Stratagene. Antes de hibridar la membrana se tiñó con azul de metileno.

IV) Marcaje de las sondas. Para marcar las sondas (descritas en la tabla 5) se tomó 1 µl de oligonucleótido 10 µM y 14 µl de H<sub>2</sub>O. Se calentaron por 5 min a 85 – 90 °C y se enfriaron inmediatamente. Después se adicionaron 2 µl de amortiguador PNK 10X, 1 µl de PNK (Polinucleotide quinase, Biolabs) y 2 µl de γ-ATP 6,000 Ci/ mmolas (concentración final 3 µM). Las reacciones se incubaron a 37 °C por 30 - 60 min luego se purificaron por columnas de Micro Bio-Spin Chromatography (BioRad) y se desnaturalizaron por 5 min a 95 °C.

V) Hibridación del slot-blot. Cada membrana se prehibridó con 10 ml de amortiguador Church durante una hora a 60 °C. Después de la hora se desechó la solución y se reemplazó por nueva, luego se adicionó la sonda previamente desnaturalizada y se hibridó toda la noche en horno rotatorio a 60 °C. Los lavados de la membrana se hicieron una vez por 5 min y luego cuatro veces por 20 min con 50 ml de 0.1% de SDS y SSC 1X. Todos los lavados se hicieron a la

misma temperatura de hibridación. Al término de los lavados la membrana se envolvió en ega pack y se expuso en la pantalla de fósforo. Se leyó la emisión radioactiva con un phosphoimager TYPHOON 8600.

### **11. Generación del modelo de los motivos PPR**

Se analizó la secuencia de Pet309 con el programa TPRpred (Karpenahalli *y col.* 2007) el cual indicó la presencia de 12 motivos PPR localizados entre los aminoácidos 312 al 759. Seis de los motivos con el valor  $p$  más bajo ( $\sim 1e-07$ - $1e-06$ , el cual indica  $1 \times 10^{-7}$  a  $1 \times 10^{-6}$ ) corresponden a la región que comprende los residuos 347-560. Esta porción de la proteína se analizó con el servidor HHpred (Soding *y col.* 2005) y se alineó con la proteína PilF de *Pseudomonas aeruginosa* (Kim *y col.* 2006) la cual contiene 6 motivos TPR. El alineamiento mostró 10% de identidad. El modelo tridimensional de los motivos PPR de Pet309 se construyó con SWISSMODEL (Shwede *y col.* 2003) y el modelo del alineamiento estructural se creó con PyMOL.

### **12. Búsqueda de supresoras.**

Para obtener las cepas supresoras de *pet309Δppr2* (pFT19) se creció esta cepa en medio líquido no fermentable (etanol/glicerol) con 10 % de glucosa, en lugar de 20 % como se usa normalmente. Se dejaron crecer por dos días a 30 °C y posteriormente se plaquearon  $10^5$ ,  $10^6$  y  $10^7$  células por caja en medio sólido a base de etanol/glicerol con 0.1 % de glucosa y se incubaron a 30 °C por 12 días.

Citoinducciones. La citoinducción es un método por el cual a una levadura que no contiene DNAm<sub>t</sub> (rho0) se le transfiere esta molécula por medio de un apareamiento con otra cepa que sí contiene DNAm<sub>t</sub> (rho+). Es importante que la cepa que contiene DNAm<sub>t</sub> tenga presente la mutación *kar1*, la cual evita que se fusionen los núcleos y sólo se transfiera el DNAm<sub>t</sub>.

Se crecen la cepa donadora (YC48 que contiene DNAMt) y la cepa receptora (las supresoras que no contiene DNAMt - rho0 -) en 2 - 5 ml de YPD por toda la noche. Se tomó 750  $\mu$ l de la cepa donadora y 250  $\mu$ l de la cepa receptoras, se mezclan y se cenfrifugaron a velocidad máxima por 30 seg. El pellet se tomó con pipeta y se colocó en una caja de YPD y se dejó secar a 30 °C. Después de 2 - 4 hr se checó la formación de schmoo (levaduras con forma de pera que estan listas para aparearse) y la producción de cigotos. Cuando la mezcla de las cepas tuvieron suficientes schmoos se resuspendió en 2 ml de YPD líquido y se creció por 3 hr a 30 °C. De este cultivo se tomó una dilución  $10^{-2}$  (10  $\mu$ l del cultivo en 980  $\mu$ l de agua estéril) y se plaquearon 100  $\mu$ l en medio selectivo contra la cepa donadora (para el estudio de las revertantes se usó medio mínimo con solo tres aminoácidos +arg, +lys +leu). Se incubó el cultivo por 2 - 4 días a 30 °C. Posteriormente se hicieron impresiones en los siguientes medios:

1. Medio de selección contra las colonias receptoras haploides. Sólo las diploides crecieron, en este caso se uso -lys.
2. Medio contra la donadora (la cepa que cedió el DNAMt). Las colonias diploides y las colonias receptoras haploides crecieron. El medio usado fue +arg, +lys, +leu.
3. Medio con césped de levadura para confirmar la presencia del DNAMt, en este caso se uso medio respiratorio YPEG.

Cepas rho0. Se tomaron un par de colonias de la cepa que se le desea eliminar el DNAMt en este caso las cepas supresoras y se crecieron en 2 ml de medio mínimo -ura con 5  $\mu$ l de bromuro de etidio (10 mg/ml) y se incubaron por 2 días a 30 °C. Se tomó una alícuota de aproximadamente 20  $\mu$ l del cultivo previo para inocular nuevamente en 2 ml de medio mínimo -ura con 5  $\mu$ l de bromuro de etidio. Se creció por un día y de este cultivo se tomó una alícuota para sembrar una caja de medio mínimo -ura. Se creció por dos días y finalmente se tomó un par de colonias de tamaño medio para re-estriar en medio mínimo -ura. Las colonias finales ya no contienen DNAMt.

### 13. Soluciones y Amortiguadores

#### 13.1. Geles de acrilamida desnaturizante SDS-PAGE

	Gel Separador 12%	Gel Concentrador 4%
30 % acrilamida 0.8 % bis-acrilamida	6 ml	0.65 ml
Tris 2 M pH 8.8	2.81 ml	-
Tris 2 M pH 6.8	-	312.5 $\mu$ l
SDS 20 %	75 $\mu$ l	25 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	6 ml	3.95 ml
10 % APS	75 $\mu$ l	50 $\mu$ l
TEMED	7.5 $\mu$ l	5 $\mu$ l

#### Amortiguador de Laemmli 2X:

100mM Tris-HCl pH 6.8

4% SDS

20% de glicerol

0.2% de azul de bromofenol

2% de  $\beta$ -mercaptoetanol

#### Amortiguador de electroforesis 5X:

0.125 M Tris (1x=0.025M pH 8.3)

1.25 M glicina (1x= 0.25 M)

0.5 % SDS (1x= 0.1 %)

Correr el gel por 30 min a 60 V y 2 hr a 100 V. Posteriormente se transfieren las proteínas a una membrana para Western blot.

#### **13.2. Amortiguadores para purificación de mitocondrias:**

##### Tris-DTT (TD)

0.1 M Tris-SO<sub>4</sub> pH 9.4

10 mM DTT

MP2

1.2 M sorbitol

20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.4

3 mg de zimoliasa 20T

SH (para mitocondrias que se usaron para IP-RNA no se agregó EDTA)

20 mM HEPES pH 7.4

1 mM EDTA

0.6 M sorbitol

Buffer Homogenizador

10 M Tris pH 7.4

1 mM EDTA

0.2 % BSA

1 mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo)

0.6 M sorbitol

50 ug/ml TLCK (N $\alpha$ -Tosil-L-lisina-clorometilcetona - HCl)

**13.3. Soluciones para Western blot**

Blocking Solution:

20 g de Leche

10 ml de Tris 1 M pH 7.6

6 ml NaCl 5 M

H<sub>2</sub>O para 200 ml

Prepara fresca

Blotting solution:

0.5 g de Leche

0.5 ml de Tris 1 M pH 7.6

1 ml NaCl 5 M

0.1 ml de EDTA 500 mM

1 ml de Tween-20 5 %

H<sub>2</sub>O para 50 ml

Agregar el anticuerpo.



Solución de lavado:

10 ml de Tris 1 M pH 7.6  
20 ml NaCl 5 M  
2 ml de EDTA 500 mM  
1 ml de Tween-20 5 %  
H<sub>2</sub>O para 1 L

Solución para remover anticuerpo:

700 µl de β-mercaptoetanol  
6.25 ml de Tris 1M pH 7.6  
20 ml SDS 10%  
H<sub>2</sub>O para 100ml  
Preparar fresca

Dilución de anticuerpos

Anti Arg8                    1: 10,000  
Anti CS                        1: 1000  
Anti Cox1                     1: 200  
Anti HA/peroxidasa        1: 1000  
Anti conejo/peroxidasa    1: 5000  
Anti ratón/peroxidasa     1: 3000

**13.4. Soluciones y preparación del gel SDS-PAGE para traducción in organello.**

Amortiguador ioTL 1.5X (Preparar a 4 °C)

375 µl	2.4 M sorbitol
225 µl	1 M KCl
22.5 µl	1 M KPi pH 7.2
30 µl	1 M Tris pH 7.4
19 µl	1 M MgSO <sub>4</sub>
45 µl	100 mg/ml BSA (libre de ácidos grasos)
30 µl	200 mM ATP <sup>&amp;</sup>
15 µl	50 mM GTP <sup>&amp;</sup>
9.1 µl	aminoácidos (-Met, -Tyr. -Cys) 2 mg/ml de cada uno
10 µl	10 mM cisteína
18.2 µl	1 mg/ml de tirosina
1.7 mg	ácido 2-cetoglutarico*
3.5 mg	fosfoenol piruvato*

\*Pesar y disolver en 200  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O. Agregar a la mezcla para completar 1 ml de volumen final. & Adicionar hasta el final de la preparación. Agregar piruvato cinasa a una concentración final de 0.2 %, antes de comenzar la reacción.

Geles desnaturalizantes SDS-PAGE para traducción in vivo o in organelo.

	Gel separador 12 %	Gel apilador 4 %
30/0.3 % acrilamida/bis-acrilamida	6.75 ml	0.83 ml
2 M Tris pH 8.8	3.28 ml	---
2 M Tris pH 6.8	---	150 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	4.5 ml	4 ml
20 % SDS	83.5 $\mu$ l	25 $\mu$ l
10 % APS	100 $\mu$ l	25 $\mu$ l
TEMED	10 $\mu$ l	5 $\mu$ l

**13.5. Preparación de geles para northern blot.**

Para un gel de 187.7 ml:

Agarosa 1.5 g

H<sub>2</sub>O-DEPC 134.5 ml

Hervir para disolver la agarosa completamente.

Adicionar:

MOPS 10X 15 ml

Formaldehído 26.7 ml

Mezclar bien y vaciar en la cámara de electroforesis. Después de cargar las muestras el gel se corre con MOPS 1X hasta  $3/4$  V/cm.

**13.6. Reacción y condiciones de PCR usando como templado cDNA.**

4  $\mu$ l cDNA

0.5  $\mu$ l dNTPs 10 mM

0.7  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>

2.5  $\mu$ l 10X Amortiguador Taq pol

2.5  $\mu$ l oligo F 10  $\mu$ M

2.5 µl oligo R 10 µM

0.3 µl Taq pol

12 µl H<sub>2</sub>O-DEPC

5 min 94 °C

45 seg 94 °C

1 min 48 °C

1 min 72 °C

5 min 72 °C

} 30 ciclos

### **13.7. Amortiguadores**

#### Amortiguador MOPS 10X para electroforesis de RNA

MOPS	41.8 g
Acetato de sodio	6.8 g pH 7
EDTA	3.7 g

#### Amotiguador SSC 10X

NaCl	175.3 g
Citrato de sodio	88.2 g

Ajustar pH 7.0 con HCl

#### Solución Denhardt's 50X

1 % w/v BSA

1 % w/v Ficoll

1 % w/v PVP

Filtrar con membrana de 0.45 µm.

#### Solución TE

10 mM Tris pH 8.0

1 mM EDTA pH 8.0

Solución Church

7 % SDS

0.5 M NaHPO<sub>4</sub> pH 7.0

1 mM EDTA

**13.8. Tablas de oligonucleótidos y sondas.**

<b>Tabla 3. Lista de oligonucleótidos empleados para la generación de mutantes.</b>		
En minúsculas se muestran los nucleótidos modificados para la mutación.		
<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Mutación que incorporan</b>
PET309F12	GTGAATGGACATTGTGAATTTACG	
PET309R4	CCGAACtCGAGGATTTGGTTTTCAAGTTAC AC	
PET309F33	TTGCCATCATCTACAACGCCAAATATTTAA C	Eliminan los 12 PPR centrales
PET309R33	CGTTGTAGATGATGGCAATTGGTCGTGCT GAGCATCAGG	
PET309F19	CCATAATGCTTgcAGTGTATCGTGG	K424A
PET309R14	CCACGATACACTgcAAGCATTATGG	
PET309F20	GCTTAAAGTGTATgcTGGTTTAAATGACC	R427A
PET309R15	GGTCATTTAAACCAgcATACACTTTAAGC	
PET309F21	CATAATGCTTgcAGTGTATgcTGGTTTAAAT GAC	K424A- R427A
PET309R16	GTCATTTAAACCAgcATACACTgcAAGCATT ATG	
PET309F22	GGTATTTTGATGtttACTATGGCC	Y354A
PET309R17	GGCCATAGTaaaCATCAAATACC	
PET309F23	GCACATTATgcaGTCGGAGATTTTC	K393A
PET309R18	GAAATCTCCGACTgcATAATGTGC	

PET309F24	GTATACTATGGCCgcaATTGGTGAATTG	R358A
PET309R19	CAATTCACCAATtgcGGCCATAGTATAC	

<b>Tabla 4. Lista de oligonucleótidos empleados para el RT-PCR</b>		
<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Gen que amplifica</b>
CO1E4-R2	TTGTAGCTCCAATTATTAATGGTAATAAAT AG	Sobre la región codificante de <i>COX1</i>
CO15'-400F	GAGAGTATTAATATCATTAAATATATATAT ATG	5'-UTR de <i>COX1</i>
CO1R5-5'	TAATCATCTTTGTACCATTTTTAC	
COX3R- CODIF	CCTAAATATGTAGCTTCAGC	Sobre la región codificante de <i>COX3</i>
COX3F- 5'UTR	CCTTTAATATTAATAAATTAAT	5'-UTR de <i>COX3</i>
COX3R- 5'UTR	CTAAATTGTCATAAATTTATTG	
ATP8R- CODIF	CTAGATACATATAATCTTAAGATC	Sobre la región codificante de <i>ATP8</i>
ATP8F-5'- UTR	GTCAGTATTTTATATTAATGTTTAA	5'-UTR de <i>ATP8</i>
ATP8R-5'- UTR	GGAACTAATTGTGGCATTTTTA	

<b>Tabla 5. Lista de oligonucleótidos utilizados como sondas para el slot-blot</b>	
<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>
COX1-1	ATATAAGTAATAGATATAATTAATAATATATTAATATTTTATA TAAATA
COX1-2	TATAAATAATATTAATAATATAGATTATGAAAGAGAGATTATA ATATCATT
COX1-3	ATATCATTAAATATATATATATGTTATATAATTTAAATGATTT TAATATA
COX1-4	TTAATATATATATATATATTATATTATAGATTATGATACATTT ATATAAA
COX1-5	TATATAAATAATATATATATAAAAATTAATTATACTATTACTTT ATAATA
COX1-6	TTATAATATAATAATATTTATTTATAAAGATATAAAAGAATTG TTTAAAG
COX1-7	GTTTAAAGTTATAACTAAAATATTATATAGTATTCATTAATAA TTAATAT
COX1-8	ATTAATATTATAAATTCAACTATTGTTATATTTATAAATAGAA TAATATA
COX1-9	ATAATATATTATTATCCTTTAAGATATAACAATAATTATTTAA ATTAAAT
COX1-10	AATTAAATTAATTAATTTAATTAATTTTTTTTTTTAATGAAT ATAATA
COX1-11	ATATAATAATAATAATATTATTAATAATTAATATATAAAAAAAA AGTAAAA

## RESULTADOS

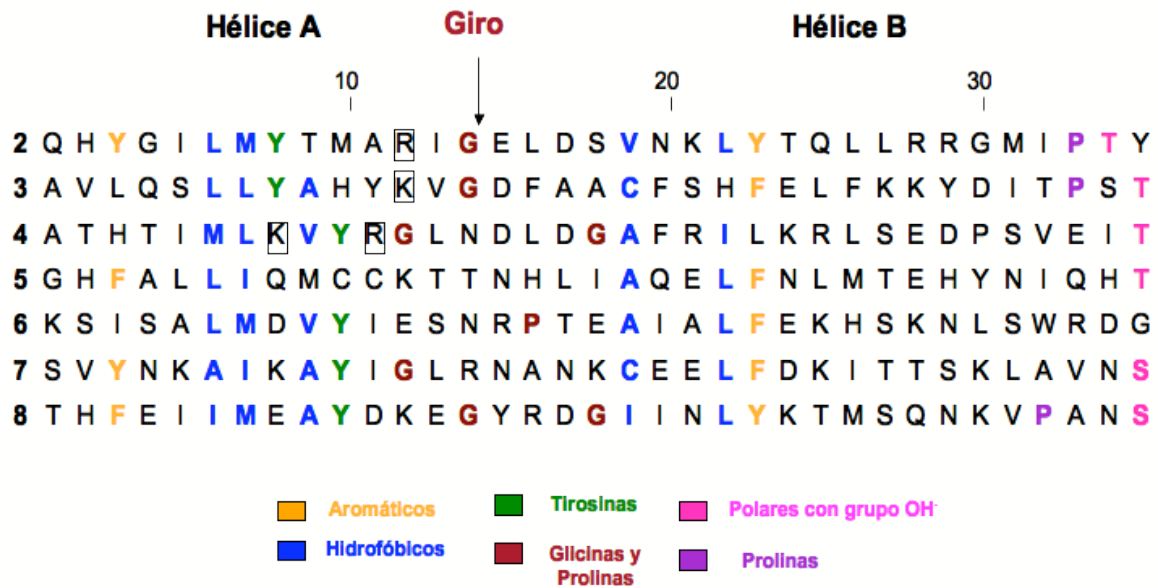
### PARTE I. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE PET309 CON EL mRNA DE COX1.

#### **1. La interacción entre los dominios PPR de Pet309 con el mRNA de COX1 es mediado posiblemente por fuerzas electrostáticas.**

Cuando se comenzó a trabajar con los dominios PPR de Pet309 (en el año 2005) el programa TPRpred (Karpenahalli y col. 2007) empleado para detectar motivos PPR determinaba que Pet309 presentaba 8 dominios PPR que abarcaban los aminoácidos 346 al 632 (Tavares-Carreón y col. 2008). Posteriormente en el año 2009 la base de datos de este programa se enriqueció con el incremento de nuevas secuencias de proteínas PPR, por lo que se predijo que Pet309 contenía 12 motivos PPR ubicados del residuo 312 al 759. Como se mencionaba en la introducción con el nuevo software SCIPHER ahora se predice que Pet309 contiene aproximadamente 20 dominios PPR, los cuales abarcan casi completamente a toda la proteína. Sin embargo, los motivos PPR fuertemente predichos con este programa coinciden con los predichos por el programa TPRpred, que son los 12 dominios PPR mostrados en la figura 7A (y son los motivos PPR con los que trabajamos a lo largo de la tesis).

Se predice que cuando los dominios PPR se encuentran en serie éstos pueden formar una estructura de superhélice. Cada motivo PPR está compuesto por dos alfa hélices antiparalelas, la hélice A ubicada en el interior de la superhélice mientras que la hélice B está en el exterior (Small y Peeters, 2000). Se ha propuesto que el conjunto de todos los motivos PPR forman una cavidad que expone aminoácidos básicos (provenientes de la hélice A) los cuales pueden interaccionar con el esqueleto fosfatado del RNA. Para averiguar si esta hipótesis era correcta, creamos un modelo de la estructura de los dominios PPR tomando los aminoácidos 346-560 que abarcan sólo 6 motivos PPR de Pet309 (Figura 7A). Este modelo se basa en la estructura cristalográfica de la proteína PilF que es una proteína TPR (tetratricopeptide repeat) de *Pseudomonas*

*aeruginosa* (Kim y col. 2006). Con el modelo generado, localizamos algunos aminoácidos básicos ubicados en la hélice alfa de los motivos PPR, los cuales se proyectan al interior de la cavidad (Tavares-Carreon y col. 2008). En la figura 7 se muestra un alineamiento de los 8 dominios PPR centrales, en los cuales se muestra la localización de los aminoácidos básicos que se mutaron y la alta degeneración de los aminoácidos que los conforman.

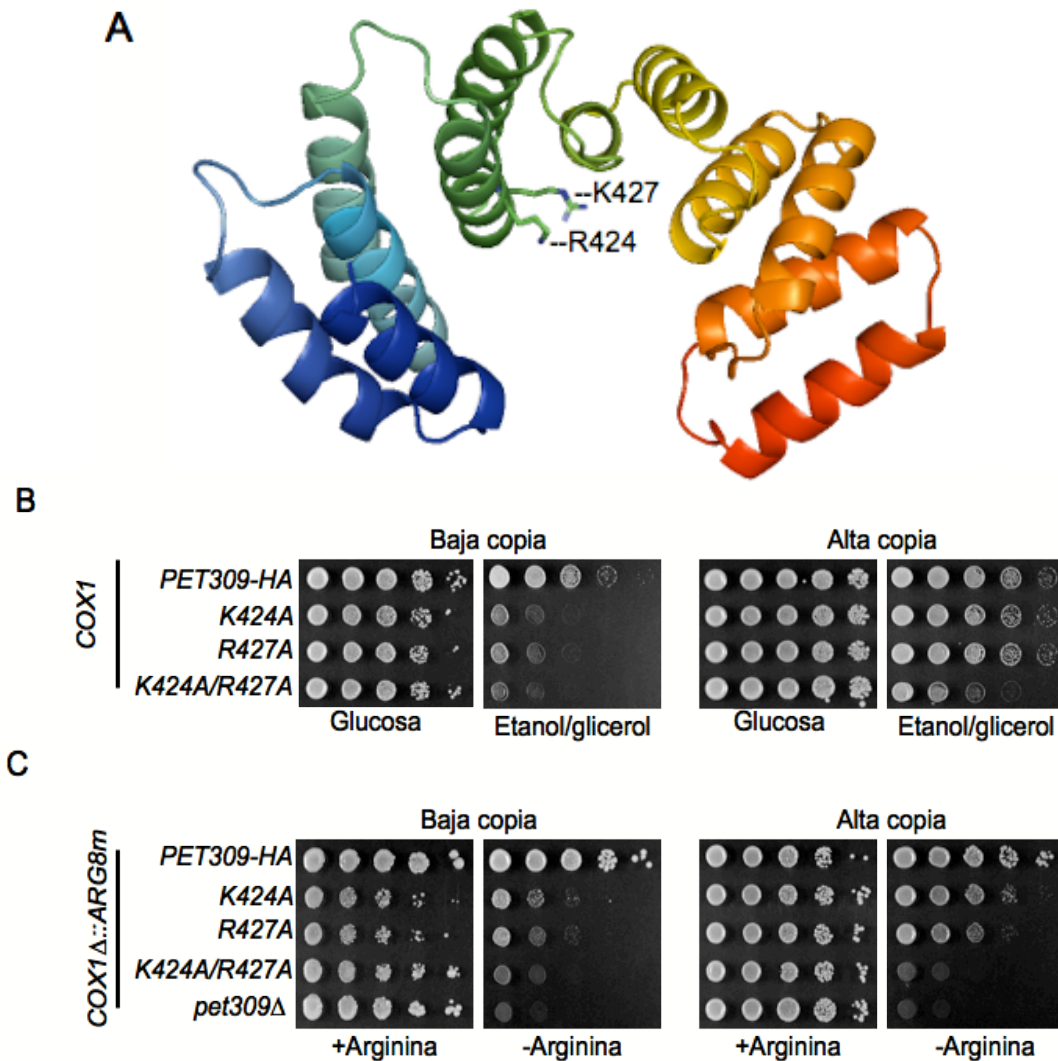


**Figura 7.** Alineamiento de los aminoácidos de los 8 dominios PPR centrales de Pet309. En cuadros blancos se muestran los aminoácidos básicos mutados. En color se representan los residuos que se conservan entre los motivos PPR.

Para evaluar la importancia de los aminoácidos básicos de los dominios PPR en la traducción del mRNA de *COX1*, se generaron mutantes puntuales de 2 residuos básicos localizados en el cuarto PPR. Este PPR abarca los aminoácidos 417-451. Se eligieron los aminoácidos K424 y R427 (Figura 8A) los cuales están mirando hacia el interior de la superhélice. Estos residuos se sustituyeron por alaninas generando las mutaciones K424A y R427A. Las mutantes clonadas en plásmidos de bajo número de copias (Figura 8B), disminuían su capacidad respiratoria en medio no fermentable. Pero cuando se expresaron en plásmidos de alto número de copias se recobró la capacidad



respiratoria a niveles muy semejantes a la silvestre. Esto indica que la sobreexpresión de las proteínas mutantes puede compensar el defecto respiratorio de las mutantes en bajo número de copia. Igualmente, se construyó la doble mutante K424A-R427A, esta mutante se expresó tanto en plásmido de baja copia como en sobreexpresión. Se observó un comportamiento sinérgico en ambas condiciones, sugiriendo que la sobreexpresión no puede compensar el defecto respiratorio (Figura 8B).



**Figura 8.** Los residuos básicos del tercer PPR son importantes para la interacción con el mRNA de COX1. A) Modelo de 6 dominios PPR (aminoácidos 346 al 560) donde se muestran la localización de los residuos K424 y R427 del tercer PPR. B) Diluciones

seriadas de la cepa silvestre Pet309, de las mutantes sencillas y del vector vacío (*pet309Δ*) expresadas en baja y alta copia. Las cepas se crecieron en medio carente de uracilo o etanol/glicerol. C) Las mismas construcciones se transformaron en la cepa con *cox1Δ::ARG8<sup>m</sup>*. Las cepas se crecieron en medio con o sin arginina (-Arg). Todas las cepas se crecieron por 4 días a 30°C.

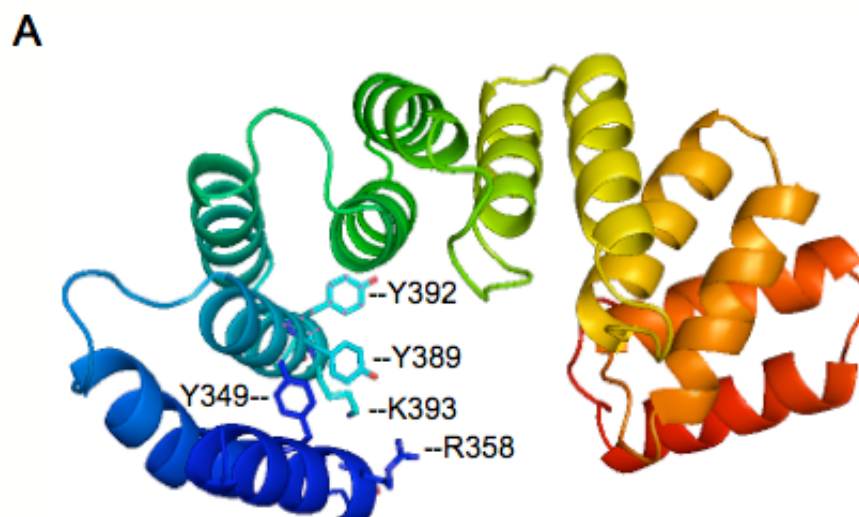
Para corroborar si el defecto respiratorio observado en las mutantes puntuales se debía a la falta de traducción del mRNA de *COX1*, se utilizó una cepa en la cual la región codificante de *COX1* fue reemplazada por el gen *ARG8<sup>m</sup>*. En condiciones normales la proteína Arg8 está codificada por el gen nuclear *ARG8* y se importa a la matriz mitocondrial, donde participa en la síntesis de arginina. Para utilizar a este gen como reportero de la traducción se recodificó para que se expresara en el DNAm (Steele y col. 1996). La cepa que se empleó para este estudio contiene al gen *cox1::ΔARG8<sup>m</sup>* flanqueado por los extremos 5' y 3'-UTR de *COX1*, por lo que la traducción de este gen reportero depende de Pet309 (Perez-Martínez y col. 2003). De esta manera, si Pet309 es funcional se expresará el gen *ARG8<sup>m</sup>* y las cepas serán capaces de crecer en un medio sintético carente de arginina.

Se transformó a la cepa *cox1::ΔARG8<sup>m</sup>* con los plásmidos que contienen tanto a las mutantes puntuales sencillas como a la mutante doble. Observamos que las mutantes siguen el mismo patrón descrito arriba: las mutantes sencillas en baja copia crecen menos en un medio sin arginina (Figura 8C). Sin embargo, cuando se sobreexpresa a las proteínas mutantes sencillas se compensa el fenotipo mostrando niveles semejantes a la cepa silvestre. Sin embargo, en la mutante doble observamos que no hay compensación del fenotipo en sobreexpresión (Figura 8C). Con esto confirmamos que el defecto respiratorio provocado por las mutaciones puntuales del cuarto PPR afecta directamente la traducción del mRNA de *COX1*.

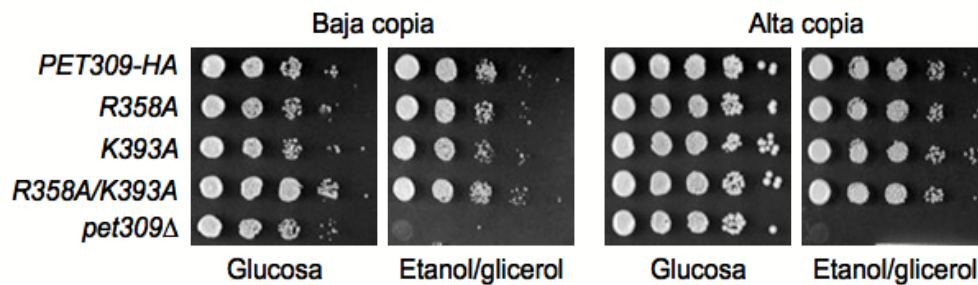
De la misma manera quisimos averiguar si los algunos aminoácidos básicos ubicados en otros motivos PPR participan en la función de Pet309. Para ello, localizamos dos aminoácidos básicos en el segundo y tercer PPR. La

arginina 358 localizada en el segundo PPR y la lisina 393 del tercer PPR (Figura 9A). Estos se sustituyeron por alaninas para generar las mutantes sencillas así como la mutante doble.

En contraste con las mutaciones del cuarto PPR arriba descritas, las mutaciones sencillas (R358A y K393A respectivamente) así como la doble mutante R358A-K393A no afectaron la capacidad respiratoria de las células. Las mutantes crecieron a niveles muy semejantes a la silvestre (Figura 9B). Al analizar el modelo generado de los 6 motivos PPR de Pet309, observamos que alrededor de los aminoácidos R358A y K393A existen residuos aromáticos como las tirosinas 349, 389 y 392, las cuales se orientan hacia el interior de la cavidad propuesta para Pet309. Por datos de la estructura de proteínas pumilio con su RNA blanco se sabe que residuos hidrofóbicos interactúan con bases nitrogenadas específicas del RNA formando interacciones de apilamiento (interacciones tipo  $\pi$ ) (Wang y *col.* 2002). De esta manera podríamos suponer que la falta de fenotipo de las mutantes R358A y K393A, se debe a que se compensó la pérdida de las interacciones electrostáticas mediadas por los aminoácidos básicos mutados por las interacciones tipo  $\pi$ . Sin embargo, para demostrar que Pet309 mantiene interacciones tipo  $\pi$  con el RNA de COX1 se requiere de más estudios para comprobar esta hipótesis.



**B**



**Figura 9.** Los residuos básicos del primer y segundo PPR no se requieren para la interacción con el mRNA de *COX1*. A) Modelo de 6 dominios PPR donde se muestra la localización de los residuos Y349, R358, Y389 Y392 y K393 del primer y segundo PPR respectivamente. B) Diluciones seriadas de la cepa silvestre Pet309, las mutantes sencillas, dobles y del vector vacío (*pet309Δ*) expresadas en baja y alta copia. Las cepas se crecieron en medio carente de uracilo o etanol/glicerol. Todas las cepas se crecieron por 4 días a 30°C.

Estos datos indican que algunos de los aminoácidos básicos localizados en la cavidad central formada por los motivos PPR son necesarios para la síntesis de Cox1. Estos residuos podrían jugar un papel importante en el reconocimiento e interacción electrostática entre los motivos PPR y el RNA de *COX1*.

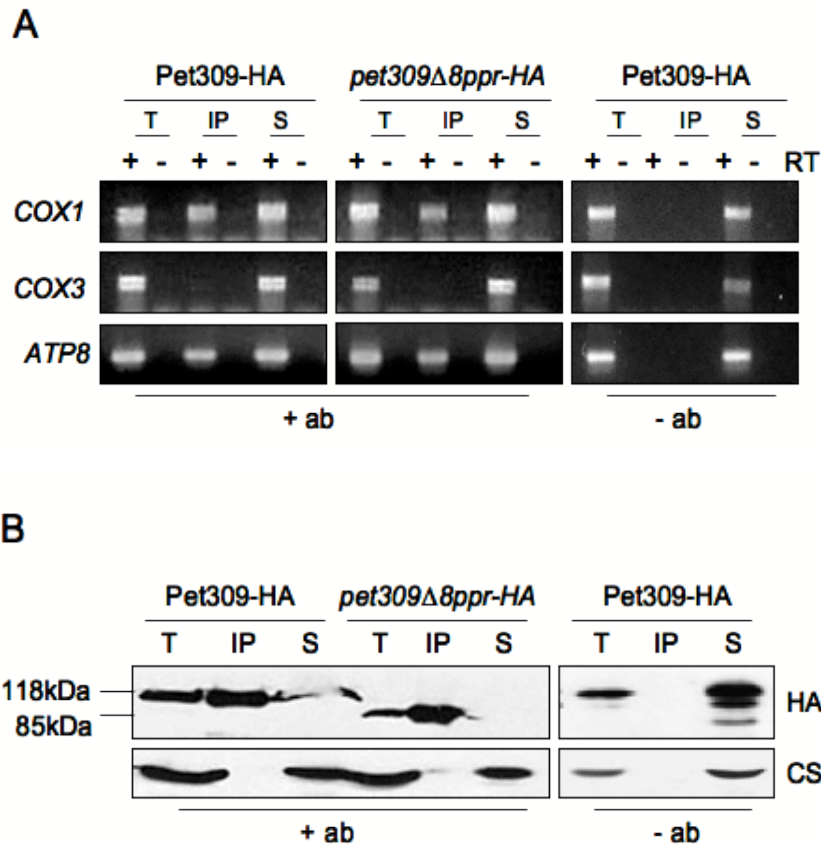
## **2. Interacción física entre *Pet309* y el mRNA de *COX1*.**

A la fecha no existe reporte de interacción física entre *Pet309* y el mRNA de *COX1*. Sin embargo, evidencia genética indica que *Pet309* actúa específicamente sobre la región 5'-UTR del mRNA de *COX1* (Manthey y McEwen, 1995). Para demostrar que existe una interacción física entre *Pet309* y el mRNA de *COX1* realizamos inmunoprecipitaciones de RNA (IP-RNA) basados en la técnica de Ostheimer y col (2003) para cloroplastos. En estos ensayos se

usó la proteína Pet309 etiquetada con un triple epítotope de hemaglutinina (HA) localizado al final del extremo carboxilo terminal. Sabemos que a 30 °C, la función de Pet309 no se afecta por este epítotope (Tavares-Carreón y col. 2008). Se solubilizó a las mitocondrias con digitonina (3.5 mg/mg de proteína mitocondrial) y a continuación el sobrenadante se inmunoprecipitó con el anticuerpo anti-HA. Posteriormente se extrajo RNA tanto de la fracción inmunoprecipitada como del sobrenadante para generar cDNA, el cual se emplea para amplificar a *COX1*, *COX3* y *ATP8*.

En mi trabajo de maestría generé la mutante *pet309Δ8ppr* carente de 8 motivos centrales, en la cual se afecta la capacidad respiratoria de la levadura debido a que el mRNA de *COX1* no se traduce, (Tavares-Carreón y col. 2008). Quisimos probar si en esta mutante era capaz de interactuar con el mRNA de *COX1*. Para ello realizamos ensayos de IP-RNA tanto de Pet309 silvestre como de la mutante expresadas en bajo número de copia, ya que semejaba una condición cercana a la fisiológica.

En la figura 10A observamos las bandas de amplificación del cDNA para *COX1* en la fracción inmunoprecipitada de la cepa silvestre Pet309-HA como para la mutante Pet309Δ8ppr-HA y la porción inmunoprecipitada del control sin adicionar anticuerpo anti-HA está ausente. Como se esperaba *COX3* no está presente en las fracciones inmunoprecipitadas ya que su traducción no depende de Pet309. Interesantemente, observamos que el gen *ATP8* el cual está localizado río abajo de *COX1* está presente en la fracción inmunoprecipitada de Pet309 y de Pet309Δ8ppr. Esto indica que Pet309 puede interactuar con el mRNA de *COX1* antes de que la región de *COX1* sea procesada del policistrón.



**Figura 10.** Pet309 interacta con el mRNA de COX1. A) RT-PCR de la inmunoprecipitación de Pet309 (118 kDa) y *pet309Δ8ppr* (85 kDa). Las mitocondrias se solubilizaron y se inmunoprecipito a Pet309 con un anticuerpo anti-HA. El RNA aislado de la fracción total (T), inmunoprecipitada (IP) y sobrenadante (S) se usó para amplificar el cDNA de los genes COX1, COX3 y ATP8. El cDNA fue generado con (+) o sin (-) transcriptasa reversa (RT). Como control negativo se inmunoprecipitó a Pet309-HA sin adicionarle anticuerpo HA (-ab). B) Un cuarto de cada muestra fue tomado para hacer Western blot y analizar la eficiencia de la inmunoprecipitación. Se empleó un anticuerpo anti-citrato (cs) sintasa como control de inmunoprecipitación específica.

Se analizó la fracción inmunoprecipitada por Western blot tomando un cuarto de está fracción e indicó que Pet309 como Pet309Δ8ppr fueron inmunoprecipitadas, mientras que la señal de Pet309-HA sin adicionar anticuerpo anti-HA fue ausente (Figura 10B). Al analizar a la proteína citrato

sintasa (proteína soluble de matriz mitocondrial) observamos que sólo está presente en la fracción sobrenadante, apoyando que la reacción de inmunoprecipitación fue específica para Pet309-HA.

Adicionalmente se realizó Southern blot de los productos de PCR obtenidos para confirmar que la banda amplificada en la RT-PCR fuera efectivamente *COX1*. Se hibridaron los productos obtenidos que representaban a *COX1* como a *COX3* con una sonda específica para *COX1*. Como resultado se obtuvo que sólo hay hibridación de *COX1* en los productos del RT-PCR, mientras que en *COX3* no hay hibridación (Figura 11), tanto en la cepa silvestre Pet309 como en la cepa Pet309 $\Delta$ 8ppr. Por lo que se confirma que estamos inmunoprecipitando específicamente al mRNA de *COX1*.



**Figura 11.** Confirmación de que el producto de PCR obtenido durante la IP de Pet309 es *COX1*. Southern blot donde se demuestra que los productos amplificados de la inmunoprecipitación es *COX1* detectándose en la fracción total (T), inmunoprecipitada (IP) y el sobrenadante (S). RT= reverse transcriptase. El panel superior es el amplificado de *COX1* y el panel inferior es de *COX3*. Ambos experimentos se hibridaron con la sonda de *COX1*.

Como conclusión observamos que hay interacción de Pet309 con el mRNA de *COX1* y que esta asociación es específica. Además, detectamos que la interacción de Pet309 con *COX1* ocurre previo al procesamiento del resto del policistrón.

Previamente nosotros demostramos que en la mutante Pet309 $\Delta$ 8ppr ya no se traduce el mRNA de COX1 indicando que probablemente la interacción de Pet309 $\Delta$ 8ppr con el mRNA de COX1 se afectó. Sin embargo, los resultados obtenidos fueron contrarios a los esperados. Se observó interacción del mRNA de COX1 con Pet309 $\Delta$ 8ppr igual que la cepa silvestre (Figura 10A).

### **3. *Saccharomyces cerevisiae* requiere la presencia de los 12 motivos PPR para que respire.**

Una posible explicación de por qué la cepa mutante Pet309 $\Delta$ 8ppr conserva la interacción con el RNA de COX1 podría ser por la presencia de los otros cuatro dominios PPR presentes en Pet309 $\Delta$ 8ppr, pudieran mantener la interacción con el mRNA de COX1.

Basados en esta predicción se generó una mutante de *pet309* carente de 12 motivos PPR (residuos 312 al 759) (Figura 12A). Esta se clonó en vectores para expresión de levadura en bajo y alto número de copia. Al analizar el fenotipo de la proteína Pet309 $\Delta$ 12ppr se observó que la cepa es incapaz de respirar en fuentes de carbono no fermentables, como etanol/glicerol (Figura 12B). Si Pet309 $\Delta$ 12ppr está expresada en un vector de alto número de copias la mutante conservó el fenotipo no respiratorio (Figura 12B). Esto sugiere que ni la sobreexpresión de la proteína es capaz de restaurar la capacidad respiratoria.

Para corroborar que el fenotipo provocado por la cepa mutante Pet309 $\Delta$ 12ppr está afectando específicamente la síntesis de Cox1 y no su ensamblaje dentro de la membrana interna mitocondrial, empleamos al gen *ARG8<sup>m</sup>* como reportero de la traducción. Se analizó el fenotipo de Pet309 $\Delta$ 12ppr en el fondo mitocondrial *cox1 $\Delta$ ::ARG8<sup>m</sup>*, y observamos que la cepa era incapaz de crecer en medio carente de arginina (Figura 12C). Cuando sobreexpresamos a Pet309 $\Delta$ 12ppr se conservó el fenotipo arginina menos (Figura 12C). Lo cual sugiere que Pet309 $\Delta$ 12ppr está afectando específicamente la traducción del mRNA de COX1 (ver sección 5).





#### **4. *Pet309*Δ12ppr se localiza en la membrana interna mitocondrial de manera periférica.**

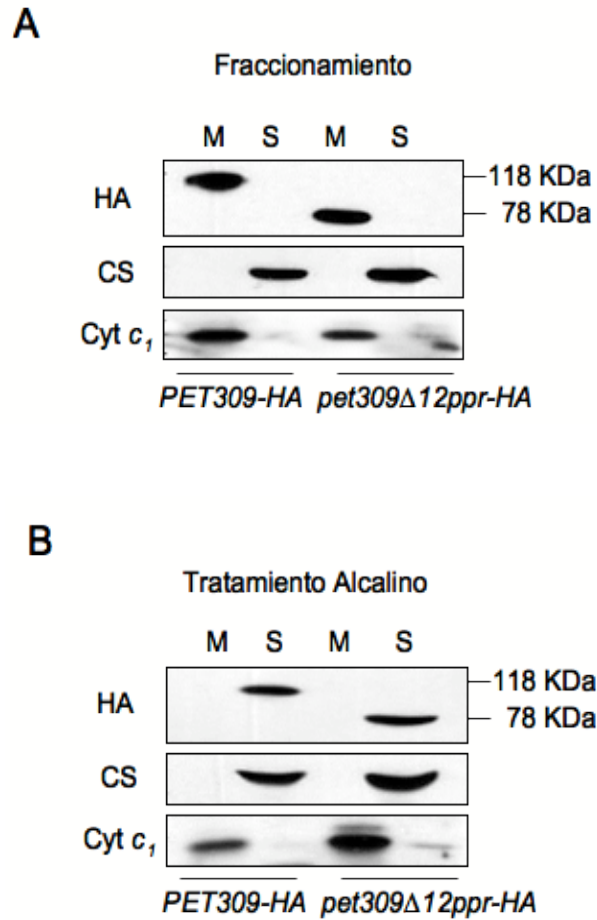
Pet309 es una proteína localizada en la membrana interna mitocondrial, asociada de manera periférica y orientada hacia la matriz mitocondrial (Tavares-Carreón y col. 2008). Para averiguar si Pet309Δ12ppr conserva la misma topología que una cepa silvestre se realizaron ensayos de fraccionamiento mitocondrial y extracción alcalina mitocondrial.

El primer experimento para localizar a Pet309Δ12ppr fue el fraccionamiento mitocondrial, el cual consistió en fragmentar a las mitocondrias por medio de sonicación para romper las membranas. Posteriormente las fracciones soluble y membranal se separaron por ultracentrifugación y se analizaron por SDS-PAGE y Western blot.

El resultado indicó que Pet309Δ12ppr se localiza en la fracción membranal igual que Pet309 silvestre (Figura 13A). Como control de proteína membranal se inmunodetectó a citocromo *c1* el cual es una proteína integral de membrana interna que forma parte del complejo III respiratorio y sólo se detectó en la fracción membranal. La proteína citrato sintasa, proteína soluble de matriz mitocondrial sólo fue detectada en la fracción soluble.

Posteriormente se determinó si Pet309Δ12ppr se comportaba como una proteína periférica de membrana. Para ello, se trataron a las mitocondrias con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> alcalino para extraer proteínas unidas periféricamente a la membrana interna mitocondrial. Posterior al tratamiento, las mitocondrias se ultracentrifugaron para separar la fracción membranal de la fracción soluble. En las fracciones solubles se encuentran las proteínas periféricas.

El ensayo reveló que Pet309Δ12ppr se comporta como una proteína periférica de membrana (Figura 13B). Igualmente, se usaron como controles de proteína membranal a citocromo *c1* y como proteína soluble la citrato sintasa. Con estos ensayos se concluye que Pet309Δ12ppr está asociada a la membrana mitocondrial de manera periférica, igual que Pet309 silvestre.



