



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio de la función de Pet309 en mitocondrias de levaduras mediante mutagénesis dirigida

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
JESÚS EMMANUEL FRÍAS JIMÉNEZ

TUTOR PRINCIPAL  
Dra. Xóchitl Pérez Martínez  
Instituto de Fisiología Celular

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. RUY PÉREZ MONTFORT  
Instituto de Fisiología Celular

Dr. D. ALEJANDRO FERNÁNDEZ VELASCO  
Facultad de Medicina

Ciudad de México. Marzo 2019



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.

## **Agradecimientos**

La primera persona a la que agradezco es a la Dra. Xóchitl Pérez Martínez, quien fue mi tutora. Agradezco haberme aceptado y haber investigado la razón de que en un principio no fui aceptado en el posgrado. Esa fue la primera ocasión en que pude apreciar su calidad humana reflejada como interés en sus alumnos. También agradezco el apoyo académico, moral y profesional que me ha brindado. Muchas gracias por tanto. Xóchitl.

Mis padres tuvieron que verme salir de Nayarit y confiar en que sabría cuidarme y salir adelante, muchas gracias por su apoyo y amor incondicional. Todos los días los tengo en mi mente y en mi corazón, pues forman parte de mis hábitos, virtudes y ganas de vivir. Los quiero.

Yolanda, Angie y Aldo. Definitivamente la amistad es un pilar importante para el desempeño y desarrollo profesional, ustedes también han representado un vistazo a lo bueno que resulta de dedicarse a la investigación. Las risas, molestias, apoyos, compañerismo y aprendizaje no hubieran sido tan buena combinación sin ustedes tres. Me quedo con lo mejor que los tres me dieron oportunidad de aprenderles.

Agradezco a mi comité tutorial durante los semestres y a mis tutores de tesis por su ayuda imprescindible para realizar este proyecto.

Agradezco el valioso apoyo técnico proporcionado por la Dra. Yolanda Camacho Villasana para la realización de esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio, instituto y posgrado, muchas gracias.

Gracias al Instituto de Fisiología Celular, por demostrarme qué es estar inmerso en la investigación y por permitirme ser parte de un instituto con misión en ofrecer investigación de calidad.

El posgrado de Ciencias Bioquímicas tiene mi total agradecimiento por brindarme esta gran oportunidad. Es reconocible el interés que demuestran en que sus estudiantes sean profesionales con una formación de calidad y prestigio que la UNAM garantiza.

A las fuentes financiadoras durante mis estudios de posgrado: Beca de CONACyT para la realización de estudios de Maestría (51302255-1), a los proyectos PAPIIT (IN204414 y IN209217) y CONACyT (179387 y 284514).

## Índice

Resumen	5
Introducción	6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudio	6
Las mitocondrias de <i>S. cerevisiae</i>	6
Cadena transportadora de electrones y fosforilación oxidativa	7
Citocromo <i>c</i> oxidasa en <i>S. cerevisiae</i>	8
Proteínas con motivos de alfas hélices de unión a ácidos nucleicos	8
Proteínas PPR	11
Descubrimiento y distribución	11
Motivos PPR	12
Funciones de las proteínas PPR	13
Reconocimiento de ARN	14
Pet309	17
Predicción de motivos PPR en Pet309	18
Justificación	19
Hipótesis	20
Objetivo general	20
Objetivos particulares	21
Resultados	22
Elaboración de modelos estructurales predichos sobre la estructura de Pet309	22
Identificación de residuos dentro de Pet309 para llevar a cabo mutagénesis dirigida	23
Las mutantes de Pet309 no generaron un fenotipo respiratorio observable	24
Los niveles de Pet309 y de Cox1 varían en cada cepa mutante	26
Análisis de Pet309 como homodímero <i>in vivo</i> .	27
Discusión	31
Conclusión	35
Perspectivas	35
Material y métodos	36
APÉNDICE	46
REFERENCIAS	54

## Resumen

Dentro de las mitocondrias, la membrana interna forma crestas en donde está dispuesta la cadena transportadora de electrones, que contiene subunidades codificadas tanto en el genoma mitocondrial como en el nuclear. El último aceptor de electrones de esta cadena respiratoria es el Complejo IV o citocromo *c* oxidasa (CcO). De las proteínas que dan estructura, ensamblan y regulan la traducción dentro de la mitocondria, la mayoría son codificadas en el núcleo y transportadas hasta la matriz mitocondrial. Dentro de estas proteínas que reconocen y regulan la traducción y estabilidad de ARNm mitocondriales se encuentran aquellas que poseen motivos PPR (por sus siglas en inglés Pentatricopeptide Repeat Motifs). Estas proteínas están ampliamente distribuidas en mitocondrias y cloroplastos de plantas, aunque también han sido identificadas en mitocondrias de muchos otros eucariotes entre los que se encuentran los hongos y mamíferos. Cada motivo PPR tiene 35 aminoácidos en forma de doble hélice anti-paralela que en conjunto forman un solenoide con una superficie interna donde el ARN blanco es reconocido. Normalmente estas proteínas tienen uno o dos ARNm mitocondriales blanco, por lo que son altamente específicas. Las posiciones de los residuos en estas proteínas que se han propuesto y posteriormente comprobado que son importantes para el reconocimiento y especificidad de ARNm para plantas son las 2, 5 y 35. Sin embargo, en hongos y otros eucariotes el patrón identificado para plantas no es muy conservado y tampoco ha sido muy explorado. En nuestro laboratorio estudiamos a la proteína PPR Pet309 en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Pet309 es un activador traduccional que se requiere para que el ARNm mitocondrial *COXI* pueda traducirse y producir a la proteína Cox1, subunidad 1 de la CcO. En el presente trabajo decidimos realizar mutagénesis dirigida a aminoácidos específicos de Pet309 que por sus posiciones y tipo de residuo pensamos que podrían ser importantes para la función de Pet309. Nuestros resultados sugieren que la mutación de uno o dos residuos por cada motivo PPR no es suficiente para generar un defecto respiratorio en la levadura. Por otro lado decidimos analizar si en mitocondrias purificadas Pet309 podría formar homodímeros *in vivo*, ya que en el modelo estructural de una proteína PPR de plantas se observó que se formaban homodímeros. Determinamos que al menos Pet309 no parece formar homodímeros *in vivo* en mitocondrias de levadura.