**Figura 13.** Pet309Δ12ppr es una proteína periférica de membrana interna mitocondrial. A) Pet309Δ12ppr está presente en la membrana mitocondrial. Como control de proteína soluble mitocondrial se empleó citrato sintasa (CS) y como control de proteína integral de membranal se utilizó citocromo c1 (Cyt c<sub>1</sub>). B) Extracción de proteínas mitocondriales en medio alcalino de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Pet309Δ12ppr se detectó en la fracción soluble. M: fracción membranal; S: fracción soluble. Pet309 se detectó con un anticuerpo comercial contra HA.

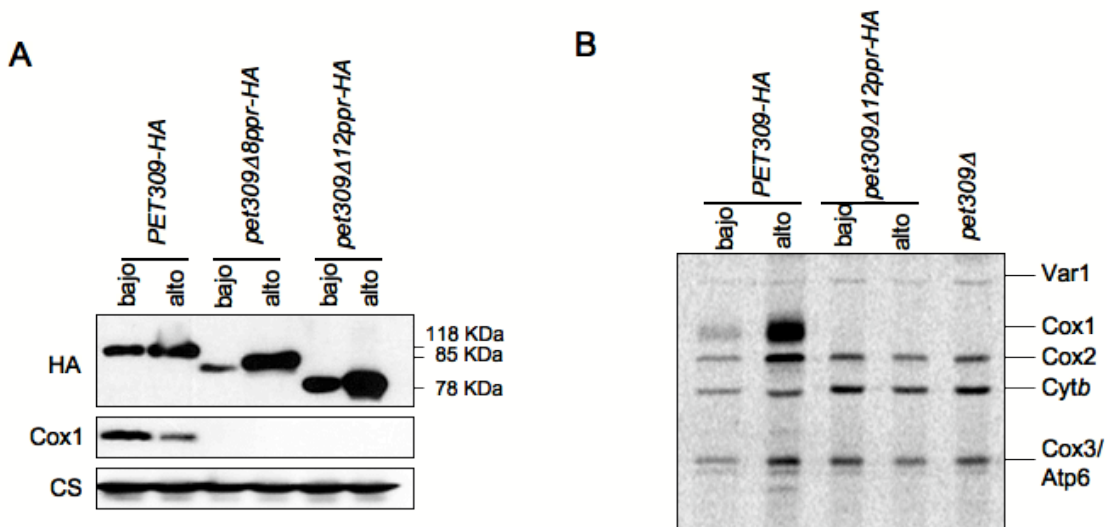
## **5. Los 12 motivos PPR de Pet309 se requieren para sintetizar a Cox1 pero no para acumular los niveles del mRNA de COX1.**

Se ha observado que Pet309 se requiere para traducir y estabilizar al mRNA de COX1 (Manthey y McEwen, 1995). Previamente se construyó una mutante de pet309 carente de 8 dominios PPR (Pet309 $\Delta$ 8ppr) la cual es incapaz de sintetizar a Cox1 (Tavares-Carreón y col. 2008) sin afectar la estabilidad del mRNA de COX1. Para investigar si Pet309 $\Delta$ 12ppr afecta la acumulación de esta proteína de la misma manera que Pet309 $\Delta$ 8ppr, purificamos mitocondrias que expresan a Pet309 $\Delta$ 12ppr tanto en baja como en alto número de copias. Mediante Western blot se observó que la proteína Cox1 está ausente en Pet309 $\Delta$ 12ppr, tanto en baja copia como en sobreexpresión (Figura 14A). Estos resultados indican que la mutación introducida en *PET309* está afectando la acumulación de Cox1. Es interesante observar que cuando se sobreexpresa la proteína Pet309 silvestre baja la cantidad de proteína Cox1. Esta observación fue consistente con lo antes reportado (Tavares-Carreón y col. 2008). Esto puede indicar que es importante mantener concentraciones bajas de esta proteína para mantener una biogénesis adecuado de Cox1. Debido a que los activadores traduccionales se encuentran en bajas concentraciones dentro de la célula (Fox, 1996b), es posible que su sobreexpresión induzca cambios en la biogénesis de los genes codificados en la mitocondria (Fiori y col. 2005).

Posteriormente se realizó marcaje radioactivo con metionina [ $S^{35}$ ] de proteínas sintetizadas en la mitocondria. Para realizar este experimento, se cultivaron las levadura que expresaban a Pet309 y a Pet309 $\Delta$ 12ppr tanto en baja copia como en sobreexpresión. Las células se incubaron con cicloheximida para bloquear la traducción citosólica, permitiendo la traducción mitocondrial. Posteriormente se adicionó metionina [ $S^{35}$ ] con el objetivo de marcar a las proteínas recién sintetizadas en la mitocondria. Se purificaron las mitocondrias y las proteínas se analizaron mediante electroforésis SDS-PAGE y autoradiografía. Se observó que todas las proteínas codificadas en la mitocondria se marcaron en todas las cepas estudiadas a excepción de Cox1, la

cual no se sintetiza en presencia de Pet309 $\Delta$ 12ppr tanto en baja o alta copia así como en la mutante nula de *pet309*.

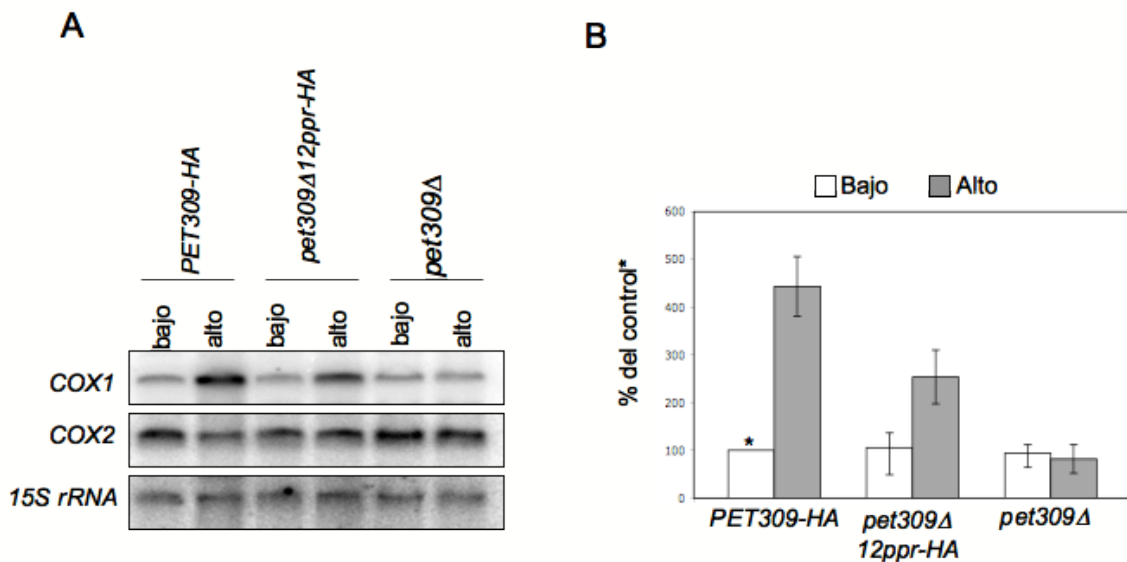
Cox1 únicamente fue detectada en las cepas que presentan a Pet309 silvestre (Figura 14B). Cuando sobreexpresamos a Pet309 se incrementa considerablemente la cantidad de Cox1, sin embargo en el Western blot no se detectan estos niveles de la proteína. Posiblemente el exceso de Cox1 es dentro de la mitocondria conlleva a una desregulación de esta proteína lo cual induce una sobre degradación de la misma, por factores que aún no se tiene bien esclarecido.



**Figura 14.** La proteína Cox1 no se sintetiza en la mutante *pet309 $\Delta$ 12ppr*. A) Inmunodetección de Cox1 en las mutantes *pet309 $\Delta$ ppr* en bajo y alto número de copia. Como control de carga se utilizó la proteína citrato sintasa (CS). Se cargaron 50 $\mu$ g de proteína mitocondrial y se separaron por SDS-PAGE al 12%. KDa= Kilo Dalton B) Síntesis de proteínas mitocondriales *in vivo*. Las proteínas fueron marcadas con metionina [ $^{35}$ S] por 20 minutos y analizadas por SDS-PAGE y autoradiografía. Var1 subunidad ribosomal; Cox1, subunidad I; Cox2, subunidad II; Cox3, subunidad III de la citocromo c oxidasa; Cyt b, citocromo b del complejo bc1; Atp6, subunidad 6; Atp8 subunidad 8; Atp9, subunidad 9 de la ATP sintasa.

Para averiguar si Pet309 $\Delta$ 12ppr afectaba la acumulación del mRNA de COX1, purificamos RNA total de cepas que contenían Pet309 $\Delta$ 12ppr en baja como alta copia y realizamos un northern blot. El experimento se hizo por triplicado y en todos los casos se hibridó específicamente con sondas para COX1, COX2 y 15S rRNA marcadas radioactivamente.

Se encontró que los niveles del mRNA de COX1 se incrementaron más de cuatro veces cuando la cepa silvestre de Pet309 estaba en sobreexpresión (Figura 15A). Cuando se sobreexpresa a Pet309 $\Delta$ 12ppr el mRNA de COX1 se acumuló al doble respecto a la cepa expresada en bajo número de copia. Este efecto sobre COX1 es específico, ya que los niveles del mRNA de COX2 no se vieron afectados en presencia de Pet309 ó Pet309 $\Delta$ 12ppr en ningún caso. También se observa que la expresión de COX1 en presencia de los vectores vacíos disminuye considerablemente. Este dato se puede corroborar con lo previamente descrito por Manthey y McEwen (1995) en el cual mutantes nulas de *pet309* bajan al 50% los niveles del mRNA de COX1. Esto indica que la acumulación del mRNA de COX1 es dependiente de la presencia de Pet309. La cuantificación de las bandas obtenidas en los northern blot se muestran en figura 15B.



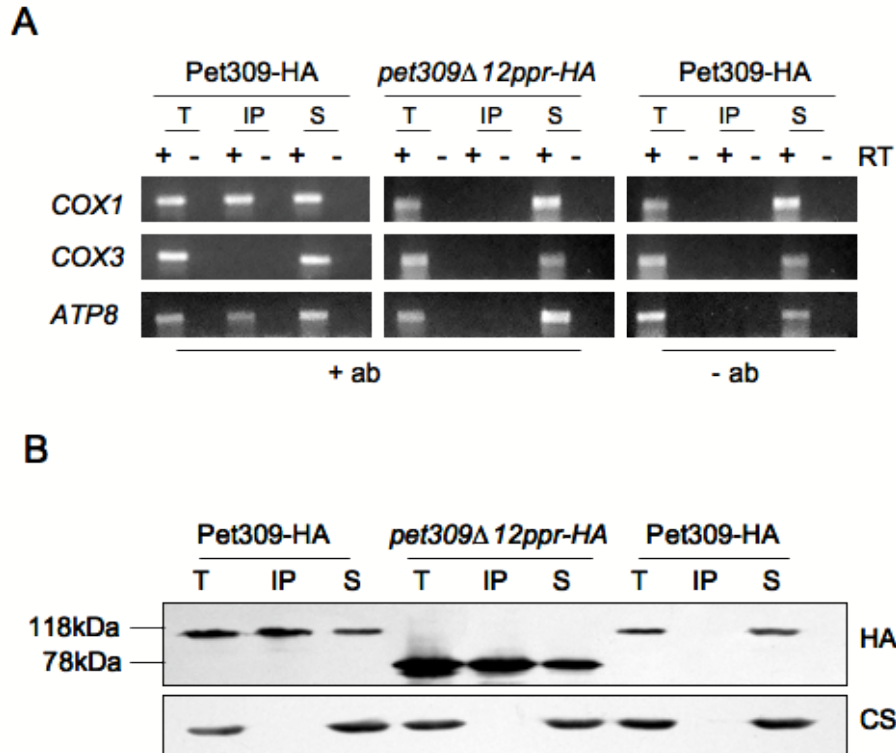
**Figura 15.** La ausencia de los 12 motivos PPR de Pet309 no afecta la acumulación del mRNA de COX1. Se analizaron 10 µg de RNA total por cepa. Como control de carga se empleó el 15S rRNA. B) Cuantificación de los mRNA de COX1 expresada en porcentaje tomando a la cepa silvestre en baja copia como el 100%.

Los datos sugieren que a pesar de que Pet309 ya no contiene 12 motivos PPR, la proteína no ha perdido su función estabilizadora sobre el mRNA de COX1, sin embargo está abatida la traducción del mismo.

### **6. La interacción física entre Pet309 y el mRNA de COX1 depende de los 12 dominios PPR.**

A continuación nos preguntamos si Pet309 $\Delta$ ppr12 tendría capacidad para interactuar con el mRNA de COX1. Para ello se realizaron ensayos de IP-RNA. Estos ensayos se llevaron a cabo en la cepa silvestre Pet309 y en la mutante Pet309 $\Delta$ 12ppr expresados en bajo número de copia.

El resultado mostró que la interacción con el mRNA de COX1 se compromete cuando pet309 carece de 12 motivos PPR. Se observó que Pet309 $\Delta$ 12ppr es incapaz de inmunoprecipitar con COX1 (Figura 16A). ATP8 tampoco inmunoprecipitó con Pet309. Se usó como control positivo a Pet309 silvestre la cual ya habíamos demostrado que interactuaba con el RNA de COX1. Para corroborar que la ausencia de la interacción no se debía a una ineficiente inmunoprecipitación de Pet309 $\Delta$ 12ppr, se tomó un cuarto de la fracción inmunoprecipitada para analizarla por Western blot, y se observó la eficiencia de la inmunoprecipitación (Figura 16B). Se encontró que más del 50 % de Pet309, tanto silvestre como mutante se inmunoprecipitó. Así se confirmó que la pérdida de interacción se debe únicamente a la carencia de 12 motivos PPR.



**Figura 16.** La interacción entre el mRNA de *COX1* y *pet309* se abate en ausencia de 12 dominios PPR de Pet309 A) RT-PCR de la inmunoprecipitación de Pet309 (118 kDa) y *Pet309Δ12ppr* (78 kDa). El RNA aislado de la fracción total (T), inmunoprecipitada (IP) y sobrenadante (S) se usó para amplificar preparar cDNA y amplificar a los genes *COX1*, *COX3* y *ATP8*. El cDNA fue generado con (+) o sin (-) transcriptasa reversa (RT). Como control negativo se realizó la reacción de inmunoprecipitación de Pet309-HA sin adicionarle anticuerpo contra HA (-ab). B) Un cuarto de cada muestra de la IP-RNA fue tomado para hacer Western blot y analizar la eficiencia de la inmunoprecipitación. Se empleo anticuerpo contra anti-citrato sintasa como control de inmunoprecipitación específica.



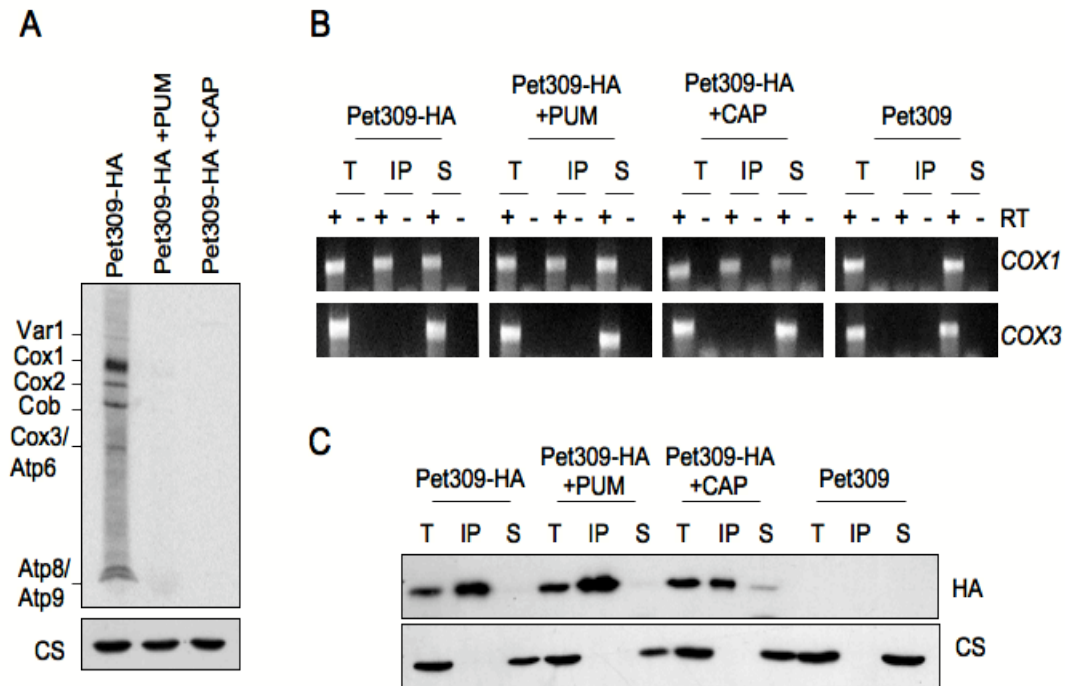
## **7. La interacción entre Pet309 y el mRNA de COX1 no depende de la traducción mitocondrial.**

La traducción mitocondrial se lleva a cabo por ribosomas localizados en la membrana interna mitocondrial y la mayoría de los activadores traduccionales se localizan en esta zona, lo que permite un acoplamiento entre la síntesis de proteínas membranales codificados por el DNAmT y su inserción en la membrana interna (Fox, 1996a; Smits y col. 2010). Datos de nuestro laboratorio indican que Pet309 se asocia al ribosoma mitocondrial (Zamudio-Ochoa, datos no publicados). Para averiguar si la interacción entre Pet309 y el mRNA de COX1 depende de una traducción activa por los ribosomas mitocondriales, se realizaron ensayos de IP-RNA de Pet309 en presencia de dos inhibidores de la traducción: puromicina y cloranfenicol. La puromicina inhibe la síntesis de proteínas al causar la liberación prematura del polipéptido naciente proveniente del ribosoma (Sohmen y col. 2009), mientras que el cloranfenicol inhibe la actividad de la peptidil transferasa de la subunidad 50S ribosomal bloqueando la elongación del péptido y dejando unida la cadena naciente al ribosoma (Sohmen y col. 2009).

Se purificaron mitocondrias de la cepa silvestre de Pet309 y se realizó un ensayo de traducción *in organelo* en presencia de puromicina y cloranfenicol. Como se observa en la figura 17A, se bloqueó la traducción mitocondrial al adicionar puromicina (45  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) o cloranfenicol (3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ).

Una vez que se verificó que ambos antibióticos inhibían la traducción mitocondrial se inmunoprecipitó a Pet309 en presencia de estos fármacos. El resultado de la inmunoprecipitación indicó que Pet309 conserva la interacción con el mRNA de COX1 (Figura 17B) en presencia de puromicina o cloranfenicol. Lo que indica que la asociación de Pet309 con el RNA de COX1 es independiente de la presencia de la cadena naciente sobre el ribosoma o de la actividad ribosomal; por lo tanto no es prerequisite la traducción mitocondrial para la asociación de Pet309 con el mRNA de COX1.

La eficiencia de la inmunoprecipitación de Pet309 se detectó mediante Western blot (Figura 17C). Se observó que Pet309 inmunoprecipitó con gran eficiencia, aún cuando los dos fármacos estaban presentes.



**Figura 17.** La interacción de Pet309 con el *mRNA* de *COX1* no depende de la traducción mitocondrial. A) Marcaje radioactivo de proteínas mitocondriales en presencia de puromicina (PM) o cloranfenicol (CAP). Las mitocondrias se incubaron con los antibióticos por 5 min previo al marcaje con metionina [ $S^{35}$ ]. B) RT-PCR del RNA de *COX1* en presencia o ausencia de los antibióticos. El RNA fue incubado con o sin transcriptasa reversa (RT) para generar el cDNA y amplificar los genes *COX1* y *COX3*. C) Western blot de la IP-RNA. El total (T), pellet (IP) y el sobrenadante (SN) de la inmunoprecipitación fueron analizados por Western blot con los anticuerpos contra HA para Pet309 y contra citrato sintasa (CS).

## **8. Pet309 reconoce la región -140 a -90 nucleótidos río arriba del ATG del mRNA de COX1.**

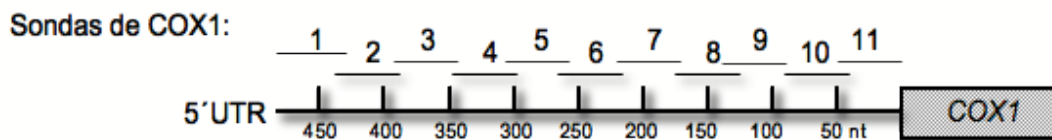
Se ha reportado que algunas proteínas PPR se unen *in vitro* a sus RNA blancos (Pfalz y col. 2009; Okuda y col. 2007; Williams-Carrier y col. 2008; y Hattory y Sugita, 2009). Un primer reporte sugería que al menos cada dominio PPR debía unir 2-3 nucleótidos (Schmitz-Linneweber y col. 2005). Sin embargo, un estudio reciente indicó que la proteína PPR10 de maíz, la cual contiene 18 motivos PPR reconoce sólo 17 nucleótidos del RNA *atpl-atpH* de cloroplasto (Prikryl y col. 2011), lo que indica que cada motivo PPR debe de estar reconociendo sólo un nucleótido.

Nuestros resultados indican que Pet309 interacciona físicamente con el 5'-UTR del mRNA de COX1. Ahora quisimos determinar si Pet309 reconoce todos los 450 nucleótidos que abarca el 5'-UTR del mRNA de COX1 (Dieckmann y Staples. 1994) ó sólo una porción de éste.

Para determinar la región del extremo 5'-UTR de COX1 a la cual se une Pet309 nos basamos en la metodología de Ostheimer y col (2003), en la cual se realizan ensayos de IP-RNA, pero en esta ocasión el RNA inmunoprecipitado se analiza por slot-blot. En estos ensayos de IP-RNA no usamos inhibidor de RNasas cuando solubilizamos las mitocondrias. Esto tiene como objetivo que las RNasas endógenas de la mitocondria degraden el RNA libre o desprotegido por la proteína Pet309. De esta manera, la región del RNA que interacciona con Pet309 quedará protegido de las RNasas y podremos identificarlo por medio de sondas marcadas radioactivamente.

Para mapear la región nucleotídica del extremo 5'-UTR del mRNA de COX1 que es reconocida por los dominios PPR, se generaron 11 oligonucleótidos con un tamaño de 50 pares de bases (50mer) y con un solapamiento de ocho nucleótidos entre ellas (Figura 18). Estos oligonucleótidos están basados en la secuencia del extremo 5'-UTR de COX1 obtenido del SGD (*Saccharomyces* Genome Database); la secuencia exacta de cada sonda se encuentra en la tabla número 5.

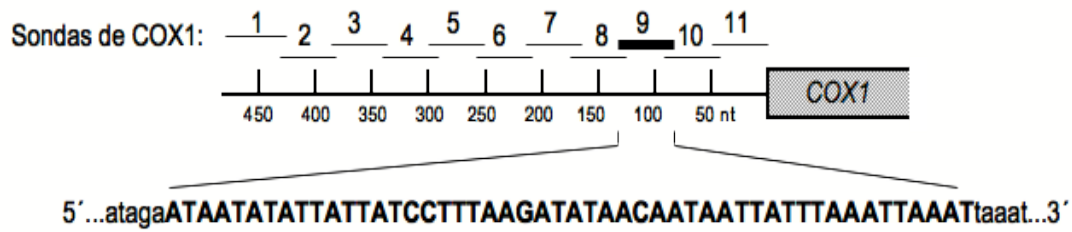
Para este ensayo se hizo IP-RNA y el RNA obtenido de la fracción inmunoprecipitada (P) como de la fracción sobrenadante (S) se fijan a una membrana de nylon con ayuda de un equipo para hacer slot-blot. Los oligonucleótidos generados se marcaron radioactivamente con  $^{32}\text{P}$ -dATP. Una vez marcados se hibridaron con el RNA fijado a la membrana de nylon y se expusieron por 1 día en una pantalla de fósforo para detectar la marca radioactiva.



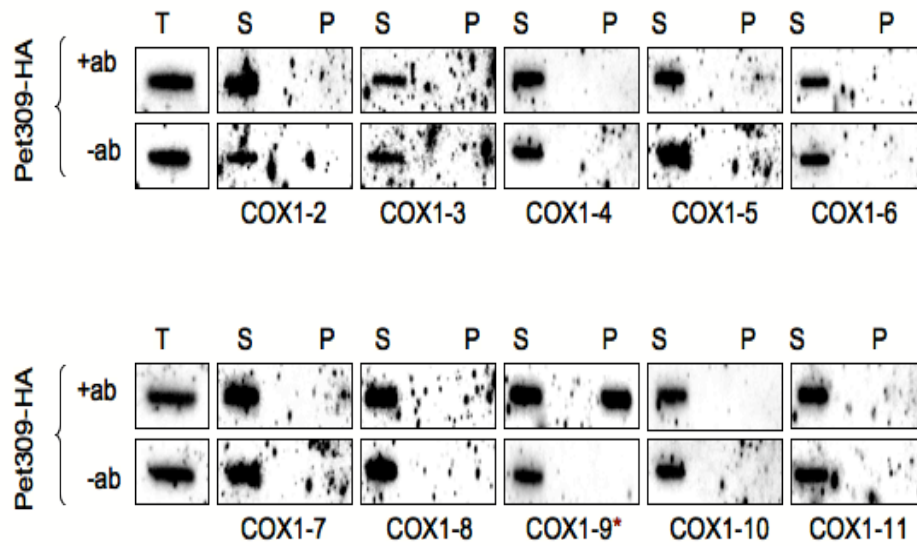
**Figura 18.** Esquema de la localización de las sondas del extremo 5'-UTR del mRNA de *COX1*. Las sondas se generaron a partir de 1 nucleótido río arriba del AUG de *COX1*. Las sondas están numeradas del 1 a 11. La región codificante de *COX1* se muestra en el cuadro gris.

Se usó la cepa silvestre de Pet309-HA y se realizaron ensayos por duplicado agregando o no anticuerpo contra HA, con el objetivo de que las muestras sin anticuerpo fueran el control negativo. Los resultados obtenidos revelaron que de las 11 sondas generadas sólo la sonda COX1-9 es capaz de reconocer el RNA de la fracción inmunoprecipitada (IP), ninguna otra sonda fue capaz de reconocer el RNA de las porciones IP de manera consistente (Figura 19B). Estos datos sugieren fuertemente que Pet309 reconoce una zona específica del extremo 5'-UTR del mRNA de *COX1*. La región reconocida está ubicada en la zona de 140 a 90 nucleótidos río arriba del codón de inicio AUG de *COX1*.

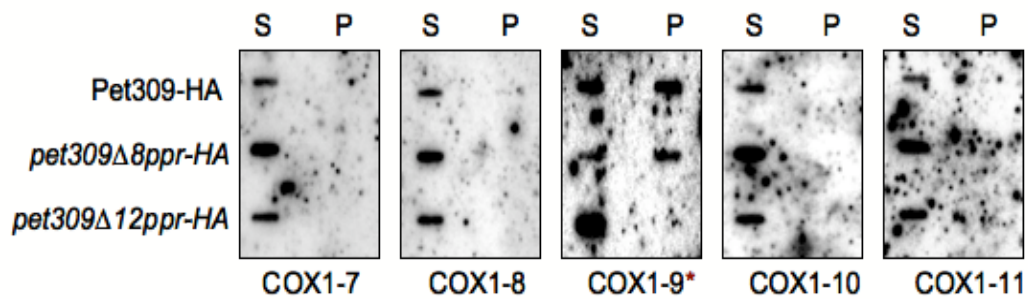
A



B



C



**Figura 19.** Pet309 reconoce la región entre -90 y -140 del extremo 5'-UTR del mRNA de COX1. A) Diagrama que muestra las sondas generadas para hibridar con la membrana del slot blot, en barra negra se indica la sonda que hibridó en la inmunoprecipitación (P). Abajo del diagrama se indica la secuencia de la sonda que es reconocida por Pet309. B) Mitocondrias con Pet309-HA fueron solubilizadas con digitonina e

inmunoprecipitadas con o sin anticuerpo anti-HA (+ab; -ab). Porciones iguales de RNA de la fracción inmunoprecipitada (P) como del sobrenadante (S) fueron fijadas a una membrana de nylon mediante un slot-blot. El RNA total obtenido de las mitocondria también se fijo e hibridó. C) RNA de las fracciones inmmunoprecipitada (P) y sobrenadante (S) de las cepas Pet309-HA, Pet309 $\Delta$ 8ppr-HA y Pet309 $\Delta$ 12ppr-HA, las cuales fueron hibridadas con las sondas COX1-7 a COX1-10. El asterisco identifica la sonda que hibridó con el inmunoprecipitado en B) y C).

Se logró identificar que Pet309 se une alrededor de -140 a -90 nucleótidos del extremo 5'-UTR del mRNA de COX1. Para averiguar si la proteína Pet309 $\Delta$ 8ppr y Pet309 $\Delta$ 12ppr conservan el mismo reconocimiento sobre la porción 5'-UTR, se realizaron IP-RNAs con cada cepa mutante. Se observó que Pet309 $\Delta$ 8ppr logra unirse en la misma posición que la proteína silvestre Pet309, mientras que Pet309 $\Delta$ 12ppr fue incapaz de reconocer el extremo 5'-UTR de COX1 (Figura 19C). Este resultado indicó que la proteína Pet309 $\Delta$ 12ppr perdió el reconocimiento con el mRNA de COX1 y que Pet309 $\Delta$ 8ppr lo conserva. El conjunto de estos datos apoyan el resultado de la IP-RNA en la cual no logramos coinmunoprecipitar el RNA de COX1 en la mutante Pet309 $\Delta$ 12ppr (Figura 16).

Con esta evidencia se concluye que Pet309 reconoce e interacciona físicamente con el 5'-UTR del mRNA de COX1 y que al menos se requieren 8 motivos PPR para este reconocimiento. Además se une a una región específica del mRNA de COX1 entre 140 nt y 90 nt río arriba del codón de inicio AUG.

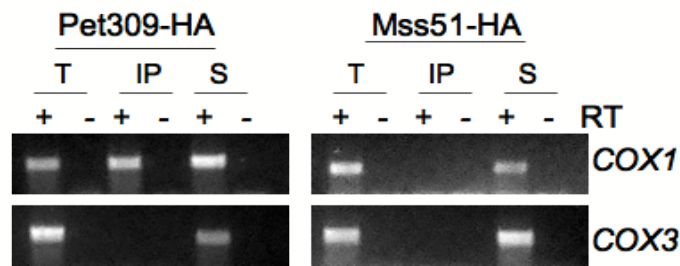
### **9. La interacción entre Pet309 y el mRNA de COX1 depende de Mss51.**

Mss51 también es activador traduccional del mRNA de COX1 e interacciona genéticamente con el extremo 5'-UTR de este mensajero (Pérez-Martínez y col. 2003 y 2009). A pesar de que Mss51 es un activador traduccional, no se le han identificado motivos PPR o algún otro motivo que una moléculas de RNA.

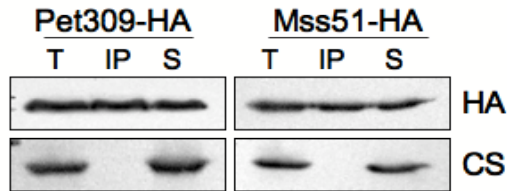
Previamente se reportó que Mss51 interaccionaba con el RNA de COX1 por triple híbrido (Zambrano y col. 2007) y quisimos probar si por medio de la IP-

RNA lográbamos detectar esta interacción. Empleamos una cepa en la cual Mss51 está etiquetada en su extremo carboxilo terminal con un epítotope de hemaglutinina. Si Mss51 interacciona con el mRNA de *COX1* debemos detectar este RNA por RT-PCR en la fracción inmunoprecipitada. Los datos indicaron que no coimmunoprecipita el mRNA de *COX1* con Mss51, por lo tanto no logramos amplificar este producto cuando hacemos el RT-PCR (Figura 20A). Al analizar el Western blot de las fracciones inmunoprecipitadas de la IP-RNA se observó que Mss51 inmunoprecipitaba con eficiencia, con lo que descartamos que la falta de interacción de Mss51 con el RNA de *COX1* no se debe a una falla en la inmunoprecipitación (Figura 20B).

**A**



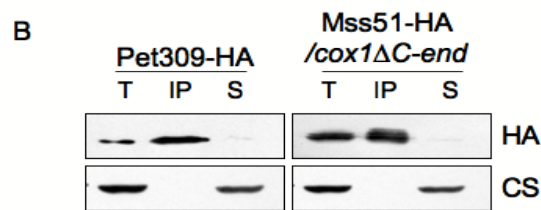
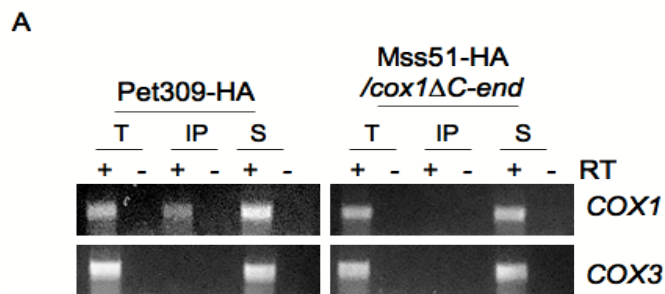
**B**



**Figura 20.** No se detectó interacción de Mss51 con el *mRNA* de *COX1*. A) RT-PCR de la inmunoprecipitación de Pet309-HA y Mss51-HA. El RNA aislado de la fracción total (T), inmunoprecipitada (IP) y sobrenadante (S) se usó para amplificar los genes *COX1* y *COX3*. El cDNA fue generado con o sin transcriptasa reversa (RT). B) Un cuarto de cada muestra de la IP-RNA fue tomado para hacer Western blot y analizar la eficiencia de la inmunoprecipitación. CS: anti-citrato sintasa.

Se ha observado que Mss51 es una proteína bifuncional, activa la traducción del mRNA de *COX1* y se asocia al extremo carboxilo terminal de Cox1 para asistir el ensamblaje de esta proteína (Shingu-Vazquez y col. 2010). Se ha propuesto que existen dos poblaciones de Mss51: una encargada de traducir el mRNA de *COX1* y otra encargada de asistir el ensamblaje de la proteína recién sintetizada Cox1. Como no logramos coinmunoprecipitar el RNA de *COX1* en presencia de Mss51, decidimos emplear una cepa carente de los últimos 15 residuos de la proteína Cox1 (*cox1Δ::C-end*). Ya se reportó que en esta cepa se desestabiliza la asociación de Mss51 con la proteína Cox1 y se encuentra libre para llevar a cabo la activación traduccional (Shingu-Vazquez y col. 2010). De esta manera, Mss51 ya no está involucrada en el ensamblaje del CcO, únicamente en la traducción del mRNA de *COX1*.

Nuevamente se realizaron tres ensayos independientes de IP-RNA de la cepa silvestre Pet309-HA como control positivo y de Mss51-HA en el fondo *cox1Δ::C-end*. En los tres casos obtuvimos resultados negativos al no poder coinmunoprecipitar el RNA de *COX1* con Mss51 (Figura 21A). Es posible que Mss51 no se asocie al RNA de *COX1* por ello no logramos detectar dicha interacción, a pesar de que la inmunoprecipitación de Mss51 es muy eficiente (Figura 21B).

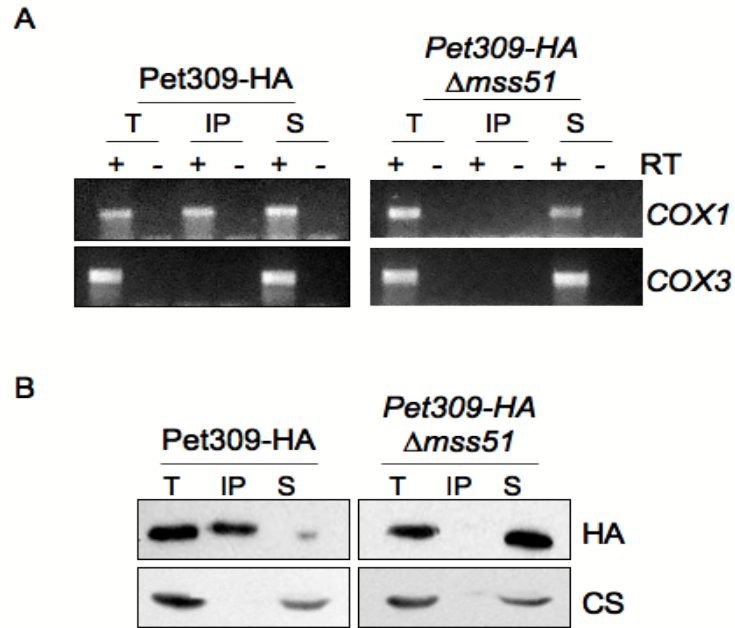




**Figura 21.** No se detectó interacción de Mss51 con el *mRNA de COX1* en presencia de *cox1ΔC-end*. A) RT-PCR de la inmunoprecipitación de Pet309-HA, Mss51-HA/*cox1Δ::C-end* y Pet309 sin epítipo HA como control negativo. El RNA aislado de la fracción total (T), inmunoprecipitada (IP) y sobrenadante (S) se uso para amplificar los genes *COX1* y *COX3*. El cDNA fue generado con o sin transcriptasa reversa (RT). B) Un cuarto de cada muestra de la IP-RNA fue tomado para hacer Western blot y analizar la eficiencia de la inmunoprecipitación. CS: anti-citrato sintasa.

Mss51 y Pet309 son activadores traduccionales del mRNA de *COX1* y como se mencionaba anteriormente, Mss51 sensa la traducción/inserción de Cox1. Es posible que la interacción que reportamos entre Pet309 y el RNA de *COX1* esta mediada por Mss51. Para comprobar esta hipótesis realizamos ensayos de IP-RNA en una cepa que contiene la versión silvestre de Pet309-HA y la mutante nula de *mss51* (Pet309-HA/ $\Delta$ *mss51*).

Los resultados del Western blot de la IP-RNA indicaron que no hay inmunoprecipitación de Pet309-HA en la mutante nula de  $\Delta$ *mss51*, ya que no la inmunodetectamos en la fracción IP (Figura 22B). Esto lleva por consecuencia que no coinmunoprecipite el RNA de *COX1*, lo cual se corrobora con el RT-PCR (Figura 22A). Estos datos sugieren que Mss51 tiene un papel importante sobre la conformación de Pet309. Es posible que la falta de Mss51 provoque que el extremo C-terminal de Pet309, donde se localiza el epítipo HA se oculte y por lo tanto no se pueda inmunoprecipitar. Por tal motivo, es necesario generar otro anticuerpo que reconozca a pet309 para analizar si su interacción con el mRNA de *COX1* se abate en ausencia de Mss51.



**Figura 22.** En ausencia de Mss51 la interacción de Pet309 con el *mRNA* de *COX1* se afecta. A) RT-PCR de la inmunoprecipitación de Pet309-HA y *Pet309/ $\Delta mss51$* . Se amplificaron los genes *COX1* y *COX3* a partir del RNA aislado de la fracción total (T), inmunoprecipitada (IP) y sobrenadante (S). El cDNA fue generado con o sin transcriptasa reversa (RT). B) Se tomó un cuarto de cada muestra de la IP-RNA para hacer Western blot y analizar la eficiencia de la inmunoprecipitación.

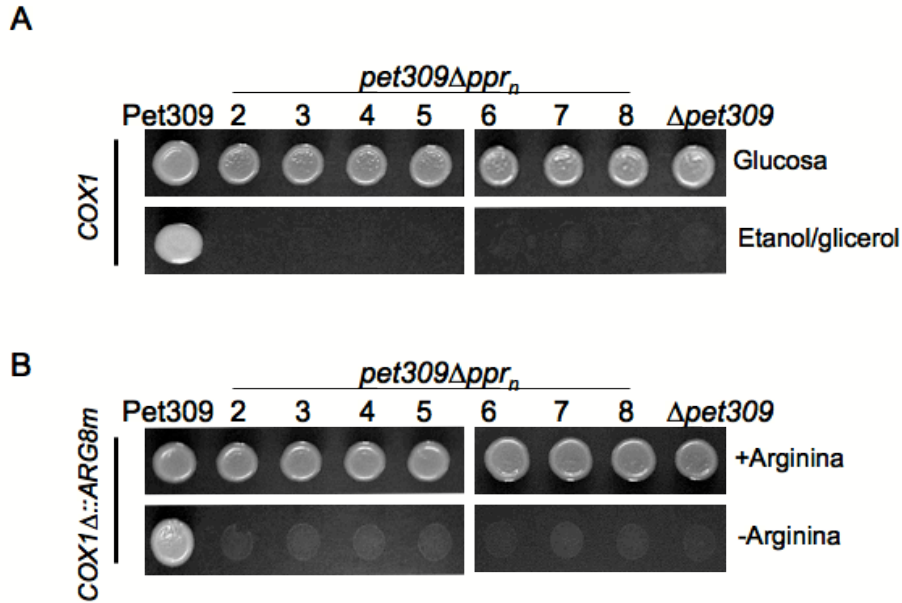
## Parte II. BÚSQUEDA DE SUPRESORAS CAPACES DE RESTAURAR EL FENOTIPO RESPIRATORIO.

### **1. Obtención de cepas que suprimen el defecto respiratorio de *pet309Δppr2*.**

Los resultados muestran que la mutante *pet309Δ8ppr* es incapaz de respirar porque se abate la síntesis de la proteína Cox1, sin embargo es totalmente capaz de interaccionar con el RNA de COX1. Esto significa que de alguna manera se pierde la comunicación entre la proteína Pet309Δ8ppr y el ribosoma. Es posible que esta comunicación sea mediada por alguna proteína que interaccione directa o indirectamente con Pet309.

Para resolver esta pregunta se buscaron cepas supresoras capaces de suprimir el defecto respiratorio ocasionada por la mutación *pet309Δ8ppr*. Al caracterizar genética y bioquímicamente a las supresoras, se espera que éstas proporcionen información de posibles proteínas que estarían interactuando con Pet309 y que promuevan la traducción del mRNA de COX1. Se buscaron supresoras respiratorias de la cepa con *pet309Δ8ppr*, sin embargo no se obtuvo ninguna. Creemos que la eliminación de 8 dominios PPR era muy grande como para encontrar una supresora capaz de restaurar el fenotipo de esta mutante. Por tal motivo, se realizaron mutantes en las que se eliminó cada uno de los 8 motivos PPR centrales de Pet309. Se generaron las mutantes individuales del PPR 2 al 8, y se analizó el fenotipo de las mutantes clonadas en plásmidos de bajo número de copia. Se observó que las mutantes pierden la capacidad respiratoria al no crecer en un medio no fermentable (Figura 23A).

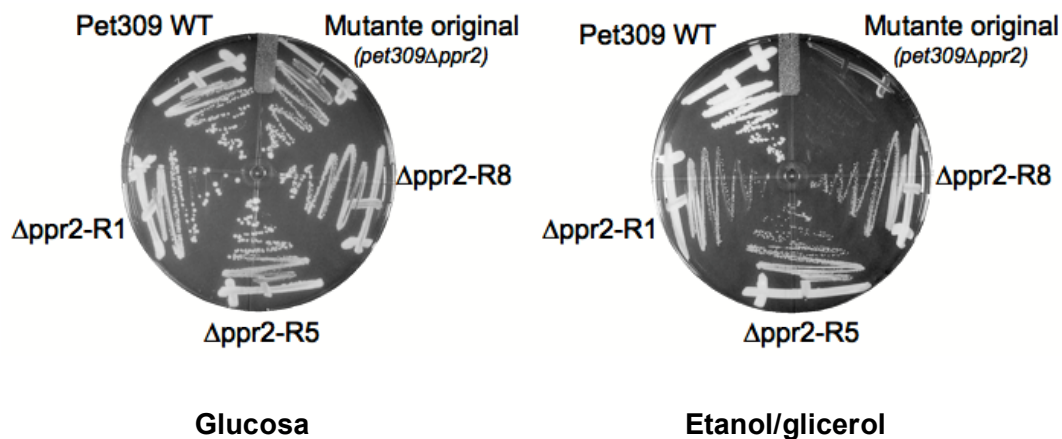
Para corroborar que el defecto respiratorio observado en las mutantes era debido a la falta de traducción del mRNA de COX1, se utilizó la cepa con el gen *cox1Δ:: ARG8<sup>m</sup>* como reportero de la traducción. Se observó que ninguna de las mutantes generadas fue capaz de crecer en un medio carente de arginina (Figura 23B). Esto indica que la traducción del mRNA de COX1 se ve afectada cuando *pet309* carece de uno sólo de sus motivos PPR centrales.



**Figura 23.** Cada uno de los motivos PPR centrales de Pet309 son requeridos para la síntesis de Cox1. A) Las cepas se crecieron en medio fermentativo (glucosa) o no fermentativo (etanol/glicerol) y se expresaron en un fondo mitocondrial silvestre. B) Las cepas se crecieron en un medio con o sin arginina y bajo el control del reportero de la traducción *cox1Δ::ARG8<sup>m</sup>*. Todas las cepas se crecieron a 30°C por 3 días.

Con estos resultados concluimos que no sólo *pet309Δ8ppr* es incapaz de respirar sino también las mutantes de cada uno de los motivos PPR. A continuación elegimos a la mutante *pet309Δppr2*, la cual carece del segundo motivo PPR para buscar supresoras respiratorias. De esta manera las posibilidades de que obtengamos una cepa supresora de la mutante *pet309Δppr2* (carente de 35 aminoácidos) son más elevadas en comparación con la mutante *pet309Δ8ppr*, que carece de 280 aminoácidos.