## **Introducción**

### ***Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudio**

La levadura *S. cerevisiae* es empleada como modelo de estudio de los mecanismos de expresión del genoma mitocondrial. Esto se debe a que es un organismo facultativo, de tal manera que es posible perturbar la función mitocondrial sin afectar la viabilidad celular por crecimiento fermentativo. Este modelo ofrece la oportunidad de aplicar herramientas de genética debido a que su ciclo de vida presenta fase asexual y sexual. Además es uno de los pocos organismos en que se puede hacer mutagénesis dirigida en el DNA mitocondrial (Bonney y Fox, 2002; Dieckmann y Staples, 1990).

Las levaduras mutantes del genoma mitocondrial o nuclear pueden presentar fenotipo diferente a las de tipo silvestre cuando las funciones mitocondriales relacionadas a la respiración se ven afectadas. Un fenotipo derivado de estos cambios es el que presentan las colonias denominadas “petite”, las cuales crecen a una tasa menor que las de tipo silvestre, o bien, son incapaces de crecer en medio estrictamente respiratorio (Sherman, 1963).

La levadura pierde su ADN mitocondrial de manera natural, o bien, de manera artificial podemos encontrar cepas sin ADN mitocondrial. A las cepas bajo esta condición se les denomina “*rho0*”, siendo “*rho+*” aquellas que presentan su genoma mitocondrial (Burke et al, 2000).

### **Las mitocondrias de *S. cerevisiae***

La mitocondria es un organelo eucarionte formado por una membrana externa y una interna que dan lugar a dos compartimentos mitocondriales: espacio intermembranal y matriz mitocondrial. A través de la membrana externa pasan moléculas menores a 5,000 Daltones e iones mediante los canales transmembranales. La membrana interna forma crestas y es impermeable a iones y a la mayoría de las moléculas pequeñas. El espacio intermembranal se localiza entre las dos membranas, y posee gran cantidad de protones. La matriz mitocondrial está rodeada por la membrana interna, contiene las enzimas solubles del ciclo de Krebs, beta oxidación, vías de síntesis de aminoácidos, vitaminas, de centros fierro

azufre y grupos hemo, así como el genoma mitocondrial y la maquinaria necesaria para expresarlo (Maleszka et al, 1991; Albert, 2006).

### **Cadena transportadora de electrones y fosforilación oxidativa**

La mitocondria se encarga de proveer la mayor cantidad de energía que la célula necesita. El trabajo lo realiza mediante la cadena transportadora de electrones acoplada a la fosforilación oxidativa de la ATPsintasa. La cadena transportadora de electrones está formada por cuatro complejos proteicos: complejo I (NADH deshidrogenasa o NADH:ubiquinona oxidoreductasa), complejo II (succinato deshidrogenasa), complejo III (ubiquinol citocromo *c* oxidorreductasa, o complejo *bc<sub>1</sub>*) y complejo IV (citocromo *c* oxidasa). La diferencia de pH es generado por reacciones redox acopladas al bombeo de protones a través de los complejos I, III y IV desde la matriz hacia el espacio intermembranal, mientras que la fuerza protón-motriz para fosforilar ADP se genera en el complejo ATPsintasa (Mathews, 2002).

Los componentes de la cadena transportadora de electrones, al igual que el complejo ATPsintasa, se encuentran inmersos en la membrana interna mitocondrial. En la levadura, la cadena respiratoria está formada por tres enzimas NADH deshidrogenasas en la periferia y por los complejos proteicos II, III y IV embebidos en la membrana. Los sustratos iniciales para las reacciones redox son el NADH y el FADH<sub>2</sub>, sus electrones se transfieren a través del par de enzimas NADH deshidrogenasas para el NADH y el complejo II para el FADH<sub>2</sub>, hasta la Ubiquinona Q, la cual una vez reducida es sustrato del complejo III, donde se oxida y los electrones son transferidos hasta el citocromo *c*, el cual una vez reducido es oxidado por el complejo IV, que a la vez reduce O<sub>2</sub> para formar agua (Suart, 2008). Los protones en el espacio intermembranal regresan a la matriz a través del complejo ATPsintasa proporcionando la energía para fosforilar ADP.