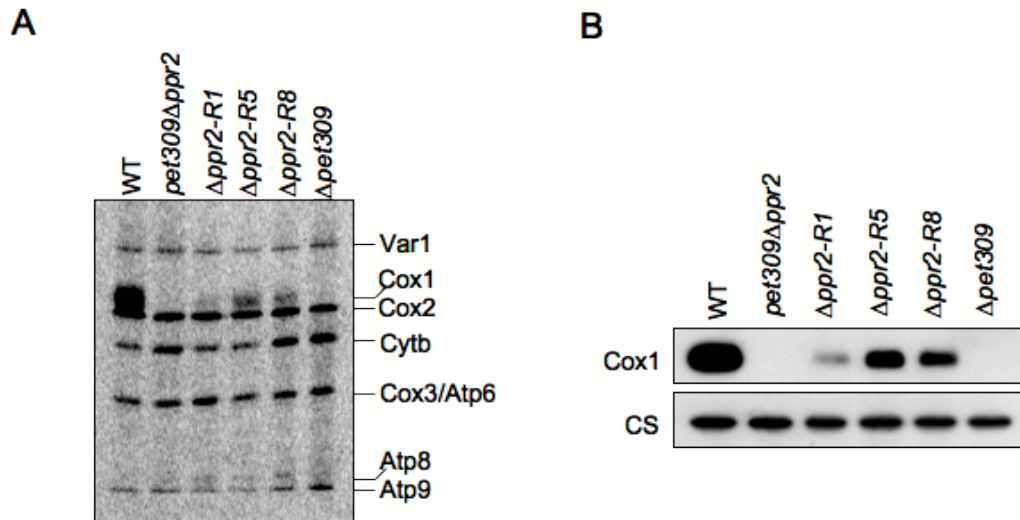
Bajo este contexto buscamos supresoras de *pet309Δppr2* y obtuvimos 8 supresoras independientes capaces de restaurar el fenotipo no respiratorio de esta mutante. Debido a la dificultad de analizar todas las supresoras, nos enfocamos en estudiar sólo a tres supresoras las cuales mostraban capacidad respiratoria parcial y presentaban diferente tamaño de colonias entre ellas (Figura 24). A estas supresoras les llamamos Δ*ppr2*-R1, Δ*ppr2*-R5 y Δ*ppr2*-R8.



**Figura 24.** Supresoras capaces de restaurar la respiración de la mutante *pet309Δappr2*. Las 3 Supresoras (*Δappr2-R1*, *Δappr2-R5* y *Δappr2-R8*) se crecieron por 6 días a 30°C en medio no fermentable a base de etanol-glicerol. Las cepas que aquí se utilizaron no contienen el epítipo HA en Pet309 para evitar que interfiera en la obtención de cepas represoras.

Como se observó que las supresoras eran capaces de respirar, se marcaron radioactivamente las proteínas mitocondriales de las tres supresoras con el objetivo de comprobar que éstas sintetizaban nuevamente a Cox1. Se observó que la síntesis de Cox1 se restaura en distintas cantidades, las cuales corresponden con la capacidad de crecimiento en medio respiratorio: *Δappr2-R5* y *Δappr2-R8* sintetizan más proteína Cox1 en comparación con *Δappr2-R1* (Figura 25A), la mutante original *pet309Δappr2* como la mutante nula de *Δpet309* no sintetizan a Cox1. Para corroborar que la poca cantidad de Cox1 detectada en el marcaje radioactivo fuera estable, se inmunodetectó a Cox1 por medio de Western blot. Se observó que en las tres supresoras Cox1 era estable (Figura 25B). Con esto se concluye que las supresoras restauraron la síntesis de Cox1 y por tal motivo son capaces de respirar en medio no fermentable. Sin embargo, los niveles de expresión de Cox1 son muy bajos en comparación con la cepa silvestre. No descartamos la posibilidad de que existan otros factores que

promuevan el fenotipo respiratorio de las supresoras además de la restauración en la síntesis de Cox1.

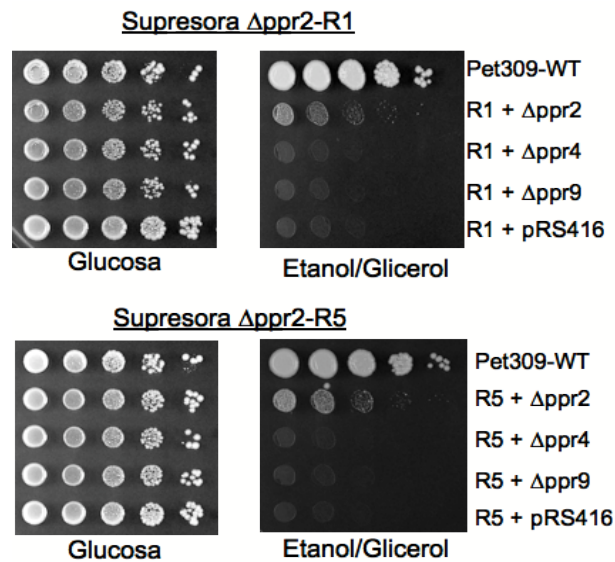


**Figura 25.**  $\Delta ppr2-R1$ ,  $\Delta ppr2-R5$  y  $\Delta ppr2-R8$  son capaces de restaurar la síntesis de Cox1. A) Traducción *in vivo* de las supresoras en presencia de cicloheximida. Las proteínas fueron marcadas con [ $^{35}$ S] metionina por 20 minutos y se analizaron por SDS-PAGE y autoradiografía. B) Western blot de las supresoras, se detectó a Cox1 en fase estacionaria. Como control de carga se utilizó citrato sintasa (CS).

Era posible que el fenotipo obtenido de las supresoras se debiera a mutaciones en el gen *pet309Δppr2* (todas las supresoras contienen este plásmido), por lo que se secuenció el gen *pet309Δppr2* de una de las supresoras. La secuencia indicó que no había ningún cambio, sustitución o adición de nucleótidos. Cuando se eliminó el plásmido que contiene a *pet309Δppr2* de las supresoras estas no fueron capaces de respirar, lo que indica que se requiere la presencia de *pet309Δppr2* para que las cepas supresoras respiren. Estos datos indicaron dos cosas: 1) el fenotipo supresor no se debe a mutaciones intragénicas en el gen *pet309Δppr2* (al menos de las tres supresoras estudiadas) y 2) las supresoras contienen algún gen mutado de origen nuclear o mitocondrial, que reestablece la respiración.

## 2. El fenotipo supresor es específico para *pet309Δppr2*.

Los datos previos sugieren que las cepas supresoras requieren de *pet309Δppr2* para restablecer el fenotipo respiratorio. Para averiguar si las supresoras necesitan específicamente del gen *pet309Δppr2* se eliminó el plásmido que contiene la versión *pet309Δppr2* de la supresora  $\Delta ppr2$ -R1 y  $\Delta ppr2$ -R5 y se reemplazó por los plásmidos que contienen a *pet309Δppr4* (carente del cuarto PPR) y *pet309Δppr9* (carente del noveno PPR). Los resultados indicaron que en presencia de estos plásmidos las supresoras no son capaces de respirar, únicamente respiran cuando tienen el plásmido original *pet309Δppr2*. Esto sugiere que el fenotipo supresor es específico para *pet309Δppr2* (Figura 26), ya que no puede ser compensado por otras mutantes PPR. Además sugiere que la (s) posible(s) proteína(s) que mutó para recuperar el fenotipo respiratorio solo identifica o reconoce la “ausencia” del segundo PPR de Pet309.

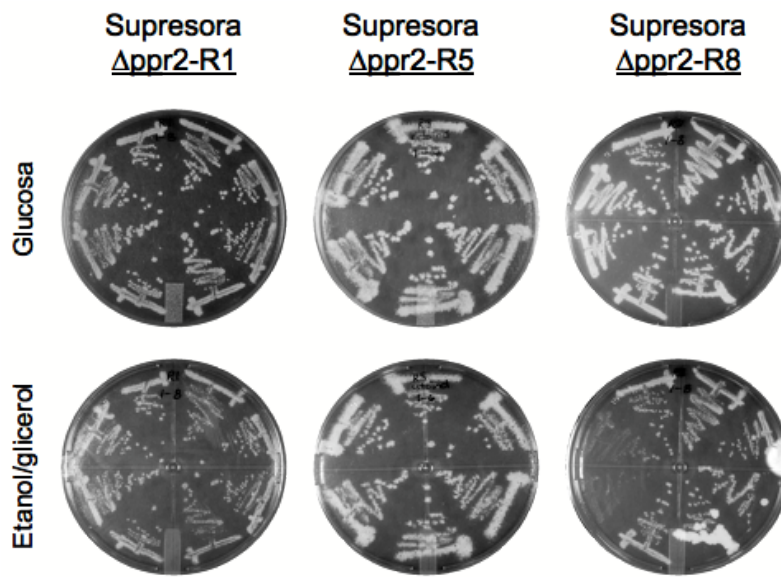


**Figura 26.** El fenotipo respiratorio de las supresoras es específico para *pet309Δppr2*. Diluciones seriadas de las supresoras  $\Delta ppr2$ -R1 y  $\Delta ppr2$ -R5 a las cuales se les eliminó el plásmido *pet309Δppr2* y se sustituyó por los plásmidos *pet309Δppr2* ( $\Delta ppr2$ ), *pet309Δppr4* ( $\Delta ppr4$ ), *pet309Δppr9* ( $\Delta ppr9$ ) y pRS416 como vector vacío. Las cepas se crecieron a 30°C por seis días.

### 3. Las supresoras $\Delta ppr2-R1$ , $\Delta ppr2-R5$ y $\Delta ppr2-R8$ son de origen nuclear.

Con los datos previos podemos sugerir que algún gen (gen X) de origen nuclear o mitocondrial trabaja en conjunto con  $pet309\Delta ppr2$  para reestablecer la síntesis de la proteína Cox1 en las supresoras. Para averiguar si el origen del gen X es mitocondrial, a las cepas supresoras se les eliminó su DNA mitocondrial (cepas rho0) con bromuro de etidio. Una vez hechas las supresoras rho0 se aparearon con una cepa que tuviera DNA mitocondrial silvestre (rho+), de esta manera la cepa supresora aceptó el DNA mitocondrial nuevo por medio de una citoinducción (vease material y métodos). Si la supresora es incapaz de respirar con el DNAmT recién adquirido será porque el gen X estaba localizado en el DNAmT. Por el contrario, si la supresora es capaz de respirar con el DNAmT nuevo es porque el gen X está localizado en el núcleo.

Las citoinductantes obtenidas que acarreaban el DNAmT silvestre, se estriaron en medio respiratorio a base de etanol/glicerol como fuentes de carbono. Se observó que las tres supresoras eran totalmente capaces de crecer en medio respiratorio con el DNAmT nuevo (Figura 27). Esto indicó que el gen X que causa el fenotipo respiratorio en las cepas supresoras es de origen nuclear.



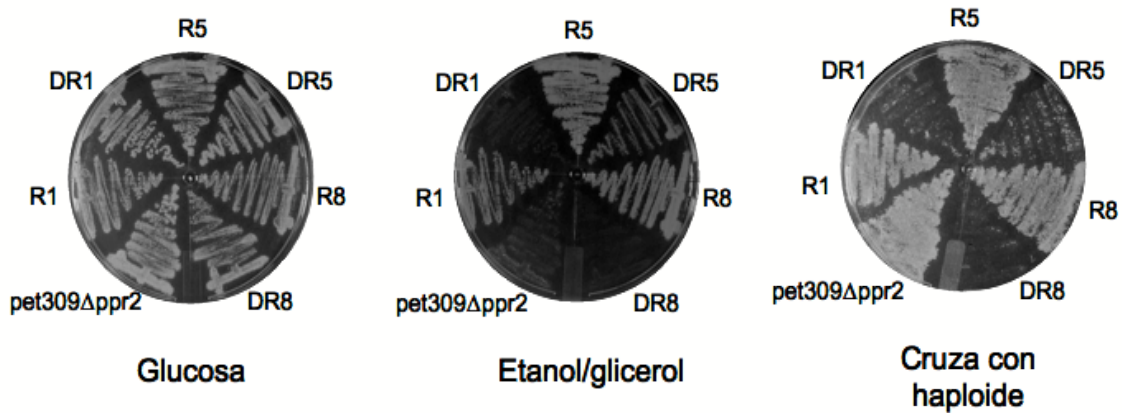


**Figura 27.** Las tres supresoras son capaces de respirar con DNAm<sub>t</sub> silvestre. Estriado de diferentes colonias de las supresoras, a las cuales se les sustituyó su DNAm<sub>t</sub> por DNAm<sub>t</sub> silvestre. Todas las cepas se crecieron a 30 °C por seis días. Los dos sectores de la caja inferior derecha no recibieron DNAm<sub>t</sub> nuevo por lo tanto no crecieron en medio respiratorio.

Sabemos que la mutación que provocó el fenotipo supresor es debido a un gen nuclear. Para saber si este gen es recesivo o dominante se generaron diploides de las supresoras. Las diploides generadas nos permitirán conocer si la mutación (el gen X) es recesiva o dominante. Si la diploide es capaz de respirar entonces el gen X es dominante, si la diploide no puede respirar entonces el gen X es recesivo. Para generar las diploides, las supresoras se aparearon a la cepa madre a la cual previamente se le eliminó el DNA mitocondrial para que la supresora compensara esta carencia y sólo este presente la dosis doble cromosomal. Se comprobó que las diploides fueran diploides apareándolas con una cepa haploide, en este caso las diploides son incapaces de cruzarse, sólo se aparean las supresoras haploides como se muestra en la figura 28.

Observamos que las diploides  $\Delta$ ppr2-R1 (DR1) y  $\Delta$ ppr2-R8 (DR8), no son capaces de respirar en medio no fermentativo, lo que indica que estas supresoras son recesivas. Por otro lado, la diploide  $\Delta$ ppr2-R5 (DR5) es capaz de respirar en medio con etanol/glicerol, lo que prueba que esta supresora es dominante (Figura 28).

En resumen tenemos dos supresoras recesivas ( $\Delta$ ppr2-R1 y  $\Delta$ ppr2-R8) y una supresora dominante  $\Delta$ ppr2-R5.



**Figura 28.** Las supresoras  $\Delta$ appr2-R1 y  $\Delta$ appr2-R8 son recesivas, mientras que  $\Delta$ appr2-R5 es dominante. Estriado de diploides en medio rico (glucosa), medio respiratorio (etanol/glicerol) y cruza con la cepa haploide. Todas las cepas se crecieron a 30°C por seis días. Para simplicidad del esquema, R1 =  $\Delta$ appr2-R1, R5 =  $\Delta$ appr2-R5 y R8 =  $\Delta$ appr2-R8 son las cepas haploides, DR1 =  $\Delta$ appr2-R1, DR5 =  $\Delta$ appr2-R1 y DR8 =  $\Delta$ appr2-R8 son las cepas diploides.

En colaboración con el Dr. Thomas Fox de la Universidad de Cornell, se mandaron a secuenciar el genoma de las tres supresoras y estamos en espera de obtener los resultados. En los tres casos esperamos obtener la secuencia de un gen nuclear que este involucrado ya sea en la traducción o en la transcripción mitocondrial.

## DISCUSIÓN

### **1. Relevancia de las proteínas PPR.**

Las proteínas PPR son consideradas factores que actúan en trans reconociendo un RNA blanco y regulando su expresión, ya sea en la mitocondria o en cloroplasto. Participan en la traducción, transcripción, edición y estabilización del RNA (Schimitz-Linneuber y Small, 2008), sin embargo, el mecanismo de acción no es claro. Estas proteínas tienen un papel fisiológico importante, ya que participan en procesos como la respiración, fotosíntesis, germinación, desarrollo de semillas y adaptación a estrés ambiental (Raynaud y col. 2007; Zsigmond y col. 2008; Gutierrez-Marcos y col. 2007; Gothandam y col. 2005). Se propone que estas proteínas unen RNA de cadena lineal de manera secuencia específica (Prikril y col. 2011; Small and Peeters, 2000), sin embargo no se sabe cómo llevan a cabo el reconocimiento del RNA.

Las proteínas PPR se encuentran en todos los eucariotes estudiados, pero su número es reducido en animales: en *Trypanosoma brucei* hay ocho proteínas PPR y en humano sólo se han reportado siete (Pusnik y col. 2007, Lightowlers y Chrzanowska- Lightowlers, 2008; Davies y col. 2009). Por el contrario, en plantas la familia de proteínas PPR está ampliamente expandida, con más de 450 miembros en *Arabidopsis thaliana* y 650 en arroz (Lurin y col. 2004).

En levadura, ya se reportaron cinco activadores traduccionales mitocondriales que son proteínas PPR: Aep1, Aep2, Cbp1, Pet111 y Pet309. En este trabajo nos enfocamos a estudiar el papel de los dominios PPR de Pet309 sobre la activación traduccional del mRNA de *COX1*. En plantas las proteínas PPR no sólo contienen estos dominios estructurales, por lo regular van acompañados de otros motivos localizados en el extremo carboxilo terminal: E y DYW. Los motivos E parecen ser requeridos para la edición de RNA (Zehrmann y col. 2011) y el subgrupo DYW se ha implicado en el reclutamiento de factores

catalíticos y los dominios PPR sólo dan la especificidad por el RNA (Saha y *col.* 2007).

Las últimas predicciones bioinformáticas sugieren que Pet309 contiene alrededor de 22 motivos PPR a lo largo de su estructura (Lipinski y *col.* 2011), lo que facilita su estudio y todos los datos arrojados de esta proteína son evidencia directa de la función de los motivos PPR. Esto hace de Pet309 un buen modelo para estudiar detalladamente estos motivos estructurales.

## ***2. Los motivos PPR centrales participan en la traducción del mRNA de COX1 pero no en su acumulación.***

Al usar a la levadura como modelo nos permitió hacer disecciones sencillas de la función de los motivos PPR de Pet309, no sólo eliminando los 12 motivos PPR fuertemente predichos, sino también haciendo mutantes puntuales de aminoácidos básicos. Los resultados obtenidos indicaron claramente que el inicio de la traducción y la acumulación del mRNA de *COX1* son funciones independientes. Los datos muestran que la eliminación de 12 motivos PPR, lo cual representa más de un tercio de la proteína (420 aminoácidos de 965) afectó dramáticamente la actividad traduccional de Pet309 sobre el mRNA de *COX1*, sin afectar de manera negativa la acumulación del mismo. Se propone que la región C-terminal de Pet309 es la involucrada en la acumulación del mRNA de *COX1* (Zamudio-Ochoa, datos sin publicar) y en la mutante Pet309 $\Delta$ 12ppr se conservó intacta la región C-terminal, por ello seguimos viendo acumulación en los niveles del RNA de *COX1*. Estos datos no son excepcionales para Pet309, se han reportado otras proteínas PPR (CRP1, HCF152 y PPR38) que funcionan como barrera para proteger de exonucleasas a su RNA específico, ya que protegen los nucleótidos que son reconocidos por las exonucleasas reflejándose esta función como estabilidad del RNA (Barkan y *col.* 1994; Meierhoff y *col.* 2003; Hattori y Sugita, 2009).

Datos previos de proteínas PPR en plantas sugieren que los dominios E y DYW localizados en el extremo carboxilo terminal podrían estar involucrados en

el reclutamiento de factores con actividad catalítica (Saha y col. 2007). Las proteínas Crr4 y Crr21 de *A. thaliana*, participan en la edición de RNA de cloroplasto. Ambas proteínas contienen en su extremo C-terminal motivos E además de motivos PPR. Los motivos E de estas proteínas se intercambiaron entre sí y afectando la función de las proteínas, pero cuando se eliminaron los motivos, la función ya no se conservó (Okuda y col. 2007).

Pet309 no contiene ninguno de estos dominios, sin embargo datos experimentales de nuestro laboratorio sugieren que Pet309 tiene tres regiones bien definidas. Creemos que los dominios PPR centrales reconocen el mRNA de *COX1* y se unen a él, la región N-terminal reconoce al ribosoma para activar la traducción del mRNA de *COX1* y la porción C-terminal da acumulación o incrementa la expresión del mRNA. Cuando realizamos ensayos de IP-RNA en una cepa Pet309 $\Delta$ C-end observamos que no se afecta la unión con el RNA. (Tavares-Carreón y col. 2008; Zamudio-Ochoa, datos no publicados). A pesar de estos datos y de que Pet309 está compuesta casi en su totalidad de motivos PPR, no descartamos la posibilidad de que todas las regiones propuestas para Pet309 sean capaces de unir RNA. Sin embargo proponemos que la región central de Pet309 es la que determina la unión o afinidad por el mRNA de *COX1*.

Con este panorama consideramos que Pet309 es multifuncional, y que cada función está bien definida en las regiones de la proteína. Por ello creemos que cuando Pet309 carece de los 12 dominios PPR centrales se afecta el reconocimiento del mRNA de *COX1* pero al conservar la región C-terminal está sigue acumulando el mRNA.

### **3. Pet309 interacciona con el mRNA de COX1.**

Nuestros estudios demuestran una interacción *in vivo* de Pet309 con su RNA específico. Una ventaja de este sistema es que Pet309 reconoce su sustrato endógeno en condiciones naturales dentro de la mitocondria, por lo que pudimos analizar cómo se podría afectar dicha interacción mediante otros factores y condiciones en la mitocondria. Los primeros datos que sugerían que

Pet309 podía estar asociándose con el RNA de *COX1* eran genéticos: Por medio de supresoras de una cepa  $\Delta pet309$  se determinó que Pet309 podría estar interaccionando con el extremo 5'-UTR, ya que estas supresoras sustituyeron el extremo 5'-UTR del RNA de *COX1* por el de citocromo *b* ó *COX3*. Ahora este mRNA fue traducido con ayuda de los activadores de citocromo *b* ó *COX3*, ya que *pet309* no estaba presente (Manthey y McEwen, 1995). Esta hipótesis fue corroborada con ARG8<sup>m</sup>, donde se vió que al sustituir el 5'-UTR de *COX1* por el de *COX2*, la síntesis de ARG8<sup>m</sup> dejó de depender de Pet309 (Perez-Martinez. 2009).

Previamente se demostró que Pet54 (activador traduccional de *COX3*) interacciona *in vitro* con el mRNA de *COX3* y a diferencia de Pet309, Pet54 contiene motivos de unión a RNA catalogados como RRM (RNA recognition motifs) los cuales no son tan específicos y están compuestos en su mayoría de hojas  $\beta$  plegadas que generan una estructura globular (Kaspar y col. 2008). Nuestros resultados indicaron por primera vez que un activador traduccional, en este caso Pet309 interacciona específicamente con su RNA blanco *in vivo* al inmunoprecipitar a Pet309 y junto con esta proteína coinmunoprecipitar el mRNA de *COX1*.

A pesar de que en algunos experimentos observamos que Pet309 inmunoprecipita con una eficiencia de casi el 100 %, no lográbamos coinmunoprecipitar con el mismo porcentaje el mRNA de *COX1* (Figura 17 y 21). Este dato puede indicar que la relación presente en la mitocondria de activador traduccional-mRNA mitocondrial no es equimolar, siempre hay un exceso de mRNA de *COX1*. Tal vez por eso, es que observamos que cuando sobreexpresamos a Pet309 se acumula más mRNA de *COX1*, porque Pet309 esta uniendo más RNAs que antes estaban libres y eran susceptibles a degradación. Se ha reportado que los activadores traduccionales se encuentran en bajas concentraciones dentro de la mitocondria (Fox, 1996b), tal vez como un mecanismo que regula la expresión de los genes mitocondriales en respuesta a las necesidades bioenergéticas y la disponibilidad de fuentes de energía.

Debido a que la síntesis de las subunidades codificadas en el DNAm<sup>t</sup> se lleva a cabo por los ribosomas que están asociados a la membrana, decidimos inhibir al ribosoma mitocondrial para ver si se afecta la interacción de Pet309 con el mRNA de *COX1*. Los datos indicaron que al inhibir la función del ribosoma mitocondrial, Pet309 conservó la interacción. Lo cual sugiere que la asociación de Pet309 con el mRNA de *COX1* es independiente de la actividad ribosomal. Creemos que la actividad de los ribosomas no influye sobre la interacción de Pet309 con el mRNA de *COX1*; ya que la porción N-terminal de Pet309 es la responsable de la asociación con el ribosoma más no con el mRNA de *COX1* (Bauerschitt y col. 2010; Zamudio-Ochoa, datos no publicados).

Debido a la ausencia de estructura cristalográfica de las proteínas PPR se generó un modelo de la estructura de 6 dominios PPR centrales. Este modelo nos ayudó a tener una visión general del arreglo de los aminoácidos básicos localizados en la cavidad, con el objetivo de hacer mutagénesis dirigida. Detectamos un par de residuos básicos mirando hacia el interior de la cavidad, los cuales se cambiaron por alaninas, generando mutantes sencilla o dobles. Observamos que al cambiar los residuos básicos del tercer PPR se afectaba considerablemente la función de Pet309. Esto apoya la hipótesis de que los aminoácidos básicos localizados en el túnel de la estructura generada por los dominios PPR son esenciales para la interacción o reconocimiento del ácido nucleico. Interesantemente, los residuos básicos del primer y segundo PPR no tuvieron efecto sobre la traducción. Estos datos pueden explicarse al analizar con detalle los residuos que rodean a los aminoácidos mutagenizados y observamos la presencia de residuos aromáticos como tirosinas. Estos residuos aromáticos pueden estar involucrados en interacciones tipo  $\pi$  con las bases nitrogenadas del ácido nucleico, de esta manera compensan la ausencia de los aminoácidos básicos y por lo tanto no tenemos fenotipo de estas mutantes. Se ha observado en estructuras cristalográficas de proteínas pumilio (las cuales funcionan como reguladores traduccionales de mRNA específicos al unirse a la porción 3'-UTR) con el RNA asociado, que los fosfatos del RNA están mirando

hacia el exterior (Lu y Hall, 2011). Sin embargo, no podemos afirmar que suceda lo mismo para las proteínas PPR.

Este tipo de interacción proteína-ácido nucleico no es exclusivo para la familia de proteínas PPR, también se han reportado interacciones tipo  $\pi$  para la familia de proteínas pumilio, y para la proteína mTERF, la cual es un factor de terminación transcripcional mitocondrial. Se han corroborado por estructuras cristalográfica para ambas proteínas uniéndose a su RNA o DNA blanco, la presencia de interacciones tipo  $\pi$  (Miller y col. 2008; Yakubovskaya y col. 2010). Con esto resumimos que los dominios PPR podrían interactuar con su RNA blanco a través de fuerzas electrostáticas e interacciones tipo  $\pi$ .

Posteriormente se generaron mutantes de Pet309 en las cuales se eliminó uno a uno los dominios PPR, observando que ninguna de estas mutantes logró respirar en un medio a base de etanol/glicerol. Confirmamos que este fenotipo se debía a una falla en la traducción (Tavares-Carreón y col. 2008) cuando usamos el reportero de la traducción *cox1:: $\Delta$ ARG8m* y no logramos rescatar el crecimiento en medio carente de arginina. Esto implica que hay una dependencia entre sí de todos los motivos PPR para inducir la síntesis de Cox1, dato que no se había demostrado antes para proteínas PPR.

Se sugiere que la superficie formada por el conjunto de motivos PPR crea una zona electrostática que recluta a otras proteínas que realizarán la función catalítica, y la región de la cavidad tiene como función mantener la interacción con el RNA (Delannoy y col. 2007). Es posible que al eliminar un solo motivo PPR no se altere la unión con el mRNA de *COX1* porque están presentes los otros motivos PPR. Sin embargo, puede afectarse la superficie que generan el conjunto de motivos PPR y por lo tanto el reclutamiento de los posibles factores que ayuden a que se traduzca el mRNA de *COX1*. Por ello es que sugerimos que la dependencia dada entre todos los motivos PPR es para estructurar una superficie que sea capaz de atraer otras proteínas y que ayuden a promover la traducción del mRNA de *COX1*. Con ayuda de las supresoras esperamos confirmar esta hipótesis, ya que si eliminamos un solo dominio PPR se abate la traducción sin que se afecte la interacción por el mRNA de *COX1*.

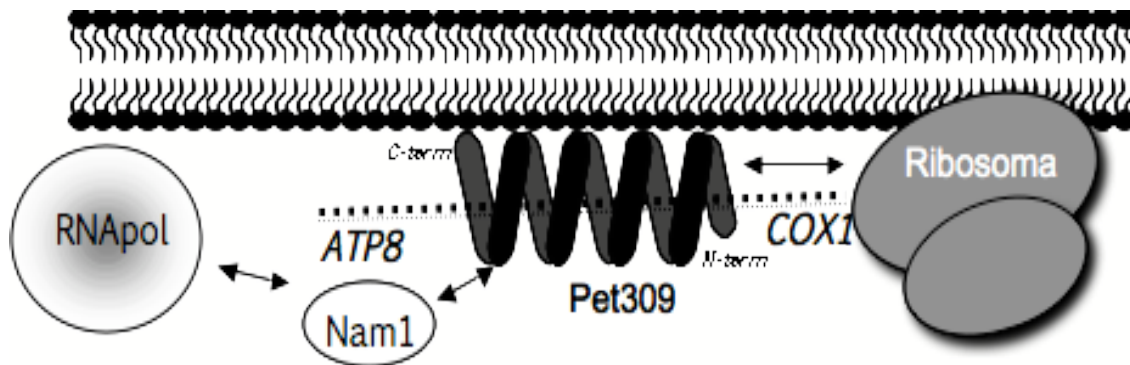


#### **4. *Pet309* interacciona con el transcrito *COX1-ATP8*.**

Interesantemente, cuando coimmunoprecipitamos el mRNA de *COX1* también logramos detectar el mRNA de *ATP8*, gen codificado río abajo de *COX1*. Los datos indican que *Pet309* interacciona con el policistrón antes de que éste sea procesado y se escinda a *COX1* del resto de los genes (Figuras 10 y 16). Manthey y McEwen (1995) observaron que la traducción del resto de los genes codificados río bajo de *COX1* son independientes de *Pet309*. A la fecha no se ha descrito un activador traduccional para *ATP8* por lo que proponemos que *Pet309* ayuda indirectamente a que el mRNA de *ATP8* se acerque a la membrana interna mitocondrial donde también están localizados los ribosomas mitocondriales.

Nuestros resultados sugieren que *Pet309* al estar asociándose al transcrito *COX1-ATP6-ATP8*, no sólo induce la traducción sino también de manera indirecta puede estar vinculando la transcripción. De esta manera, mientras se va transcribiendo el policistrón, *Pet309* se une al ribosoma y promueve su traducción.

Un reporte previo indica que *Pet309* interacciona con Nam1 (Naithani y col. 2003) proteína que ya se ha demostrado acopla la transcripción con la traducción al interaccionar con la región N-terminal de la RNA polimerasa mitocondrial (Rodeheffer y col. 2001; Wallis y col. 1994). Un trabajo reciente demostró por estudios genéticos y bioquímicos que la RNAPol mitocondrial interacciona físicamente con *Pet309* y con otras proteínas que previamente se habían sugerido ser parte del aparato transcripcional (Harkov y col. 2009). Estos datos nos permiten elaborar una hipótesis en la cual *Pet309* puede estar funcionando como un puente entre la transcripción y la traducción (Figura 29). Sin embargo, aún no tenemos datos para corroborar esta hipótesis.



**Figura 29.** Pet309 podría acoplar la traducción con la transcripción. Pet309 al interactuar con el poliestrón *COX1-ATP8* y al mismo tiempo asociarse con el ribosoma activa la traducción. Sin embargo, también se ha detectado asociación de Pet309 con Nam1 y con la RNAPol, la cual vincula la transcripción con la traducción al interactuar con el N-terminal de la RNAPol. De esta manera Pet309 se propone forma un puente que acopla la traducción con la transcripción.

**5. La región que reconoce Pet309 del 5'-UTR del mRNA de *COX1* forma una estructura tipo tallo-asa.**

Para averiguar si la región del extremo 5'-UTR del mRNA de *COX1* que reconoce Pet309 forma una estructura secundaria, se analizó toda la secuencia del extremo 5'-UTR de *COX1* con el programa DINAfold (Markham y Zuker. 2005). Se usaron parámetros estándar y una temperatura de 30 °C, con lo que se obtuvo una estructura tallo-asa de la región reconocida por Pet309 (Figura 28). La estructura obtenida se corroboró al usar otro software como mFold (Zuker M. 2003), y se observó que la estructura tipo tallo-asa se conservaba. Estos datos se han observado para la proteína PPR10 de planta, donde se ha logrado identificar que la región que reconoce en su RNA blanco forma una estructura secundaria tipo tallo-asa (Prikryl y col. 2011).



octanucleotídica es traducido normalmente *in vivo* y 2) el octanucleótido está a una distancia considerablemente alejada del codón de inicio (Costanzo y Fox, 1988). La función de esta secuencia se estudió en el gen *COX3* (Costanzo y Fox, 1990) pero para *COX1* no se sabe si es funcional.

Dado que es dudosa la función del octanucleótido, se proponen varias alternativas para elucidar como se da la traducción mitocondrial. 1) los activadores traduccionales pueden sustituir la carencia del elemento Shine-Dalgarno y 2) pueden existir algunas proteínas ribosomales que jueguen un papel importante en el reconocimiento del mRNA y que son independientes de la secuencia octanucleotídica.

Se ha observado que los extremos 5'-UTR de mRNA de bacterias como cloroplasto que carecen de secuencias Shine-Dalgarno son menos estructurados en comparación con los 5'-UTR que sí tienen elementos Shine-Dalgarno. Sugiriendo que la accesibilidad del AUG por el ribosoma es crítico (Scharff y Bock, datos sin publicar). Por ello, se propone la presencia de activadores traduccionales, para hacer más accesible el reclutamiento del ribosoma hacia el mRNA que será traducido.

##### ***5. Pet309 y Mss51 pueden estar trabajando en conjunto para activar la traducción del mRNA de COX1.***

Mss51 es una proteína que también está íntimamente relacionada con la expresión de la proteína Cox1, ya que también es un activador traduccional específico para *COX1* igual que Pet309. La información sobre como trabajan estas proteínas en la síntesis de *COX1* es escasa, sólo se sabe que tanto Mss51 como Pet309 reconocen el extremo 5'-UTR del mRNA de *COX1* (Perez-Martinez y col. 2003 y 2009). En el laboratorio se ha tratado intensamente de detectar si Pet309 y Mss51 interaccionan físicamente. Se han hecho varios experimentos de inmunoprecipitaciones con y sin entrecruzadores, por geles nativos azules y ensayos de doble híbrido; pero los datos siempre han sido negativos (Shingu-Vazquez y Mayorga-Juarez, datos no publicados). Esto puede indicar que no hay

interacción entre estas proteínas o que posiblemente la interacción es transitoria, lo que causa que no se logre detectar.

Por lo tanto, quisimos averiguar si Mss51 es capaz de interaccionar físicamente con el mRNA de *COX1*, pero cuando inmunoprecipitamos a Mss51, no logramos tener éxito en la detección por RT-PCR del RNA de *COX1*. Tenemos dos posibles respuestas para explicar estos datos, a) Mss51 no se le han detectado dominios de unión a RNA, b) bajo nuestras condiciones no logramos coinmunoprecipitar el RNA de *COX1*. Sin embargo, hay un reporte en el cual se detectó por triple híbrido que Mss51 interacciona con el RNA de *COX1* y lograron determinar que la posición nucleotídica del RNA de *COX1* que reconoce Mss51 es de -245 a +23 (Zambrano y *col.* 2007). Estos datos tiene un rango de incertidumbre, ya que en los experimentos para detectar la interacción usaron sólo la porción N-terminal de Mss51 (177 aminoácidos de 446 que es el tamaño total de Mss51) y mostró asociación de aproximadamente 270 nucleótidos, que es una porción muy grande. Por lo que la interacción de Mss51 con el mRNA de *COX1* sigue abierta a más exploraciones.

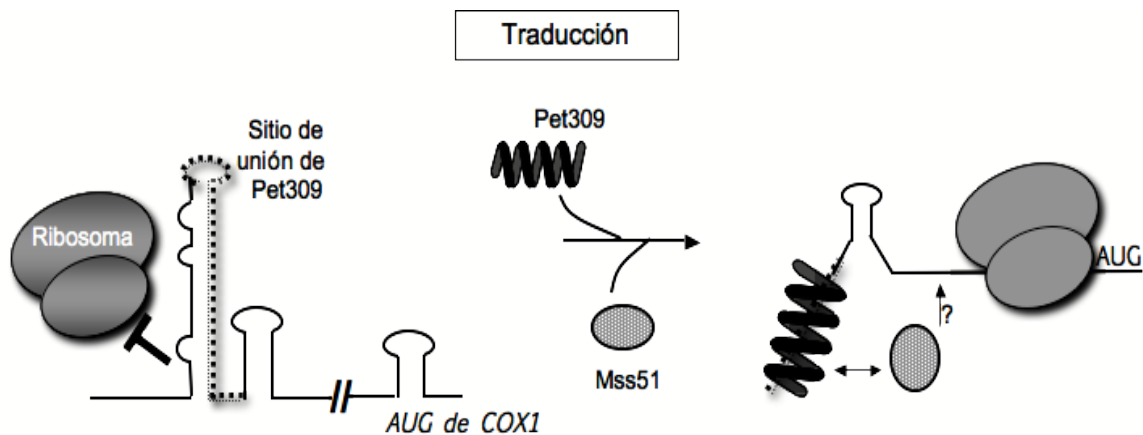
Para determinar si Mss51 ayuda a Pet309 en el reconocimiento del mRNA de *COX1*, se construyó la mutante nula de *mss51* y realizamos inmunoprecipitaciones de Pet309 para tratar de estudiar si la unión de Pet309 al RNA depende de Mss51. Para nuestro asombro Pet309 ya no inmunoprecipitó en cepas  $\Delta mss51$ . Es posible que la ausencia de Mss51 provocó un cambio conformacional de Pet309, de tal manera que el epítipo HA fusionado al C-terminal de Pet309 quedará escondido y por lo tanto la inmunoprecipitación resultará negativa. Estos datos sugieren que de alguna manera Mss51 le puede proporcionar a Pet309 algún tipo de modificación estructural que podría ser mediada directamente por Mss51 ó a través del RNA de *COX1*.

Hay que recordar que Mss51 no sólo participa como activador traduccional también interacciona con la proteína Cox1 recién sintetizada para ayudar a su ensamblaje (Perez-Martinez y *col.* 2003 y 2009). Proponemos que Pet309 es la primera proteína que reconoce el mRNA de *COX1* y lo estabiliza para que posteriormente sea traducido. Luego debe de entrar Mss51 a este

complejo para otorgarle a Pet309 una conformación más eficiente para llevar a cabo estas funciones.

Nuestros datos indican que la zona que reconoce Pet309 y que forma una estructura de tallo-asa se encuentra a 90 nucleótidos río arriba del codón de inicio. A pesar de ser sólo modelos, ya se han reportado este tipo de estructuras en otros 5'-UTR de plantas. Se determinó que la proteína PPR10 también reconoce una estructura tipo tallo-asa, la cual está localizada a 20 nucleótidos río arriba del AUG del gen *atpH*. Esta porción es remodelada por PPR10 para posteriormente atraer al ribosoma y sintetizar *atpH* (Prikryl y col. 2011). Es posible que en estos 90 nucleótidos existentes entre el tallo-asa y el AUG se posicionen Mss51 y junto con Pet309 faciliten el reclutamiento del ribosoma para traducir el mRNA de *COX1*.

Proponemos que para que se inicie la síntesis de Cox1 se crea una cascada de eventos en la mitocondria en la cual: 1) Pet309 reconoce la estructura tallo-asa localizada a -90 nucleótidos río arriba del AUG de *COX1*, 2) de alguna manera Pet309 provoca cambios estructurales que facilitan la entrada del ribosoma, 3) el reconocimiento del ribosoma por el RNA de *COX1* puede ser incrementado cuando Mss51 está presente, además de que puede estar posicionándose en -90 nucleótidos río arriba del AUG (Figura 31). De esta manera, es más fácil para el ribosoma reconocer el sitio correcto de inicio de la traducción para el mRNA de *COX1*. Adicionalmente, proponemos que Mss51 se coloca río abajo de Pet309 y entra después de ella. Ya que se ha observado que en mutantes nulas de *mss51* se genera un polipéptido llamado mp15 el cual es generado por una mala traducción del mRNA de *COX1*. Esto significa que si no hay Mss51 se produce una traducción defectuosa, por lo que Mss51 también podría ayudar a que el ribosoma se coloque en el sitio correcto de inicio de la traducción (Zambrano y col. 2007).



**Figura 31.** Modelo de acción de Pet309 como activador traduccional. El 5'-UTR de COX1 presenta estructuras secundarias, las cuales bloquean la entrada del ribosoma. Una vez importada Pet309 a la mitocondria ésta reconoce el stem-loop generado, de alguna manera lo desestabiliza y sirve de punto de anclaje para el ribosoma mitocondrial. Es posible que Mss51 ayude a que la interacción entre Pet309 y el mRNA sea estable. Por otro lado, Mss51 de alguna manera reconoce el mRNA de COX1 indicado con (?) y en conjunto con Pet309 se reclute al ribosoma y lo posicionen en al AUG correcto para iniciar la traducción.

## **6. Las supresoras reestablecen la respiración.**

Los datos obtenidos avalan cómo Pet309 puede estar activando la traducción, sin embargo aún quedan muchas interrogantes por responder. Hemos observado que al eliminar un sólo dominio PPR de Pet309 se afecta dramáticamente la respiración de la levadura ya que no se sintetiza Cox1 a pesar de conservar la interacción con el mRNA de COX1. La pregunta es por qué observamos este fenotipo y para resolver esta incógnita obtuvimos supresoras que restauraron la capacidad respiratoria.

Se ha propuesto que los dominios PPR no tienen actividad catalítica, por lo que estos motivos funcionan como adaptadores que reconocen específicamente

a su RNA mensajero blanco. También se sugiere que la superficie generada por los motivos PPR es blanco de proteínas, las cuales llevarían a cabo la función catalítica, como traducir, editar, splicing, etc. (Delannoy y col. 2007).

Estos antecedentes sustentan la posibilidad de que otra(s) proteína(s) podría estar interaccionando con Pet309 y que es necesaria para activar la traducción del mRNA de *COX1*. Además se ha observado que Pet309 se localiza dentro de grandes complejos proteínicos en la mitocondria (Krause y col. 2004).

Con la ayuda de las supresoras podremos determinar si falta alguna(s) proteína(s) que estén interaccionando con Pet309, las cuales no precisamente tienen que estar mediando la interacción entre Pet309 y el mRNA de *COX1*, pero que se necesiten para mantener una unión con el ribosoma, y por lo tanto necesarias para activar la traducción del mensajero mitocondrial *COX1*. Estas supresoras nos podrían dar información de otras proteínas que se necesiten para activar la traducción de *COX1* y que antes no se tenían consideradas.

Los datos que tenemos de las supresoras, indican que son nucleares, esto da una gran ventaja sobre otras supresoras encontradas para mutantes nulas de *pet309*, donde se observaban cambios en el DNAm (Manthey y McEwen, 1995). Ahora, no sólo tenemos supresoras de Pet309, sino supresoras específicas para los dominios PPR. Esto ayudará a entender mejor el mecanismo de acción de las proteínas PPR, y tratar de elucidar el mecanismo traduccional en la mitocondria.

Las supresoras que estamos estudiando son específicas para el segundo PPR y no pueden ser compensadas por otros PPR aledaños (Figura 28). Esto sugiere que el gen X que mutó sólo reconoce la “ausencia” de la superficie generada por el PPR2. Lo cual es interesante, ya que nos podría estar hablando de que el gen X codifica para una proteína relacionada con el reconocimiento de Pet309 .

También existe la posibilidad de que las supresoras nos ayuden a validar el modelo de la figura 29, en el cual proponemos que Pet309 funciona como



intermediario entre la transcripción y la traducción. Si encontramos que la proteína X es Nam1 u otra involucrada en la transcripción.

En general, lo que esperamos de estas supresoras es que nos proporcionen información acerca de cómo se activa la traducción mitocondrial. Es posible que encontremos proteínas que estén mediando la interacción entre Pet309 y la traducción. En *Chlamydomonas* existen datos genéticos que apoyan esta hipótesis. Los mRNA *petA* y *psbD* son reconocidos por proteínas PPR las cuales se asocian en el extremo 5' del mRNA para estabilizarlo. Estas proteínas a su vez, interactúan con una segunda proteína que une porciones de RNA adyacentes e incrementan la traducción de la región codificante (Boulouis y col. 2011; Schwarz y col. 2007). Con este panorama, proponemos que existen otras proteínas que reconocen la superficie generada por los dominios PPR de Pet309 y que ayudan a incrementar la eficiencia de la traducción del mRNA de *COX1* (Figura 29). Sin embargo no descartamos la posibilidad de que la proteína X, sea capaz de adaptarse a otra zona de la porción convexa de los PPR de Pet309 o que provoque un cambio conformacional en los dominios PPR que se refleje en la unión con el mRNA de *COX1*.

## CONCLUSIONES

### Parte I. Interacción RNA-Pet309

1. Los dominios PPR centrales de Pet309 se requieren para traducir el mRNA de *COX1* pero no para su acumulación.
2. Pet309 interacciona con el mRNA de *COX1* antes de que se procese el transcrito primario y esta interacción es independiente del ribosoma activo.
3. Los 12 dominios PPR centrales interaccionan directamente con el 5'-UTR del mRNA de *COX1*.
4. Nuestros datos preliminares sugieren que la interacción entre los dominios PPR de Pet309 y el 5'-UTR del mRNA podría estar mediada por fuerzas electrostáticas y de tipo  $\pi$ .
5. El sitio de unión de Pet309 está localizada aproximadamente entre -140 a -90 nt del codón de inicio de la región del 5'-URT del mRNA de *COX1*.
6. La región -90 a -140 del 5'-UTR posiblemente forma una estructura tipo tallo-asa que bloquearía la entrada del ribosoma al mRNA de *COX1*

### Parte II. Búsqueda de supresoras

1. Se obtuvieron supresoras que recuperan el defecto respiratorio provocado por *pet309 $\Delta$ ppr2*.
2. El fenotipo supresor no radica en alguna mutación dentro del gen *pet309 $\Delta$ ppr2*, se localiza en un gen nuclear.
3. Dos de las supresoras son dominantes mientras que una es recesiva.
4. Este fenotipo supresor es específico para *pet309 $\Delta$ ppr2* y ninguna otra delección compensa esta mutación.

## PERSPECTIVAS

### Parte I. Interacción RNA-Pet309

- Generar mutantes por biobalística de la región que se predice formaría una estructura tallo-asa del 5'-UTR donde se uniría Pet309, y hacer ensayos de IP-RNA, para corroborar la importancia de esta estructura secundaria en la traducción. Esto con la finalidad de corroborar la presencia y la importancia en la regulación de la traducción del mRNA de *COX1*.
- Hacer IP-RNA en cepas que tengan a Pet309- $\Delta$ *cox4* (carente de la subunidad 4 de la CcO) para descartar que Pet309 se afecta sólo cuando *mss51* esta eliminada y no por una falla en el ensamblaje del complejo CcO. Esto nos ayudaría analizar como influye Pet309 bajo un contexto en el cual el ensamblaje de Cox1 esta afectado.
- Generar mutantes de Nam1 y Rpo41 y realizar ensayos de inmunoprecitación de estas proteínas con Pet309. Lo cual nos ayudaría a validar (o no) el modelo propuesto para Pet309 como proteína que vincula la transcripción con la traducción.

### Parte II. Búsqueda de supresoras

- Una vez secuenciadas las supresoras se generarán las mutantes  $\Delta$ *genX*, y se verificará el fenotipo, para saber si afecta la respiración.
- Observar si el *genX* es específico o tiene efecto pleiotrópicos sobre la respiración, para ello se hará:
  - Western de proteínas mitocondriales y marcaje radioactivo de proteínas mitocondriales ivTL.
  - Espectro de citocromos.
- Localización de la proteína X. Determinar si es una proteína soluble o integral de membranal para conocer su colocación dentro de la mitocondria.

- Hacer una inmunoprecipitación de Pet309 con la proteína X, para estudiar si hay que interaccionan entre ellas y observar si estará afectada la interacción en *pet309Δppr2*.
- Por medio de centrifugación en gradientes de sacarosa determinar si la proteína X interacciona con el ribosoma y si está interacción depende de *pet309Δppr2*.
- Buscar otras supresoras de otras mutantes PPR, que nos arrojen diferente información sobre la función de Pet309 como proteína de andamiaje que recluta factores para activar la traducción.

## APÉNDICE 1

### Referencias.

- ♦ Akagi H., Nakamura A., Yokozeki-Misono Y., Inagaki A., Takahashi H., Mori K., and Fujimura T. 2004. Positional cloning of the rice *Rf-1* gene, a restorer of BT-type cytoplasmic male sterility that encodes a mitochondria-targeting PPR protein. *Theor Appl Genet.* 108: 1449-1457.
- ♦ Barrientos A., Barros M.H., Valnot I., Roting P., and Tzagoloff A. 2002. Cytochrome oxidase in health and disease. *Gene* 286: 53-63. Barrientos A., Korr D., and Tzagoloff A. 2002. Shy1p is necessary for full expression of mitochondrial COX1 in the yeast model of Leigh's syndrome. *EMBO* 21:43-52.
- ♦ Barkan A., Walker M., Nolasco M., and Johnson D. 1994. A nuclear mutation in maize blocks the processing and translation of several chloroplast mRNAs and provides evidence for the differential translation of alternative mRNA forms. *EMBO J.* 13: 3170-3181.
- ♦ Bauerschmitt H., Mick D. U., Deckers M., Vollmer C., Funes S., Kehrein K., Ott M., Rehling P., and Herrmann J. M. 2010. Ribosome-binding proteins Mdm38 and Mba1 display overlapping functions for regulation of mitochondrial translation. *Mol Biol Cell.* 21: 1937-1944.
- ♦ Beick S., Schimitz-Linneweber C., Williams-Carrier R., Jensen B. And Barkan A. 2008. The pentatricopeptide repeat protein PPR5 stabilizes a specific tRNA precursor in maize chloroplasts. *Mol Cell Biol.* 28 : 5337-5347.
- ♦ Bentolila S., Alfonso A. A., and Hanson M.R. 2002. A pentatricopeptide repeat-containing gene restores fertility to cytoplasmic male-sterile plants. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99: 10887-10892.
- ♦ Bonnefoy N., and Fox T. D. 2001. Genetics transformation of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Meth Cell Biol.* 65: 381-396.
- ♦ Brown N. G., Costanzo M. C., and Fox T. D. 1994. Interactions among three proteins that specifically activate translation of the mitochondria COX3 mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 14: 1045-1053.

- ♦ Cai W., Okuda K., Peng L., and Shikanai T. 2011. PROTON GRADIENT REGULATION 3 recognizes multiple targets with limited similarity and mediates translation and RNA stabilization in plastids. *Plant J.* 67: 318-327.
- ♦ Capaldi, R.A. 1990. Structure and functions of cytochrome *c* oxidase. *Annu. Rev. Biochem.* 1990. 59: 569-96.
- ♦ Coffin J.W., Dhillon R., Ritzel R., 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 mitochondrial encoded COX1 protein. *Curr Genet.* 32: 273-280.
- ♦ Costanzo M C., and Fox TD. 1988. Specific translational activation by nuclear gene products occurs in the 5' untranslated leader of a yeast mitochondrial mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 2677-2681.
- ♦ Costanzo M.C., and Fox T.D. 1990. Control of mitochondrial gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* 24: 91-113.
- ♦ Costanzo M.C., and Fox T.D. 1993. Suppression of a defect in the 5'-untranslated leader of the mitochondrial COX3 mRNA by a mutation affecting an mRNA – specific translational activator protein. *Mol Cell Biol.* 13: 4806-4813
- ♦ D'Andrea L.D., and Regan L. 2003. TRP proteins: the versatile helix. *TRENDS Biochem Sci.* 28: 655-662.
- ♦ Davies S.M., Rackham O., Shearwood A.M., Hamilton K.L., Narsai R., Whelan J., and Filipovska A. 2009. Pentatricopeptide repeat domain protein 3 associates with the mitochondrial small ribosomal subunit and regulates translation. *FEBS Lett.* 583: 1853-1858.
- ♦ Das A.K., Cohen P.T.W., and Barford D. 1998. The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO J.* 17: 1192-1199.
- ♦ Decoster E. Simon M. Hatat D. and Faye G. (1990) The MSS51 gene product is required for the translation of the COX1 mRNA in yeast mitochondria. *Mol. Gen. Genet.* 224:111-118.
- ♦ Delannoy E, Stanley WA, Bond CS, Small ID. 2007. Pentatricopeptide repeat (PPR) proteins as sequence-specificity factors in post-transcriptional processes in organelles. *Biochem Soc Trans.* 35:1643-7.

- ♦ Desloire S., Gherbi H., Laloui W., Marhadour S., Clouet V., Cattolico L., Falentin C., Giancola S., Renard M., Budar F., Small I., Caboche M., Delourme R., and Bendahmane A. 2003. Identification of the fertility restoration locus *Rfo* in radish as a member of the pentatricopeptide repeat protein family. *EMBO Rep.* 4: 588-594.
- ♦ Dieckmann C., and Staples R. 1994. Regulation of mitochondrial gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int Rev Cytol.* 152: 145-181.
- ♦ Diekert K., Kispal G., Guiard B., and Lill R. 1999. An internal targeting signal directing proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 11746-11751.
- ♦ Dowhan W, Bibus CR, and Schatz G. 1985. The cytoplasmically-made subunit IV is necessary for assembly of cytochrome c oxidase in yeast. *EMBO J.* 4: 179-184.
- ♦ Edwards T.A., Pyle S.E., Wharton R.P., and AggarwallA.K. 2001. Structure of pumilio reveals similarity between RNA and peptide binding motif. *Cell.* 105: 281-9
- ♦ Ellis T. P., Helfenbein K.G., Tzagaloff A., and Dieckmann C.L. 2004. Aep3p stabilizes the mitochondrial bicistronic mRNA encoding subunits 6 and 8 of the H<sup>+</sup>-translocating ATP synthase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Chem.* 279: 15728-15733
- ♦ Fiori A., Pérez-Martínez X., and Fox T.D. 2005. Overexpression of the COX2 translational activator, Pet112p, prevents translation of COX1 mRNA and cytochrome c oxidase assembly in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* 56: 1689-1704.
- ♦ Fox T. D. 1996. Genetics strategies for identification of mitochondrial translation factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* 264: 228-237.
- ♦ Fox T. D. (1996-a) Genetics in mitochondrial translation. Translational control. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 25:733-758.
- ♦ Fox T. D. (1996-b) Translational control of endogenous and recorded nuclear genes in yeast mitochondria: regulation and membrane targeting. *Experimentia (Basel).* 52:1130-1135.

- ♦ Fujiki Y., Hubbard A., Fowler S., and Lazarrow P. 1982. Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 93: 97-102.
- ♦ Gancedo, J. M. 1998. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 334–361.
- ♦ Glick B., and Pon L. 1995. Isolation of highly purified mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in enzymology.* 260: 213-223.
- ♦ Goffeau A., Barrell B. G., Bussey H., Davis R.W., Dujon B., Feldman H., Galibert F, Hoheisel J.D., Jacq C., Johnston M., Louis E.J., Mewes H.W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., Oliver S.G. 1996. Life with 6000 genes. *Science* 274, 546–552.
- ♦ Gothandam K M., Kim E S., Cho H., and Chung Y. 2005. OsPPR1, a pentatricopeptide repeat protein of rice is essential for the chloroplast biogenesis. *Plant Mol Biol.* 58: 421-433.
- ♦ Grivell L.A. 1995. Nucleo-mitochondrial interactions in mitochondrial gene expression. *Criti. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30: 121-164.
- ♦ Groves M.R., and Barford D. 1999. Topological characteristics of the helical repeat proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9:383-389.
- ♦ Gutiérrez-Marcos JF, Dal Prà M, Giulini A, Costa LM, Gavazzi G, Cordelier S, Sellam O, Tatout C, Paul W, Perez P, Dickinson HG, Consonni G. 2007. Empty pericarp4 encodes a mitochondrion-targeted pentatricopeptide repeat protein necessary for seed development and plant growth in maize. *Plant Cell.* 19:196-210.
- ♦ Haffter P., McMullin T.W., and Fox T.D. 1990. A genetic link between an mRNA-Specific translational activator and the translational system in yeast Mitochondria. *Genetics.* 152: 495-503.
- ♦ Haffter P., and Fox T.D. 1992. Suppression of carboxy-terminal truncation of the yeast mitochondrial mRNA-specific translational activator PET122 by mutations in two new genes, MRP17 and PET127. *Genetics.* 235:64-73.
- ♦ Hammani K., Okuda K., Tanz S.K., Chateigner-Boutin A.L., Shikanai T., Small I. 2009. A study of new Arabidopsis chloroplast RNA editing mutants reveals general features of editing factors and their target sites. *Plant Cell.* 21:3686-3699.



- ♦ Hammani K., des Francs-Small CC., Takenaka M, Tanz S.K., Okuda K., Shikanai T., Brennicke A., and Small I. 2011. The pentatricopeptide repeat protein OTP87 is essential for RNA editing of nad7 and atp1 transcripts in Arabidopsis mitochondria. *J Biol Chem.* 286:21361-21371.
- ♦ Hattori M., Miyake H., and Sugita M. 2007. A pentatricopeptide repeat protein is required for RNA processing of clpP Pre-mRNA in moss Chloroplasts. *J Biol Chem.* 282: 10773-10782.
- ♦ Hattori M., and Sugita M. 2009. A moss pentatricopeptide repeat protein binds to the 3' end of plastid clpP pre-mRNA and assists with mRNA maturation. *FEBS J.* 276:5860-5869.
- ♦ Hill J.E., Myers A.M., Koerner T.J. and Tzagoloff A. 1993. Yeast/E. coli shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast.* 163-167.
- ♦ Huber A.H., Nelson W.J., and Weis W.I. 1997. Three dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell.* 90: 871-882.
- ♦ Ito H., Fukuda Y., Murata K., and Kimura A. 1983. Transformation intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol.* 153: 163-168.
- ♦ Iwata S., Ostermeir C., Ludwig B and Michel H. 1995. Structure at 2.8 Å of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature.* 376: 660-669.
- ♦ Jones E., Pringle J. R., and Broach J. R. 1992. The molecular and cell biology of *Saccharomyces cerevisiae*, Vol 2. Gene Expression. Cold Spring Harbord Laboratory Press, Cold Spring Harbord N York. U.S.A.
- ♦ Kadenbach B, Huttemann M, Arnold S, Lee I, and Bender E. 2000. Mitochondrial energy metabolism is regulated via nuclear-coded subunits of cytochrome c oxidase. *Free Radic Biol Med.* 29: 211-221.
- ♦ Karpenahalli M.R, Lupas A. N. and Soding J. 2007. TPRpred: a tool for prediction TPR-PPR and SEL-1 repeats from protein sequence. *BMC Bioinformatics.* 8:2.
- ♦ Kaspar B. J., Bifano A.L and Caprara M.G. 2008. A shared RNA-binding site in the Pet54 protein is required for translational activation and group I intron splicing in yeast mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 36(9): 2958-2968.
- ♦ Kim, K., Oh J., Han D., Kim E.E., Lee B and Kim Y. 2006. Crystal structure of PilF: functional implication in the type 4 pilus biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Biophys Res Commun.* 340 (4): 1028-1038.

- ♦ Kotera E., Tasaka M., and Shikanai T. 2005. A pentatricopeptide repeat protein is essential for RNA editing in chloroplast. *Nature*. 433:326-330.
- ♦ Krause-Buchholz U., Barth K., Dombrowski C., and Rödel G. 2004. *Saccharomyces cerevisiae* translational activator Cbs2p is associated with mitochondrial ribosomes. *Curr Genet*. 46: 20-28.
- ♦ Krause-Buchholz U., Schöbel K., Lauffer S., and Rödel G. 2005. *Saccharomyces cerevisiae* translational activator Cbs1p is associated with translationally active mitochondrial ribosomes. *Biol Chem*. 386:407-415.
- ♦ Kühl I., Dujeancourt L., Gausne M., Hebert C.J. and Bonnefoy N. 2011. A genome wide study in fission yeast reveals nine PPR proteins that regulate mitochondrial gene expression. *Nucleic Acids Res*. 39 (18): 8029-8041.
- ♦ Lahmy S., Barnèche F., Derancourt J., Filipowicz W., Delseny M., and Echeverria M. 2000. A chloroplastic RNA-binding protein is a new member of the PPR family. *FEBS Letters*. 480:255-260.
- ♦ Lee C., Tibbetts A.S., Kramer G and Appling D. R. 2009. Yeast AEP3p is an accessory factor in initiation of mitochondrial translation. *J Biol Chem*. 284 (49): 34116-34125.
- ♦ Leister D and Herrmann J.M. 2007. *Mitochondria Practical Protocols*. Meth Mol Biol. Vol 372.
- ♦ Lightowlers R.N., and Chrzanowska-Lightowlers Z.M. 2008. PPR (pentatricopeptide repeat) proteins in mammals: important aids to mitochondrial gene expression. *Biochem J*. 416:e5-6.
- ♦ Lipinski K.A., Puchta O., Surendranath V., Kudla M., and Golik P. 2011. Revisiting the yeast PPR proteins--application of an Iterative Hidden Markov Model algorithm reveals new members of the rapidly evolving family. *Mol Biol Evol*. 28 (10): 2935-2948.
- ♦ Lu G., and Hall T. M. 2011. Alternate modes of cognate RNA recognition by human PUMILIO proteins. *Structure*. 19: 361-367
- ♦ Lurin C., Andrés C., Aubourg S., Bellaoui M., Bitton F., and Bruyere C. 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 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.

- ♦ Markham N. R., and Zuker M. 2005. DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction. Nucleic Acids Res. 33. W577-W581.
- ♦ Markov D.A., Savkina M., Anikin M., Del Campo M., Ecker K., Lamnowitz A. M., De Gnore J.P., and McAllister WT. 2009. Identification of proteins associated with the yeast mitochondrial RNA polymerase by tandem affinity purification. Yeast. 26: 423-440.
- ♦ Markwell M., Haas S., Bieber L., and Tolbert N. 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. Anal Biochem. 87: 206-210.
- ♦ McMullin T., 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.
- ♦ Messias A., and Sattlet M. 2004. Structural basis of single-stranded RNA recognition. 37: 279-287.
- ♦ Meierhoff K., Ferder S., Nakamura T., Bechtold N and Schuster G. 2003. HCF152, an Arabidopsis RNA binding pentatricopeptide repeat protein involved in the processing of chloroplast psbB-psbT-psbH-petB-petD RNAs. Plant Cell. 15 (6) 1480-1495.
- ♦ Mick D.U., Wagner K., van der Laan M., Frazier A.E., Perschil I., Pawlas M., Meyer H.E., Warscheid B., Rehling P. 2007. Shy1 couples Cox1 translational regulation to cytochrome c oxidase assembly. EMBO J. 26:4347-4358.
- ♦ Miller M.Y., Higgin J.J., and Tanaka Hall TM. 2008. Basis of altered RNA-binding specificity by PUF proteins revealed by crystal structures of yeast Puf4p. Nat Struct Mol Biol. 15: 397-402.
- ♦ Mingler M K., Hingst A M., Clement S L., Yu L E., Reifur L., and Koslowsky. 2006. Identification of pentatricopeptide repeat protein in *Trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol. 150:37-45
- ♦ 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 USA. 100: 605-610.

- ♦ Moreno J. I., Buie K. S., Price R.E., and Piva M.A. 2009 Ccm1p/Ygr150cp, a pentatricopeptide repeat protein, is essential to remove the fourth intron of both COB and COX1 pre-mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 55(4):475-84
- ♦ Mulero J., and Fox T D. 1993b. PET111 acts in the 5'-leader of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial COX2 mRNA to promote its translation. *Genetics*. 133: 509-516.
- ♦ Mulero J., and Fox T D. 1994. Reduced but accurate translation from a mutant AUA initiation codon in the mitochondrial COX3 mRNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*. 242: 383-390.
- ♦ 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.
- ♦ Nijtmans L G., Artal Sanz M., Bucko M., Farhoud M.H., Feenstra M., Hakkaart G.A., Zeviani M., and Grivell L A. 2001. Shy1p occurs in a high molecular weight complex and is required for efficient assembly of cytochrome c oxidase in yeast. *FEBS Lett*. 498: 46-51.
- ♦ Nouet C., Bourens M., Hlavacek O., Marsy S., Lemaire C and Dujardin G. 2007. Rmd9p Controls the Processing/Stability of Mitochondrial mRNAs and Its Overexpression Compensates for a Partial Deficiency of Oxa1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 175(3):1105-15
- ♦ Okuda K., Myouga F., Motohashi R., Shinozaki K., and Shikanai T. 2007. Conserved domain structure of pentatricopeptide repeat proteins involved in chloroplast RNA editing. *PNAS*. 104:8178-8183.
- ♦ Ostheimer G.J., Williams-Carrier R., Belcher S., Osborne E., Gierke J., Barkan A. 2003. Group II intron splicing factors derived by diversification of an ancient RNA-binding domain. *EMBO J*. 22:3919-29.
- ♦ Pérez-Martínez X., Broadley S A., and Fox, T D. 2003. Mss51 promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. *EMBO J*. 22: 5951-5961.

- ♦ Pierrel F., Bestwick M.L., Cobine P.A., Khalimonchuk O., Cricco J.A., Winge D.R. 2007. Coa1 links the Mss51 post-translational function to Cox1 cofactor insertion in cytochrome c oxidase assembly. *EMBO J.* 26(20):4335-4346.
- ♦ Prikryl J., Rojas M., Schuster G., and Barkan A. 2011. Mechanism of RNA stabilization and translational activation by a pentatricopeptide repeat protein. *Proc Natl Acad Sci.* 108:415-420.
- ♦ Pfalz J., Bayraktar O.A., Prikryl J., Barkan A. 2009. Site-specific binding of a PPR protein defines and stabilizes 5' and 3' mRNA termini in chloroplasts. *EMBO.* 28:2042-52.
- ♦ Puchta O., Lubas M., Lipinski K.A., Piatkowski J., Malecki M., and Golik P. 2010. DRM1 (CCM1/YGR150C) of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an RNA-Binding protein from the pentatriptide repeatfamily required for the maintenanceof the mitochondrial 15S ribosomal RNA. *Genetics.* 184:959-973.
- ♦ 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.
- ♦ Raynaud, C., Loiselay C., Wostrikoff K., Kuras R., Girard-Bascou J., Wollman F.A., and Choquet Y. 2007. Evidence for regulatory function of nucleus4 encoded factors on mRNA stabilization and translation in the chloroplast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:9093-8.
- ♦ Riistama S., Puustinen A., García-Horsman A., Iwata S., Michel H., and Wikström M. 1996. Channelling of dioxygen into the respiratory enzyme. *Biochim Biophys Acta.* 1275: 1-4.
- ♦ Robbins J.C., Heller W. P., and Hanson M.R. 2009. A comparative genomics approach identifies a PPR-DYW protein that is essential for C-to-U editing of the *Arabidopsis* chloroplast accD transcript. *RNA.* 15:1142-1153.
- ♦ Rodeheffer M.S., Boone B.E., Bryan A.C., Shadel G.S.2001. Nam1p, a protein involved in RNA processing and translation, is coupled to transcription through an interaction with yeast mitochondrial RNA polymerase. *J Biol Chem* 276:8616-22
- ♦ Saha D., Prasad A.M., and Srinivasan R. 2007. Pentatricopeptide repeat proteins and their emerging roles in plants *Plant Physiol Biochem.* 45:521-34.

- ♦ Sambrook J., and Russell D.W. 2001. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 3th Edition.
- ♦ Sanchirico M, E., Fox T. D and Mason T.L. 1998. Accumulation of mitochondrially synthesized *Saccharomyces cerevisiae* Cox2p and Cox3p depends on targeting information in untranslated portions of their mRNAs. *EMBO J.* 17(19): 5796-804.
- ♦ Schmitz-Linneweber C and Small I. 2008. Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. *Trends Plant Sci.* 13: 663-670
- ♦ 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.
- ♦ Schwede T. Kopp J., Guex N., and Peitsch M.C. 2003. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* 32: 3381-3385.
- ♦ Shingú-Vázquez M., Camacho-Villasana Y., Sandoval-Romero L., Butler C.A., Fox T.D, Pérez-Martínez X. 2010. The carboxyl-terminal end of Cox1 is required for feedback assembly regulation of Cox1 synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. 285:34382-34389.
- ♦ Sikorski R S., and Hieter P. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 122: 19-27.
- ♦ Small I.D., and Peeters N. 2002. The PPR motif – a motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem Sci.* 25: 46-47.
- ♦ Söding J., Biegert A., and Lupas .N. 2005. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res.* 33: W244-W248.
- ♦ Sohman D., Harás J.M., Schlünzen F., Wilson D.N. 2009. SnapShot: Antibiotic inhibition of protein synthesis I. *Cell.* 138: 1248-1248e1.
- ♦ 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.* 93: 5253-5257.
- ♦ Tang J., Kobayashi K., Suzuki M., Matsumoto S., Muranaka T. 2010. The mitochondrial PPR protein LOVASTATIN INSENSITIVE 1 plays regulatory

roles in cytosolic and plastidial isoprenoid biosynthesis through RNA editing. *Plant J.* 61(3):456-66

- ♦ Taanman J W., and Capaldi R A. 1993. Subunit VIa of yeast cytochrome c oxidase is not necessary for assembly of the enzyme complex but modulates the enzyme activity. Isolation and characterization of the nuclear-coded gene. *J Biol Chem* 268: 18754-18761.
- ♦ Tavares-Carreón F. 2007. Función de los dominios PPR de la proteína Pet309p sobre la expresión del gen mitocondrial Cox1 de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Maestría.
- ♦ Tavares-Carreón F, Camacho-Villasana Y, Zamudio-Ochoa A, Shingu-Vázquez M, Torres-Larios A, Pérez-Martínez X. 2008. The pentatricopeptide repeats present in Pet309 are necessary for translation but not for stability of the mitochondrial COX1 mRNA in yeast. *J Biol Chem* 283: 1472-1479.
- ♦ Tasaki E., Hattori M., and Sugita M. 2010. The moss pentatricopeptide repeat protein with a DYW domain is responsible for RNA editing of mitochondrial ccmFc transcript. *Plant J.* 62(4): 560-570.
- ♦ Tsukihara T., Aoyama H., Yamashita E., Tomizaki T., Tamaguchi H., Shinzawa-Itoh K., Nakashima R., Yaono R., and Yoshikawa S. 1996. The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science.* 272: 1136-1144.
- ♦ Vázquez Memije ME., y Tuena de Gómez Poyou. 2002. Mitocondria, una Mirada a la evolución de los conceptos básicos y modernos. Ed Prado. México.
- ♦ Verbitskiy D., Zerhrmann A., Brennicke A., and Takenaka M. 2010. A truncated MEF11 protein shows site-specific effects on mitochondrial RNA editing. *Plant Signal Behav.* 5(5): 446-455.
- ♦ Wallis M.G., Groudinsky O., Slonimski P.P., and Dujardin G. 1994. The NAM1 protein (NAM1p), which is selectively required for cox1, cytb and atp6 transcript processing/stabilisation, is located in the yeast mitochondrial matrix. *Eur J Biochem* 222:27-32.
- ♦ Wang X., McLachlan J., Zamora P.D., and Hall TM. 2002. Modular recognition of RNA by a human pumilio-homology domain. *Cell.* 110: 501-512.

- ♦ Westermann B. and Neupert W. 2000 Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 16, 1421–1427.
- ♦ Williams-Carrier R., Kroeger T. and Barkan A. 2008. Sequence-specific binding of a chloroplast pentatricopeptide repeat protein to its native group II intron ligand. *RNA*. 14:1930-1941.
- ♦ Williams E.H., Butler C.A., Bonnefoy N and Fox T.D. 2007. Translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria: functional interactions among mitochondrial ribosomal protein Rsm28p, initiation factor 2, methionyl-tRNA-formyltransferase and novel protein Rmd9p. *Genetics* 175:1117-26
- ♦ Williams P M., and Barkan A. 2003. Chloroplast -localized PPR protein required for plastid ribosome accumulation. *Plant J.* 36: 675-686.
- ♦ Yakubovskaya E., Mejia E., Byrnes J., Hambardjjeva E. and Garcia-Diaz M. 2010. Helix unwinding and base flipping enable human MTERF1 to terminate mitochondrial transcription. *Cell*. 141: 982-993.
- ♦ Zambrano A., Fontanesi F., Solans A., de Oliveira R.L., Fox T.D., Tzagoloff A., and Barrientos A. 2007. Aberrant translation of cytochrome c oxidase subunit 1 mRNA species in the absence of Mss51p in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. 18:523-535.
- ♦ Zamudio-Ochoa A. 2009. Estudio de la función de la región carboxilo terminal de Pet309 en la expresión de Cox1 en mitocondrias de levadura. Tesis de Licenciatura.
- ♦ Zerrmann A., Verbitskiy D-, Härtel B, Brennicke A and Tabkenaka M. 2011. PPR proteins network as site-specific RNA editing factors in plant organelles. *RNA Biol*. 8: 67-70
- ♦ Zsigmond, L., Rigo L., Szarka A., Szekely G., Otvos K., Darula Z., Medzihradzsky K. F., Koncz C., Koncz Z., and Szabados L. 2008. Arabidopsis PPR40 connects abiotic stress responses to mitochondrial electron transport. *Plant Physiol* 146:1721-37.
- ♦ Zuker M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*. 31: 3406-3415.



## APÉNDICE 2

### Artículos publicados durante el doctorado.

1. **Tavares-Carreón Faviola**, Camacho-Villasana Yolanda, Zamudio-Ochoa Angelica, Shingu-Vazquez Miguel, Torres-Larios Alfredo and Perez-Martinez Xochitl. The Pentatricopeptide Repeats Present in Pet309 Are Necessary for Translation but Not for Stability of the Mitochondrial COX1 mRNA in Yeast (2008) J Biol Chem. Vol 283(3): 1472-9.
2. Perez-Martinez Xochitl, Funes Soledad, Camacho-Villasana Yolanda, Marjavaara Sanna, **Tavares-Carreón Faviola**, Shingu-Vazquez Miguel. Protein Synthesis and Assembly in Mitochondrial Disorders. (2008) Curr Top Med Chem. Vol 8(15): 1335-1350.
3. **Tavares-Carreón F**, Camacho-Villasana Y, Zamudio-Ochoa A, Pérez-Martínez X. The pentatricopeptide repeat motifs from Pet309 are necessary for binding to the mitochondrial COX1 transcript in yeast. Manuscrito en preparación para someterse a Mol Biol Cell.

# 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-Martínez<sup>1</sup>

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.

Biogenesis of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase (COX)<sup>2</sup> 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

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,

\* 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.

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

<sup>2</sup> 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<math>\alpha</math> ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG pet309<math>\Delta</math>::LEU2</i> ( $\rho+$ , $\Delta\Sigma ai$ )	This study
XPM231	<i>Mata<math>\alpha</math> ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG pet309<math>\Delta</math>::LEU2</i> ( $\rho+$ , <i>cox1<math>\Delta</math>::ARG8<sup>m</sup></i> )	This study
XPM201	<i>Mata<math>\alpha</math> ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG</i> ( $\rho+$ , $\Delta\Sigma ai$ )	This study
XPM10b	<i>Mata<math>\alpha</math> ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG</i> ( $\rho+$ , <i>cox1<math>\Delta</math>::ARG8<sup>m</sup></i> )	52
SB5	<i>Mata<math>\alpha</math> ura3<math>\Delta</math> ade2 PET309::3xHA</i> ( $\rho+$ )	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  $\alpha$  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 *pet309 $\Delta$ ::LEU2* deletion construct was obtained by PCR. Strains XPM201 and XPM10b were transformed with the PCR product (31), and correct integration of the *pet309 $\Delta$ ::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 YEp352 (33) to generate pXP97 and pXP104, respectively. All *pet309* mutant sequences were generated by fusion PCR (34), using Accuzyme DNA polymerase (Bioline) 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 [<sup>35</sup>S]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).

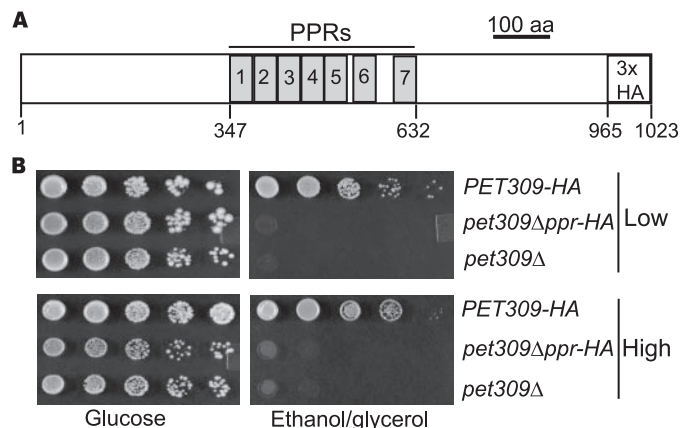
**Northern Blot Analyses**—Total RNA was prepared using the TRIzol reagent (Invitrogen) from yeast cultures grown to late log phase on raffinose-synthetic complete media lacking uracil. RNA was blotted to Hybond XL membrane (GE Healthcare). Blots were probed sequentially with the radioactively labeled *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  $1 \times 10^{-7}$  to  $1 \times 10^{-6}$ ) 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

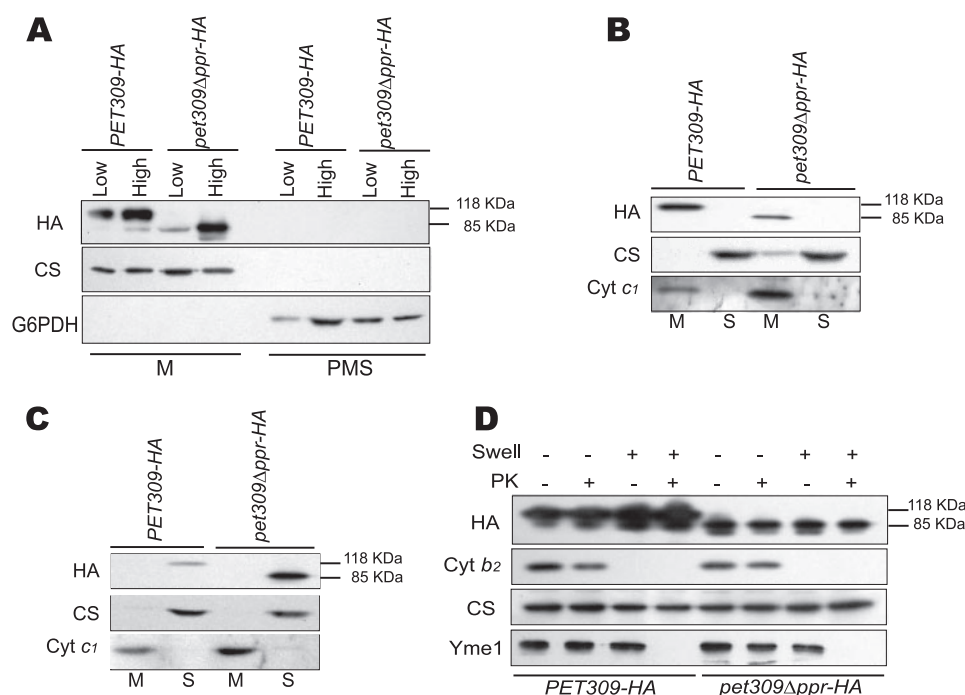
## PPR Domains of Pet309 Are Required for COX1 Translation

the crystal structure of PilF (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 Pet309 $\Delta$ ppr-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  $\mu$ g 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  $\mu$ g 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*<sub>1</sub> (*Cyt c*<sub>1</sub>) as an integral membrane protein marker. *C*, 100  $\mu$ g of mitochondria from strains expressing the *pet309-HA* alleles on low copy plasmids were subjected to alkaline  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  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  $\mu$ g 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  $\mu$ g/ml). Samples were resolved by SDS-PAGE, immunoblotted, and probed with anti-HA, anti-cytochrome *b*<sub>2</sub> (*Cyt b*<sub>2</sub>) 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. 1*A*). 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*<sup>-</sup> phenotype of a *pet309Δ::LEU2* mutant. Both the wild-type *PET309-HA* and the *pet309Δppr-HA* genes were cloned in the vectors pRS416 and YE<sub>p</sub>352 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. 1*B*). 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. 2*A*). 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



(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 $\Delta$ ppr-HA protein co-purified with mitochondria.

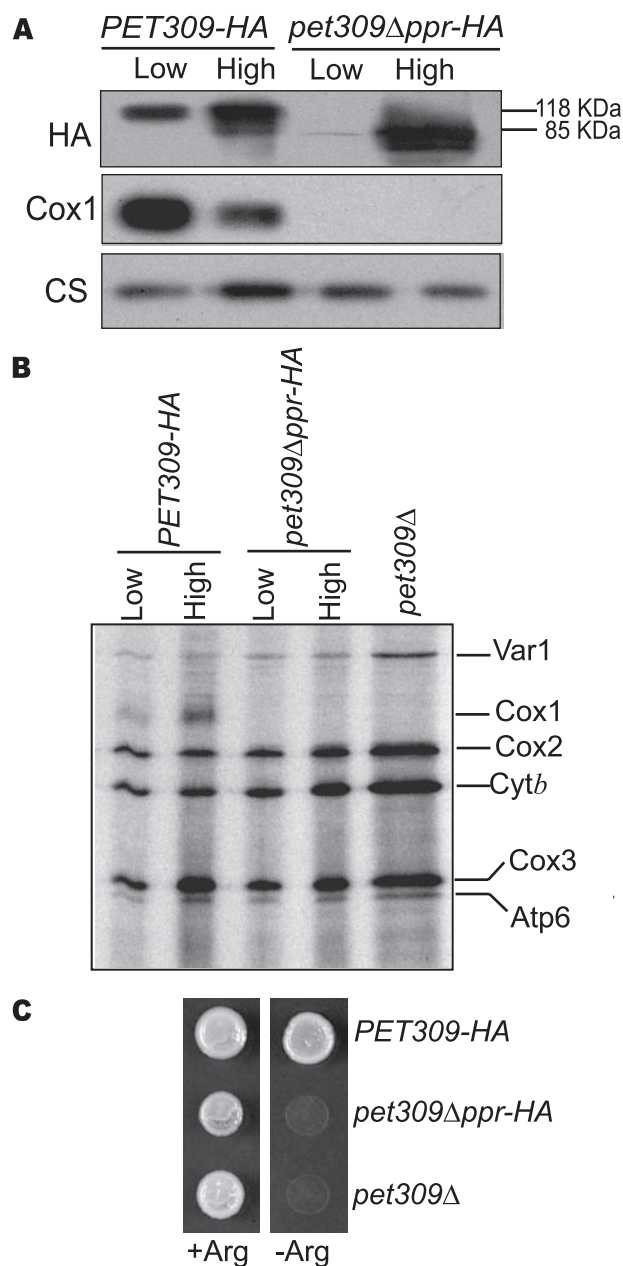
Next, we investigated whether the Pet309 $\Delta$ ppr-HA protein was membrane-bound or soluble. Mitochondria from strains bearing the *PET309-HA* or the *pet309 $\Delta$ ppr-HA*, low copy plasmids were sonicated and centrifuged. Both the wild-type Pet309-HA and the mutant Pet309 $\Delta$ ppr-HA proteins were present in the membrane pellet (Fig. 2B) and absent from the soluble supernatant. Alkaline Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> extraction of the mitochondrial membranes solubilized the wild-type Pet309-HA and the Pet309 $\Delta$ 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 $\Delta$ 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 $\Delta$ 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 $\Delta$ 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 $\Delta$ ppr-HA* mutant (Fig. 3A). The mutant did not accumulate Cox1 even in *pet309 $\Delta$ 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 $\Delta$ ppr-HA* mutation on *COX1* translation, we first analyzed [<sup>35</sup>S]methionine-labeled proteins from mitochondria carrying the *pet309 $\Delta$ 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 $\Delta$ ppr-HA*, or empty vector (*pet309 $\Delta$* ), 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 [<sup>35</sup>S]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 $\Delta$ ::ARG8<sup>m</sup>* 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 $\Delta$ 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 $\Delta$* ) 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<sup>m</sup>* replaced the *COX1* coding sequence (*cox1Δ::ARG8<sup>m</sup>*). The *ARG8<sup>m</sup>* 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<sup>m</sup>* has been demonstrated to be dependent upon Pet309 (52). In cells carrying the wild-type *PET309-HA*, the *cox1Δ::ARG8<sup>m</sup>* gene supported growth in Arg<sup>−</sup> 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.

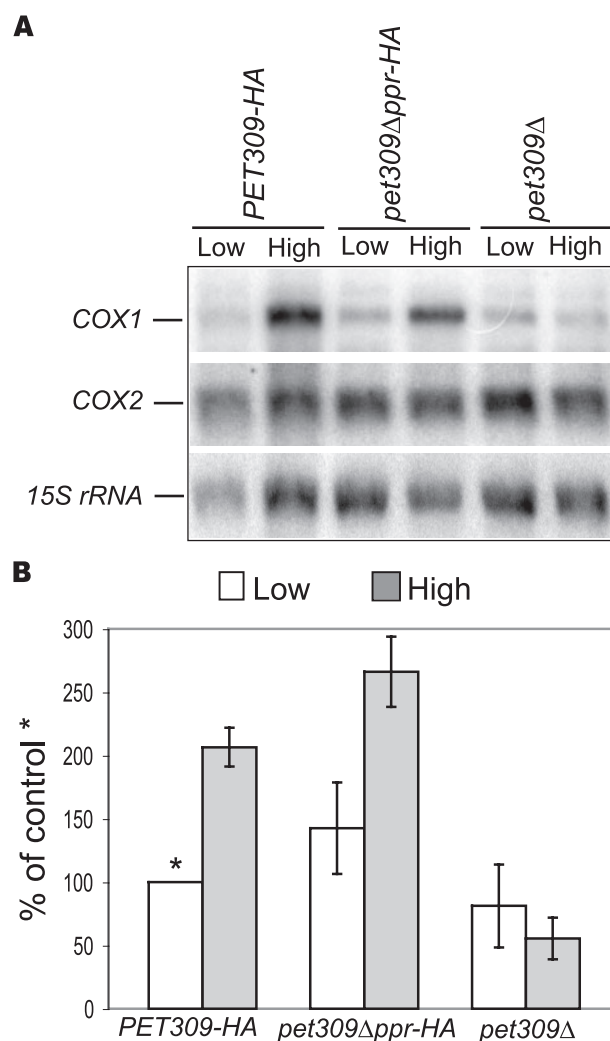
**The PPR Motifs in Pet309 Are Not Required for Stabilization of the COX1 mRNA**—Pet309 is also involved in the *COX1* mRNA stability, as null mutants show a reduced accumulation of the mature *COX1* mRNA (11). This effect is particularly strong when the *COX1* gene has introns, but it is also observed 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 (*pet309Δppr<sub>1-7</sub>-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<sup>m</sup>* 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

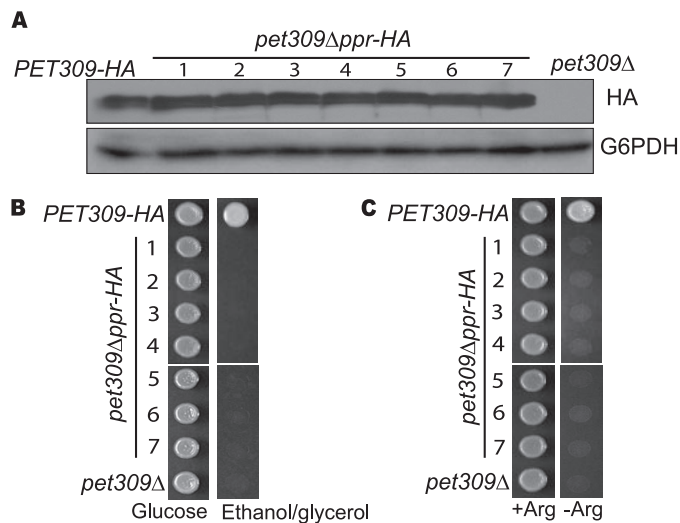


**FIGURE 4. The PPR region of Pet309 is not necessary to stabilize the COX1 mRNA.** A, 10  $\mu$ g of total RNA from strains bearing the wild-type *PET309-HA*, the *pet309Δppr-HA* gene or empty vector (*pet309Δ*), in low copy (Low) or high copy plasmids (High) were analyzed by Northern blot hybridization 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.

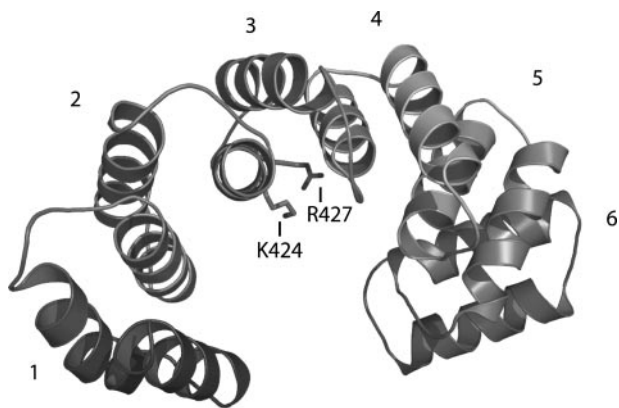
repeats present in Pet309 is necessary for *COX1* mRNA translation.

Similar Pet<sup>−</sup> and Arg<sup>−</sup> 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  $\alpha$  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



**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<sub>n</sub>* 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 μg 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<sup>tr</sup>* 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 PilF (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 PilF (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<sup>tr</sup>* 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<sup>+</sup> 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.

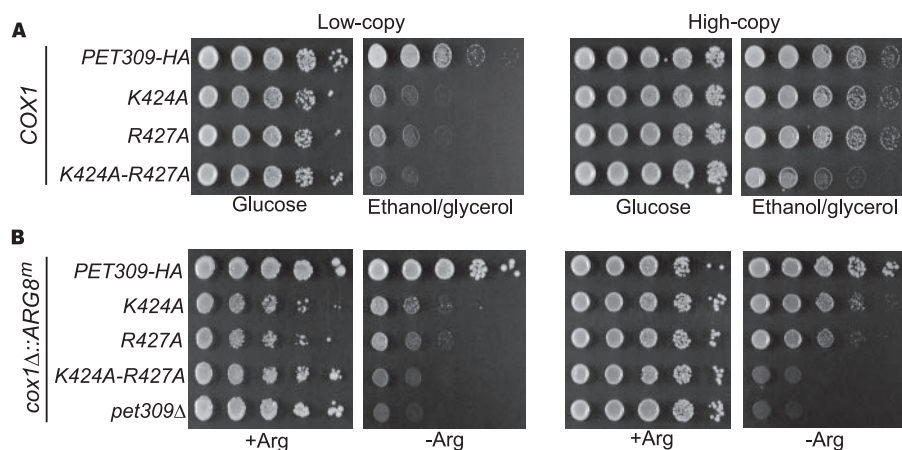
## DISCUSSION

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 Pet309Δppr into mitochondria. As observed for the wild-type Pet309, overexpression of Pet309Δppr 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<sup>m</sup>* 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 where 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
- Sanchirico, 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

# Protein Synthesis and Assembly in Mitochondrial Disorders

Xochitl Pérez-Martínez<sup>1,\*</sup>, Soledad Funes<sup>2</sup>, Yolanda Camacho-Villasana<sup>1</sup>, Sanna Marjavaara<sup>3</sup>, Faviola Tavares-Carreón<sup>1</sup>, Miguel Shingú-Vázquez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

<sup>2</sup>Gene Center, Department of Chemistry and Biochemistry, University of Munich, Germany, <sup>3</sup>Research Program of Molecular Neurology, Biomedicum-Helsinki, University of Helsinki, Finland

**Abstract:** Human mitochondrial DNA (mtDNA) codes for 13 polypeptides which constitute the central core of the oxidative phosphorylation (OXPHOS) complexes. The machinery for mitochondrial protein synthesis has a dual origin: a full set of tRNAs, as well as the 12S and 16S rRNAs are encoded in the mitochondrial genome, while most factors necessary for translation are encoded by nuclear genes. The mitochondrial translation apparatus is highly specialized in expressing membrane proteins, and couples the synthesis of proteins to the insertion into the mitochondrial inner membrane. In recent years it has become clear that defects of mitochondrial translation and protein assembly cause several mitochondrial disorders.