Las proteínas que dan estructura, ensamblan y llevan a cabo las reacciones redox y fosforilación oxidativa, en su mayoría son codificadas en el núcleo, sintetizadas en el citosol y subsecuentemente importadas a la mitocondria. Solamente ocho proteínas son sintetizadas en el genoma mitocondrial: Var1 de la subunidad pequeña ribosomal, Cob del complejo III, Cox1, Cox2 y Cox3 del complejo IV, y Atp6, Atp8 y Atp9 del completo ATPsintasa, (Herrmann & Funes, 2005).



### **Citocromo *c* oxidasa en *S. cerevisiae***

La citocromo *c* oxidasa (CcO) es el último aceptor de electrones de la cadena respiratoria, toma electrones del citocromo *c* y los transfiere al oxígeno molecular para reducirlo a agua. En *S. cerevisiae* está formada por 12 subunidades, de las cuales las tres más grandes Cox1, Cox2 y Cox3, conforman el núcleo catalítico y son codificadas en el genoma mitocondrial (Herrmann & Funes, 2005).

Cox1 posee 12 cruces transmembranales conectados por pequeñas asas y contiene a los grupos hemo  $a/a_3$  y al centro de  $Cu_B$  para reducir el  $O_2$  (Tsukihara et al, 1996). Esta subunidad se codifica por el gen mitocondrial *COX1*. La síntesis de Cox1 se encuentra bajo el control de dos proteínas codificadas en el núcleo: Mss51 y Pet309. Pet309 tiene un papel en el inicio de la traducción, mientras que Mss51 podría también participar en la elongación e integración de Cox1 en la membrana (Perez-Martinez et al, 2003; Barrientos et al, 2004; Pérez-Martínez et al, 2009). Pet309 es un activador traduccional que actúa en la región 5' no traducible del ARNm de *COX1* y que también participa en la acumulación de este transcrito (Manthey & McEwen, 1995). Las mutantes nulas de estas proteínas son incapaces de crecer en medio respiratorio, mientras que en medio fermentativo las colonias crecen con características de tipo *petite*.

### **Proteínas con motivos de alfas hélices de unión a ácidos nucleicos**

Las proteínas que presentan dominios estructurales formados por motivos de alfas-hélices en repeticiones en tándem se encuentran en todos los reinos de la vida, y están involucradas en una variedad de funciones. Las repeticiones en estas proteínas pueden ser de 25-45 aminoácidos en tamaño, consisten de 2-3 hélices con un núcleo hidrofóbico conservado, y se arreglan de 2-25 repeticiones para formar una súper hélice o conformación C (Rubinson et al, 2012). Las repeticiones en tándem son estabilizadas mediante interacciones de largo alcance que tienen lugar sólo entre repeticiones adyacentes, (Main et al 2005) y como consecuencia de esto el total de repeticiones tiende a formar una superficie extendida. Esta particularidad es muy útil para unir macromoléculas y aunque originalmente fueron identificadas las uniones con otras proteínas, se han identificado proteínas con motivos estructurales arreglados en tándem que tienen como molécula afín ácidos ribonucleicos (Filipovska et al, 2011).

La unión de proteínas con ácidos nucleicos es fundamental y esencial para la célula. El genoma de todos los organismos tiene que ser guardado dentro de un compartimento celular, debe ser reparado a la brevedad después de sufrir daño, además de replicado en una copia lo más fiel posible para poder ser heredado a la descendencia, y por supuesto, tiene que someterse a su lectura e interpretación. Las proteínas que están involucradas en todos estos procesos y que participan de manera física y directa, lo hacen mediante residuos específicos en química y posición, que a través de la evolución se ha hecho más compleja por la diversificación de las estructuras proteicas (Mackay et al, 2011; Main et al, 2003).

El metabolismo de ARN tiene un papel importante en la expresión genética en organelos y las proteínas de unión a ácidos nucleicos son esenciales en estos procesos (Stern et al, 2010). La transcripción de las moléculas de ARN a menudo involucra múltiples transcritos con extremos 5' y 3' no traducibles, los cuales deben ser editados para lograr procesar el ARN. Estos primeros transcritos están bajo el control de procesos de maduración, "splicing", escisión y edición. Todos los pasos requieren numerosos factores proteicos específicos codificados en el núcleo (Delannoy et al, 2007).

Las interacciones proteína-ácido nucleico son variadas, incluyen las interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, interacciones tipo apilamiento (stacking) y fuerzas de unión de van der Waals en diferentes combinaciones para ofrecer diferente fuerza de unión y especificidad. Para discriminar entre las diferentes moléculas de ácidos nucleicos, las proteínas emplean un conjunto de características estructurales que interaccionan con las secuencias de bases nitrogenadas y peculiaridades del esqueleto de fosfatos, así como su combinación para identificar el ácido nucleico blanco (Lunde et. al, 2007; Auweter et al, 2006; Mackay et al, 2011).