Since direct studies on protein synthesis in human mitochondria are still a relatively difficult task, we owe our current knowledge of this field to the large amount of genetic and biochemical studies performed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. These studies have allowed the identification of several genes involved in mitochondrial protein synthesis and assembly, and have provided insights into the conserved mechanisms of mitochondrial gene expression. In the present review we will discuss the most recent advances in the understanding of the mechanisms and factors that govern mammalian mitochondrial translation/protein insertion, as well as known pathologies associated with them.

**Keywords:** Assembly, mitochondria, mitochondrial disease, mitochondrial DNA (mtDNA), mitoribosomes, oxidative phosphorylation (OXPHOS), translation, yeast.

## 1. INTRODUCTION

Oxidative phosphorylation, the metabolic pathway that couples respiration to ATP production, takes place within mitochondria. These organelles arose from an endosymbiotic process that involved  $\alpha$ -proteobacteria [1]. As a result of this process, mitochondria have their own genome, which is highly reduced. Human mitochondrial DNA (mtDNA) is a circular, double stranded DNA molecule of 16.6 kb that codes for 13 proteins, which are subunits of the OXPHOS complexes [2]: *ND1* to *ND6* and *ND4L* code for subunits 1 to 6 and 4L of the NADH dehydrogenase complex (Complex I); *CYTB* codes for cytochrome *b*, a component of the *bc<sub>1</sub>* complex (Complex III); *COX1*, *COX2* and *COX3* code subunits 1, 2 and 3 of cytochrome *c* oxidase (complex IV); *ATP6* and *ATP8* code subunits a and A6L from the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase (Complex V). In addition, human mtDNA encodes 22 tRNAs, as well as the 12S and 16S rRNAs, which are components of the mitochondrial ribosomes.

The polypeptides encoded by mitochondrial genes are highly hydrophobic, exhibiting two to 15 transmembrane stretches. These proteins are part of the catalytic core of the OXPHOS complexes, and the majority is highly conserved from bacteria to animals. The mitochondrial translation machinery is highly specialized for expression of membrane proteins. Therefore mitochondrial ribosomes are associated to the inner membrane [3, 4]. In *S. cerevisiae*, this association is mediated by proteins like Oxa1p [5, 6], Mba1p [7] and Mdm38p [8]. In addition, yeast translational activators

are associated with the mitochondrial inner membrane, and are thought to tether initiation of translation to the region where newly made polypeptides are to be inserted (reviewed in [9, 10]). Assembly of OXPHOS complexes is associated with protein synthesis. For example, Cox11p is a protein involved in delivering of Cu<sub>B</sub> to subunit 1 of the cytochrome *c* oxidase, and is associated with mitochondrial ribosomes [11]. All these observations strongly suggest that translation of mitochondrial mRNAs is coupled with insertion of newly made proteins into the mitochondrial inner membrane, as well as with the incorporation of prosthetic groups and assembly of the OXPHOS complexes [12].

In addition, mitochondrial translation seems to be coupled with transcription. In yeast these processes are physically and genetically coupled through interaction of the mitochondrial RNA polymerase with Nam1p, a protein involved in translation [13, 14]. In humans mitochondrial translation and transcription could be coupled by the interaction of the RNA polymerase with the ribosomal protein MrpL12 [15].

The mitochondrial translation system is more closely related to the bacterial system than to the eukaryotic apparatus found in the cytosol. However, important differences from the prokaryotic system are present: *i*) Mitochondrial genetic code is different from the standard one and reveals variability between species [16]. In human mitochondria, AUG and AUA (as well as AUU exclusively in the case of *ND2*) serve as methionine codons [17]. TGA, which is a stop codon in the universal genetic code, is read as tryptophan in human mitochondria, whereas AGA and AGG, conventionally encoding arginine, are used as stop codons in this system, in addition to UAA and UAG. *ii*) The polypeptides encoded by the mammalian mitochondrial genome are

\*Address correspondence to this author at the Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria. Apartado postal 70-243, México D.F. 04510, México; Tel: (+52-55) 5622-5662; Fax: (+52-55) 5622-5630; E-mail: xperez@ifc.unam.mx

synthesized from nine monocistronic and two dicistronic transcripts with overlapping open reading frames [2, 18]. Some of the transcripts lack a complete stop codon, and at these locations, the post-transcriptional addition of poly(A) tails produces a functional termination codon [19]. *iii*) In mammalian mitochondria the same tRNA<sup>Met</sup> is used for both initiation and elongation. The mitochondrial tRNA<sup>Met</sup> bears the unusual modified base 5-formyl cytidine (f5C) in the first position of the anticodon [20]. This base might be responsible for the ability of this tRNA to decode the AUG and AUA codons [21]. *iv*) Mammalian mitochondrial ribosomes have a relatively low RNA content and a higher protein content than the prokaryotic ribosomes. About half of these proteins are homologs of bacterial proteins, while the rest are unique to mitochondria (reviewed in [22]). *v*) Of particular interest is the observation that the mammalian mitochondrial mRNAs have an almost complete lack of untranslated regions. Thus, a Shine/Dalgarno interaction between the mRNA and the 12S rRNA is not used during mammalian mitochondrial translation. The yeast mitochondrial mRNAs also lack a typical Shine/Dalgarno element. However, in this organism translational activators that are mRNA-specific, could be involved in the localization of the small ribosomal subunit near the translational start codon [9].

Although our understanding of the mechanisms of mitochondrial protein synthesis and assembly is far from complete, in this review we discuss the current understanding of mammalian mitochondrial protein synthesis, as well as the pathologies associated with defects in this process. These pathologies are caused by mutations in nuclear or mitochondrial genes that affect translation (reviewed in [23]), as well as assembly of newly made proteins into the OXPHOS complexes. All reported mutations causing mitochondrial disease in humans can be found in the Mitomap (<http://www.mitomap.org/>) and OMIM (Online Mendelians Inheritance in Man; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM>) databases.

In this review we will also address some aspects of the mitochondrial translation in the yeast *S. cerevisiae*. This microorganism is widely used for the study of mitochondrial functions, as its experimental manipulation is relatively easy as compared to mammalian systems. This budding yeast is a facultative aerobic organism where the presence of a functional OXPHOS system is not essential for the survival of the cell, hence it can tolerate the absence of any of the mitochondrial components that are related to the biogenesis of the OXPHOS complexes. In addition, *S. cerevisiae* has been particularly suitable to explore the mechanisms for coupling translation to assembly of newly synthesized proteins in the inner membrane.

## 2. TRANSLATION MACHINERY

### 2.1. Mitochondrial Ribosomes

Mitochondrial ribosomes (mitoribosomes) are very complex structures whose assembly requires the coordinated expression of mitochondrial and nuclear genes. The mitochondrial rRNAs are encoded in the mitochondrial genome of all the organisms reported to date, while the genes for mitochondrial ribosome proteins (MRPs) are

predominantly encoded by the nuclear genome [24]. In mammalian mitochondria every MRP is encoded in the nuclear genome, while in yeast the only MRP encoded by the mitochondrial genome is Var1p, a component of the small subunit of the mitoribosome [25, 26]. In contrast, the mitochondrial genomes of many protozoa and plants encode numerous MRPs [27].

As a reminiscence of their ancestral prokaryotic origins, it was expected that organellar ribosomes would be very similar to the eubacterial ones. However, even though the main features of mitoribosomes are comparable with those of bacterial or eukaryotic cytoplasmic ribosomes, they present striking differences (reviewed in [22]). Mammalian mitoribosomes have a low RNA content, and have a smaller sedimentation coefficient as compared to those of eubacteria and to the cytoplasmic ribosomes (70S for eubacterial *-E. coli-*, 80S for cytoplasmic and 55S for human mitochondrial ribosomes). Nevertheless, they are larger in mass and dimensions than 70S bacterial ribosomes [28]. The mitoribosome has a protein:RNA ratio of 69% protein and 31% RNA, whereas the bacterial ribosome has a protein:RNA ratio of 33% protein and 67% RNA [28].

The rRNAs found in the mitoribosomes are also variable in length and sequence. Within the small ribosomal subunit, the rRNA molecule present in yeast mitochondria is 15S, while in human mitochondria this molecule is only 12S. The size of the latter shows a reduction of about 40% when compared to the equivalent 16S rRNA found in bacterial small ribosomal subunits. Within the large ribosomal subunit, the yeast mitochondria contain a 21S rRNA molecule whereas in human mitochondria this is a 16S molecule, about half the size of the bacterial 23S [22, 24, 29]. An interesting feature shared by the animal and fungal mitochondrial ribosomes is that they lack 5S rRNA, which is an essential component of the large subunit of other ribosomes, i.e. *E. coli* ribosomes and plant mitoribosomes [24, 30]. However, the 5S rRNA is encoded in the nuclear genome and imported into the mitochondrial matrix. The functional relevance of this process remains to be elucidated [31, 32].

Mitoribosomes have gone through major adaptations during mitochondrial evolution. One of the most striking adjustments, was the increase in protein content by elongation of its proteins and the acquisition of new ribosomal proteins. However, during evolution several MRPs from bacterial origin have been lost as well [27]. The total number of identified MRPs range from around 81 in most metazoan species, to 80 in yeast, 63 in plants, and 39 in the apicomplexan *Plasmodium falciparum* [27]. Through proteomic analysis, around 80 MRPs have been identified in mammalian mitochondria (reviewed in [22]). Currently, information regarding the functions of the MRPs that are not present in bacterial ribosomes is rather limited. Since mitochondrial encoded proteins are inserted into the inner membrane in a co-translational manner, at least some of the metazoan-specific supernumerary MRPs might be important for this process [27].

Since the core components of the OXPHOS complexes are encoded in the mitochondrial genome and need to be synthesized by mitochondrial ribosomes, in principle any

mutation altering the assembly and/or function of the mitochondrial ribosomes either at the MRPs or the rRNAs, could result in a human disorder. However, there are just a few cases reported where a link between mutations in components of the mitochondrial ribosome and a human disorder have been established with certainty: point mutations at nt 1494 and 1555 in the 12S rRNA gene are some of the mutations associated with maternally inherited non-syndromic sensorineural deafness and aminoglycoside-induced deafness [33-35]. These mutations decrease the accuracy of translation and make the ribosomal decoding site hypersusceptible to aminoglycoside antibiotics [36]. An extensive analysis in Japanese diabetic patients revealed two point mutations, C1310T and A1438G, in the 12S rRNA [37], whereas the mutation T1119C was found in young obese adults but not in diabetic patients [38]. An unusual 12S rRNA mutation was reported (T1095C) in a pedigree with maternally inherited sensorineural deafness and Parkinson's disease, which suggested that the last one could be another manifestation of mutations affecting the mitochondrial translation machinery [39].

Regarding the MRPs, a nonsense mutation in the gene coding for MRPS16 was associated with fatal, neonatal encephalopathy. This patient had a marked reduction of the 12S rRNA transcript level, and translation was severely affected [40]. In addition, many MRPs have been proposed as candidates for human mitochondrial disorders, as they map to loci associated with mitochondrial pathologies. These pathologies include deafness, Usher syndrome 1E, retinitis pigmentosa, Leigh syndrome, Spinocerebellar ataxia, Russel-Silver syndrome, Stuve-Wiedemann syndrome, among others [41-43]. In Table 1 we summarize the human mitochondrial disorders that are possibly related to MRPs. It also compares these MRPs with the *S. cerevisiae* MRPs, and the phenotype observed of the disruptions made in yeast.

There are fewer cases that have been associated with the assembly of the mitoribosome. This depends among other factors on a protein called paraplegin. Mutations in the gene *SPG7*, which encodes paraplegin, are associated with hereditary spastic paraplegia (HSP) [44]. Paraplegin is a highly conserved AAA-protease present in the mitochondrial inner membrane from yeasts and mammals (reviewed in [45]). One of the fundamental roles of paraplegin is the cleavage of the N-terminal targeting sequence of MrpL32p after its import into mitochondria. MrpL32p is an essential component of the mitoribosome, and its processing is a prerequisite for assembly into the mitoribosome [46].

To add another degree of complexity to the assembly of the mitoribosome in human mitochondria, some MRPs have isoforms, an example of this is MRPS18, which has three isoforms [47]. The implication of this finding is that human mitochondrial ribosomes are heterogeneous, depending on which isoform they contain, and raises the possibility of functional specialization for the different mitochondrial ribosomes. This could imply that mutations in specific MRP isoforms may affect specific tissues, giving rise to a wide spectrum of disorders [48].

## 2.2. Mitochondrial tRNAs

Human mtDNA encodes 22 tRNAs. For each amino acid there is only one tRNA, except for leucine and serine, which require two tRNAs, dedicated to different codon groups: Leu<sup>(UUR)</sup> and Leu<sup>(CUN)</sup>, and Ser<sup>(UCN)</sup> and Ser<sup>(AGY)</sup> respectively. Mitochondrial tRNAs can decode two codons. This is achieved by "wobble" base pairing, where in the third position of an anticodon, a purine can be replaced with another purine, or pyrimidine with another pyrimidine [49]. In mitochondria, the most studied example of wobble binding is the tRNA Leu<sup>(UUR)</sup> mentioned above. The anticodon can read both UUA and UUG codons. This occurs via a modification of the wobble base by taurine [50]. The same kind of modification by taurine also occurs in the tRNA Lys. These modifications have a crucial role in stabilizing the codon-anticodon interaction in the ribosome [51].

Human mitochondrial tRNAs have minimized structures compared to other species or to cytoplasmic tRNAs: they have shortened stems and loops or even lack entire domains [52]. They have a decreased GC content and an increased amount of non-Watson-Crick base pairing in the stems, leading to a thermodynamic instability. This has been proposed to increase the susceptibility of mitochondrial tRNAs to suffer pathogenic mutations (reviewed in [53]).

tRNA mutations are the most common group of mtDNA mutations. They can cause an impairment of the mitochondrial protein synthesis and therefore can be associated with several syndromes [54]. A typical feature for mitochondrial tRNA mutations is that the same mutation can cause very different disease phenotypes in different families, and different mutations can cause similar disease phenotypes in different individuals.

The most studied tRNA mutations are located in the tRNA Leu<sup>(UUR)</sup> which is known to be a hot spot for mitochondrial mutations. Mutations within the tRNA Leu<sup>(UUR)</sup> are associated with MELAS (myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes). For instance, in Finland the MELAS mutation has arisen at least 9 different times [55]. 80% of the identified patients bearing a defect in tRNA Leu<sup>(UUR)</sup> present an A3243G mutation, and about 10% a T3271C mutation. Both mutations prevent the taurine modification in the wobble base of the tRNA, leading to a defect in reading UUG codons, but not UUA codons [51]. Complex I is particularly affected by this mutation because *ND6* has many UUR codons [56], and 42% of leucine codons are UUG codons. Mutations in the *ND6* gene itself give a MELAS type disease, which even further supports the hypothesis [57]. In addition, the A3243G mutation has been shown to cause impaired transcription termination [58], impaired pre-tRNA processing [59, 60], decreased stability and aminoacylation [59, 61], and abnormal tRNA conformation [62]. The same mutation can cause a wide variety of symptoms, the mildest being diabetes mellitus (with or without hearing loss), developed by 85% of the patients before the age of 70 [63]. Interestingly, the point

**Table 1. Comparison of MRPs from Human and Yeast that are Candidates for Mitochondrial Disorders**

Human MRP	Yeast MRP [24, 27, 176]	Deletion phenotype in yeast	Candidate mitochondrial disorder	Reference
<b>Small subunit</b>				
MRPS2	Mrp4p	YPG <sup>b</sup>	DFNB33 <sup>a</sup> Leigh syndrome	[43] [42]
MRPS10	Rms10p	lethal	Spinocerebellar ataxia	[42]
MRPS11	Mrps18p	lethal	DFNA30 <sup>a</sup>	[43]
MRPS12	Ynr036cp	YPG-	DFNA4	[41, 43]
MRPS14	Mrp2p	YPG-	DFNA7	[41]
MRPS15	Mrps28p	YPG-	DFNA2 Stuve-Wiedemann syndrome	[43] [42]
MRPS17	Mrps17p	YPG-	Russell-Silver syndrome	[42]
MRSP18A MRPS18B	Rsm18p	YPG-	Spinocerebellar ataxia	[42]
MRPS21	Mrp21p	YPG-	DFNA7	[43]
MRPS23	Rsm25p	YPG-	Retinitis pigmentosa 17 Russell-silver syndrome	[41] [42]
MRPS26	-	-	Hallervorden-Spatz syndrome	[41]
MRPS29 (DAP3)	Rsm23p	YPG-	DFNA7 Apoptotic protein	[43] [47]
MRPS30	-	-	Leigh syndrome	[42]
MRPS33	Rsm27p	YPG-	DFNB13	[43]
<b>Large Subunit</b>				
MRPL2	Rml2p	YPG-	Spinocerebellar ataxia	[42]
MRPL3	MrpL9p	YPG-	DFNA18 Moebius syndrome 2	[43] [41]
MRPL4	YmL6p	lethal	DFNB15	[41, 43]
MRPL9	-	-	DFNA7 Retinitis pigmentosa 18	[43] [41]
MRPL12	Mnp1p	lethal	DFNA20	[43]
MRPL14	MrpL38p	YPG-	Spinocerebellar ataxia	[42]
MRPL19	Img1p	YPG-	DFNA43	[43]
MRPL24	-	-	DFNA7	[43]
MRPL38	MrpL35p	YPG-	DFNA20	[43]
MRPL39	-	-	Usher syndrome, type 1E	[41, 42]
MRPL41	MrpL27p	YPG-	DFNB33 Leigh syndrome	[43] [42]
MRPL42	-	-	DFNA25	[43]
MRPL46	MrpL17p	YPG-	DFNA30	[43]
MRPL48	-	-	Leigh syndrome	[42]

(Table 1) Contd....

Human MRP	Yeast MRP [24, 27, 176]	Deletion phenotype in yeast	Candidate mitochondrial disorder	Reference
MRPL49	Img2p	YPG-	Leigh syndrome	[42]
MRPL53	-	-	MMD <sup>a</sup>	[42]
MRPL54	MrpL37p	YPG-	Leigh syndrome DFNB15	[42] [43]

<sup>a</sup>DFNA: autosomal dominant non-syndromic hearing loss; DFNB: autosomal recessive non-syndromic hearing loss; MMD: Multiple mitochondrial dysfunctions syndrome. <sup>b</sup> YPG-: respiratory deficient cells.

mutation A12300G on tRNA Leu<sup>(CUN)</sup> has been shown to suppress the pathological phenotype caused by the A3243G mutation [59]. Mitochondrial translation, complex assembly and cell respiration are normal in cells containing 99% of pathological MELAS mutation and moderate amount of the suppressor mutation. This kind of suppression has never been found *in vivo* in patients nor healthy relatives of the patients. Interestingly, the tRNA Leu<sup>(CUN)</sup> has taurine modifications in some of its tRNA, but not in all, enabling to read UUR codons, but not UUY codons for phenylalanine [64].

The other well-studied tRNA mutation is the A8344G mutation in the tRNA Lys causing myoclonic epilepsy associated with ragged-red fibers (MERRF) [65]. This mutation decreases the aminoacylation of the tRNA and premature termination of translation takes place at, or near of, each lysine codon [66]. In addition, this mutation prevents the taurine modification in tRNA Lys [51]. It has been suggested that the decreased efficiency of the wobble base modification caused by the lack of taurine modification, can be one explanation for the differences in the degree of the disorder observed in different patients. It is also known that this mutation is tolerated at high levels: healthy relatives can present mutant loads up to 70% [67].

tRNA molecules must be modified in order to be functional. Therefore, mutations present in the components required to complete any of the modifications required by the tRNAs, can also be found associated to human disorders. One example of this, are mutations found in the gene encoding the pseudouridylate synthase 1 (*PUS1*). This enzyme is responsible for the pseudouridylation of both cytoplasmic and mitochondrial tRNAs. The identified mutations have been linked to cause mitochondrial myo-pathy, lactic acidosis and sideroblastic anemia (MLASA), a progressive disorder affecting muscle and erythroid cells [68].

One common symptom caused by mtDNA mutations is deafness. Some tRNA mutations, like tRNA Ser<sup>(UCN)</sup>, Leu<sup>(UUR)</sup>, Lys and Glu cause syndromic or non-syndromic hearing losses. (reviewed in [69]).

### Mitochondrial Aminoacyl-tRNA Synthetases

Mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases are encoded by nuclear genes and are imported into mitochondria. Defects in these genes have been recently shown to cause mitochondrial disease by affecting mitochondrial translation. Mitochondrial leucyl tRNA synthetase (*LARS2*) has been

shown to be a type 2 diabetes susceptibility gene in the Netherlands and Denmark [70].

An intronic mutation in the arginine tRNA synthetase gene (*RARS2*) causes severe infantile encephalopathy associated with pontocerebellar hypoplasia and multiple mitochondrial respiratory-chain defects. The mutation produces a short *RARS2* transcript and reduction in both, the amount of tRNA Arg and its aminoacylation status [71].

Recently, mutations in the mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase (*DARS2*) were found to cause leuko-encephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation (LBSL). Enzyme activities of mutant proteins were decreased, but no mitochondrial phenotype was seen in patient's fibroblast and lymphoblast cell lines [72]. The precise role that this mutation plays during the development of the observed malfunctions remains to be elucidated.

### 2.3. Translation Initiation, Elongation and Termination

#### Translation Initiation

In eubacteria, translation initiation depends on three factors: IF1, IF2 and IF3 (reviewed in [73]). In mammalian mitochondria, homologs of IF2 (IF2<sub>mt</sub>) and IF3 (IF3<sub>mt</sub>) can be clearly identified [74-76]. In contrast, no IF1 homolog has been detected in mitochondria, however, IF2<sub>mt</sub> can perform the functions that both essential factors IF2 and IF1 play in *E. coli*. A conserved insertion of 37 amino acids in IF2<sub>mt</sub> substitutes the function of IF1 [77]. This insertion is only found in mitochondrial IF2s, and could be in close proximity to the small ribosomal subunit to directly influence its binding to the ribosome [78]. In eubacteria IF1 is the smallest of the three initiation factors, with a molecular mass of 8.2 kDa. IF1 binds to the A-site of the small ribosomal subunit and is thought to direct the initiator tRNA to the P site in the ribosome by blocking the A site. In addition IF1 enhances the dissociation and association of the ribosome: in the presence of IF1, the interaction between IF2 and the small ribosomal subunit is enhanced, and the release of IF2 is indirectly promoted when IF1 is ejected (reviewed in [73]).

IF2<sub>mt</sub> is a GTP/GDP binding protein that promotes the binding of tRNA fMet to the small ribosomal subunit. This binding is dependent on the presence of mRNA, closely resembling the prokaryotic IF2 [75]. Yeast IF2<sub>mt</sub> is encoded by the *IFM1* gene [79]. It has the same domain structure and biochemical properties as the mammalian mitochondria IF2<sub>mt</sub>, but with enhanced ability to bind unformylated

initiator tRNA Met [80, 81]. Genetic evidence suggests that Rsm28p, a dispensable component of the yeast mitochondrial ribosomal small subunit, could have partially overlapping roles with IF2<sub>mt</sub> [82]. The *rsm28Δ* mutation, together with mutations in the *IFM1* and *FMT1* (which encodes the methionyl-tRNA-formyltransferase) genes caused a synthetic respiratory defective phenotype. This suggests that in yeast, Rsm28p participates in the assembly of the initiation complex [82]. To date, no ortholog of Rsm28p has been identified in mammalian mitochondria.

The bacterial IF3 has several roles in translation initiation (reviewed in [73]): *i*) It prevents the association of the ribosomal subunits by binding to the small subunit; *ii*) stimulates the rapid formation of codon-anticodon interaction at the ribosomal P-site; *iii*) proofreads the selection of the initiator tRNA fMet and the AUG codon in the P-site by promoting dissociation of initiation complexes with incorrectly bound tRNAs; and *vi*) promotes the shift in position of the mRNA from the standby site to the decoding position in the P-site of the small ribosomal subunit.

IF3<sub>mt</sub> has a central portion bearing only 20.8% identity to the *E. coli* IF3 [76]. IF3<sub>mt</sub> does not appear to be highly conserved among animals. For example, BLAST searches failed to identify the homolog of IF3<sub>mt</sub> in *C. elegans* [76]. IF3<sub>mt</sub> promotes the dissociation of the ribosome, as it does in bacteria. It stimulates tRNA fMet binding to the mRNAs on the ribosome [76]. Structural modeling of IF3<sub>mt</sub> suggests that the central region of this protein is similar to the bacterial IF3 [76, 83]. However, the mammalian IF3<sub>mt</sub> has extensions of around 30 amino acids at the N and C termini surrounding a central region, which is homologous to the bacterial IF3. These extensions on IF3<sub>mt</sub> are not essential for promoting initiation complex formation on mitochondrial ribosomes. However, the C-terminal extension appears to be important to reduce the affinity of IF3<sub>mt</sub> for the large subunit, preventing improper joining of the ribosomal subunits during initiation complex formation [83, 84]. BLAST searches allowed the tentative identification of the *Schizosaccharomyces pombe* IF3<sub>mt</sub>, which shows 25% and 20.9% sequence identity to the bacterial and human IF3<sub>mt</sub>, respectively. In contrast to the human factor, *S. pombe* IF3<sub>mt</sub> has no predicted N and C-terminal extensions. To date, the *S. cerevisiae* homolog has not been firmly established [76].

#### **Selection of Initiation Site and Translational Activators in Yeast Mitochondria**

A feature of the human mitochondrial translation system is that the mRNAs in this organelle have an almost complete lack of 5' untranslated regions (5'-UTR). The start codon is generally located within three nucleotides of the 5' end [2]. Thus, mammalian mitochondrial ribosomes cannot recognize the start codon using the Shine/Dalgarno interaction between the mRNA and the 12S rRNA as observed in bacteria. Further, this system does not use a cap-binding and scanning mechanism such as observed in the eukaryotic cytoplasm. To date, it is not understood how mitochondrial ribosomes select the translation initiation site in the mRNAs. Jones et al. (2008) [85] found that the first 35 nucleotides of the mammalian mitochondrial mRNAs are highly unstructured. The start codons could be accessible within single stranded motifs, making them potentially accessible for ribosome

binding. These data are consistent with a model in which the specialized mitochondrial ribosome preferentially allows passage of unstructured 5' sequences into the mRNA entrance site to participate in translation initiation.

In the yeast *S. cerevisiae*, translation initiation is controlled by a family of proteins known as translational activators (reviewed in [9, 10]). Each member of this family is specific for a mitochondrial mRNA. These proteins act on the 5'-UTR of the target mRNA to promote translation initiation. Genetic and biochemical evidences indicate that translational activators interact with the ribosome, and at least for some activators, this interaction is mediated by their carboxy terminal portion (for examples see [86, 87]). This suggests that, through the interaction with the small ribosomal subunit and with the mRNA's 5'-UTR, translational activators could participate in the recognition of the start codon by the ribosome. In addition, translational activators are associated with the mitochondrial inner membrane and with themselves, suggesting that these proteins tether mRNAs to the mitochondrial inner membrane, where newly made polypeptides will be integrated [14, 88-90]. Table 2 shows the yeast translational activators known and their target mRNAs. *ATP8* and *VARI1* are the only genes for which no translational activators have been found.

**Table 2. Translational Activators Found in *S. cerevisiae* Mitochondria**

Translational activator <sup>a</sup>	Target mRNA
Pet309p	<i>COX1</i>
Pet111p	<i>COX2</i>
Pet54p	<i>COX3</i>
Pet122p	<i>COX3</i>
Pet494p	<i>COX3</i>
Cbs1p	<i>CYTB</i>
Cbs2p	<i>CYTB</i>
Atp22p	<i>ATP6</i>
Aep1p (Nca1p)	<i>ATP9</i>
Aep2p (Atp13p)	<i>ATP9</i>

<sup>a</sup>Taken from [9, 10], except for Atp22p, which is described in [90].

Translational activators have highly diverged, so clear homologs can only be found among fungi [91]. However, this does not necessarily imply that there is no equivalent system to the translational activators in mammals. To date, only Pet309p has been found to have an ortholog in humans: the protein LRPPRC. The role of this protein during the synthesis of Cox1p will be discussed later. It has been suggested that in contrast to what has been found in yeast, the mammalian translational activators could interact with the coding regions of the mitochondrial mRNAs [23].

One characteristic of the yeast translational activators is that the non-respiratory phenotype produced by mutations on the mRNA's 5'-UTR can be experimentally bypassed by the exchange of this region with the 5'-UTR from a different

mRNA [9]. There is a group of translational activators whose effect is not restricted to the 5'-UTR region, making the bypass mentioned above impossible. This is the case for Cbp6p, which is a protein required for *CYTB* mRNA translation [92]. A better understood example is Mss51p, a protein necessary for *COX1* mRNA translation. The action of Mss51p maps to the *COX1* 5'-UTR, as well as the coding region [93]. In addition Mss51p physically interacts with the newly made Cox1p, suggesting that this protein is involved in the coordination of Cox1p synthesis and insertion into the mitochondrial inner membrane [93, 94]. Together with Mss51p, the assembly regulation of Cox1p synthesis could be mediated by factors like Cox14p [94] and Coa1p [95, 96].

### PPR Proteins and Translation

PPR (pentatricopeptide repeat) proteins are a recently discovered family of proteins, which has essential roles in mitochondrial and chloroplast biogenesis (reviewed in [97, 98]). In general, members of this family are involved in RNA metabolism [97]. PPR motifs are 35 amino acids repeats usually present as a tandem within a protein. These repeats are predicted to form a superhelix that encloses a central groove with an RNA-binding surface [99]. Predicted models of PPR proteins indicate that the bottom of the central groove is positively charged, which could facilitate the binding of RNA molecules [99, 100].

Some PPR-containing proteins are part of the mitochondrial translation machinery. PPR proteins are associated with mitoribosomes, although their role is not clear at present [101-104]. Some PPR-containing proteins act as translational activators [105-107]. This is the case for the yeast protein Pet309p and its human ortholog, LRPPRC, with 7 and 11 predicted repeats, respectively [100, 107]. The presence of these motifs in Pet309p is necessary for the production of the protein Cox1p, but it is dispensable for the transcription or stability of the *COX1* mRNA, indicating that the 7 PPR motifs present in Pet309p are required for *COX1* mRNA translation [100]. LRPPRC is an RNA binding protein that it is localized in mitochondria and nucleus [108]. The role of LRPPRC in both nuclear and mitochondrial mRNA metabolism suggests that this protein could coordinate gene expression between the two organelles.

### Translation Initiation and Disease

Currently, two genes have been associated to defects in translation initiation. One candidate gene is *LRPPRC*, which is implicated in the mitochondrial disease Leigh Syndrome of the French-Canadian type [107]. The C1119T transition of *LRPPRC* causes an A354V missense mutation, resulting in significantly lower levels of the LRPPRC protein in mitochondria. It is not clear whether import of the mutant protein is affected, or if the protein is degraded after import. The mutation A354V is associated with reduced levels of *COX1* and *COX3* mRNA transcripts, [109], and could affect the *COX1* mRNA translation initiation, as the yeast counterpart does [107].

Another candidate factor is IF3<sub>mt</sub>, which was found to interact with the mitochondrial serine-threonine kinase PINK1. Mutations in the later protein cause the early-onset autosomal recessive PARK6 variant of Parkinson's disease [110]. The *MTIF3* gene, which codes for IF3<sub>mt</sub>, was shown

to present an allelic association with Parkinson's disease. Since an altered function of IF3<sub>mt</sub> may affect the availability of mitochondrial encoded proteins, it was proposed as a possible link between mitochondrial protein synthesis, oxidative stress and an increased vulnerability for Parkinson's disease [111].

### Translation Elongation

Mammalian mitochondrial translation elongation requires three factors: EF-Tu<sub>mt</sub> [112-114], EF-Ts<sub>mt</sub> [115] and EF-G<sub>mt</sub> [116]. Prior to ribosome binding, EF-Tu<sub>mt</sub> forms a complex with the incoming aminoacyl-tRNA in a GTP dependent manner. After codon-anticodon interaction in the A-site and hydrolysis of GTP, EF-Tu<sub>mt</sub> is released from the ribosome [117]. EF-Ts<sub>mt</sub> works as a guanine exchange factor during the functional recycling of EF-Tu<sub>mt</sub> [118]. EF-Ts<sub>mt</sub> forms a stable complex with EF-Tu<sub>mt</sub> to promote release of GDP from EF-Tu<sub>mt</sub>. The complex formed by EF-Tu<sub>mt</sub> and EF-Ts<sub>mt</sub> dissociates upon binding of a new molecule of GTP and aminoacyl-tRNA to EF-Tu<sub>mt</sub> [117]. The crystal structure of the bovine EF-Tu-Ts<sub>mt</sub>-complex suggests that the interaction between EF-Tu<sub>mt</sub> and EF-Ts<sub>mt</sub> results in disruption of the Mg<sup>2+</sup> binding site, which lowers the affinity of EF-Tu<sub>mt</sub> for guanine nucleotides [119]. EF-Tu<sub>mt</sub> has been identified in *S. cerevisiae* [120, 121]. While EF-Ts<sub>mt</sub> is absent in this organism, in the yeast *S. pombe*, both EF-Tu<sub>mt</sub> and EF-Ts<sub>mt</sub> are present [122], as it is the case for mammalian elongation factors. However, *S. cerevisiae* EF-Tu<sub>mt</sub> has been found to be functionally equivalent to the *S. pombe* EF-Tu/EF-Ts<sub>mt</sub> couple [122]. It was also suggested that the GTPase activity of *S. cerevisiae* EF-Tu<sub>mt</sub> is independent of an exchange factor and therefore it would not require EF-Ts<sub>mt</sub> [122].

EF-Tu<sub>mt</sub> binds to the mitochondrial inner membrane independently of the presence of mitochondrial ribosomes. In addition to the role in translation elongation, bovine EF-Tu<sub>mt</sub> was found to carry chaperone properties [123]; *In vitro*, it protects proteins from thermal aggregation and promotes refolding of denatured proteins. It might be involved in mediating degradation of misfolded, newly synthesized mitochondrial proteins [123]. The chaperone activity has also been documented for bacteria, chloroplasts and cytosolic EF-Tu (for examples see [124-126]).

Mitochondrial EF-G<sub>mt</sub> was first characterized in bovine [116]. There are two forms of this factor, EF-G1<sub>mt</sub> and EF-G2<sub>mt</sub>, which are coded by two different genes, from yeast to mammals [79, 127]. Both genes have strong homology to bacterial EF-G. The prokaryotic EF-G catalyzes the translocation step, during which the A- and P-site tRNAs move to the P and E sites of the elongating ribosome, and mRNA is advanced by one codon (Nierhaus 1996; Caldas *et al.* 2000; Rodnina *et al.* 2000).. Bacterial EF-G has also been suggested to display chaperone activities, with a possible function in protein folding and protection from stress [128]; however this role has not been established yet for mitochondrial EF-G<sub>mt</sub>.

Mutations in the human mitochondrial elongation factors manifest in a variety of symptoms that have been reported in a few case-reports. A homozygous C997T mutation in *TSMF*, the gene coding for the mitochondrial translation elongation factor EF-Ts<sub>mt</sub>, is associated with encephalo-



myopathy and hypertrophic cardiomyopathy [129]. This mutation predicts a R333W substitution that is likely to disrupt the EF-Tu-EF-Ts<sub>mt</sub> complex. A patient with severe infantile macrocystic leukodystrophy with micropolygyria had the mutation R339Q in EF-Tu<sub>mt</sub> [130]. Mutations in EF-G<sub>1mt</sub> are the cause of *i*) progressive hepatocerebralopathy due to the substitution N174S affecting a highly conserved residue of the GTP-binding domain [131], *ii*) fatal hepatopathy, due to heterozygous mutations leading to a protein with the mutation S321P, as well as a product with a premature stop at amino acid 607 [132], and *iii*) early-onset Leigh syndrome, with allelic mutations that produce a stop codon at position 47 and a M496R substitution [130].

### Translation Termination

The human mitochondrial genetic code employs four termination codons [16]: AGA and AGG (these two codons conventionally would encode arginine), UAA and UAG. Once the translation complex has reached the termination codon, the completed protein must be dissociated from the final tRNA, ribosome, and its mRNA. The proteins responsible for fulfilling these functions are the release factors (RFs). Recently, the mitochondrial release factor mtRF1a was found to decode the stop codons UAA and UAG [133]. *In silico* analyses identified an additional candidate for a release factor protein, mtRF1 [134]; however, *in vitro* experiments did not show a release activity [133]. The lack of activity could be due to the use of heterologous bacterial ribosomes rather than 5S mitoribosomes. The putative mtRF1 could decode the stop codons AGG and AGA *in vivo* [133].

Two termination factors have been identified in *S. cerevisiae* mitochondria: mRF1p and Rrf1p. mRF1p is responsible for stop codon recognition and peptide release [135, 136], whereas Rrf1p is the mitoribosome recycling factor [137]. Rrf1p promotes the dissociation of the tRNA, mRNA and the ribosome, so the components are available for another round of translation.

### 3. HOW MITOCHONDRIAL TRANSLATION IS COUPLED TO INSERTION OF NEWLY MADE PROTEINS?

Although mitochondria evolved from bacteria, there are several aspects that have changed since the organelle originated. In the case of the proteins delivered to the inner membrane, almost the entire bacterial mechanism of recognition and targeting of membrane proteins seems to be replaced in mammalian and yeast mitochondria. Since most, if not all, mitochondrial encoded proteins are highly hydrophobic, there is no need for a system that distinguishes between soluble and membrane proteins. Accordingly, all the components of the SRP and Sec translocon are absent from mammalian and yeast mitochondria [138, 139], favoring the hypothesis that the translation mechanism in mitochondria is specialized to deal exclusively with membrane proteins. The translation machinery is normally associated with the mitochondrial inner membrane, allowing synthesis of proteins and their insertion to occur in a simultaneous and coordinated manner [3, 4, 139, 140]. Most of our current knowledge in the field of membrane insertion of mitochondrial encoded proteins comes from studies made

in the yeast *S. cerevisiae*, therefore, we will describe the findings made in this microorganism and describe what has been observed in the case of human mitochondria.

### Oxa1p: A Ribosome Anchor that Works as an Insertase

One of the first factors involved in inner membrane protein insertion that was characterized was the insertase Oxa1p [141, 142]. This protein belongs to the conserved family of proteins called Alb3/Oxa1/YidC, which includes homologs present in chloroplasts, mitochondria and bacteria respectively [143, 144]. It is the only known component of the inner membrane insertion machinery that has been conserved during evolution in mitochondria from all organisms studied to date. Oxa1p was originally identified as a component required for the biogenesis of the respiratory chain complexes, in particular, for the cytochrome *c* oxidase (thus it was named Oxa1p for *o*xidase *a*ssembly) [141, 142]. This protein forms a homo-oligomeric complex that facilitates the integration of mitochondrial encoded proteins into the inner membrane, as well as of some nuclear encoded proteins that are encoded in the nuclear genome, imported into the mitochondrial matrix and finally reach the inner membrane in an export-like step [145-148]. Oxa1p spans the mitochondrial inner membrane five times, exposing its N-terminus to the intermembrane space and its long C-terminus to the matrix [149]. It can be divided structurally into two functional domains: *i*) the membrane core that constitutes the insertase section of the protein, and *ii*) the C-terminus predicted to form a coiled coil structure that possess the ability to bind mitochondrial ribosomes [5, 6, 150].

The role of Oxa1p during the insertion of mitochondrial encoded proteins can be clearly monitored for the subunits of the cytochrome *c* oxidase that are encoded by the mitochondrial genome (Cox1p, Cox2p and Cox3p, as well as for the cytochrome *b* (the core subunit of the *bc<sub>1</sub>* complex). The interaction between Oxa1p and the newly synthesized Cox1p, Cox2p and Cox3p is very transient and occurs essentially during the insertion process [147]. Complex I is completely absent in the yeast *S. cerevisiae* where most of the studies addressing the function of Oxa1p have been performed. However, in the filamentous fungus *Neurospora crassa* the depletion of Oxa1p produced a decrease on the steady state levels of Complex I, suggesting that it also plays a role during the biogenesis of this complex [148].

The C-terminal domain of Oxa1p is predicted to form an  $\alpha$ -helical domain that has the ability to bind to mitochondrial ribosomes. The deletion of this ribosome binding domain (RBD) prevents the interaction of the ribosomes with the insertase region of Oxa1p leading to the release of the translation products from the mitoribosomes, into the matrix and their subsequent accumulation within that subcompartment of the organelle [5, 6]. Although the precise site of interaction is currently unknown, Oxa1p can be cross-linked to Mrp20p, a component of the large ribosomal subunit. Mrp20p is the homolog subunit to the bacterial L23, which is located next to the peptide exit tunnel of the ribosome [5]. The interaction between Oxa1p and translating ribosomes, constitutes one of the crucial steps during the co-translational insertion of mitochondrial translation products by facilitating the interaction of the newly synthesized proteins with the insertion machinery.

The role of Oxa1p during the biogenesis of the OXPHOS complexes is not limited to the insertion of some of their core subunits, but it is also involved in their further assembly. In the case of the  $F_1F_0$ -ATP synthase, Oxa1p is not strictly required for the insertion of the three subunits that are mitochondrial encoded (Atp6p, Atp8p and Atp9p) [151]. Rather, Oxa1p directly interacts with newly synthesized Atp9p after its insertion and mediates the assembly of its oligomeric form into the functional  $F_1F_0$ -ATP synthase. This role during the assembly is not dependent on the C-terminus, and occurs after the insertion of the proteins [152].

Since the function of Oxa1p in yeast has a significant impact on the assembly of functional OXPHOS complexes Coenen *et al* reasoned that patients where the activity of more than one OXPHOS complex is compromised could carry mutations in Oxa1L. In order to address this, they analyzed fibroblasts isolated from patients with combined deficiencies in complex I and IV [153]. In this study no mutations in Oxa1L were associated with the observed phenotypes. Yet, since this study was reduced to the analysis of few patients, it is not possible to discard the possibility that cases where the gene Oxa1L contains pathogenic mutations would be found in the future. Alternatively, since mutations in the human Oxa1L would presumably produce severe alterations in several OXPHOS complexes simultaneously, such severe alterations could result in lethal effects in humans preventing embryonic development.

There is little experimental evidence about the function of Oxa1L in mammalian cells. In a recent report, a knock down of the Oxa1L gene in HEK293 cells affected the biogenesis of the NADH:Ubiquinone oxidoreductase (Complex I) of which the steady state levels were decreased. In this study, it was also observed that both the steady state levels and the activity of the  $F_1F_0$ -ATP synthase were strongly affected. Intriguingly, in contrast with what is observed in yeast cells, the absence of Oxa1L did not compromise the assembly and/or activity of the cytochrome *c* oxidase [154].

#### **Mba1p: A Membrane Associated Ribosome Receptor**

Mba1p is a membrane associated protein located in the mitochondrial inner membrane facing the matrix. This protein belongs to a high molecular weight complex whose components have not yet been identified [155, 156]. In a similar way than Oxa1p, Mba1p interacts transiently with mitochondrial translation products, in particular with the subunits of the cytochrome *c* oxidase Cox1p, Cox2p and Cox3p, at early steps of their synthesis [155]. Mba1p binds to the large subunit of the mitochondrial ribosomes independently of the protein synthesis process or of the presence of Oxa1p [7]. Mba1p overlaps in function and substrate specificity with Oxa1p. However, they seem to belong to independent export machineries, since the combined absence of Mba1p and the C-terminal RBD of Oxa1p impairs almost completely the insertion of the three subunits of the cytochrome *c* oxidase as well as the cytochrome *b* [7]. Mba1p and Oxa1p seem to coordinate the co-translational membrane insertion specially by positioning of the ribosome and its exit tunnel to the proximity of the place where the actual insertion process occurs [7].

Although Mba1p clearly plays an important role during the insertion of inner membrane proteins in mitochondria of yeast, it is a protein that seems to be conserved only in fungi. However, database searches identified the ribosomal protein L45 (Mrpl45) as a related protein [7]. Mrpl45 was found as a protein present in purifications of mitochondrial ribosomes in animals, and it was observed to be missing in fungi [157]. And although it has been proposed that these two proteins are functional homologs, experimental evidence supporting this idea is still missing [7].

#### **Mdm38p and Ylh47p**

In yeast, two additional homolog proteins have been identified which form stable complexes with mitochondrial ribosomes: Mdm38p and Ylh47p [8]. An *mdm38Δ* strain shows a disrupted mitochondrial network, an apparent swelling of the mitochondria [158], and carries defects in  $K^+$  homeostasis [159]. Recently, it was shown that mitochondria from an *mdm38Δ* strain exhibit a severe reduction in the amounts of cytochrome *b* and Atp6p [8]. This was also reflected in a strong growth defect observed in non-fermentable carbon sources. In the same study, Mdm38p was shown to interact with mitochondrial nascent chains. Consequently it was proposed to function as a component of the mitochondrial export machinery in an Oxa1p-independent pathway [8]. In addition, Mdm38p has been proposed to work as an essential component of the  $K^+/H^+$  exchange system, and the changes observed in the mitochondrial encoded proteins were attributed to be a secondary effect [159, 160]. The role that Ylh47p plays is even more conspicuous than the one of Mdm38p: in the yeast deletion strain, the protein insertion is almost not affected and there is no growth defect observed on non-fermentable carbon sources [8].

The human homolog of Mdm38p and Ylh47p is called LETM1 [159, 161]. It has been identified as one of the possible candidates responsible for the Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS, OMIM 194190), a complex malformation syndrome caused by the deletion of parts of the distal short arm of chromosome 4 [162, 163]. The core characteristics of WHS are growth retardation, microcephaly and mental retardation, epilepsy and cranio-facial dysgenesis. In human mitochondria, *LETM1* is located in the inner membrane, exposed to the matrix, and oligomerized in high molecular weight complexes of unknown composition [158]. Down-regulation of *LETM1* led to fragmentation of the mitochondrial network but was not associated with changes in the levels of respiratory chain complexes. Furthermore, the observed fragmentation was recovered by the ionophore nigericin, which catalyzes the electroneutral exchange of  $K^+$  against  $H^+$ . The analysis of fibroblasts obtained from WHS patients did not resemble the results observed in the cell line where *LETM1* was depleted, therefore the possible role of mutations within this gene during the development of WHS remains to be clarified [158].

#### **Assembly Factors for the OXPHOS Complexes**

Mitochondrial proteomes include much more proteins than those that are encoded in the mitochondrial genome and are translated within the matrix. In *S. cerevisiae* there are between 700 and 800 proteins [164] and in mammalian

**Table 3. Assembly Factors of the Mitochondrial OXPHOS Complexes Known to be Linked to Human Disorders**

Protein name in yeast	OXPHOS complex	Known function in yeast or human	Human homolog	Linked disorders	References
-	I	Assembly chaperone	CIA30	Cardioencephalomyopathy	[201, 202]
-	I	Assembly chaperone	B17.2	Progressive encephalopathy	[200, 201]
Bcs1p	III	ATP dependent chaperone for a pre-Complex III until the assembly of Rieske-FeS protein occurs	BCS1L	Tubulopathy, hepatic involvement and encephalopathy; GRACILE syndrome; Visceral and neurological involvement with lactic acidosis; Björnstad syndrome	[171, 194-199]
Cox10p	IV	Heme A biosynthesis	COX10	Ataxia, tubulopathy and Leukodystrophy; Leigh syndrome; Anemia, sensorineural hearing loss; fatal infantile hypertrophic cardiomyopathy	[190-193]
Cox15p	IV	Heme A biosynthesis	COX15	Leigh syndrome; Fatal infantile hypertrophic cardiomyopathy	[187-189]
Sco1p	IV	Copper metallation of the CuA site in Cox2	SCO1	Hepatic failure and encephalopathy	[182-186]
Sco2p	IV	Copper metabolism and insertion	SCO2	Hypertrophic cardiomyopathy and encephalopathy	[181]
Shy1p	IV	Assembly factor	SURF1	Leigh syndrome	[179, 180]
At12p	V	Formation of dimmers of subunits alpha and beta	ATPAF2	Resembling COFS syndrome	[177, 178]

mitochondria this number increases to 1,500 polypeptides [165]. The vast majority of the mitochondrial proteins are encoded in the nuclear genome, synthesized in the cytosol, and transported post-translationally to the organelle. As a consequence, functional mitochondria are the result of a tightly regulated expression, targeting and assembly of both nuclear and mitochondrial encoded proteins. The mechanisms used by the cytosolic proteins to reach their correct destinations within mitochondria have been studied intensively for a few decades (for reviews see [166-168]). After the sorting has occurred, the proteins should fold and incorporate into their functional complexes. This process occurs by the help of assembly factors, a general group of chaperones that do not belong to the functional complex but are necessary throughout their construction. Each one of the OXPHOS complexes has a very precise course of assembly (for reviews see [169-172]). This implies that even when each of the subunits of one complex are synthesized and inserted correctly, further steps on the assembly line of the complex could occur improperly and result also in some disorder of mitochondrial origin. Table 3 summarizes the assembly factors that have been identified in patients, the disorder linked to them and their identified molecular function.

#### 4. CONCLUDING REMARKS

The correct development of any aerobic organism strongly depends on the mitochondrial OXPHOS. To achieve this, the machineries involved in protein synthesis within the organelle, protein insertion into the inner membrane, and

functional assembly of each of the OXPHOS complexes have to be tightly coordinated. Until now, we owe most of our understanding on these mechanisms on studies made in the model organism *S. cerevisiae*. However the understanding of the mechanisms of human mitochondrial translation and assembly remains far from complete. Further studies in human cell lines, the identification of more patients, and the availability of more efficient protocols for genome sequencing, will increase our knowledge about the mutations that are associated with disorders of mitochondrial origin, in particular as a result of problems with protein synthesis, membrane insertion, and assembly of the OXPHOS complexes.

For example, it will be exciting to explore the mechanisms by which the mitoribosomes locate the translation initiation site within mitochondrial mRNAs, as well as how the mitoribosomes are recycled [173]. Moreover, in the yeast *S. cerevisiae*, mitochondria with reduced or imbalanced translation capacity exhibit increased ROS production, with an impact on chronological lifespan. This establishes a link between ageing and the control of mitochondrial translation [174]. It will be interesting to see whether perturbations in the mitochondrial gene expression, particularly at the level of translation are associated with differences in aging and lifespan in higher organisms [175].

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by research grants (to X.P.M.) from CONACyT (47514) and PAPIIT, Universidad Nacional Autónoma de México (IN215008). SKM is a Finnish

Academy postdoctoral researcher. We are grateful to Michael Zick (University of Munich) for critically reading the manuscript.

## ABBREVIATIONS

5'-UTR	=	5' Untranslated regions
DFNA	=	Autosomal dominant non-syndromic hearing loss
DFNB	=	Autosomal recessive non-syndromic hearing loss
HSP	=	Hereditary spastic paraplegia
LBSL	=	Leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation
MMD	=	Multiple mitochondrial dysfunctions syndrome
MELAS	=	Myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes
MERRF	=	Myoclonic epilepsy associated with ragged-red fibers
MLASA	=	Mitochondrial myopathy, lactic acidosis and sideroblastic anemia
MRPs	=	Mitochondrial ribosomal proteins
mtDNA	=	Mitochondrial DNA
OXPHOS	=	Oxidative phosphorylation
PPR	=	Pentatricopeptide repeat
RBD	=	Ribosome binding domain

## REFERENCES

- Gray, M.W.; Burger, G.; Lang, B.F. Mitochondrial evolution. *Science* **1999**, *283*, 1476-81.
- Anderson, S.; Bankier, A.T.; Barrell, B.G.; de Bruijn, M.H.; Coulson, A.R.; Drouin, J.; Eperon, I.C.; Nierlich, D.P.; Roe, B.A.; Sanger, F.; Schreier, P.H.; Smith, A.J.; Staden, R.; Young, I.G. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **1981**, *290*, 457-65.
- Watson, K. The organization of ribosomal granules within mitochondrial structures of aerobic and anaerobic cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **1972**, *55*, 721-6.
- Liu, M.; Spremulli, L. Interaction of mammalian mitochondrial ribosomes with the inner membrane. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 29400-6.
- Jia, L.; Dienhart, M.; Schramm, M.; McCauley, M.; Hell, K.; Stuart, R.A. Yeast Oxa1 interacts with mitochondrial ribosomes: the importance of the C-terminal region of Oxa1. *Embo J* **2003**, *22*, 6438-47.
- Szyrach, G.; Ott, M.; Bonnefoy, N.; Neupert, W.; Herrmann, J.M. Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria. *Embo J* **2003**, *22*, 6448-57.
- Ott, M.; Prestele, M.; Bauerschmitt, H.; Funes, S.; Bonnefoy, N.; Herrmann, J.M. Mba1, a membrane-associated ribosome receptor in mitochondria. *Embo J* **2006**, *25*, 1603-10.
- Frazier, A.E.; Taylor, R.D.; Mick, D.U.; Warscheid, B.; Stoepel, N.; Meyer, H.E.; Ryan, M.T.; Guiard, B.; Rehling, P. Mdm38 interacts with ribosomes and is a component of the mitochondrial protein export machinery. *J Cell Biol* **2006**, *172*, 553-64.
- Fox, T.D., *Genetics of mitochondrial translation*, in *Translational Control*, J.W.B. Hershey, M.B. Matthews, and N. Sonenberg, Editors. 1996, Cold Spring Harbor Press: Cold Spring Harbor, NY. p. 733-758.
- Towpik, J. Regulation of mitochondrial translation in yeast. *Cell Mol Biol Lett* **2005**, *10*, 571-94.
- Khalimonchuk, O.; Ostermann, K.; Rodel, G. Evidence for the association of yeast mitochondrial ribosomes with Cox11p, a protein required for the Cu(B) site formation of cytochrome c oxidase. *Curr Genet* **2005**, *47*, 223-33.
- Ryan, M.T.; Hoogenraad, N.J. Mitochondrial-nuclear communications. *Annu Rev Biochem* **2007**, *76*, 701-22.
- Rodeheffer, M.S.; Boone, B.E.; Bryan, A.C.; Shadel, G.S. Nam1p, a protein involved in RNA processing and translation, is coupled to transcription through an interaction with yeast mitochondrial RNA polymerase. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 8616-22.
- Naithani, S.; Saracco, S.A.; Butler, C.A.; Fox, T.D. 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* **2003**, *14*, 324-33.
- Wang, Z.; Cotney, J.; Shadel, G.S. Human mitochondrial ribosomal protein MRPL12 interacts directly with mitochondrial RNA polymerase to modulate mitochondrial gene expression. *J Biol Chem* **2007**, *282*, 12610-8.
- Barrell BG, B.A., Drouin J. A different genetic code in human mitochondria. *Nature* **1979**, *282*, 189-194.
- Fearnley, I.M.; Walker, J.E. Initiation codons in mammalian mitochondria: differences in genetic code in the organelle. *Biochemistry* **1987**, *26*, 8247-51.
- Wallace, D.C. The mitochondrial genome in human adaptive radiation and disease: on the road to therapeutics and performance enhancement. *Gene* **2005**, *354*, 169-80.
- Ojala, D.; Montoya, J.; Attardi, G. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* **1981**, *290*, 470-4.
- Moriya, J.; Yokogawa, T.; Wakita, K.; Ueda, T.; Nishikawa, K.; Crain, P.F.; Hashizume, T.; Pomerantz, S.C.; McCloskey, J.A.; Kawai, G.; *et al.* A novel modified nucleoside found at the first position of the anticodon of methionine tRNA from bovine liver mitochondria. *Biochemistry* **1994**, *33*, 2234-9.
- Takemoto, C.; Ueda, T.; Miura, K.; Watanabe, K. Nucleotide sequences of animal mitochondrial tRNAs(Met) possibly recognizing both AUG and AUA codons. *Nucleic Acids Symp Ser* **1999**, *77*-8.
- O'Brien, T.W. Properties of human mitochondrial ribosomes. *IUBMB Life* **2003**, *55*, 505-13.
- Jacobs, H.T.; Turnbull, D.M. Nuclear genes and mitochondrial translation: a new class of genetic disease. *Trends Genet* **2005**, *21*, 312-4.
- Graack, H.R.; Wittmann-Liebold, B. Mitochondrial ribosomal proteins (MRPs) of yeast. *Biochem J* **1998**, *329* ( Pt 3), 433-48.
- Groot, G.S.; Mason, T.L.; Van Harten-Loosbroek, N. Var1 is associated with the small ribosomal subunit of mitochondrial ribosomes in yeast. *Mol Gen Genet* **1979**, *174*, 339-42.
- Terpstra, P.; Butow, R.A. The role of var1 in the assembly of yeast mitochondrial ribosomes. *J Biol Chem* **1979**, *254*, 12662-9.
- Smits, P.; Smeitink, J.A.; van den Heuvel, L.P.; Huynen, M.A.; Ettema, T.J. Reconstructing the evolution of the mitochondrial ribosomal proteome. *Nucleic Acids Res* **2007**, *35*, 4686-703.
- Sharma, M.R.; Koc, E.C.; Datta, P.P.; Booth, T.M.; Spremulli, L.L.; Agrawal, R.K. Structure of the mammalian mitochondrial ribosome reveals an expanded functional role for its component proteins. *Cell* **2003**, *115*, 97-108.
- Kitakawa, M.; Isono, K. The mitochondrial ribosomes. *Biochimie* **1991**, *73*, 813-25.
- Szymanski, M.; Barciszewska, M.Z.; Erdmann, V.A.; Barciszewski, J. 5S Ribosomal RNA Database. *Nucleic Acids Res* **2002**, *30*, 176-8.
- Entelis, N.S.; Kolesnikova, O.A.; Dogan, S.; Martin, R.P.; Tarassov, I.A. 5 S rRNA and tRNA import into human mitochondria. Comparison of *in vitro* requirements. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 45642-53.
- Smirnov, A.; Tarassov, I.; Mager-Heckel, A.M.; Letzelter, M.; Martin, R.P.; Krasheninnikov, I.A.; Entelis, N. Two distinct structural elements of 5S rRNA are needed for its import into human mitochondria. *Rna* **2008**, *14*, 749-59.
- Prezant, T.R.; Agopian, J.V.; Bohman, M.C.; Bu, X.; Oztas, S.; Qiu, W.Q.; Arnos, K.S.; Cortopassi, G.A.; Jaber, L.; Rotter, J.I.; *et al.* Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet* **1993**, *4*, 289-94.

- [34] Hamasaki, K.; Rando, R.R. Specific binding of aminoglycosides to a human rRNA construct based on a DNA polymorphism which causes aminoglycoside-induced deafness. *Biochemistry* **1997**, *36*, 12323-8.
- [35] Zhao, H.; Young, W.Y.; Yan, Q.; Li, R.; Cao, J.; Wang, Q.; Li, X.; Peters, J.L.; Han, D.; Guan, M.X. Functional characterization of the mitochondrial 12S rRNA C1494T mutation associated with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss. *Nucleic Acids Res* **2005**, *33*, 1132-9.
- [36] Hobbie, S.N.; Bruell, C.M.; Akshay, S.; Kalapala, S.K.; Shcherbakov, D.; Bottger, E.C. Mitochondrial deafness alleles confer misreading of the genetic code. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 3244-9.
- [37] Tawata, M.; Ohtaka, M.; Iwase, E.; Ikegishi, Y.; Aida, K.; Onaya, T. New mitochondrial DNA homoplasmic mutations associated with Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes* **1998**, *47*, 276-7.
- [38] Guo, L.J.; Oshida, Y.; Fuku, N.; Takeyasu, T.; Fujita, Y.; Kurata, M.; Sato, Y.; Ito, M.; Tanaka, M. Mitochondrial genome polymorphisms associated with type-2 diabetes or obesity. *Mitochondrion* **2005**, *5*, 15-33.
- [39] Thyagarajan, D.; Bressman, S.; Bruno, C.; Przedborski, S.; Shanske, S.; Lynch, T.; Fahn, S.; DiMauro, S. A novel mitochondrial 12SrRNA point mutation in parkinsonism, deafness, and neuropathy. *Ann Neurol* **2000**, *48*, 730-6.
- [40] Miller, C.; Saada, A.; Shaul, N.; Shabtai, N.; Ben-Shalom, E.; Shaag, A.; Hershkovitz, E.; Elpeleg, O. Defective mitochondrial translation caused by a ribosomal protein (MRPS16) mutation. *Ann Neurol* **2004**, *56*, 734-8.
- [41] Kenmochi, N.; Suzuki, T.; Uechi, T.; Magoori, M.; Kuniba, M.; Higa, S.; Watanabe, K.; Tanaka, T. The human mitochondrial ribosomal protein genes: mapping of 54 genes to the chromosomes and implications for human disorders. *Genomics* **2001**, *77*, 65-70.
- [42] O'Brien, T.W.; O'Brien, B.J.; Norman, R.A. Nuclear MRP genes and mitochondrial disease. *Gene* **2005**, *354*, 147-51.
- [43] Sylvester, J.E.; Fischel-Ghodsian, N.; Mougey, E.B.; O'Brien, T.W. Mitochondrial ribosomal proteins: candidate genes for mitochondrial disease. *Genet Med* **2004**, *6*, 73-80.
- [44] Casari, G.; De Fusco, M.; Ciarmatori, S.; Zeviani, M.; Mora, M.; Fernandez, P.; De Michele, G.; Filla, A.; Coccozza, S.; Marconi, R.; Durr, A.; Fontaine, B.; Ballabio, A. Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. *Cell* **1998**, *93*, 973-83.
- [45] Rugarli, E.I.; Langer, T. Translating m-AAA protease function in mitochondria to hereditary spastic paraplegia. *Trends Mol Med* **2006**, *12*, 262-9.
- [46] Nolden, M.; Ehses, S.; Koppen, M.; Bernacchia, A.; Rugarli, E.I.; Langer, T. The m-AAA protease defective in hereditary spastic paraplegia controls ribosome assembly in mitochondria. *Cell* **2005**, *123*, 277-89.
- [47] Cavdar Koc, E.; Ranasinghe, A.; Burkhart, W.; Blackburn, K.; Koc, H.; Moseley, A.; Spremulli, L.L. A new face on apoptosis: death-associated protein 3 and PDCD9 are mitochondrial ribosomal proteins. *FEBS Lett* **2001**, *492*, 166-70.
- [48] Spirina, O.; Bykhovskaya, Y.; Kajava, A.V.; O'Brien, T.W.; Nierlich, D.P.; Mougey, E.B.; Sylvester, J.E.; Graack, H.R.; Wittmann-Liebold, B.; Fischel-Ghodsian, N. Heart-specific splice-variant of a human mitochondrial ribosomal protein (mRNA processing; tissue specific splicing). *Gene* **2000**, *261*, 229-34.
- [49] Barrell, B.G.; Anderson, S.; Bankier, A.T.; de Bruijn, M.H.; Chen, E.; Coulson, A.R.; Drouin, J.; Eperon, I.C.; Nierlich, D.P.; Roe, B.A.; Sanger, F.; Schreier, P.H.; Smith, A.J.; Staden, R.; Young, I.G. Different pattern of codon recognition by mammalian mitochondrial tRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1980**, *77*, 3164-6.
- [50] Suzuki, T.; Suzuki, T.; Wada, T.; Saigo, K.; Watanabe, K. Taurine as a constituent of mitochondrial tRNAs: new insights into the functions of taurine and human mitochondrial diseases. *Embo J* **2002**, *21*, 6581-9.
- [51] Kirino, Y.; Yasukawa, T.; Ohta, S.; Akira, S.; Ishihara, K.; Watanabe, K.; Suzuki, T. Codon-specific translational defect caused by a wobble modification deficiency in mutant tRNA from a human mitochondrial disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101*, 15070-5.
- [52] Helm, M.; Brule, H.; Friede, D.; Giege, R.; Putz, D.; Florentz, C. Search for characteristic structural features of mammalian mitochondrial tRNAs. *Rna* **2000**, *6*, 1356-79.
- [53] Wittenhagen, L.M.; Kelley, S.O. Impact of disease-related mitochondrial mutations on tRNA structure and function. *Trends Biochem Sci* **2003**, *28*, 605-11.
- [54] Scaglia, F.; Wong, L.J. Human mitochondrial transfer RNAs: role of pathogenic mutation in disease. *Muscle Nerve* **2008**, *37*, 150-71.
- [55] Majamaa, K.; Moilanen, J.S.; Uimonen, S.; Remes, A.M.; Salmela, P.I.; Karppa, M.; Majamaa-Voltti, K.A.; Rusanen, H.; Sorri, M.; Peuhkurinen, K.J.; Hassinen, I.E. Epidemiology of A3243G, the mutation for mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes: prevalence of the mutation in an adult population. *Am J Hum Genet* **1998**, *63*, 447-54.
- [56] Andrews, R.M.; Kubacka, I.; Chinnery, P.F.; Lightowlers, R.N.; Turnbull, D.M.; Howell, N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* **1999**, *23*, 147.
- [57] Ravn, K.; Wibrand, F.; Hansen, F.J.; Horn, N.; Rosenberg, T.; Schwartz, M. An mtDNA mutation, 14453G-->A, in the NADH dehydrogenase subunit 6 associated with severe MELAS syndrome. *Eur J Hum Genet* **2001**, *9*, 805-9.
- [58] Hess, J.F.; Parisi, M.A.; Bennett, J.L.; Clayton, D.A. Impairment of mitochondrial transcription termination by a point mutation associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* **1991**, *351*, 236-9.
- [59] El Meziane, A.; Lehtinen, S.K.; Hance, N.; Nijtmans, L.G.; Dunbar, D.; Holt, I.J.; Jacobs, H.T. A tRNA suppressor mutation in human mitochondria. *Nat Genet* **1998**, *18*, 350-3.
- [60] Flierl, A.; Reichmann, H.; Seibel, P. Pathophysiology of the MELAS 3243 transition mutation. *J Biol Chem* **1997**, *272*, 27189-96.
- [61] Chomyn, A.; Enriquez, J.A.; Micol, V.; Fernandez-Silva, P.; Attardi, G. The mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episode syndrome-associated human mitochondrial tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) mutation causes aminoacylation deficiency and concomitant reduced association of mRNA with ribosomes. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 19198-209.
- [62] Wittenhagen, L.M.; Kelley, S.O. Dimerization of a pathogenic human mitochondrial tRNA. *Nat Struct Biol* **2002**, *9*, 586-90.
- [63] Maassen, J.A.; Janssen, G.M.; t Hart, L.M. Molecular mechanisms of mitochondrial diabetes (MIDD). *Ann Med* **2005**, *37*, 213-21.
- [64] Kirino, Y.; Yasukawa, T.; Marjavaara, S.K.; Jacobs, H.T.; Holt, I.J.; Watanabe, K.; Suzuki, T. Acquisition of the wobble modification in mitochondrial tRNA<sup>Leu</sup>(CUN) bearing the G12300A mutation suppresses the MELAS molecular defect. *Hum Mol Genet* **2006**, *15*, 897-904.
- [65] Shoffner, J.M.; Lott, M.T.; Lezza, A.M.; Seibel, P.; Ballinger, S.W.; Wallace, D.C. Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell* **1990**, *61*, 931-7.
- [66] Enriquez, J.A.; Chomyn, A.; Attardi, G. MtDNA mutation in MERRF syndrome causes defective aminoacylation of tRNA(Lys) and premature translation termination. *Nat Genet* **1995**, *10*, 47-55.
- [67] Hammans, S.R.; Sweeney, M.G.; Brockington, M.; Lennox, G.G.; Lawton, N.F.; Kennedy, C.R.; Morgan-Hughes, J.A.; Harding, A.E. The mitochondrial DNA transfer RNA(Lys)A-->G(8344) mutation and the syndrome of myoclonic epilepsy with ragged red fibres (MERRF). Relationship of clinical phenotype to proportion of mutant mitochondrial DNA. *Brain* **1993**, *116* (Pt 3), 617-32.
- [68] Casas, K.; Bykhovskaya, Y.; Mengesha, E.; Wang, D.; Yang, H.; Taylor, K.; Inbal, A.; Fischel-Ghodsian, N. Gene responsible for mitochondrial myopathy and sideroblastic anemia (MSA) maps to chromosome 12q24.33. *Am J Med Genet A* **2004**, *127*, 44-9.
- [69] Xing, G.; Chen, Z.; Cao, X. Mitochondrial rRNA and tRNA and hearing function. *Cell Res* **2007**, *17*, 227-39.
- [70] t Hart, L.M.; Hansen, T.; Rietveld, I.; Dekker, J.M.; Nijpels, G.; Janssen, G.M.; Arp, P.A.; Uitterlinden, A.G.; Jorgensen, T.; Borch-Johnsen, K.; Pols, H.A.; Pedersen, O.; van Duijn, C.M.; Heine, R.J.; Maassen, J.A. Evidence that the mitochondrial leucyl tRNA synthetase (LARS2) gene represents a novel type 2 diabetes susceptibility gene. *Diabetes* **2005**, *54*, 1892-5.
- [71] Edvardson, S.; Shaag, A.; Kolesnikova, O.; Gomori, J.M.; Tarassov, I.; Einbinder, T.; Saada, A.; Elpeleg, O. Deleterious mutation in the mitochondrial arginyl-transfer RNA synthetase

- gene is associated with pontocerebellar hypoplasia. *Am J Hum Genet* **2007**, *81*, 857-62.
- [72] Scheper, G.C.; van der Kloot, T.; van Andel, R.J.; van Berkel, C.G.; Sissler, M.; Smet, J.; Muravina, T.I.; Serkov, S.V.; Uziel, G.; Bugiani, M.; Schiffmann, R.; Krageloh-Mann, I.; Smeitink, J.A.; Florentz, C.; Van Coster, R.; Pronk, J.C.; van der Knaap, M.S. Mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase deficiency causes leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation. *Nat Genet* **2007**, *39*, 534-9.
- [73] Laursen, B.S.; Sorensen, H.P.; Mortensen, K.K.; Sperling-Petersen, H.U. Initiation of protein synthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **2005**, *69*, 101-23.
- [74] Liao, H.X.; Spremulli, L.L. Initiation of protein synthesis in animal mitochondria. Purification and characterization of translational initiation factor 2. *J Biol Chem* **1991**, *266*, 20714-9.
- [75] Liao, H.X.; Spremulli, L.L. Identification and initial characterization of translational initiation factor 2 from bovine mitochondria. *J Biol Chem* **1990**, *265*, 13618-22.
- [76] Koc, E.C.; Spremulli, L.L. Identification of mammalian mitochondrial translational initiation factor 3 and examination of its role in initiation complex formation with natural mRNAs. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 35541-9.
- [77] Gaur, R.; Grasso, D.; Datta, P.P.; Krishna, P.D.; Das, G.; Spencer, A.; Agrawal, R.K.; Spremulli, L.; Varshney, U. A single mammalian mitochondrial translation initiation factor functionally replaces two bacterial factors. *Mol Cell* **2008**, *29*, 180-90.
- [78] Spencer, A.C.; Spremulli, L.L. The interaction of mitochondrial translational initiation factor 2 with the small ribosomal subunit. *Biochim Biophys Acta* **2005**, *1750*, 69-81.
- [79] Vambutas, A.; Ackerman, S.H.; Tzagoloff, A. Mitochondrial translational-initiation and elongation factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **1991**, *201*, 643-52.
- [80] Garofalo, C.; Kramer, G.; Appling, D.R. Characterization of the C2 subdomain of yeast mitochondrial initiation factor 2. *Arch Biochem Biophys* **2005**, *439*, 113-20.
- [81] Garofalo, C.; Trinko, R.; Kramer, G.; Appling, D.R.; Hardesty, B. Purification and characterization of yeast mitochondrial initiation factor 2. *Arch Biochem Biophys* **2003**, *413*, 243-52.
- [82] Williams, E.H.; Butler, C.A.; Bonnefoy, N.; Fox, T.D. Translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria: functional interactions among mitochondrial ribosomal protein Rsm28p, initiation factor 2, methionyl-tRNA-formyltransferase and novel protein Rmd9p. *Genetics* **2007**, *175*, 1117-26.
- [83] Haque, M.E.; Grasso, D.; Spremulli, L.L. The interaction of mammalian mitochondrial translational initiation factor 3 with ribosomes: evolution of terminal extensions in IF3mt. *Nucleic Acids Res* **2008**, *36*, 589-97.
- [84] Bhargava, K.; Spremulli, L.L. Role of the N- and C-terminal extensions on the activity of mammalian mitochondrial translational initiation factor 3. *Nucleic Acids Res* **2005**, *33*, 7011-8.
- [85] Jones, C.N.; Wilkinson, K.A.; Hung, K.T.; Weeks, K.M.; Spremulli, L.L. Lack of secondary structure characterizes the 5' ends of mammalian mitochondrial mRNAs. *Rna* **2008**.
- [86] Haffter, P.; McMullin, T.W.; Fox, T.D. Functional interactions among two yeast mitochondrial ribosomal proteins and an mRNA-specific translational activator. *Genetics* **1991**, *127*, 319-26.
- [87] Krause-Buchholz, U.; Schobel, K.; Lauffer, S.; Rodel, G. *Saccharomyces cerevisiae* translational activator Cbs1p is associated with translationally active mitochondrial ribosomes. *Biol Chem* **2005**, *386*, 407-15.
- [88] Michaelis, U.; Korte, A.; Rodel, G. Association of cytochrome b translational activator proteins with the mitochondrial membrane: implications for cytochrome b expression in yeast. *Mol Gen Genet* **1991**, *230*, 177-85.
- [89] Sanchirico, M.E.; Fox, T.D.; Mason, T.L. Accumulation of mitochondrially synthesized *Saccharomyces cerevisiae* Cox2p and Cox3p depends on targeting information in untranslated portions of their mRNAs. *Embo J* **1998**, *17*, 5796-804.
- [90] Zeng, X.; Hourset, A.; Tzagoloff, A. The *Saccharomyces cerevisiae* ATP22 gene codes for the mitochondrial ATPase subunit 6-specific translation factor. *Genetics* **2007**, *175*, 55-63.
- [91] Costanzo, M.C.; Bonnefoy, N.; Williams, E.H.; Clark-Walker, G.D.; Fox, T.D. Highly diverged homologs of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial mRNA-specific translational activators have orthologous functions in other budding yeasts. *Genetics* **2000**, *154*, 999-1012.
- [92] Dieckmann, C.L.; Tzagoloff, A. Assembly of the mitochondrial membrane system. CBP6, a yeast nuclear gene necessary for synthesis of cytochrome b. *J Biol Chem* **1985**, *260*, 1513-20.
- [93] Perez-Martinez, X.; Broadley, S.A.; Fox, T.D. Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. *Embo J* **2003**, *22*, 5951-61.
- [94] Barrientos, A.; Zambrano, A.; Tzagoloff, A. Mss51p and Cox14p jointly regulate mitochondrial Cox1p expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **2004**, *23*, 3472-82.
- [95] Pierrel, F.; Bestwick, M.L.; Cobine, P.A.; Khalimonchuk, O.; Cricco, J.A.; Winge, D.R. Coal links the Mss51 post-translational function to Cox1 cofactor insertion in cytochrome c oxidase assembly. *Embo J* **2007**, *26*, 4335-46.
- [96] Mick, D.U.; Wagner, K.; van der Laan, M.; Frazier, A.E.; Perschil, I.; Pawlas, M.; Meyer, H.E.; Warscheid, B.; Rehling, P. Shy1 couples Cox1 translational regulation to cytochrome c oxidase assembly. *Embo J* **2007**, *26*, 4347-58.
- [97] Lurin, C.; Andres, C.; Aubourg, S.; Bellaoui, M.; Bitton, F.; Bruyere, C.; Caboche, M.; Debast, C.; Gualberto, J.; Hoffmann, B.; Leclarny, A.; Le Ret, M.; Martin-Magniette, M.L.; Mireau, H.; Peeters, N.; Renou, J.P.; Szurek, B.; Taconnat, L.; Small, I. Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* **2004**, *16*, 2089-103.
- [98] Saha, D.; Prasad, A.M.; Srinivasan, R. Pentatricopeptide repeat proteins and their emerging roles in plants. *Plant Physiol Biochem* **2007**, *45*, 521-34.
- [99] Small, I.D.; Peeters, N. The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem Sci* **2000**, *25*, 46-7.
- [100] Tavares-Carreón, F.; Camacho-Villasana, Y.; Zamudio-Ochoa, A.; Shingu-Vazquez, M.; Torres-Larios, A.; Perez-Martinez, X. The pentatricopeptide repeats present in Pet309 are necessary for translation but not for stability of the mitochondrial COX1 mRNA in yeast. *J Biol Chem* **2008**, *283*, 1472-9.
- [101] Koc, E.C.; Spremulli, L.L. RNA-binding proteins of mammalian mitochondria. *Mitochondrion* **2003**, *2*, 277-91.
- [102] Maslov, D.A.; Spremulli, L.L.; Sharma, M.R.; Bhargava, K.; Grasso, D.; Falick, A.M.; Agrawal, R.K.; Parker, C.E.; Simpson, L. Proteomics and electron microscopic characterization of the unusual mitochondrial ribosome-related 45S complex in *Leishmania tarentolae*. *Mol Biochem Parasitol* **2007**, *152*, 203-12.
- [103] Pusnik, M.; Small, I.; Read, L.K.; Fabbro, T.; Schneider, A. Pentatricopeptide repeat proteins in *Trypanosoma brucei* function in mitochondrial ribosomes. *Mol Cell Biol* **2007**, *27*, 6876-88.
- [104] Uyttewaal, M.; Mireau, H.; Rurek, M.; Hammani, K.; Arnal, N.; Quadrado, M.; Giege, P. PPR336 is associated with polysomes in plant mitochondria. *J Mol Biol* **2008**, *375*, 626-36.
- [105] Coffin, J.W.; Dhillon, R.; Ritzel, R.G.; Nargang, F.E. The *Neurospora crassa* cya-5 nuclear gene encodes a protein with a region of homology to the *Saccharomyces cerevisiae* PET309 protein and is required in a post-transcriptional step for the expression of the mitochondrially encoded COX1 protein. *Curr Genet* **1997**, *32*, 273-80.
- [106] Manthey, G.M.; McEwen, J.E. 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* **1995**, *14*, 4031-43.
- [107] 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.; Lander, E.S. Identification of a gene causing human cytochrome c oxidase deficiency by integrative genomics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100*, 605-10.
- [108] Mili, S.; Pinol-Roma, S. LRP130, a pentatricopeptide motif protein with a noncanonical RNA-binding domain, is bound *in vivo* to mitochondrial and nuclear RNAs. *Mol Cell Biol* **2003**, *23*, 4972-82.
- [109] Xu, F.; Morin, C.; Mitchell, G.; Ackerley, C.; Robinson, B.H. The role of the LRPPRC (leucine-rich pentatricopeptide repeat cassette) gene in cytochrome oxidase assembly: mutation causes lowered levels of COX (cytochrome c oxidase) I and COX III mRNA. *Biochem J* **2004**, *382*, 331-6.

- [110] Valente, E.M.; Salvi, S.; Ialongo, T.; Marongiu, R.; Elia, A.E.; Caputo, V.; Romito, L.; Albanese, A.; Dallapiccola, B.; Bentivoglio, A.R. PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* **2004**, *56*, 336-41.
- [111] Abahuni, N.; Gispert, S.; Bauer, P.; Riess, O.; Kruger, R.; Becker, T.; Auburger, G. Mitochondrial translation initiation factor 3 gene polymorphism associated with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* **2007**, *414*, 126-9.
- [112] Wells, J.; Henkler, F.; Leversha, M.; Koshy, R. A mitochondrial elongation factor-like protein is over-expressed in tumours and differentially expressed in normal tissues. *FEBS Lett* **1995**, *358*, 119-25.
- [113] Worix, V.L.; Burkhart, W.; Spremulli, L.L. Cloning, sequence analysis and expression of mammalian mitochondrial protein synthesis elongation factor Tu. *Biochim Biophys Acta* **1995**, *1264*, 347-56.
- [114] Ling, M.; Merante, F.; Chen, H.S.; Duff, C.; Duncan, A.M.; Robinson, B.H. The human mitochondrial elongation factor tu (EF-Tu) gene: cDNA sequence, genomic localization, genomic structure, and identification of a pseudogene. *Gene* **1997**, *197*, 325-36.
- [115] Xin, H.; Worix, V.; Burkhart, W.; Spremulli, L.L. Cloning and expression of mitochondrial translational elongation factor Ts from bovine and human liver. *J Biol Chem* **1995**, *270*, 17243-9.
- [116] Chung, H.K.; Spremulli, L.L. Purification and characterization of elongation factor G from bovine liver mitochondria. *J Biol Chem* **1990**, *265*, 21000-4.
- [117] Worix, V.L.; Bullard, J.M.; Ma, L.; Yokogawa, T.; Spremulli, L.L. Mechanistic studies of the translational elongation cycle in mammalian mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1997**, *1352*, 91-101.
- [118] Schwartzbach, C.J.; Spremulli, L.L. Bovine mitochondrial protein synthesis elongation factors. Identification and initial characterization of an elongation factor Tu-elongation factor Ts complex. *J Biol Chem* **1989**, *264*, 19125-31.
- [119] Jeppesen, M.G.; Navratil, T.; Spremulli, L.L.; Nyborg, J. Crystal structure of the bovine mitochondrial elongation factor Tu-Ts complex. *J Biol Chem* **2005**, *280*, 5071-81.
- [120] Nagata, S.; Tsunetsugu-Yokota, Y.; Naito, A.; Kaziro, Y. Molecular cloning and sequence determination of the nuclear gene coding for mitochondrial elongation factor Tu of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1983**, *80*, 6192-6.
- [121] Rosenthal, L.P.; Bodley, J.W. Purification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial elongation factor Tu. *J Biol Chem* **1987**, *262*, 10955-9.
- [122] Chiron, S.; Suleau, A.; Bonnefoy, N. Mitochondrial translation: elongation factor tu is essential in fission yeast and depends on an exchange factor conserved in humans but not in budding yeast. *Genetics* **2005**, *169*, 1891-901.
- [123] Suzuki, H.; Ueda, T.; Taguchi, H.; Takeuchi, N. Chaperone properties of mammalian mitochondrial translation elongation factor Tu. *J Biol Chem* **2007**, *282*, 4076-84.
- [124] Caldas, T.D.; El Yaagoubi, A.; Richarme, G. Chaperone properties of bacterial elongation factor EF-Tu. *J Biol Chem* **1998**, *273*, 11478-82.
- [125] Rao, D.; Momcilovic, I.; Kobayashi, S.; Callegari, E.; Ristic, Z. Chaperone activity of recombinant maize chloroplast protein synthesis elongation factor, EF-Tu. *Eur J Biochem* **2004**, *271*, 3684-92.
- [126] Hotokezaka, Y.; Tobben, U.; Hotokezaka, H.; Van Leyen, K.; Beatrix, B.; Smith, D.H.; Nakamura, T.; Wiedmann, M. Interaction of the eukaryotic elongation factor 1A with newly synthesized polypeptides. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 18545-51.
- [127] Hammarsund, M.; Wilson, W.; Corcoran, M.; Merup, M.; Einhorn, S.; Grand, D.; Sangfelt, O. Identification and characterization of two novel human mitochondrial elongation factor genes, hEFG2 and hEFG1, phylogenetically conserved through evolution. *Hum Genet* **2001**, *109*, 542-50.
- [128] Caldas, T.; Laalami, S.; Richarme, G. Chaperone properties of bacterial elongation factor EF-G and initiation factor IF2. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 855-60.
- [129] Smeitink, J.A.; Elpeleg, O.; Antonicka, H.; Diepstra, H.; Saada, A.; Smits, P.; Sasarman, F.; Vriend, G.; Jacob-Hirsch, J.; Shaag, A.; Rechavi, G.; Wellng, B.; Horst, J.; Rodenburg, R.J.; van den Heuvel, B.; Shoubridge, E.A. Distinct clinical phenotypes associated with a mutation in the mitochondrial translation elongation factor EFTs. *Am J Hum Genet* **2006**, *79*, 869-77.
- [130] Valente, L.; Tiranti, V.; Marsano, R.M.; Malfatti, E.; Fernandez-Vizarra, E.; Donnini, C.; Mereghetti, P.; De Gioia, L.; Burlina, A.; Castellan, C.; Comi, G.P.; Savasta, S.; Ferrero, I.; Zeviani, M. Infantile encephalopathy and defective mitochondrial DNA translation in patients with mutations of mitochondrial elongation factors EFG1 and EFTu. *Am J Hum Genet* **2007**, *80*, 44-58.
- [131] Coenen, M.J.; Antonicka, H.; Ugalde, C.; Sasarman, F.; Rossi, R.; Heister, J.G.; Newbold, R.F.; Trijbels, F.J.; van den Heuvel, L.P.; Shoubridge, E.A.; Smeitink, J.A. Mutant mitochondrial elongation factor G1 and combined oxidative phosphorylation deficiency. *N Engl J Med* **2004**, *351*, 2080-6.
- [132] Antonicka, H.; Sasarman, F.; Kennaway, N.G.; Shoubridge, E.A. The molecular basis for tissue specificity of the oxidative phosphorylation deficiencies in patients with mutations in the mitochondrial translation factor EFG1. *Hum Mol Genet* **2006**, *15*, 1835-46.
- [133] Soleimanpour-Lichaei, H.R.; Kuhl, I.; Gaisne, M.; Passos, J.F.; Wydro, M.; Rorbach, J.; Temperley, R.; Bonnefoy, N.; Tate, W.; Lightowlers, R.; Chrzanowska-Lightowlers, Z. mTRF1a is a human mitochondrial translation release factor decoding the major termination codons UAA and UAG. *Mol Cell* **2007**, *27*, 745-57.
- [134] Zhang, Y.; Spremulli, L.L. Identification and cloning of human mitochondrial translational release factor 1 and the ribosome recycling factor. *Biochim Biophys Acta* **1998**, *1443*, 245-50.
- [135] Pel, H.J.; Maat, C.; Rep, M.; Grivell, L.A. The yeast nuclear gene MRF1 encodes a mitochondrial peptide chain release factor and cures several mitochondrial RNA splicing defects. *Nucleic Acids Res* **1992**, *20*, 6339-46.
- [136] Towpik, J.; Chacinska, A.; Ciesla, M.; Ginalski, K.; Boguta, M. Mutations in the yeast mrf1 gene encoding mitochondrial release factor inhibit translation on mitochondrial ribosomes. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 14096-103.
- [137] Teyssier, E.; Hirokawa, G.; Tretiakova, A.; Jameson, B.; Kaji, A.; Kaji, H. Temperature-sensitive mutation in yeast mitochondrial ribosome recycling factor (RRF). *Nucleic Acids Res* **2003**, *31*, 4218-26.
- [138] Glick, B.S.; von Heijne, G. *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria lack a bacterial-type Sec machinery. *Protein Science* **1996**, *5*, 2651-2652.
- [139] Herrmann, J.M. Converting bacteria to organelles: evolution of mitochondrial protein sorting. *Trends Microbiol* **2003**, *11*, 74-9.
- [140] Sevarino, K.A.; Poyton, R.O. Mitochondrial membrane biogenesis: identification of a precursor to yeast cytochrome c oxidase subunit II, an integral polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1980**, *77*, 142-6.
- [141] Bauer, M.; Behrens, M.; Esser, K.; Michaelis, G.; Pratje, E. PET1402, a nuclear gene required for proteolytic processing of cytochrome oxidase subunit 2 in yeast. *Mol Gen Genet* **1994**, *245*, 272-8.
- [142] Bonnefoy, N.; Chalvet, F.; Hamel, P.; Slonimski, P.P.; Dujardin, G. OXA1, a *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene whose sequence is conserved from prokaryotes to eukaryotes controls cytochrome oxidase biogenesis. *J Mol Biol* **1994**, *239*, 201-12.
- [143] Yen, M.R.; Harley, K.T.; Tseng, Y.H.; Saier, M.H., Jr. Phylogenetic and structural analyses of the oxal family of protein translocases. *FEMS Microbiol Lett* **2001**, *204*, 223-31.
- [144] Luirink, J.; Samuelsson, T.; de Gier, J.W. YidC/Oxa1p/Alb3: evolutionarily conserved mediators of membrane protein assembly. *FEBS Lett* **2001**, *501*, 1-5.
- [145] He, S.; Fox, T.D. Membrane translocation of mitochondrially coded Cox2p: distinct requirements for export of N and C termini and dependence on the conserved protein Oxa1p. *Mol Biol Cell* **1997**, *8*, 1449-60.
- [146] Hell, K.; Herrmann, J.M.; Pratje, E.; Neupert, W.; Stuart, R.A. Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, *95*, 2250-5.
- [147] Hell, K.; Neupert, W.; Stuart, R.A. Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. *Embo J* **2001**, *20*, 1281-8.
- [148] Nargang, F.E.; Preuss, M.; Neupert, W.; Herrmann, J.M. The Oxa1 protein forms a homooligomeric complex and is an essential part of the mitochondrial export translocase in *Neurospora crassa*. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 12846-53.