Se han identificado diversas combinaciones en cuanto a la química y posición de los residuos dentro de las proteínas para unir de diferente manera a las secuencias de ácidos nucleicos que tienen como blanco. Por ejemplo, las PUF (Pumilio and FBF homology) son proteínas con repeticiones en tándem de tres hélices formadas por 36 aminoácidos que en conjunto forman una estructura tipo C. Son proteínas eucariontes que reconocen ARN mediante el siguiente código (Wang, et al, 2002; Quenault et al, 2011):

Residuo posición 12	Residuo posición 16	Base que reconoce
C	Q	A
S	R	C
S	E	G
N	G	U

Tabla 1. Combinación de aminoácidos en las proteínas PUF que unen específicamente a una base nitrogenada

Otra familia es la correspondiente a las proteínas TRAPs (trp ARN-binding attenuation protein). Estas proteínas están formadas por repeticiones largas de 75 aminoácidos en 11 tandem, regulan la transcripción y traducción al unirse a las moléculas de ARN blanco. Para esta familia se ha descrito la firma de nucleótidos GAGNNGAG para el reconocimiento del ARN blanco, donde N es cualquier base del ARN y determina el reconocimiento proteína-ARN (Antson et al, 1999).

Las proteínas TALE (Transcription Activator-Like Effector) pertenecen a bacterias patógenas y tienen como blanco ADN eucariontes. Las repeticiones de estas proteínas consisten de 34 aminoácidos que contienen en las posiciones 12 y 13 los residuos clave para la especificidad de unión con el siguiente código (Boch et al, 2010; Moscou et al, 2009; Boch et al, 2009):

Residuo en posición 12	Residuo en posición 13	Base que reconocen
N	I	A
N	D	C
N	K	G
N	Q	T

Tabla 2. Combinación de aminoácidos en las proteínas TALE que se unen específicamente a una base nitrogenada

La familia de las proteínas PPR fue descrita en el año 2000 por el grupo de Ian Small (Small, 2000). Se han identificado como proteínas que contienen motivos de alfas hélices acomodadas en tándem y formando un solenoide. Mayormente se encuentran distribuidas

en plantas, aunque se han identificado en hongos y el humano. Estas proteínas interactúan con ARN y participan en su metabolismo al dirigir proteínas efectoras al sitio correcto dentro del transcrito de ARN (Delannoy et al, 2007; Okuda et al, 2006; Kotera et al, 2005; Small, 2000; Lurin, 2004; Okuda et al, 2012).

## **Proteínas PPR**

### **Descubrimiento y distribución**

Recientemente las proteínas PPR (por sus siglas en inglés *pentatricopeptide repeat*) han sido descritas como participantes en procesos pos-transcripcionales de regulación de la expresión génica en mitocondrias y cloroplastos. Esta familia de proteínas se caracteriza por presentar motivos repetidos de 35 aminoácidos, mismos que presentan una secuencia poco conservada entre ellos (Small, 2000; Lurin, 2004).

Los primeros estudios sobre estas proteínas se realizaron en levadura, al observar que la pérdida total de la capacidad respiratoria mitocondrial era consecuencia de mutaciones individuales en el gen nuclear *PET309*. Se reportó que la proteína Pet309 se requiere no solo para la activación traduccional del ARNm de *COXI*, sino además para su estabilidad. Su sitio de unión al ARN se encuentra en el extremo 5' no traducible (Manthey, 1995).

Las proteínas PPR primero se identificaron como una nueva familia única en plantas. Son proteínas muy abundantes, representando el 1 % de los genes de *Arabidopsis thaliana* (Lurin, et al, 2004; Aubourg, et al, 2000). Ahora se conoce que son proteínas distribuidas únicamente en organismos eucariontes aunque encontradas mayormente en plantas. Fueron descritas como proteínas similares a las de la familia TPR (*tetratricopeptide repeat*, repeticiones de 34 aminoácidos) las cuales están mejor caracterizadas y forman uniones proteína-proteína. Sin embargo, las proteínas PPR únicamente presentan interacción con ARN (Small, 2000).

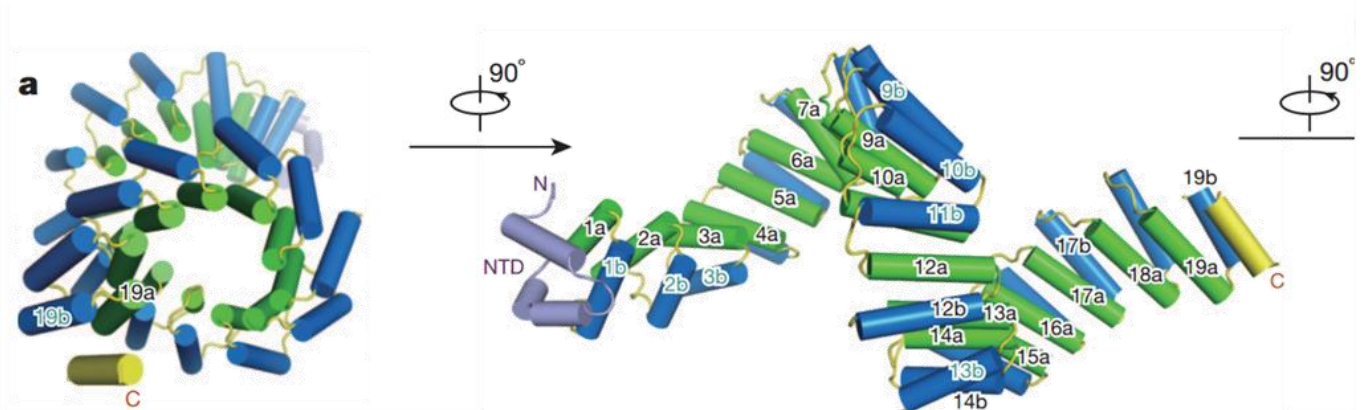
Evidencia genética, molecular y bioquímica demuestra que las proteínas PPR presentan especificidad de reconocimiento por su secuencia blanco (Andres et al, 2007; Bentolilla et al, 2002; Delannoy et al, 2007; Fujii et al, 2013; Okuda et al, 2012). Las mutaciones en las