- [149] Herrmann, J.M.; Neupert, W.; Stuart, R.A. Insertion into the mitochondrial inner membrane of a polytopic protein, the nuclear-encoded Oxa1p. *Embo J* **1997**, *16*, 2217-26.
- [150] Preuss, M.; Ott, M.; Funes, S.; Luirink, J.; Herrmann, J.M. Evolution of mitochondrial oxa proteins from bacterial YidC. Inherited and acquired functions of a conserved protein insertion machinery. *J Biol Chem* **2005**, *280*, 13004-11.
- [151] Lemaire, C.; Hamel, P.; Velours, J.; Dujardin, G. Absence of the mitochondrial AAA protease Yme1p restores F0-ATPase subunit accumulation in an oxal deletion mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 23471-5.
- [152] Jia, L.; Dienhart, M.K.; Stuart, R.A. Oxa1 directly interacts with Atp9 and mediates its assembly into the mitochondrial F1Fo-ATP synthase complex. *Mol Biol Cell* **2007**, *18*, 1897-908.
- [153] Coenen, M.J.; Smeitink, J.A.; Smeets, R.; Trijbels, F.J.; van den Heuvel, L.P. Mutation detection in four candidate genes (OXAL1, MRS2L, YME1L and MIPEP) for combined deficiencies in the oxidative phosphorylation system. *J Inherit Metab Dis* **2005**, *28*, 1091-7.
- [154] Stiburek, L.; Fornuskova, D.; Wenchich, L.; Pejznochova, M.; Hansikova, H.; Zeman, J. Knockdown of human Oxa11 impairs the biogenesis of F1Fo-ATP synthase and NADH:ubiquinone oxidoreductase. *J Mol Biol* **2007**, *374*, 506-16.
- [155] Preuss, M.; Leonhard, K.; Hell, K.; Stuart, R.A.; Neupert, W.; Herrmann, J.M. Mba1, a novel component of the mitochondrial protein export machinery of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **2001**, *153*, 1085-96.
- [156] Rep, M.; Nooy, J.; Guelin, E.; Grivell, L.A. Three genes for mitochondrial proteins suppress null-mutations in both Afg3 and Rca1 when over-expressed. *Curr Genet* **1996**, *30*, 206-11.
- [157] Koc, E.C.; Burkhardt, W.; Blackburn, K.; Moyer, M.B.; Schlatter, D.M.; Moseley, A.; Spremulli, L.L. The large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. Analysis of the complement of ribosomal proteins present. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 43958-69.
- [158] Dimmer, K.S.; Navoni, F.; Casarin, A.; Trevisson, E.; Endeles, S.; Winterpacht, A.; Salviati, L.; Scorrano, L. LETM1, deleted in Wolf-Hirschhorn syndrome is required for normal mitochondrial morphology and cellular viability. *Hum Mol Genet* **2008**, *17*, 201-14.
- [159] Nowikovsky, K.; Froschauer, E.M.; Zsurka, G.; Samaj, J.; Reipert, S.; Kolisek, M.; Wiesenberger, G.; Schweyen, R.J. The LETM1/YOL027 gene family encodes a factor of the mitochondrial K<sup>+</sup> homeostasis with a potential role in the Wolf-Hirschhorn syndrome. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 30307-15.
- [160] Nowikovsky, K.; Reipert, S.; Devenish, R.J.; Schweyen, R.J. Mdm38 protein depletion causes loss of mitochondrial K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange activity, osmotic swelling and mitophagy. *Cell Death Differ* **2007**, *14*, 1647-56.
- [161] Schlickum, S.; Moghekar, A.; Simpson, J.C.; Steglich, C.; O'Brien, R.J.; Winterpacht, A.; Endeles, S.U. LETM1, a gene deleted in Wolf-Hirschhorn syndrome, encodes an evolutionarily conserved mitochondrial protein. *Genomics* **2004**, *83*, 254-61.
- [162] Wilson, M.G.; Towner, J.W.; Negus, L.D. Wolf-Hirschhorn syndrome associated with an unusual abnormality of chromosome no. 4. *J Med Genet* **1970**, *7*, 164-70.
- [163] Endeles, S.; Fuhry, M.; Pak, S.J.; Zabel, B.U.; Winterpacht, A. LETM1, a novel gene encoding a putative EF-hand Ca<sup>2+</sup>-binding protein, flanks the Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS) critical region and is deleted in most WHS patients. *Genomics* **1999**, *60*, 218-25.
- [164] Sickmann, A.; Reinders, J.; Wagner, Y.; Joppich, C.; Zahedi, R.; Meyer, H.E.; Schonfisch, B.; Perschil, I.; Chacinska, A.; Guiard, B.; Rehling, P.; Pfanner, N.; Meisinger, C. The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100*, 13207-12.
- [165] Mootha, V.K.; Bunkenborg, J.; Olsen, J.V.; Hjerrild, M.; Wisniewski, J.R.; Stahl, E.; Bolouri, M.S.; Ray, H.N.; Sihag, S.; Kamal, M.; Patterson, N.; Lander, E.S.; Mann, M. Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. *Cell* **2003**, *115*, 629-40.
- [166] Dolezal, P.; Likic, V.; Tachezy, J.; Lithgow, T. Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. *Science* **2006**, *313*, 314-8.
- [167] van der Laan, M.; Rissler, M.; Rehling, P. Mitochondrial preprotein translocases as dynamic molecular machines. *FEMS Yeast Res* **2006**, *6*, 849-61.
- [168] Neupert, W.; Herrmann, J.M. Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem* **2007**, *76*, 723-49.
- [169] Herrmann, J.M.; Funes, S. Biogenesis of cytochrome oxidase-sophisticated assembly lines in the mitochondrial inner membrane. *Gene* **2005**, *354*, 43-52.
- [170] Pickova, A.; Potocky, M.; Houstek, J. Assembly factors of F1Fo-ATP synthase across genomes. *Proteins* **2005**, *59*, 393-402.
- [171] Fernandez-Vizarra, E.; Bugiani, M.; Goffrini, P.; Carrara, F.; Farina, L.; Procopio, E.; Donati, A.; Uziel, G.; Ferrero, I.; Zeviani, M. Impaired complex III assembly associated with BCS1L gene mutations in isolated mitochondrial encephalopathy. *Hum Mol Genet* **2007**, *16*, 1241-52.
- [172] Vogel, R.O.; Smeitink, J.A.; Nijtmans, L.G. Human mitochondrial complex I assembly: a dynamic and versatile process. *Biochim Biophys Acta* **2007**, *1767*, 1215-27.
- [173] Rorbach, J.; Soleimanpour-Lichaei, R.; Lightowlers, R.N.; Chrzanoska-Lightowlers, Z.M. How do mammalian mitochondria synthesize proteins? *Biochem Soc Trans* **2007**, *35*, 1290-1.
- [174] Bonawitz, N.D.; Rodeheffer, M.S.; Shadel, G.S. Defective mitochondrial gene expression results in reactive oxygen species-mediated inhibition of respiration and reduction of yeast life span. *Mol Cell Biol* **2006**, *26*, 4818-29.
- [175] Bonawitz, N.D.; Shadel, G.S. Rethinking the mitochondrial theory of aging: the role of mitochondrial gene expression in lifespan determination. *Cell Cycle* **2007**, *6*, 1574-8.
- [176] Gaeveer, G.; Chu, A.M.; Ni, L.; Connelly, C.; Riles, L.; Veronneau, S.; Dow, S.; Lucau-Danila, A.; Anderson, K.; Andre, B.; Arkin, A.P.; Astromoff, A.; El-Bakkoury, M.; Bangham, R.; Benito, R.; Brachat, S.; Campanaro, S.; Curtiss, M.; Davis, K.; Deutschbauer, A.; Entian, K.D.; Flaherty, P.; Foury, F.; Garfinkel, D.J.; Gerstein, M.; Gotte, D.; Guldener, U.; Hegemann, J.H.; Hempel, S.; Herman, Z.; Jaramillo, D.F.; Kelly, D.E.; Kelly, S.L.; Kotter, P.; LaBonte, D.; Lamb, D.C.; Lan, N.; Liang, H.; Liao, H.; Liu, L.; Luo, C.; Lussier, M.; Mao, R.; Menard, P.; Ooi, S.L.; Revuelta, J.L.; Roberts, C.J.; Rose, M.; Ross-Macdonald, P.; Scherens, B.; Schimmack, G.; Shafer, B.; Shoemaker, D.D.; Sookhai-Mahadeo, S.; Storms, R.K.; Strathern, J.N.; Valle, G.; Voet, M.; Volckaert, G.; Wang, C.Y.; Ward, T.R.; Wilhelm, J.; Winzeler, E.A.; Yang, Y.; Yen, G.; Youngman, E.; Yu, K.; Bussey, H.; Boeke, J.D.; Snyder, M.; Philippsen, P.; Davis, R.W.; Johnston, M. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* **2002**, *418*, 387-91.
- [177] Ackerman, S.H. Atp11p and Atp12p are chaperones for F(1)-ATPase biogenesis in mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **2002**, *1555*, 101-5.
- [178] De Meirleir, L.; Seneca, S.; Lissens, W.; De Clercq, I.; Eyskens, F.; Gerlo, E.; Smet, J.; Van Coster, R. Respiratory chain complex V deficiency due to a mutation in the assembly gene ATP12. *J Med Genet* **2004**, *41*, 120-4.
- [179] Zhu, Z.; Yao, J.; Johns, T.; Fu, K.; De Bie, I.; Macmillan, C.; Cuthbert, A.P.; Newbold, R.F.; Wang, J.; Chevrette, M.; Brown, G.K.; Brown, R.M.; Shoubridge, E.A. SURF1, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase, is mutated in Leigh syndrome. *Nat Genet* **1998**, *20*, 337-43.
- [180] Tiranti, V.; Jaksch, M.; Hofmann, S.; Galimberti, C.; Hoertnagel, K.; Lulli, L.; Freisinger, P.; Bindoff, L.; Gerbitz, K.D.; Comi, G.P.; Uziel, G.; Zeviani, M.; Meitinger, T. Loss-of-function mutations of SURF-1 are specifically associated with Leigh syndrome with cytochrome c oxidase deficiency. *Ann Neurol* **1999**, *46*, 161-6.
- [181] Papadopoulou, L.C.; Sue, C.M.; Davidson, M.M.; Tanji, K.; Nishino, I.; Sadlock, J.E.; Krishna, S.; Walker, W.; Selby, J.; Glerum, D.M.; Coster, R.V.; Lyon, G.; Scalais, E.; Lebel, R.; Kaplan, P.; Shanske, S.; De Vivo, D.C.; Bonilla, E.; Hirano, M.; DiMauro, S.; Schon, E.A. Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, a COX assembly gene. *Nat Genet* **1999**, *23*, 333-7.
- [182] Paret, C.; Lode, A.; Krause-Buchholz, U.; Rodel, G. The P(174)L mutation in the human hSCO1 gene affects the assembly of cytochrome c oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* **2000**, *279*, 341-7.
- [183] Valnot, I.; Osmond, S.; Gigarel, N.; Mehaye, B.; Amiel, J.; Cormier-Daire, V.; Munnich, A.; Bonnefont, J.P.; Rustin, P.; Rotig, A. Mutations of the SCO1 gene in mitochondrial cytochrome c oxidase deficiency with neonatal-onset hepatic failure and encephalopathy. *Am J Hum Genet* **2000**, *67*, 1104-9.



- [184] Horvath, R.; Lochmuller, H.; Stucka, R.; Yao, J.; Shoubridge, E.A.; Kim, S.H.; Gerbitz, K.D.; Jaksch, M. Characterization of human SCO1 and COX17 genes in mitochondrial cytochrome-c-oxidase deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* **2000**, *276*, 530-3.
- [185] Banci, L.; Bertini, I.; Ciofi-Baffoni, S.; Leontari, I.; Martinelli, M.; Palumaa, P.; Sillard, R.; Wang, S. Human Sco1 functional studies and pathological implications of the P174L mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104*, 15-20.
- [186] Leary, S.C.; Cobine, P.A.; Kaufman, B.A.; Guercin, G.H.; Mattman, A.; Palaty, J.; Lockitch, G.; Winge, D.R.; Rustin, P.; Horvath, R.; Shoubridge, E.A. The human cytochrome c oxidase assembly factors SCO1 and SCO2 have regulatory roles in the maintenance of cellular copper homeostasis. *Cell Metab* **2007**, *5*, 9-20.
- [187] Antonicka, H.; Mattman, A.; Carlson, C.G.; Glerum, D.M.; Hoffbuhr, K.C.; Leary, S.C.; Kennaway, N.G.; Shoubridge, E.A. Mutations in COX15 produce a defect in the mitochondrial heme biosynthetic pathway, causing early-onset fatal hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* **2003**, *72*, 101-14.
- [188] Oquendo, C.E.; Antonicka, H.; Shoubridge, E.A.; Reardon, W.; Brown, G.K. Functional and genetic studies demonstrate that mutation in the COX15 gene can cause Leigh syndrome. *J Med Genet* **2004**, *41*, 540-4.
- [189] Bugiani, M.; Tiranti, V.; Farina, L.; Uziel, G.; Zeviani, M. Novel mutations in COX15 in a long surviving Leigh syndrome patient with cytochrome c oxidase deficiency. *J Med Genet* **2005**, *42*, e28.
- [190] Nobrega, M.P.; Nobrega, F.G.; Tzagoloff, A. COX10 codes for a protein homologous to the ORF1 product of *Paracoccus denitrificans* and is required for the synthesis of yeast cytochrome oxidase. *J Biol Chem* **1990**, *265*, 14220-6.
- [191] Valnot, I.; von Kleist-Retzow, J.C.; Barrientos, A.; Gorbatyuk, M.; Taanman, J.W.; Mehaye, B.; Rustin, P.; Tzagoloff, A.; Munnich, A.; Rotig, A. A mutation in the human heme A:farnesyltransferase gene (COX10) causes cytochrome c oxidase deficiency. *Hum Mol Genet* **2000**, *9*, 1245-9.
- [192] Antonicka, H.; Leary, S.C.; Guercin, G.H.; Agar, J.N.; Horvath, R.; Kennaway, N.G.; Harding, C.O.; Jaksch, M.; Shoubridge, E.A. Mutations in COX10 result in a defect in mitochondrial heme A biosynthesis and account for multiple, early-onset clinical phenotypes associated with isolated COX deficiency. *Hum Mol Genet* **2003**, *12*, 2693-702.
- [193] Coenen, M.J.; van den Heuvel, L.P.; Ugalde, C.; Ten Brinke, M.; Nijtmans, L.G.; Trijbels, F.J.; Beblo, S.; Maier, E.M.; Muntau, A.C.; Smeitink, J.A. Cytochrome c oxidase biogenesis in a patient with a mutation in COX10 gene. *Ann Neurol* **2004**, *56*, 560-4.
- [194] Nobrega, F.G.; Nobrega, M.P.; Tzagoloff, A. BCS1, a novel gene required for the expression of functional Rieske iron-sulfur protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **1992**, *11*, 3821-9.
- [195] Cruciat, C.M.; Hell, K.; Folsch, H.; Neupert, W.; Stuart, R.A. Bcs1p, an AAA-family member, is a chaperone for the assembly of the cytochrome bc(1) complex. *Embo J* **1999**, *18*, 5226-33.
- [196] de Lonlay, P.; Valnot, I.; Barrientos, A.; Gorbatyuk, M.; Tzagoloff, A.; Taanman, J.W.; Benayoun, E.; Chretien, D.; Kadhom, N.; Lombes, A.; de Baulny, H.O.; Niaudet, P.; Munnich, A.; Rustin, P.; Rotig, A. A mutant mitochondrial respiratory chain assembly protein causes complex III deficiency in patients with tubulopathy, encephalopathy and liver failure. *Nat Genet* **2001**, *29*, 57-60.
- [197] Visapaa, I.; Fellman, V.; Vesa, J.; Dasvarma, A.; Hutton, J.L.; Kumar, V.; Payne, G.S.; Makarow, M.; Van Coster, R.; Taylor, R.W.; Turnbull, D.M.; Suomalainen, A.; Peltonen, L. GRACILE syndrome, a lethal metabolic disorder with iron overload, is caused by a point mutation in BCS1L. *Am J Hum Genet* **2002**, *71*, 863-76.
- [198] De Meirleir, L.; Seneca, S.; Damis, E.; Sepulchre, B.; Hoorens, A.; Gerlo, E.; Garcia Silva, M.T.; Hernandez, E.M.; Lissens, W.; Van Coster, R. Clinical and diagnostic characteristics of complex III deficiency due to mutations in the BCS1L gene. *Am J Med Genet A* **2003**, *121*, 126-31.
- [199] Hinson, J.T.; Fantin, V.R.; Schonberger, J.; Breivik, N.; Siem, G.; McDonough, B.; Sharma, P.; Keogh, I.; Godinho, R.; Santos, F.; Esparza, A.; Nicolau, Y.; Selvaag, E.; Cohen, B.H.; Hoppel, C.L.; Tranebjaerg, L.; Eavey, R.D.; Seidman, J.G.; Seidman, C.E. Missense mutations in the BCS1L gene as a cause of the Bjornstad syndrome. *N Engl J Med* **2007**, *356*, 809-19.
- [200] Ogilvie, I.; Kennaway, N.G.; Shoubridge, E.A. A molecular chaperone for mitochondrial complex I assembly is mutated in a progressive encephalopathy. *J Clin Invest* **2005**, *115*, 2784-92.
- [201] Vogel, R.O.; van den Brand, M.A.; Rodenburg, R.J.; van den Heuvel, L.P.; Tsuneoka, M.; Smeitink, J.A.; Nijtmans, L.G. Investigation of the complex I assembly chaperones B17.2L and NDUFAF1 in a cohort of CI deficient patients. *Mol Genet Metab* **2007**, *91*, 176-82.
- [202] Dunning, C.J.; McKenzie, M.; Sugiana, C.; Lazarou, M.; Silke, J.; Connelly, A.; Fletcher, J.M.; Kirby, D.M.; Thorburn, D.R.; Ryan, M.T. Human CIA30 is involved in the early assembly of mitochondrial complex I and mutations in its gene cause disease. *Embo J* **2007**, *26*, 3227-37.

*To be submitted to Molecular Biology of the Cell*

**The pentatricopeptide repeat motifs from Pet309 are necessary for binding to the mitochondrial COX1 transcript in yeast.**

Faviola Tavares-Carreón, Yolanda Camacho-Villasana, Angélica Zamudio-Ochoa and Xochitl Pérez-Martínez\*.

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

\*Address correspondence to: Xochitl Pérez-Martínez, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria. Apartado postal 70-243, México D.F. 04510, México. Tel: 011-52-55-5622-5662; Fax: 011-52-55-5622-5630; E-mail: [xperez@ifc.unam.mx](mailto:xperez@ifc.unam.mx)

Running head: Pet309 interacts with the COX1 mRNA

## Abstract

Synthesis of Cox1, the largest subunit of the cytochrome c oxidase (CcO), inside mitochondria is controlled by Pet309, a specific translational activator that functions through the COX1 mRNA 5'-UTR. Pet309 belongs to the pentatricopeptide repeat (PPR) protein family, which is generally involved in RNA metabolism in mitochondria and chloroplasts. The Pet309 sequence predicts at least 12 PPR motifs in the central portion of the protein. Deletion of these motifs selectively affected translation, but not stability of the COX1 mRNA. We used RNA coimmunoprecipitation assays to show that Pet309 is associated with the COX1 mRNA, and that this association is present before the processing of the COX1 mRNA from the ATP6/8 polycistron. The binding site for Pet309 mapped in the region around 140 to 90 nucleotides upstream of the COX1 start codon, a region that is predicted to form a weak stem-loop structure. This association was not affected by deletion of 8 PPR motifs, but was prevented after deletion of the 12 PPR region. Our data will contribute to understand the mechanism of action of the PPR motifs present in Pet309.

## Introduction

The biogenesis of mitochondria and chloroplasts is controlled by protein factors encoded in the nucleus, many of which interact with RNA at posttranscriptional, translational, and posttranslational levels. Among them are the pentatricopeptide repeat proteins (PPR), the major sequence-specific RNA binding family. PPR proteins contain degenerate 35-amino acid units that are usually present in tandem of 2 to 26 repeats throughout the protein. Based on similarity to the  $\alpha$ -solenoid super family, it is believed that each PPR folds into a pair of antiparallel  $\alpha$ -helices, whose stacking forms a superhelical structure that is able to bind a single stranded RNA molecule in its inner groove (Small and Peeters, 2000; Delannoy *et al.*, 2007). PPR proteins are located in mitochondria and chloroplasts, and have been found in all eukaryotes (O'Toole *et al.*, 2008), although the family is particularly expanded in land plants, with more than 450 members in *Arabidopsis thaliana*

(Lurin *et al.*, 2004). The PPR proteins described to date have a role on transcription, RNA processing, intron splicing, RNA stability and editing, as well as translation and mRNA polyadenylation (Schmitz-Linneweber and Small, 2008; Aphasizheva *et al.*, 2011), however the mechanism of action of this family of proteins as well as the molecular basis of PPR-RNA interaction are still unknown. Some members of this family have no recognizable domains apart from the PPR motifs, and are usually involved in mRNA stability (Yamazaki *et al.*, 2004; Schmitz-Linneweber *et al.*, 2005; Loiselay *et al.*, 2008). Others have motifs unrelated to PPRs at the C-terminal ends (the E-class PPR proteins). This region has been implicated in the recruitment of catalytic factors for RNA processing (Rivals *et al.*, 2006; Schmitz-Linneweber and Small, 2008).

The genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* predicts the presence of 14 PPR proteins

(Schmitz-Linneweber and Small, 2008; Lipinski *et al.*, 2011). One of such proteins is the mitochondrial RNA polymerase Rpo41; others are involved in general mitochondrial RNA maturation and translation (Rpm2, Rmd9, Dmr1, Aep3) (Stribinskis *et al.*, 2001a; Stribinskis *et al.*, 2001b; Nouet *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2009; Puchta *et al.*, 2010), while some of these proteins (Msc6, Rmd9L, Yer077c, Sov1) are of unknown functions; an important group of PPR proteins found in yeast are mRNA-specific translational activators (Cbp1, Pet111, Pet309, Atp22, Aep1, Aep2) (for a review see (Perez-Martinez *et al.*, 2008). Pet309 is a translational activator specific for the mitochondrial COX1 mRNA, which codes for subunit 1 of the cytochrome c oxidase (CcO). This subunit is the largest of the enzyme and bears the metallic centers heme a, a<sub>3</sub> and Cu<sub>B</sub> for oxygen reduction. Synthesis of Cox1 is highly regulated and is coupled to CcO assembly (Fontanesi *et al.*, 2008; Mick *et al.*, 2011).

Pet309 is a 965 residues, peripheral inner membrane protein facing the matrix that acts on the COX1 mRNA 5'-UTR to activate translation (Manthey and McEwen, 1995; Tavares-Carreón *et al.*, 2008). This is the only site for action of Pet309, since replacement of the COX1 5'-UTR by the COX2 5'-UTR abolished the requirement of Pet309 for Cox1 synthesis (Perez-Martinez *et al.*, 2009). In addition to its role on translation, Pet309 affects the COX1 mRNA stability, and this function is particularly relevant in strains containing introns in COX1 (Manthey and McEwen, 1995). The TPRpred software originally predicted 12 PPR motifs present in the center of the protein Pet309, being 8 of these repeats more strongly predicted (Karpenahalli *et al.*, 2007). However, new

bioinformatics analysis using the SCIPHER algorithm predicted the presence of 22 putative PPR motifs present throughout the protein sequence (Lipinski *et al.*, 2011).

Our previous data indicated that the 8 central PPR motifs are necessary for translation but not for stability of the COX1 mRNA (Tavares-Carreón *et al.*, 2008). By site-directed mutagenesis it was observed that two basic amino acids that are predicted to be in the inner groove of the superhelical structure of Pet309 are necessary for translation, possibly due to the presence of electrostatic interactions with the COX1 RNA. In order to better understand the mechanism of action of Pet309 we analyzed if the protein could physically interact with the COX1 mRNA in vivo by immunoprecipitation of Pet309-RNA complexes, and studied different conditions that could affect the interaction of Pet309 with the RNA. We investigated if this interaction was affected by mutants lacking the 8 or 12 central PPR motifs, and made a closer map of the region on the COX1 mRNA is Pet309 interacting.

## Results

### *Pet309 interacts with the COX1 mRNA*

It is well established that mitochondrial translational activators specifically act on the 5'-UTR from their target mRNA. However, do date there is no experimental evidence that this family of proteins physically interact with their target mRNA in vivo. We investigated if Pet309 could interact with the COX1 mRNA. To

allow detection of Pet309 we added sequences encoding three hemagglutinin epitopes at the C-terminus of Pet309 (Pet309-HA). These epitopes did not affect respiratory growth of otherwise wild-type strains (Tavares-Carreón *et al.*, 2008). In addition, in order to avoid RNA degradation we deleted the *NUC1* gene encoding a major mitochondrial nuclease (Miyakawa *et al.*, 2008). Mitochondria were purified and solubilized with the gentle detergent digitonin. Pet309-HA was immune precipitated with anti-HA antibodies and RNA was isolated from the supernatant and immune precipitate fractions. The presence of the *COX1*, *COX3* or *ATP8* mRNA was analyzed by cDNA synthesis with reverse transcriptase and PCR amplification. The primers used were located at the 5'-UTR sequence of each gene. Western blot analysis of the immune precipitate fractions indicated that Pet309-HA was precipitated, while the signal of Pet309-HA in a control experiment without the addition of the anti-HA antibody was absent (Figure 1A). In contrast the non-related mitochondrial citrate synthase protein was exclusively present in the supernatant fractions, supporting that the immune precipitation reaction is specific for Pet309-HA. After RNA purification and analysis it was observed that approximately 30% of the *COX1* PCR product was present in the immune precipitation fraction (Figure 1B) and absent in the precipitation reaction without antibody. As expected *COX3* was absent from the immune precipitate, as translation of this mRNA is independent of Pet309. Interestingly, we observed that the *ATP8* gene which is located downstream of the precursor transcript bearing *COX1* is also present on the immune precipitate fraction. This indicates that Pet309 can interact with

the *COX1* mRNA before the *COX1* region is processed from the polycistron.

To confirm that the PCR product observed was derived from *COX1* the agarose gel from Figure 1B was transferred to a membrane and subjected to southern blot analysis using a probe for *COX1*. As expected, the PCR product of *COX1* gave a positive signal with the radioactive probe, while the *COX3* PCR product did not hybridize.

The sequence of Pet309 predicts the presence of around 22 PPR motifs (Lipinski *et al.*, 2011), however, the most strongly predicted PPR domains are located at the center of the protein. We previously demonstrated that these motifs are necessary for *COX1* mRNA translation. We investigated if this mutant protein would retain the capacity to bind RNA. Mitochondria was solubilized with digitonin and Pet309 was immunoprecipitated with an HA antibody. The presence of the *COX1*, *COX3* or *ATP8* mRNAs was confirmed by cDNA synthesis and PCR. The western blot analysis of the immunoprecipitation indicated that the reaction was efficient (Figure 2A). Similar to what was observed for the wild-type strain, the mutant carrying Pet309 $\Delta$ 8ppr was still able to interact with the *COX1* and *ATP8* mRNAs (Figure 2B).

Together these data indicate that Pet309 physically interacts with the *COX1* mRNA. This interaction occurs before *COX1* is processed from the precursor transcript that includes the *ATP8* gene. Deletion of the 8 central PPR motifs did not abolish Pet309 interaction with the ribosome.

*The twelve central PPR repeats on Pet309 are necessary for translation, but not for stability of the COX1 mRNA.*

In addition to the 8 central PPR motifs we studied, the TPRpred server predicts another 4 repeats, one upstream and 3 downstream of this region, albeit with lower score (having higher P-values). In order to understand the role of the extra PPR motifs we created a deletion from residues 312 to 759 (*pet309Δ12ppr-HA*), which corresponds to the 12 central PPR motifs. The construct included a triple HA epitope fused to the C-terminal end of the protein for immunoprecipitations and western blot analysis.

Both, the wild-type *PET309-HA* and the *pet309Δ12ppr-HA* genes were cloned in ARS/CEN and 2 $\mu$  vectors to allow expression in yeast in low-copy or multiple-copy plasmids, respectively, and the plasmids were transformed into a yeast *pet309Δ::LEU2* mutant. The *pet309Δ12ppr-HA* strain could not grow on a non-fermentable carbon source in either single-copy or multiple-copy expression plasmids (data not shown). To investigate the basis of the non-respiratory phenotype of the *pet309Δ12ppr-HA* strain we first looked if the mutant protein was stable. Mitochondria 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. Western blot analysis of mitochondrial protein extracts showed that the Pet309-HA protein was recognized by the anti-HA antibody as a 118 KDa band for the wild type gene or as a 78 KDa band for the *pet309Δ12ppr-HA* mutant (Fig. 3A). The same blot was probed with an antibody to Cox1, and it

showed no accumulation of the Cox1 protein in the *pet309Δ12ppr-HA* mutant (Fig. 3A), even in high-copy expression.

To investigate the effect of the *pet309Δ12ppr-HA* mutation on *COX1* translation, we analyzed [<sup>35</sup>S]methionine labeled proteins from mitochondria carrying the *pet309Δ12ppr-HA* mutation in low-copy or high-copy expression plasmids (Fig. 3B). The *pet309Δ12ppr-HA* mutation completely prevented Cox1 labeling even in over expression conditions. As expected, labeling of Cox1 in strains with the wild-type *PET309-HA*, was normal, while a null mutation (*pet309Δ*) completely prevented Cox1 labeling. These results suggest that the 12 PPR domain of Pet309 is necessary for the *COX1* mRNA translation.

We next investigated whether the Pet309 $\Delta$ 12ppr-HA protein was membrane bound or soluble. Mitochondria from strains bearing the *PET309-HA* or the *pet309Δ12ppr-HA*, low-copy plasmids were sonicated and centrifuged. Both the wild-type Pet309-HA and the mutant Pet309 $\Delta$ 12ppr-HA proteins were present in the membrane pellet (Figure 3C) and absent from the soluble supernatant. Alkaline Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> extraction of the mitochondrial membranes solubilized the wild-type Pet309-HA and the Pet309 $\Delta$ ppr-HA proteins (Figure 3D), indicating that both behave as peripheral membrane proteins.

Pet309 is also involved in the *COX1* mRNA stability, as null mutants show a reduced accumulation of the mature *COX1* mRNA (Manthey and McEwen, 1995). It was previously

demonstrated that the *pet309Δ8ppr-HA* mutation did not affect *COX1* mRNA stability. We next analyzed whether deletion of the 12 PPR repeats present in Pet309 could affect the *COX1* mRNA accumulation. Levels of the *COX1* mRNA were analyzed by Northern blot and normalized to the mitochondrial *15S rRNA* (Figures 3E-F). In wild-type cells expressing the high-copy *PET309-HA* gene, the *COX1* mRNA signal was increased four times as compared to the low-copy *PET309-HA* cells. A similar pattern was obtained for the *pet309Δ12ppr-HA* cells, except that the *COX1* accumulation was increased only 2-fold. This effect was specific for *COX1*, as 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 (Fiori *et al.*, 2005). This result indicates that Pet309 lacking the 12 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 *pet309Δ12ppr-HA* cells.

We conclude that the 12 PPR domains present in the central portion of Pet309 do not affect the association of the protein with the membrane, and are necessary for translation of the *COX1* mRNA. The absence of these repeats do not affect the *COX1* mRNA stability, and high expression of the *pet309Δ12ppr-HA* protein caused accumulation of the *COX1* mRNA, as observed for the wild-type Pet309-HA protein.

*The 12 central PPR motifs from Pet309 are necessary for interaction with the COX1 mRNA.*

We sought to investigate whether the 12 PPR motifs on Pet309 were necessary to maintain an interaction with the *COX1* mRNA. Pet309-HA was immunoprecipitated from mitochondrial extracts carrying either the wild type *PET309-HA* or the *pet309Δ12ppr-HA* genes. Western blot analysis of the precipitate and supernatant fractions showed that Pet309-HA was efficiently immunoprecipitated with the anti-HA antibody (Figure 4A), whereas the non-related citrate synthase was present in the supernatant fraction. We then looked for the presence of the *COX1*, *COX3* or *ATP6* mRNAs in the immunoprecipitate. None of these three mRNAs was found to be associated with the Pet309Δ12ppr-HA protein, indicating that deletion of the 12 PPR motifs abolished the interaction between Pet309 and the *COX1* mRNA (Figure 4B).

*Pet309 interacts with a region around 90 to 140 nucleotides upstream of the COX1 AUG start codon.*

The *COX1* 5'-UTR is around 450 nucleotides long. In order to more precisely map the RNA sequence or sequences that are associated with Pet309 we performed immunoprecipitations without ribonuclease inhibitor to decrease the size of the coimmunoprecipitated RNA fragments. The RNAs recovered from the Pet309-HA immunoprecipitation pellets and supernatants were applied to slot-blots and hybridized to a series of 50 nt probes covering the *COX1* 5'-UTR sequence. These probes overlapped with each other by 8 nucleotides (Figure 5A). The strongest enrichment at the *COX1* locus was

consistently detected with primer number 9. The sequence of this region is ATAATATATTATTATCCTTTAAGATATA ACAATAATTATTTAAATTAAT, which is located 90 to 140 nucleotides upstream of the *COX1* AUG start codon (Figure 5B). In some experiment repetitions we were able to observe a faint signal with probe number 8 and probe number 5. The significance of this observation remains unknown.

We next tested if the *pet309Δ8ppr-HA* and *pet309Δ12ppr-HA* mutants maintain a physical association with the *COX1* mRNA under the experimental conditions described above. RNA coimmunoprecipitation and slot blot analysis revealed that the *Pet309Δ8ppr-HA* can interact with the *COX1* probe 9, while interaction of the *Pet309Δ12ppr-HA* protein is abolished. These data is consistent with the observations in figures 2 and 4.

We conclude that *Pet309* interacts with a specific region of the *COX1* 5'-UTR, and that this interaction is absent in mutants lacking the central 12 PPR motifs, but not 8 PPR motifs.

#### *Interaction of Pet309 with the COX1 mRNA does not depend on active ribosomes.*

Experimental evidence suggests that *Pet309* interacts with the mitochondrial ribosome (Bauerschmitt *et al.*, 2010; Fontanesi *et al.*, 2010) Zamudio-Ochoa *et al.*, our unpublished data). We investigated if *Pet309* was still able to bind to the *COX1* mRNA in the presence of antibiotics that inhibit mitochondrial ribosomes. Purified mitochondria was incubated with puromycin or chloramphenicol prior to carry out protein synthesis in the presence of 35S-methionine (Figure 6A).

Puromycin causes premature chain termination and release, while chloramphenicol inhibits the peptidyl transferase activity of the ribosome (Sohmen *et al.*, 2009). After *Pet309-HA* immunoprecipitation we observed that the *COX1* mRNA co-precipitated with *Pet309* regardless of the presence of puromycin or chloramphenicol (Figure 6B-C). This indicated that the interaction of *Pet309* with the *COX1* mRNA is not affected if translating ribosomes are inhibited.

#### *Mss51 acts different from Pet309 as a translational activator.*

*Mss51* and *Pet309* have targets that map to the *COX1* 5'-UTR, independently from the *COX1* coding region. This was demonstrated because expression of the mitochondrial *ARG8<sup>m</sup>* reporter gene that is located instead of the *COX1* coding region (*cox1Δ::ARG8<sup>m</sup>*) depends on both proteins (Perez-Martinez *et al.*, 2003; Perez-Martinez *et al.*, 2009). However, very little is understood about the mechanisms of action of *Pet309* and *Mss51* as translational activators, and if both proteins act in a similar way cooperating to translate the *COX1* mRNA. One important difference between these proteins is that while accumulation of the *cox1Δ::ARG8<sup>m</sup>* mRNA is decreased by half on *pet309Δ* mutants, deletion of *mss51* did not have any effect on the accumulation of the *cox1Δ::ARG8<sup>m</sup>* (Figure 7A). The effect of the *pet309Δ* mutation is consistent with the theory that this protein is involved in stabilization of the *COX1* transcript (Manthey and McEwen, 1995).



To try to understand how these two proteins can cooperate to activate translation of the *COX1* mRNA we first analyzed whether Mss51 is able to interact with the *COX1* mRNA as Pet309 does. We used a strain in which Mss51 was tagged at the C-terminal end with a triple epitope of hemagglutinin (Mss51-HA). This epitope does not interfere with the catalytic function of Mss51 (Perez-Martinez *et al.*, 2003). Mss51-HA mitochondrial extracts were immunoprecipitated with an anti-HA antibody in a similar way as previously done for Pet309-HA mitochondria. The *COX1* and *COX3* mRNAs were analyzed by RT-PCR. Even though immunoprecipitation of Mss51-HA was highly efficient and comparable to the efficiency of immunoprecipitation of Pet309-HA, no interaction of Mss51-HA with the *COX1* was detected (Figure 7B-C).

We next asked if the interaction of Pet309-HA with the *COX1* mRNA depends on the presence of Mss51. Pet309-HA was immunoprecipitated from mitochondrial extracts of wild type and *mss51Δ* cells. Surprisingly, even though Pet309-HA was efficiently precipitated on wild type cells, no immunoprecipitation of Pet309-HA was detected in *mss51Δ* cells (Figure 7D). A similar result was obtained when we tried to immunoprecipitate Pet309-HA in cells lacking subunit 4 of CcO (*cox4Δ*). Presumably, in this assembly mutant the majority of Mss51 would be trapped in a high molecular weight complex with Cox1, making it unavailable for translational activation of the *COX1* mRNA.

Taken together, these data suggest that even though Mss51 and Pet309 act on the *COX1* 5'-UTR, these two proteins seem to have different roles. While Pet309 stabilized the *COX1* mRNA,

Mss51 has no effect on stability of this mRNA. In our hands no physical interaction between Mss51 and the *COX1* mRNA was detected. In addition, the HA epitope fused to the C-terminal end of Pet309 is probably changing conformation in the absence of *mss51*, since the protein was not able to immunoprecipitate with an anti-HA antibody. Unfortunately we don't have an antibody that recognizes other region of the Pet309 protein to analyze if the interaction of Pet309 with the *COX1* mRNA depends on Mss51.

## Discussion (1200 words)

### Under construction

Order of ideas:

- PPR proteins are very important for mitochondrial and chloroplast function, and thereof for the cell physiology. They are proposed to bind single-stranded RNA molecules, which has been demonstrated for 3 chloroplast proteins in vivo, while only one protein in in vitro conditions.

-We found that in vivo Pet309 binds to the mRNA, and that it binds before the processing of the transcript. Talk about the possibility that Pet309 interacts with the RNA co-transcriptionally. Interaction with Nam1 and RNA polymerase.

- Discussion of the current model of action. Interaction with the RNA and how this could destabilize a stem loop structure. Comparison of the current

models obtained from in vitro experiments.

-Mss51 also participates in translational activation. We studied the relationship between Pet309 and Mss51.

-Include Mss51 in the final part of the model.

- Discuss how this protein could stabilize the COX1 mRNA and compare with the mechanism proposed for the plant PPR protein previously discovered.

## Materials and Methods.

### *Strains, media, and genetic methods*

The *S. cerevisiae* strains used in this study are listed in Table 1. Standard genetic methods and media recipes were as described previously (Burke *et al.*, 2000; Guthrie and Fink, 2002). Complete fermentable media were YPD or YPRaf (containing 2% glucose or 2% raffinose). No fermentable medium was YPEG (3% glycerol and 3% ethanol). Minimal media contained 0.67% yeast nitrogen base, 2% glucose, and Complete Supplement Mixtures (CSMs) purchased from Bio 101 (Vista, CA). The nuclear deletion constructs with *KanMX4*, *LEU2*, or *URA3* cassettes were obtained by PCR.

### *Molecular biology methods*

Standard molecular biology methods for cloning, northern and southern blot analysis were as described previously (Sambrook and Russell, 2001). The plasmids used and generated during this work were derivatives of pXP97 and pXP104, which contained the *PET309::HA* sequence, including 310

and 205 nt of the *PET309* 5' and 3' UTR respectively (Tavares-Carreón *et al.*, 2008). The *pet309Δ12ppr* mutant was generated by fusion PCR (Ho *et al.*, 1989), using Accuzyme DNA polymerase (Biolone) and pXP97 as the DNA template. The construct lacked the residues N312 to N759. The PCR product was digested with *PstI* and *XhoI*, and cloned into equally digested pXP97. The *XbaI* - *XhoI* fragment was ligated into pXP104 to generate the 2 $\mu$ , high copy plasmid. For northern blot, total RNA was prepared using the RNeasy Mini kit (Qiagen) 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 with the radioactively labeled COX1 exon 4, COX2 and 15S rRNA genes (Shen and Fox, 1989). The 15S rRNA gene was used to standardize the loading. Blots were analyzed with a Typhoon 8600 PhosphorImager and quantitated with ImageQuANT.

### *RNA immunoprecipitation assay*

The technique was based on the chloroplast assays described before (Ostheimer *et al.*, 2003). To avoid RNA degradation during solubilization of mitochondria we deleted the *NUC1* gene encoding for a mitochondrial nuclease with a *nuc1Δ::kanMX4* cassette. Mitochondria (2 mg) were lysed with 0.7% digitonin, 100mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH 7.4, 2U of RNaseOUT (Invitrogen), and a cocktail of protease inhibitors (Roche). The solubilized fraction was subjected to a clarifying spin for 10 minutes. 5% of the supernatant was saved as the total fraction. The supernatant was

incubated with an anti-HA high affinity antibody (Roche or Pierce), which was coupled to protein A-agarose (Invitrogen) for two hours at 4°C with constant rocking. After washing the immunoprecipitate with lysis buffer, it was washed twice with 1ml of 20mM HEPES-KOH pH 7.4, and resuspended in 150 µl of the same buffer. One-fourth of the supernatant and precipitate fractions were saved for western blot analysis, and the remainder was used for RNA extraction. The supernatant and pellet fractions were adjusted with SDS to 1%, EDTA-Na to 5 mM and either 2 µg of yeast tRNA or 1 µl of GlycoBlue (Ambion) (for slot blot assays). RNA was extracted with acid phenol and treated (1.5 µg) with 1 µl of DNase I (Invitrogen) for 15 min at 30°C. The first strand of cDNA was prepared by mixing 10 µg of RNA with desoxioligonucleotides for *COX1*, *COX3*, or *ATP8* in the presence of SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). The reaction was incubated at 25°C for 5 min, then at 50°C for 60 min and at 72°C for 15 min. The cDNA was used as template for PCR reactions to amplify the *COX1*, *COX3* or *ATP8* 5'-UTRs. For slot blot assays equal proportions of each RNA sample were applied to a nylon membrane through a slot-blot manifold (Invitrogen), and hybridized with radiolabeled DNA probes specific for the *COX1* 5'-UTR sequence as indicated in Supplementary Table S1. Fifty-mer oligonucleotide probes were radiolabeled at their 5' ends with [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP and T4 polynucleotide kinase. Slot blots were hybridized in 7% SDS, 0.5M Na-Phosphate pH 7.0 at 60°C. Blots were washed with 1x SSC. 0.1% SDS at the temperature used for hybridization.

#### *Analysis of Mitochondrial Proteins*

Yeast cells were grown in raffinose medium until late log phase. Mitochondria was obtained as previously described (Diekert *et al.*, 2001). Proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (Laemmli, 1970). For Western blots, proteins were transferred to polyvinylidene difluoride, or nitrocellulose membranes and probed with an anti-Cox1 (MitoSciences, Eugene, OR), anti-hemagglutinin (HA) (Roche Diagnostics), anti-citrate synthase (Thomas D. Fox) or anti-cytochrome c1 (Diego González-Halphen). Immune complexes were detected with either goat anti-rabbit immunoglobulin (Ig)G or anti-mouse IgG conjugated to horseradish peroxidase (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) and the enhanced chemiluminescence (ECL) kit (GE Healthcare, United Kingdom), or when using anti-Cox1, the ECL Plus kit (GE Healthcare). The signals were detected using a Storm PhosphorImager 840 (GE Healthcare). For immunoprecipitation, mitochondria were solubilized in 1% digitonin and incubated with anti-HA agarose (Roche Diagnostics or Pierce) beads as described previously (Herrmann *et al.*, 2001). Mitochondrial translation products were radiolabeled with [<sup>35</sup>S]-methionine in whole cells in the presence of cycloheximide or in purified mitochondria as previously described (Westermann *et al.*, 2001). Mitochondria separation into membrane and soluble fractions, and alkaline carbonate extractions of membranes were as described (Diekert *et al.*, 2001; Tavares-Carreón *et al.*, 2008).

## Acknowledgments

We thank Alice Barkan and Jana Prikryl for the help provided to develop the RNA immunoprecipitation assay, to Gabriel del Río-Guerra and Teresa Lara-Ortiz for the gift of yeast deletion strains, and to Diego González-Halphen, Miriam Vázquez-Acevedo and Thomas Fox for the gift of antisera. We are also indebted

## References

- Aphasizheva, I., Maslov, D., Wang, X., Huang, L., and Aphasizhev, R. (2011). Pentatricopeptide repeat proteins stimulate mRNA adenylation/uridylation to activate mitochondrial translation in trypanosomes. *Mol Cell* 42, 106-117.
- Bauerschmitt, H., Mick, D.U., Deckers, M., Vollmer, C., Funes, S., Kehrein, K., Ott, M., Rehling, P., and Herrmann, J.M. (2010). Ribosome-binding proteins Mdm38 and Mba1 display overlapping functions for regulation of mitochondrial translation. *Mol Biol Cell* 21, 1937-1944.
- Burke, D., Dawson, D., and Stearns, T. (2000). *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Delannoy, E., Stanley, W.A., Bond, C.S., and Small, I.D. (2007). Pentatricopeptide repeat (PPR) proteins as sequence-specificity factors in post-transcriptional processes in organelles. *Biochem Soc Trans* 35, 1643-1647.
- 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.
- Fontanesi, F., Soto, I.C., and Barrientos, A. (2008). Cytochrome c oxidase biogenesis: new levels of regulation. *IUBMB Life* 60, 557-568.
- Fontanesi, F., Soto, I.C., Horn, D., and Barrientos, A. (2010). Mss51 and Ssc1 facilitate translational regulation of cytochrome c oxidase biogenesis. *Mol Cell Biol* 30, 245-259.
- Guthrie, C., and Fink, G.R. (eds.) (2002). *Guide to yeast genetics and molecular and cell biology*. Academic Press: San Diego.
- Herrmann, J.M., Westermann, B., and Neupert, W. (2001). Analysis of protein-protein interactions in mitochondria by coimmunoprecipitation and chemical cross-linking. *Methods Cell Biol* 65, 217-230.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., and Pease, L.R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77, 51-59.

- Karpenahalli, M.R., Lupas, A.N., and Soding, J. (2007). TPRpred: a tool for prediction of TPR-, PPR- and SEL1-like repeats from protein sequences. *BMC Bioinformatics* 8, 2.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lee, C., Tibbetts, A.S., Kramer, G., and Appling, D.R. (2009). Yeast AEP3p is an accessory factor in initiation of mitochondrial translation. *J Biol Chem* 284, 34116-34125.
- Lipinski, K.A., Puchta, O., Surendranath, V., Kudla, M., and Golik, P. (2011). Revisiting the yeast PPR proteins--application of an Iterative Hidden Markov Model algorithm reveals new members of the rapidly evolving family. *Mol Biol Evol* 28, 2935-2948.
- Loiselay, C., Gumpel, N.J., Girard-Bascou, J., Watson, A.T., Purton, S., Wollman, F.A., and Choquet, Y. (2008). Molecular identification and function of cis- and trans-acting determinants for petA transcript stability in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *Mol Cell Biol* 28, 5529-5542.
- 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.
- Mick, D.U., Fox, T.D., and Rehling, P. (2011). Inventory control: cytochrome c oxidase assembly regulates mitochondrial translation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 14-20.
- Miyakawa, I., Fujimura, R., and Kadowaki, Y. (2008). Use of the nuc1 null mutant for analysis of yeast mitochondrial nucleoids. *J Gen Appl Microbiol* 54, 317-325.
- Nouet, C., Bourens, M., Hlavacek, O., Marsy, S., Lemaire, C., and Dujardin, G. (2007). Rmd9p controls the processing/stability of mitochondrial mRNAs and its overexpression compensates for a partial deficiency of oxa1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 175, 1105-1115.
- O'Toole, N., Hattori, M., Andres, C., Iida, K., Lurin, C., Schmitz-Linneweber, C., Sugita, M., and Small, I. (2008). On the expansion of the pentatricopeptide repeat gene family in plants. *Mol Biol Evol* 25, 1120-1128.
- Ostheimer, G.J., Williams-Carrier, R., Belcher, S., Osborne, E., Gierke, J., and Barkan, A. (2003). Group II intron splicing factors derived by diversification of an ancient RNA-binding domain. *Embo J* 22, 3919-3929.
- 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., Butler, C.A., Shingu-Vazquez, M., and Fox, T.D. (2009). Dual Functions of Mss51 Couple Synthesis of Cox1 to Assembly of Cytochrome c Oxidase in *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondria. *Mol Biol Cell* 20, 4371-4380.