proteínas PPR resultan en fenotipos que no pueden ser complementados por otras proteínas PPR, lo cual indica que actúan de manera específica (Lurin et al, 2004). Además, la inactivación de una proteína PPR resulta en el mayor de los casos en la deficiencia de uno o dos transcritos. Los datos sobre la participación de las proteínas PPR indican que no son directamente efectores post-transcripcionales, sino, factores implicados en dirigir diferentes efectores al sitio correcto (Delannoy et al, 2007; Okuda et al, 2006; Kotera et al, 2005).

### Motivos PPR

Los motivos PPR fueron predichos en forma de doble hélice anti-paralela basados en su semejanza en secuencia con los motivos de las proteínas TPR (Small, 2000). Esto permitió denominar a las primeras hélices como **A** mientras que a la segundas como **B**. El conjunto de los motivos forman una estructura de solenoide en la cual las hélices A están orientadas hacia el interior y las hélices B hacia el exterior del solenoide (Yin, 2013).

Recientemente se obtuvieron estructuras tridimensionales a partir de la cristalización de proteínas PPR de plantas (Ban et al, 2013; Howart et al, 2012; KE J, 2013; Ringel R, 2011; Yin et al, 2013). Esto permitió confirmar la estructura predicha mediante dicroísmo circular y el análisis *in silico* de las proteínas (Figura 1).



**Figura 1:** Modelo cristalográfico de la proteína PPR10 de cloroplastos de maíz. Se muestra la estructura de solenoide. Las hélices A se muestran en verde, mientras que las hélices B en Azul. Tomado de Yin , et al. 2013.

### Funciones de las proteínas PPR

Las proteínas PPR están involucradas en diferentes procesos del metabolismo de los ácidos ribonucleicos en todos los organismos eucariontes analizados. Se localizan principalmente en cloroplastos y mitocondrias (Tabla 3) y reconocen 1 ó 2 ARN blancos.

<b>Tabla 3.</b> Se muestran ejemplos de proteínas PPR de diferentes organismos y sus funciones en el metabolismo del ARN.				
<b>Gen</b>	<b>Organismo</b>	<b>Proceso molecular de ARN</b>	<b>Blanco</b>	<b>Localización</b>
<i>Rfk1</i>	<i>Raphanus sativus</i>	Traducción	<i>orf125</i>	Mt
<i>Rfo</i>	<i>R. sativus</i>	Traducción	<i>orf138</i>	Mt
<i>Rflb</i>	<i>Oryza sativa</i>	Degradación de ARN	<i>1tp6- orf79</i>	Mt
<i>Rf1, Rf1a</i>	<i>O. sativa</i>	Escisión	<i>1tp6- orf79</i>	Mt
<i>CRR2</i>	<i>A. thaliana</i>	Escisión	<i>ndh8</i>	Cp
<i>CRR4</i>	<i>A. thaliana</i>	Edición	<i>ndhD</i>	Cp
<i>CRR21</i>	<i>A. thaliana</i>	Edición	<i>ndhD</i>	Cp
<i>PGR3</i>	<i>A. thaliana</i>	Estabilización y traducción	<i>petl operon</i>	Cp
<i>HCF152</i>	<i>A. thaliana</i>	Splicing y maduración	<i>petB</i>	Cp
<i>MCA1</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Estabilización	<i>petA</i>	Cp
<i>CRP1</i>	<i>Zea mays</i>	Traducción	<i>petA, psaC</i>	Cp
<i>PPR4</i>	<i>Z. mays</i>	Splicing	<i>rps12</i>	Cp
<i>PPR531-11</i>	<i>Physcomitrella patens</i>	Splicing y maduración	<i>clpP</i>	Cp
<i>LRPPRC, hLRP130</i>	<i>Human</i>	Estabilización	<i>coxI, coxIII</i>	Mt
<i>Cya5</i>	<i>Neurospora crassa</i>	Traducción	<i>coxI</i>	Mt
<i>Pet309</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Estabilización y traducción	<i>coxI</i>	Mt

Tomado de Andrés et al. 2007. Mt: Mitocondria Cp: Cloroplasto

Estas proteínas son esenciales para la función tanto de las mitocondrias como de los cloroplastos. Se ha demostrado que mutaciones en los genes de las proteínas PPR resultan en fenotipos que incluyen defectos en la maduración de semillas (Gutierrez-Marcos et al, 2007), daño en la capacidad fotosintética (Okuda et al, 2006), letalidad embrionaria (Cushing et al, 2005), esterilidad masculina citoplasmática (Bentolila et al, 2002), y

crecimiento de colonias “*petite*”, así como pérdida del crecimiento respiratorio (Tavares et al, 2008). Los procesos en los cuales participan están relacionados con el procesamiento del ARN, en los mecanismos de edición (Gobert et al, 2010; Kotera et al, 2005; Schmitz-Linneweber et al, 2006)(Tabla 1), así como en su estabilidad (Pfalz et al, 2009) y traducción (Yamazaki et al, 2004). Las mutaciones en las proteínas PPR resultan en fenotipos que no pueden ser complementados por otra PPR, lo cual indica que actúan de manera específica (Lurin et al, 2004). Además, la inactivación de una proteína PPR resulta en el mayor de los casos en la deficiencia de un solo transcrito (Delannoy et al, 2007).

A pesar de que su origen es desconocido, se piensa que las proteínas PPR han sido adquiridas para el mantenimiento de la simbiosis de organelos durante el establecimiento de mitocondrias y cloroplastos (Kobayashi et al, 2011).

### **Reconocimiento de ARN**

La secuencia de aminoácidos entre diferentes motivos PPR es muy poco conservada, por lo que ha sido difícil identificar patrones de amino ácidos que puedan explicar la alta especificidad de estas proteínas.

Durante los primeros intentos para tratar de delucidar el mecanismo por el cual las proteínas PPR reconocen al ARN blanco, se tomó como base el mecanismo de las proteínas PUF. Esta familia de proteínas con repeticiones en tándem forma una superficie convexa que interactúa con el ARN. Los residuos que participan en la interacción lo hacen apilando con las bases nitrogenadas mediante sus cadenas laterales, además de formar puentes de hidrógeno mediante residuos como serina y treonina. Las PUF tienen la característica de reconocer a más de una secuencia blanco, sin embargo, las PRR presentan mayor especificidad y su mecanismo de interacción es un tanto diferente. Las PPR evitan la degradación de la secuencia de ARN con la que están interaccionando, lo cual refleja un mecanismo en el cual la proteína rodea las bases de la secuencia blanco (Prikli et al, 2011; Filipovska and Rackham, 2012).

Se han indicado diferentes combinaciones de residuos como determinantes de la especificidad. Small y cols. 2000, propusieron que en las posiciones 2, 4, 5, 8, 12 y 32 de

cada motivo se encuentran residuos claves. Los residuos más frecuentemente encontrados son: T N L N K y E. Por otro lado, en un estudio realizado en plantas (Fuji et al, 2011) se sugirió que las posiciones 1, 4 y 34 son importantes, en estas posiciones los aminoácidos más frecuentemente encontrados son: D V y N. En general, en cada posición sugerida se encuentran aminoácidos básicos y ácidos, incluso de carácter polar sin carga, los cuales pueden formar interacciones con las bases nitrogenadas de la cadena de nucleótidos del ARN. En nuestro laboratorio encontramos que las posiciones 8 y 11 podrían ser importantes (Tavares-Carreón et al, 2008). En este caso se encontró que los residuos básicos R424 y K427 de la proteína Pet309 afectan la capacidad respiratoria en levadura. Se predice que estos residuos se encuentran en la hélice A, y que están orientados hacia adentro del solenoide. No obstante, se sugiere que la interacción con el ARN podría depender de la combinación de varios aminoácidos, así como de sus características individuales (Kobayashi et al, 2011). En experimentos de unión proteína-ARN mediante geles de retardo se observó que los cambios de aminoácidos químicamente similares (K:H, ambos básicos) no modifican la unión con el ARN blanco, mientras que el cambio de aminoácidos diferentes en la misma posición (K:N, un aminoácido básico por uno polar sin carga) reduce la interacción. Se sugiere que la interacción PPR/ARN está mediada por una conexión compleja de aminoácidos entre motivos vecinos, así como dentro de un mismo motivo (Kobayashi et al, 2011).