Perez-Martinez, X., Funes, S., Camacho-Villasana, Y., Marjavaara, S., Tavares-Carreón, F., and Shingu-Vazquez, M. (2008). Protein synthesis and assembly in mitochondrial disorders. *Curr Top Med Chem* 8, 1335-1350.

Puchta, O., Lubas, M., Lipinski, K.A., Piatkowski, J., Malecki, M., and Golik, P. (2010). DMR1 (CCM1/YGR150C) of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an RNA-binding protein from the pentatricopeptide repeat family required for the maintenance of the mitochondrial 15S ribosomal RNA. *Genetics* 184, 959-973.

Rivals, E., Bruyere, C., Toffano-Nioche, C., and Lecharny, A. (2006). Formation of the *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat family. *Plant Physiol* 141, 825-839.

Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schmitz-Linneweber, C., and Small, I. (2008). Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle

gene expression. *Trends Plant Sci* 13, 663-670.

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.

Shen, Z.H., and Fox, T.D. (1989). Substitution of an invariant nucleotide at the base of the highly conserved '530-loop' of 15S rRNA causes suppression of yeast mitochondrial ochre mutations. *Nucleic Acids Res* 17, 4535-4539.

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.

Sohmen, D., Harms, J.M., Schlunzen, F., and Wilson, D.N. (2009). SnapShot: Antibiotic inhibition of protein synthesis I. *Cell* 138, 1248 e1241.

Stribinskis, V., Gao, G.J., Ellis, S.R., and Martin, N.C. (2001a). Rpm2, the protein subunit of mitochondrial RNase P in *Saccharomyces cerevisiae*, also has a role in the translation of mitochondrially encoded subunits of cytochrome c oxidase. *Genetics* 158, 573-585.

Stribinskis, V., Gao, G.J., Sulo, P., Ellis, S.R., and Martin, N.C. (2001b). Rpm2p: separate domains promote tRNA and Rpm1r maturation in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Nucleic Acids Res* 29, 3631-3637.

Tavares-Carreón, F., Camacho-Villasana, Y., Zamudio-Ochoa, A., Shingu-Vázquez, M., Torres-Larios, A., and Pérez-Martínez, X. (2008). The pentatricopeptide repeats present in Pet309 are necessary for translation but not for stability of the mitochondrial COX1 mRNA in yeast. *J Biol Chem* 283, 1472-1479.

Westermann, B., Herrmann, J.M., and Neupert, W. (2001). Analysis of mitochondrial translation products in vivo and in organello in yeast. *Methods Cell Biol* 65, 429-438.

Yamazaki, H., Tasaka, M., and Shikanai, T. (2004). PPR motifs of the nucleus-encoded factor, PGR3, function in the selective and distinct steps of chloroplast gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J* 38, 152-163.

**Table 1.** List of strains used in the study.

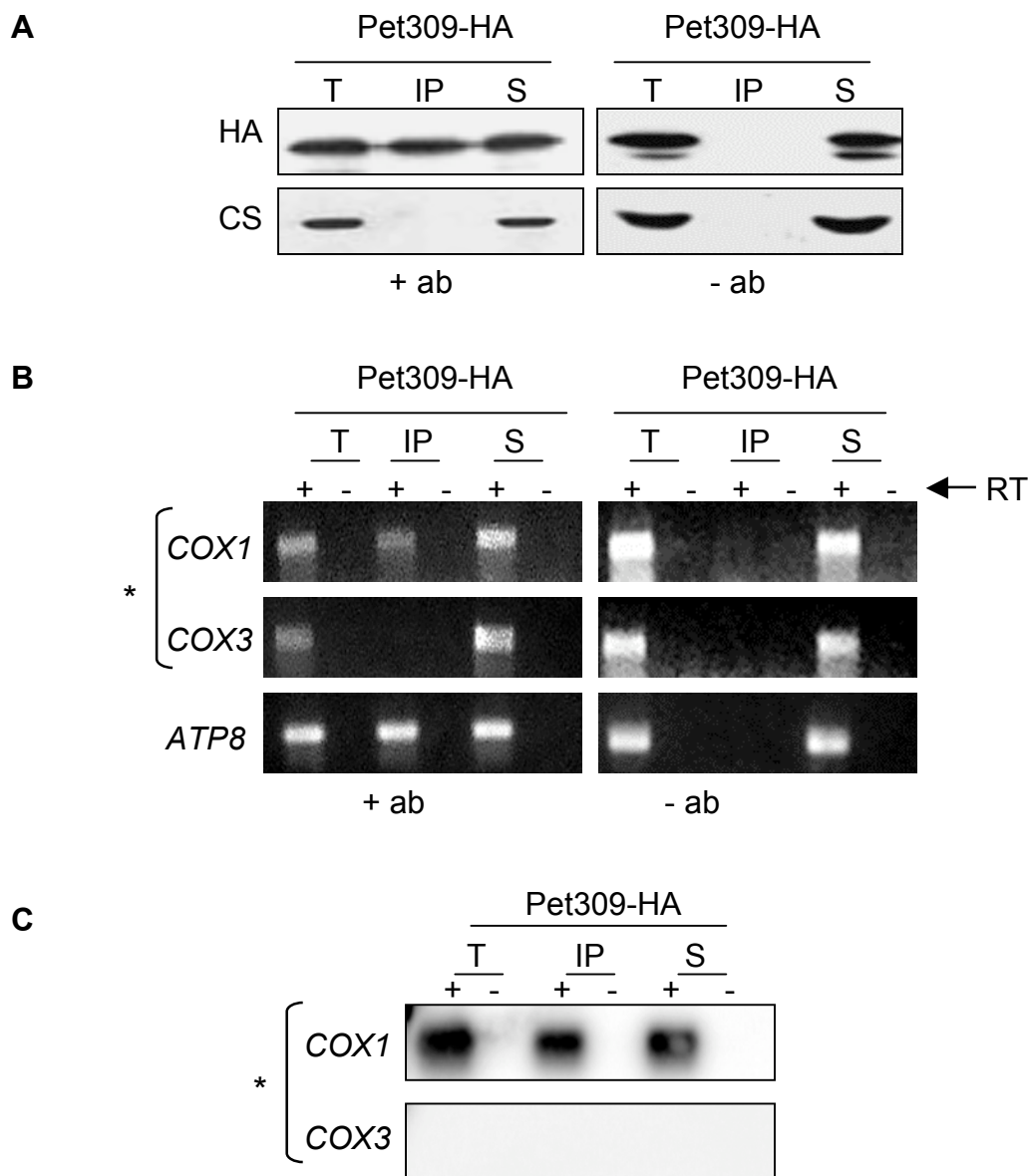
Strain name	Genotype	Reference
FTC25	<i>Mat α ura3Δ ade2 PET309::3xHA nuc1ΔKanMX4 [ρ+<sup>a</sup>]</i>	This work
FTC26	<i>Mat α ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG pet309Δ::LEU2 nuc1Δ::KanMX4 [ρ+, ΔΣai<sup>b</sup>]</i>	This work
YC122	<i>Mat α ura3Δ ade2 PET309::3xHA mss51ΔURA3 [ρ+]</i>	This work
SB5	<i>Matα, ade2, ura3Δ, PET309::3xHA [ ρ<sup>+</sup> ]</i>	Tavares-Carreón <i>et al</i> , 2004.
SB7	<i>Mat α ura3Δ ade2 MSS51::3xHA [ρ+ ]</i>	Perez-Martinez <i>et al</i> , 2003.
XPM201	<i>Mat α ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG [ρ+, ΔΣai]</i>	Tavares-Carreón <i>et al</i> , 2004.
XPM231	<i>Mat α ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG pet309Δ::LEU2 [ρ+, cox1Δ::ARG8<sup>m</sup>]</i>	Tavares-Carreón <i>et al</i> , 2004.
XPM63	<i>Mat α ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG mss51Δ::LEU2 [ρ+, cox1Δ::ARG8<sup>m</sup>]</i>	Perez-Martinez <i>et al</i> , 2003.
XPM225	<i>Mat α ade2 ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG PET309::3xHA cox4Δ::LEU2 [ρ+ ]</i>	This work
XPM232	<i>Mat α ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG pet309Δ::LEU2 [ρ+, ΔΣai]</i>	Tavares-Carreón <i>et al</i> , 2004.
FTC40	<i>Mat α ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG pet309Δppr2 [ρ+, ΔΣai]</i>	This work
FTC40-R1	<i>Mat α ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG pet309Δppr2 [ρ+, ΔΣai] (suppressor)</i>	This work
FTC40-R5	<i>Mat α ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG pet309Δppr2 [ρ+, ΔΣai] (suppressor)</i>	This work
FTC40-R8	<i>Mat α ura3-52 leu2-3,112 lys2 arg8::hisG pet309Δppr2 [ρ+, ΔΣai] (suppressor)</i>	This work

All strains are isogenic or congenic to D273-10B.

<sup>a</sup>The mitochondrial phenotype is showed between brackets.

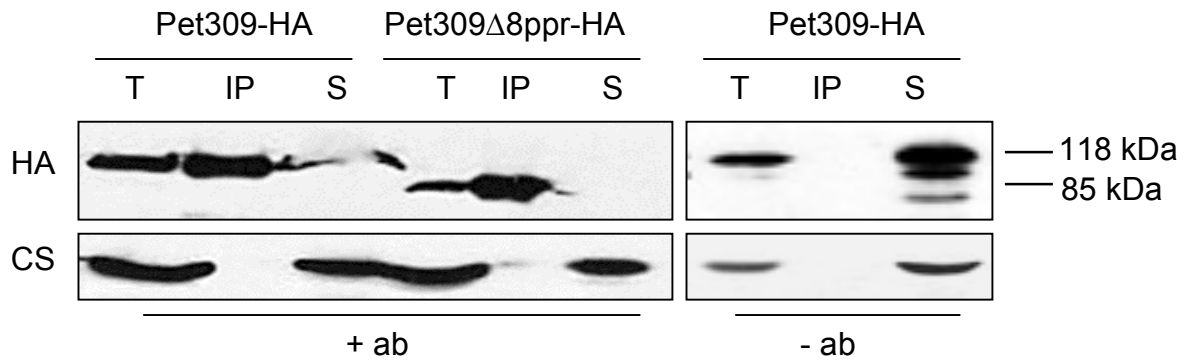
<sup>b</sup>The mitochondrial COX1 gene has no introns (ΔΣai).



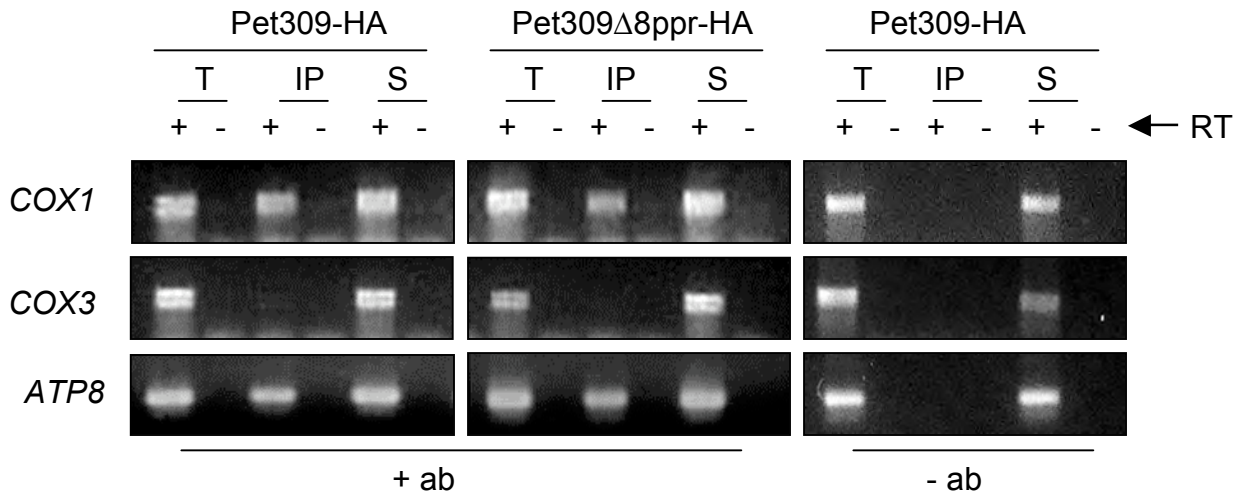


**Figure 1. Pet309 interacts with the *COX1* mRNA.** A) Mitochondria was solubilized with digitonin and Pet309-HA was immunoprecipitated with antibody anti-HA (+ab) or was mocked treated (-ab). One fourth of the immunoprecipitate (IP) and the supernatant fraction representing non-bound proteins (S) were separated by SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane for western blot. The membrane was probed with anti-HA antibody (HA), stripped and reprobred with anti-citrate synthase (CS) as a negative control for interaction. The total fraction (T) represents 5% of the mitochondrial extract used for Immunoprecipitation. B) RNA was extracted from the total (T), immunoprecipitate (IP) and supernatant (SN) fractions. Each fraction was divided in two, and cDNA was prepared in the presence (+) or absence (-) of reverse transcriptase (RT) using a primer for the *COX1*, *COX3* or *ATP8* 5'-UTRs. The (-) RT lanes represent a negative control for DNA contamination. The cDNAs were amplified using specific primers and the products were run on an agarose gel. C) The agarose gels were transferred to a Nylon membrane by southern blot and the portion of the membrane with the *COX1* and *COX3* amplification products (\*) were hybridized with a probe for *COX1*.

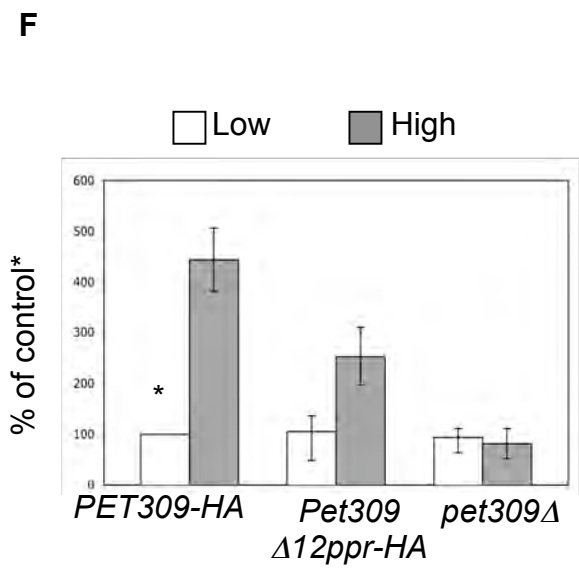
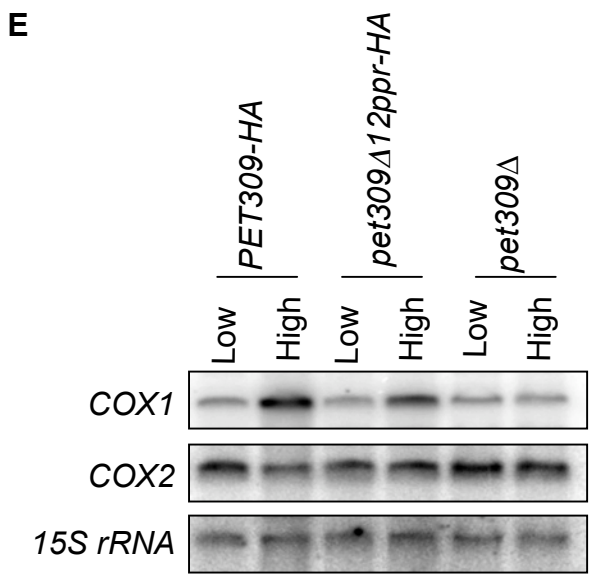
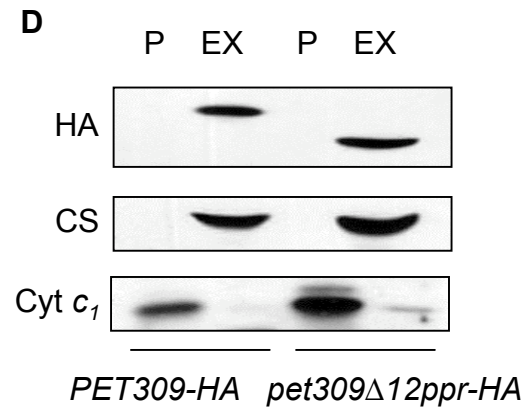
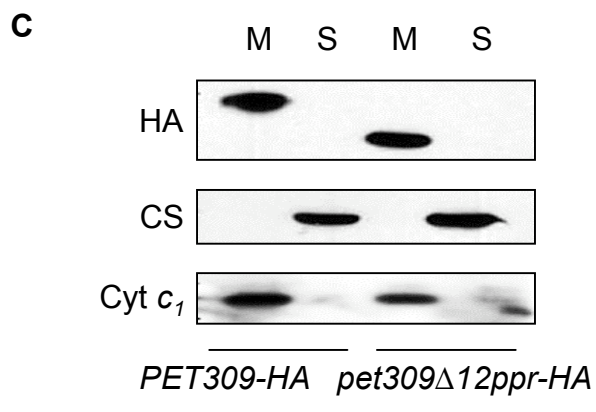
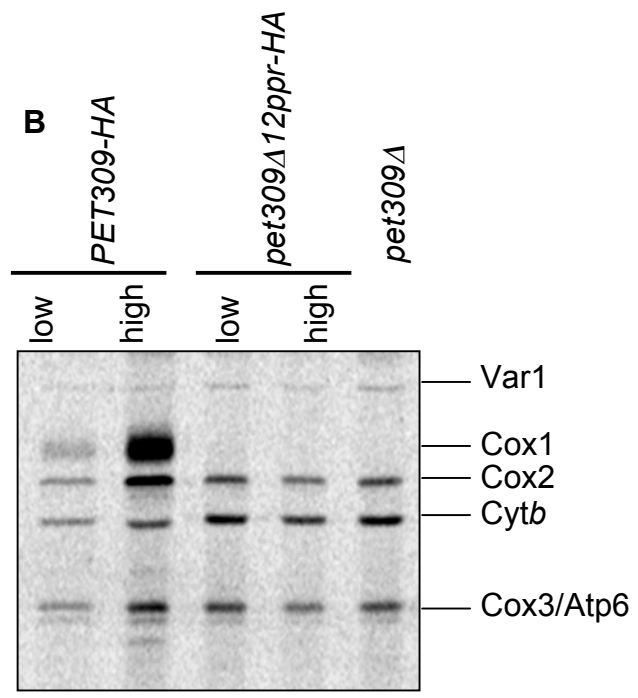
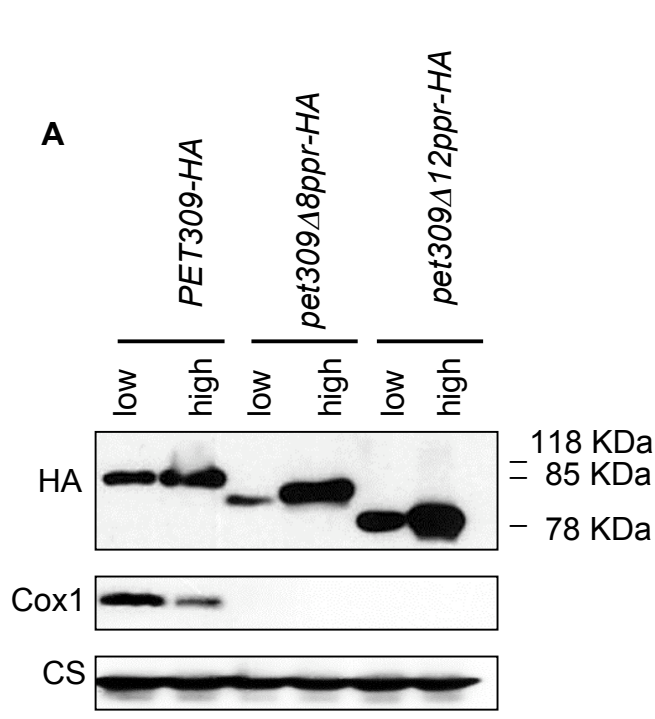
**A**



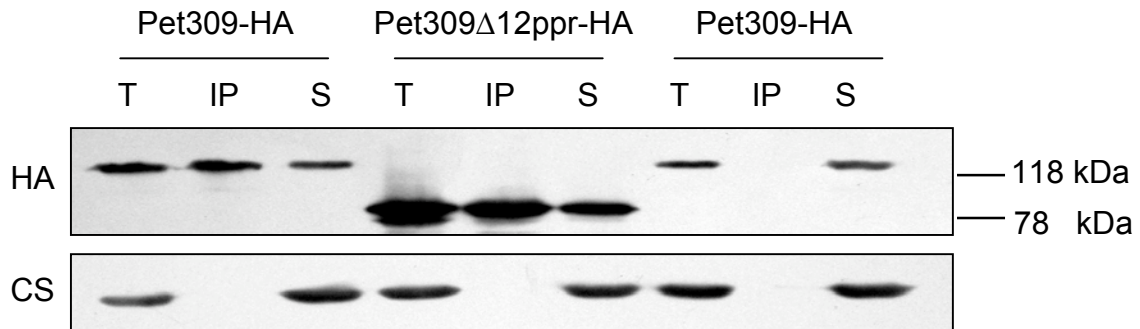
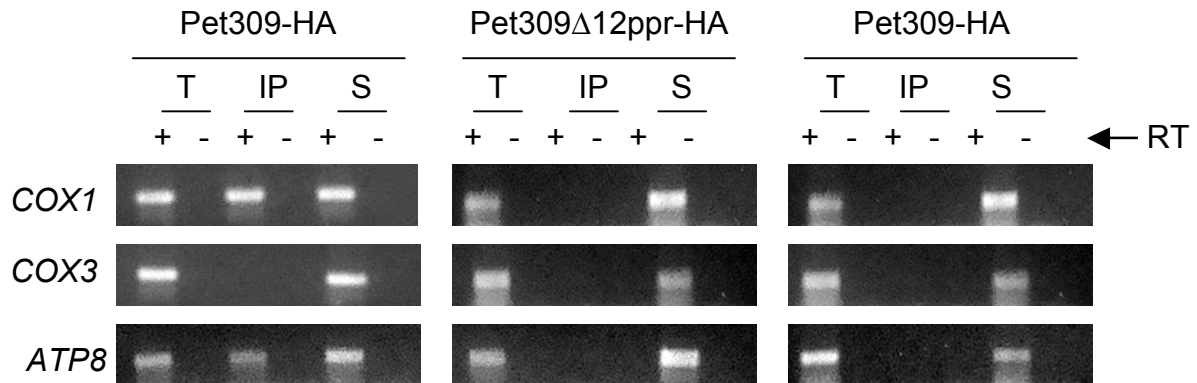
**B**



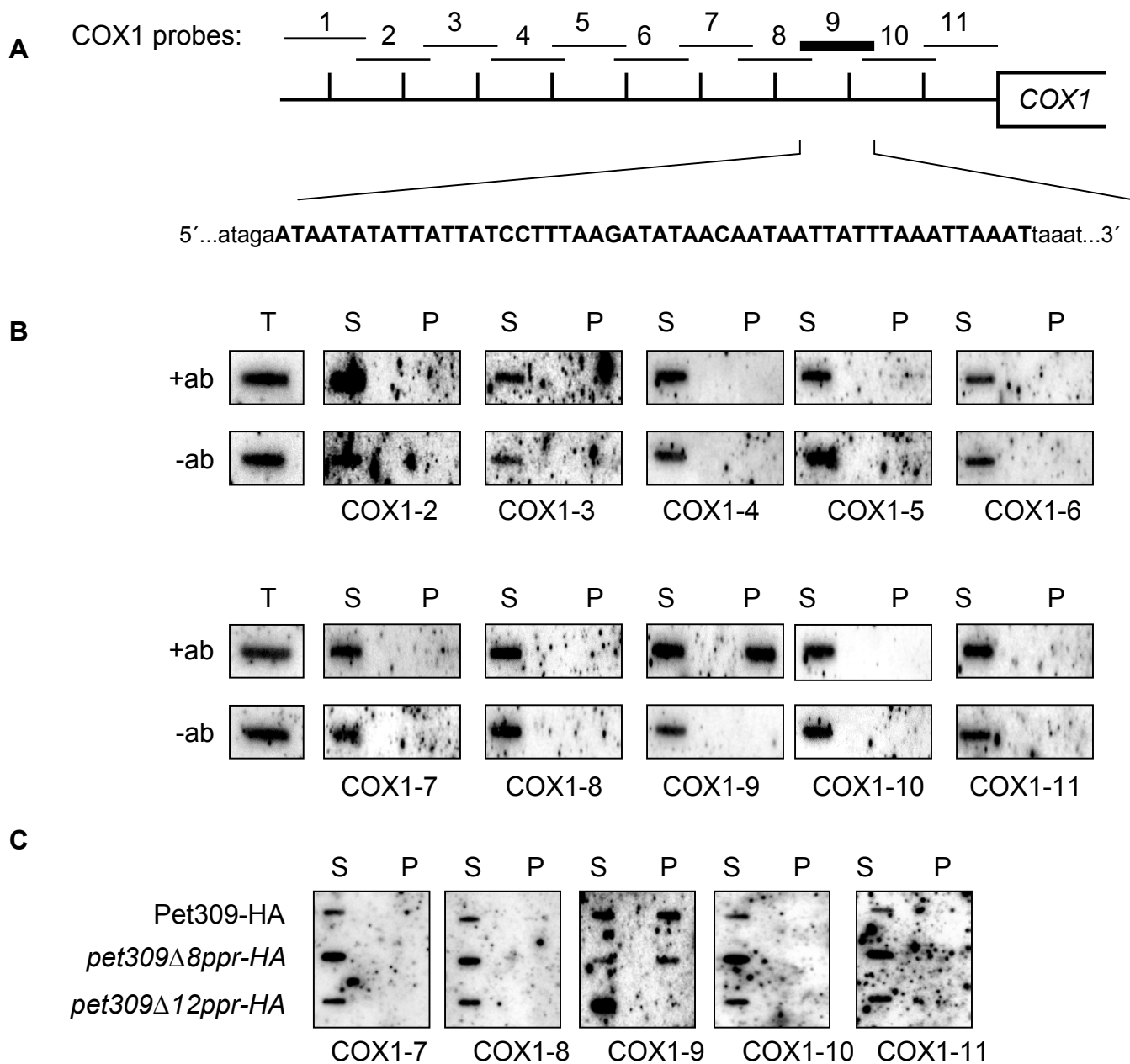
**Figure 2. The 8 central PPR motifs do not interfere with the interaction of Pet309 with the COX1 mRNA.** Mitochondrial digitonin extracts from strains bearing the wild type Pet309-HA or the mutant Pet309Δ8ppr-HA proteins were subjected to immunoprecipitation with anti-HA antibody as described in Figure 1. A) Western blot analysis of the immunoprecipitation reactions. Wild type Pet309-HA migrates with an apparent molecular weight of 118 KDa, and the mutant Pet309Δ8ppr-HA protein with a molecular weight of 85 KDa. B) Agarose gel of the RT-PCR reactions from the immunoprecipitations with anti-HA antibody.



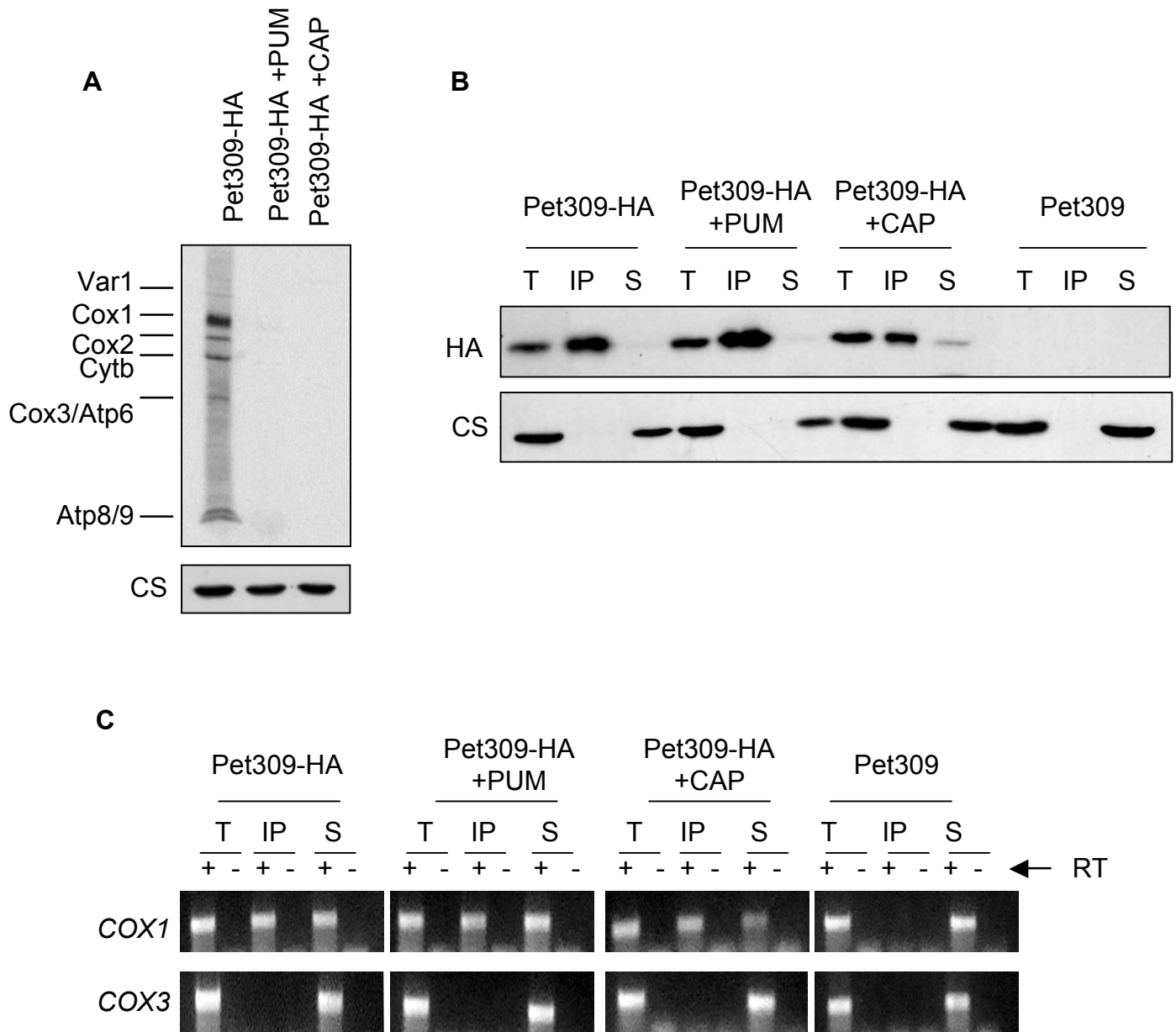
**Figure 3. Pet309 $\Delta$ 12ppr-HA is a peripheral inner membrane protein, and does not affect the COX1 mRNA accumulation.** A) 10  $\mu$ g of mitochondrial protein from the wild-type (*PET309-HA*), *pet309 $\Delta$ ppr8-HA*, and *pet309 $\Delta$ ppr12-HA* constructs expressed from High-copy or low copy plasmids were analyzed by SDS-PAGE and western blot. The membrane was probed with anti HA, Cox1 or citrate synthase (CS) antibodies. B) wild type, *pet309 $\Delta$ ppr12-HA* and *pet309 $\Delta$*  cells were labeled with (<sup>35</sup>S)-methionine in the presence of cycloheximide for 15 minutes at 30°C, and the proteins were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. C) 100  $\mu$ g of mitochondrial protein from the wild-type and *pet309 $\Delta$ ppr12-HA* strains were sonicated and centrifuged to separate the membrane (M) and soluble (S) fractions, which were analyzed by western blot using antibodies to HA, citrate synthase as a soluble protein marker, and cytochrome *c*<sub>1</sub> as membrane protein control. D) 100  $\mu$ g of mitochondrial protein from the strains in C) were incubated with alkaline Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. The integral membrane (P) and soluble, extracted (EX) proteins were analyzed by western blot as in C). E) 10  $\mu$ g of total RNA from the wild-type (*PET309-HA*) and *pet309 $\Delta$ ppr12-HA* constructs expressed from High-copy or low copy plasmids were analyzed by northern blot. The membrane was probed with (32P)-labeled COX1, COX2 and 15s rRNA (as loading control) . Total RNA from *pet309 $\Delta$*  cells expressing low-copy or high-copy empty plasmids were used as negative control. F) Quantification of the COX1 signals from 3 independent experiments like the one shown on E) were normalized to the 15s rRNA signals. The signal from the low-copy, wild type *PET309-HA* was taken as 100% (\*).

**A****B**

**Figure 4. The 12 central PPR motifs are necessary for the interaction of Pet309 with the COX1 mRNA.** Mitochondrial digitonin extracts from strains bearing the wild type Pet309-HA protein or the mutant Pet309 $\Delta$ 12ppr-HA protein lacking 12 PPR motifs from the central portion were subjected to immunoprecipitation with anti-HA antibody as described in Figure 1. A) Western blot analysis of the immunoprecipitation reactions. The mutant Pet309 $\Delta$ 12ppr-HA protein migrated with an apparent molecular weight of 78 KDa. B) Agarose gel of the RT-PCR reactions from the immunoprecipitations with anti-HA antibody.

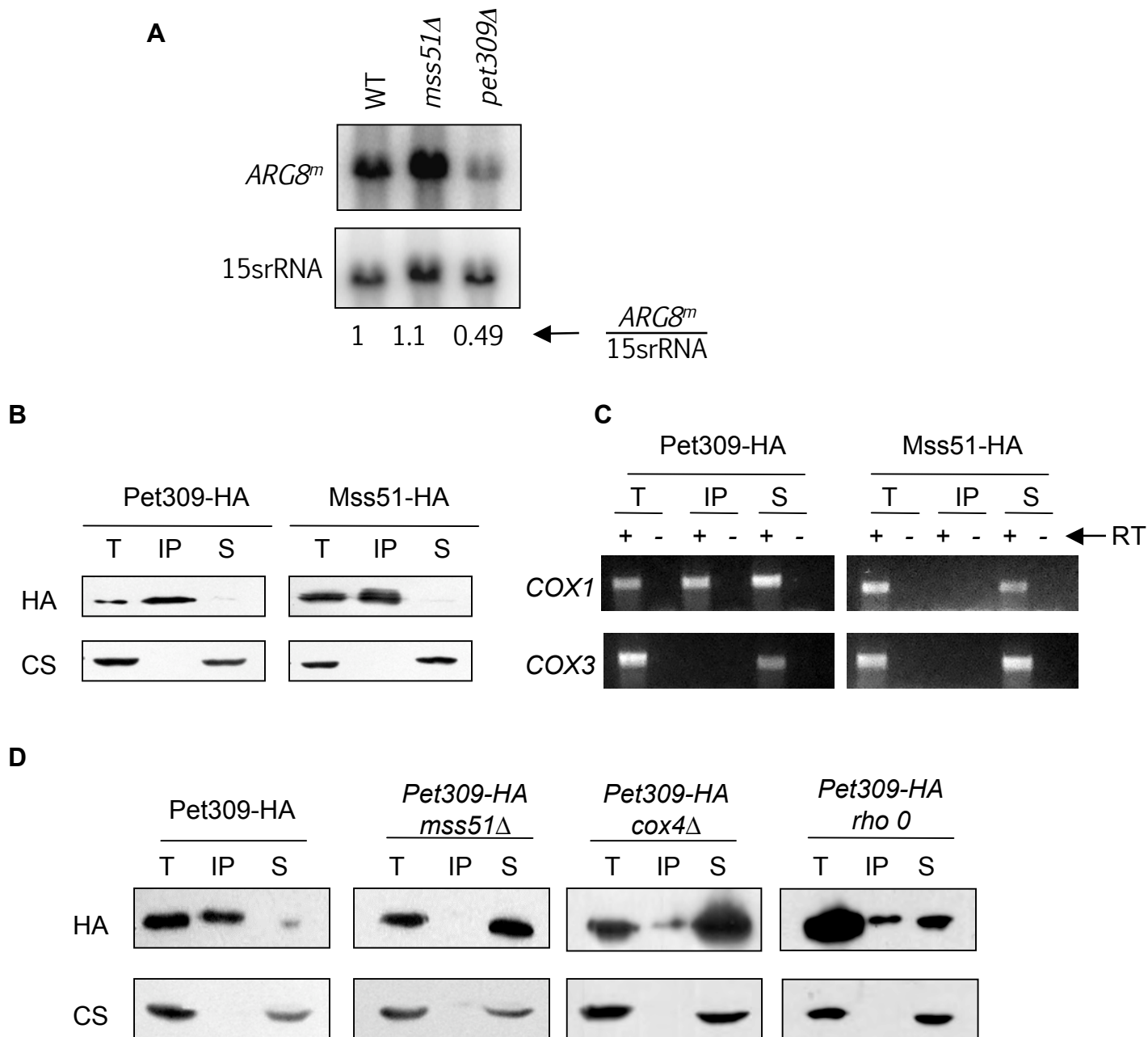


**Figure 5. Pet309 interacts with a region around 140 to 90 nucleotides upstream of the AUG start codon.** A) After immunoprecipitation of Pet309-HA from mitochondrial extracts, the associated RNA was purified and analyzed by slot blot. The position of the 50-mer oligonucleotide probes covering the 450 nt-long COX1 5'-UTR are indicated with lines. The most strongly enriched sequence corresponded to probe 9 and is indicated by a bold line. The sequence of the probe 9 is shown. B) The slot blot membranes were hybridized with the indicated oligonucleotide probes. In parallel a set of mock treated immunoprecipitations without antibody were carried out as negative controls. C) The same probes from B) were used to analyze the association of wild type Pet309-HA, Pet309 $\Delta$ 8ppr-HA and Pet309 $\Delta$ 12ppr-HA proteins with the COX1 mRNA 5'-UTR. For simplicity, only hybridizations with probes 7 to 11 were shown.



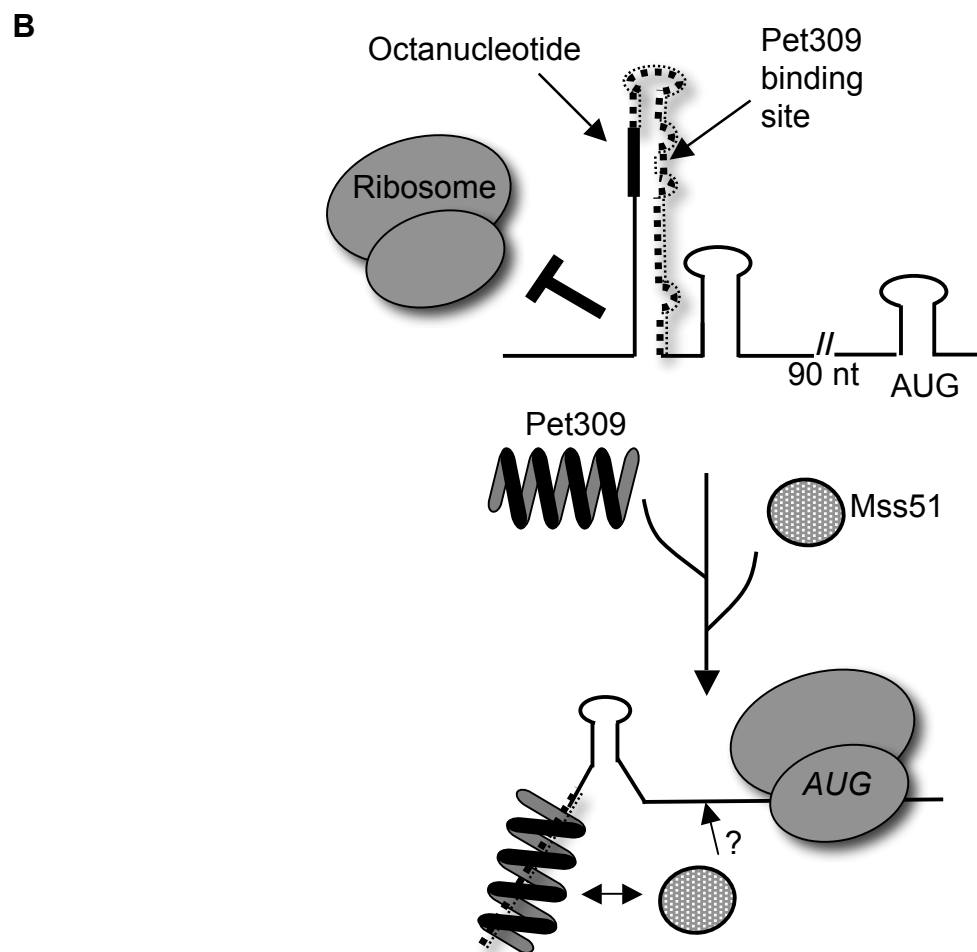
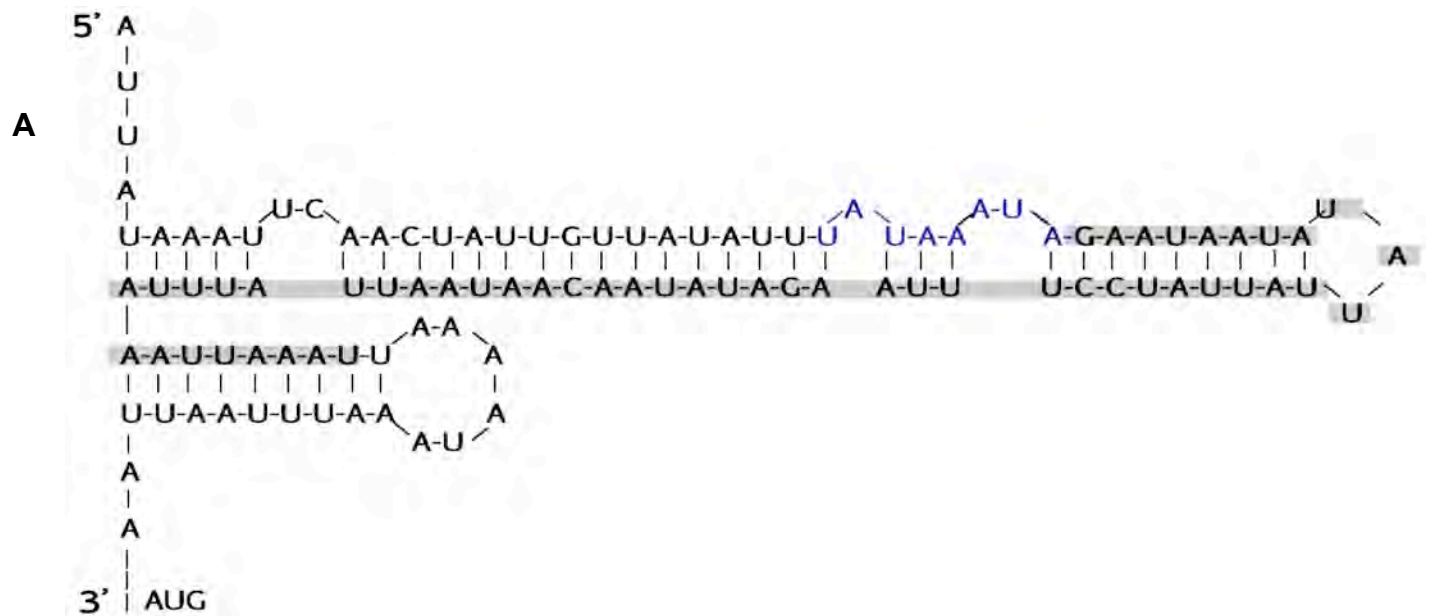
**Figure 6. The interaction of Pet309 with the COX1 mRNA is independent of the presence of active ribosomes.** A) Purified mitochondria (3mg/ml) were incubated with <sup>35</sup>S-methionine in the presence of 25 μg/μl of puromycin (PUM) or 40μg/μl of chloranphenicol (CAP) . Translation products were separated by SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane and revealed by autoradiography. The membrane was probed with an antibody to citrate synthase (CS) as a loading control. B) Mitochondrial digitonin extracts from strains bearing the Pet309-HA or Pet309 without HA epitope (Pet309) were subjected to immunoprecipitation with anti-HA antibody as described in Figure 1. The fractions were analyzed by western blot with an antibody to HA and citrate synthase (CS). B) Agarose gel of the RT-PCR reactions from the immunoprecipitations with anti-HA antibody.





**Figure 7. Mss51 has a different role from Pet309 on translational activation, and modulates Pet309 conformation.** A) 10  $\mu$ g of total RNA from wild type (WT), *mss51Δ* and *pet309Δ* cells bearing the *cox1Δ::ARG8<sup>m</sup>* mitochondrial gene were analyzed by northern blot using a probe for *ARG8<sup>m</sup>* and the *15srRNA* as loading control. The intensity of the *ARG8<sup>m</sup>* signal was quantified and normalized to the *15srRNA* signal. The coefficient of the *ARG8<sup>m</sup>* to the *15s rRNA* signal is shown below. B) Pet309-HA and Mss51-HA were immunoprecipitated as in figure 1, and the efficiency of the precipitation was analyzed by western blot with the indicated antibodies. C) RNA from the immunoprecipitations in B) was isolated and analyzed as in Figure 1. D) Pet309-HA was immunoprecipitated from mitochondrial extracts of the indicated strains. Total (T), immunoprecipitate (IP) and supernatant (S) fractions were analyzed by western using the indicated antibodies.





**Figure 8. Model of action of Pet309.** A) The region around 140 to 90 nt upstream of the COX1 AUG start codon that is recognized by Pet309 (shown with gray shadow) is predicted to form a stem-loop structure. The octanucleotide is indicated with gray characters. B) See the text for a detailed description of our current model.