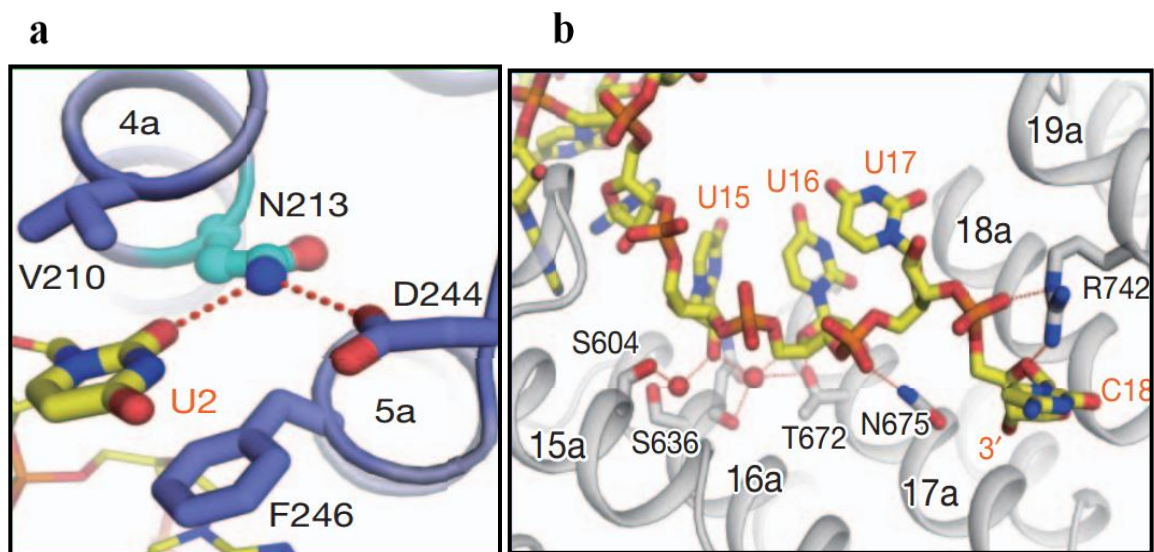
Las predicciones sobre la estructura de las proteínas PPR, así como las posiciones de aminoácidos importantes para la interacción y reconocimiento del ARN, cada vez se han confirmado mejor con la obtención de estructuras cristalográficas de diferentes proteínas PPR. Por ejemplo, Ban et al 2013, obtuvieron la estructura cristalográfica de la proteína THA8L de *A. thaliana*, en la que se observaron las hélices alfa antiparalelas características de esta familia de proteínas, mientras que Ke et al. 2013 identificaron que la proteína THA8 forma homo-dímero *in vitro*, además Howard et al, 2012 observaron la interacción entre el ARN y la proteína Prop1 de *A. thaliana*, y Ringel , et al, 2011 la del RNAP mitocondrial de humano.

El grupo de trabajo de Yin et al. (2013), obtuvo el primer cristal de una proteína PPR. La proteína es PPR10, una proteína de maíz, tiene la función de bloquear la degradación de los



transcritos *atpH* y *atpI* por exorribonucleasas. En este trabajo fue posible definir las interacción PPR/ARN. Además se observó que PPR10 forma un dímero antiparalelo con dos moléculas de ARN. La molécula de ARN efectivamente se observó dentro de la cavidad del cilindro formado por PPR10.

El código de reconocimiento consiste en aminoácidos de las posiciones 2, 5 y 35 de una repetición, y de la 2 de la siguiente repetición de la siguiente manera: los de las posiciones 2 ofrecen interacción de tipo apilamiento mientras que las posiciones 5 y 35 se coordinan con la base del ARN mediante enlaces de puentes de hidrógeno para dar especificidad de unión (ver figura 2). En total se necesitan 4 aminoácidos para unir una base nitrogenada. Los aminoácidos básicos en el resto de la alfa hélice A coordinan el esqueleto de fosfatos. La importancia de la posición 5 se comprobó mediante mutagénesis dirigida, en donde los cambios de residuos N:A resultó en la pérdida de la unión al ARN blanco (Yin et al. 2013).



**Figura 2.** Reconocimiento de ARN blanco por PPR10. **a)** El nucleótido uracilo (U2) se apila con las posiciones 2 (V210 y F246), de repeticiones adyacentes (4a y 5a), y forma puente de hidrógeno con la posición 5 (N213), el que está en la posición 35 coordinado con un puente de hidrógeno (D244). **b)** El esqueleto de fosfatos es estabilizado por residuos de las hélices A. Tomado de Yin et al. 2013.

Al analizar el alineamiento de las 19 repeticiones de PPR10, claramente se distingue un patrón conservado de aminoácidos hidrofílicos no polares en las posiciones 5 y 35, mientras que en las posiciones 2 predominan los aminoácidos hidrofóbicos (Barkan A, et al. 2012;

Takenaka et al 2013, Yin et al, 2013). Las interacciones PPR-ARN varían de acuerdo al tipo de residuos y bases nitrogenadas que intervengan, además de la parte de la secuencia del ARN donde la unión ocurra. El extremo terminal 3' contribuye menos a la afinidad en la interacción, mientras que el extremo terminal 5' no permite tantos cambios en la secuencia para ser reconocida como blanco. Estos datos sugieren que el inicio de la interacción es por el extremo terminal 5' (Barkan et al 2018).

### **Pet309**

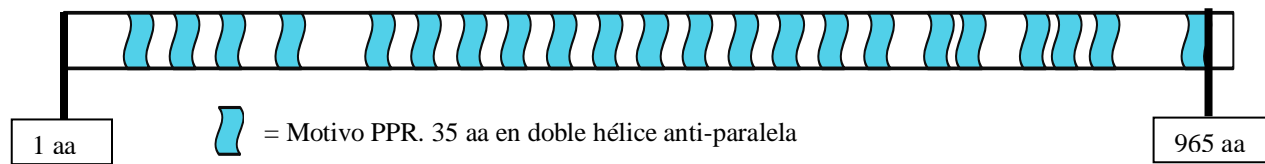
Pet309 es una proteína compuesta por 965 aminoácidos, es codificada en el genoma nuclear e importada hasta la matriz mitocondrial (Manthey & McEwen, 1995), donde se encuentra asociada a la membrana interna mitocondrial como una proteína periférica (Tavares-Carreón et al, 2008).

Pet309 como miembro de las proteínas PPR (Lipinsky et al, 2011) se ha identificado como uno de los activadores traduccionales del ARNm de Cox1, participa en su extremo 5' no traducible, afecta la acumulación y estabilidad del mensajero principalmente en transcritos con intrones (Manthey & McEwen, 1995; Tavares-Carreón et al, 2008). Las cepas nulas de Pet309 no sintetizan Cox1 por lo que son incapaces de crecer en medios respiratorios, mientras que en medios fermentativos las colonias son *petite*. Actualmente no contamos con la estructura cristalográfica de Pet309. Sin embargo, las predicciones *in silico* que se han realizado para conocer el número de motivos PPR en Pet309 han mostrado que prácticamente toda la proteína está compuesta por este tipo de repeticiones. Uno de análisis detecta 13 motivos centrales arrojado por el servidor *TPRpred*. Este se basa en información de proteínas PPR pertenecientes a plantas para identificar motivos dentro de cualquier proteína. Por otro lado el trabajo de Lipinski et al, (2011), muestra además de estos 13 motivos centrales, 10 más distribuidos hacia ambos extremos de Pet309. Lo anterior se logró al emplear secuencias de ortólogos del genoma de levaduras. De los 13 motivos centrales, se ha logrado identificar que cada uno de un total de 12 son necesarios para que Pet309 funcione como activador traduccional (Tavares-Carreón et al, 2008; Zamudio et al, 2014). Zamudio et al, 2014, demuestran que Pet309 interacciona físicamente con el ARNm

de Cox1 antes de que sea procesado del transcrito policistrónico e independientemente de si el ribosoma está activo.

### **Predicción de motivos PPR en Pet309**

Pet309 es una proteína de 965 aminoácidos que de acuerdo al trabajo de Lipinski, et al (2011) sugiere 22 motivos PPR para Pet309.



Se muestra la distribución de los 22 motivos PPR en la proteína Pet309. aa = aminoácidos. Modificado de Lipinski KA., et al (2011).

La mayoría de los estudios sobre las proteínas PPR se han realizado en plantas, lo cual ha generado la cantidad de datos necesaria para poder proponer un código de reconocimiento proteína PPR-secuencia ARN. Estos datos no se ven reflejados en los motivos PPR de hongos, en los cuales las posiciones consenso muestran diferencia en comparación a las plantas (Sam M. 2015, observación de nuestro laboratorio).

## Justificación

Todos los datos obtenidos relacionados a la importancia que tienen ciertas posiciones de las repeticiones PPR en la función, afinidad y especificidad de las proteínas se han realizado con secuencias de plantas (Lurin et al 2014; Benjamin, et al 2015; Barkan et al, 2012; Hayes et al, 2012; Ke et al, 2013; Kobayashi et al, 2011). Sin embargo, observamos que en *S. cerevisiae* no todas las posiciones importantes en plantas parecen estar conservadas. Es posible que en hongos exista un código de reconocimiento y unión a ARN que sea un poco diferente al de plantas. En este trabajo nos propusimos estudiar el papel de algunos aminoácidos de Pet309 que podrían ser importantes en su función.

En el laboratorio se emplearon los programas de predicción de estructuras terciarias I-TASSER y ROBETTA para obtener un modelo estructural. Estas herramientas se han empleado para observar la disposición de los diferentes residuos a través del solenoide, con lo cual se ha trabajado y reportado que una doble mutación de residuos básicos, R424A/K427A, en la hélice A orientados hacia el interior del solenoide origina un fenotipo deficiente en el crecimiento respiratorio, relacionado con el déficit de traducción del ARNm de *COXI* (Tavares-Carreón et al, 2008). Estos datos sugieren que el modelo obtenido es una buena herramienta para analizar a los motivos PPR de Pet309 y proponer mutaciones que nos permitan comprender mejor la importancia de los residuos que se orientan hacia el interior del solenoide y que por lo tanto, se espera que sean importantes para la interacción de Pet309 con el ARN.

Los descubrimientos en los residuos y posiciones involucrados en el reconocimiento de ARN por proteínas han proporcionado conocimiento sobre la expresión de genes en eucariontes, así como herramientas flexibles para estudiar y manipular genomas y transcriptomas. Se requieren estudios que proporcionen información estructural y detallada para fines de obtener mayor información sobre proteínas de unión a ácidos nucleicos. En plantas se han descrito las interacciones proteína PPR con su ARN afín, lo cual aumenta el acervo de conocimientos sobre este mecanismo esencial para la biogénesis y funcionamiento de cloroplastos y mitocondrias mediante la regulación de su material genético a nivel pos-transcripcional. Sin embargo, estas observaciones no parecen aplicar a

proteínas de levadura, ya que en las posiciones sugeridas y comprobadas mediante técnicas bioquímicas y moleculares no suele haber el tipo de aminoácidos que se tiene en el cristal de PPR10 y que se sugieren en plantas (Barkan, et al. 2012; Takenaka et al, 2013, Yin et al, 2013)

Por ello, se pretende analizar residuos en Pet309 que de acuerdo al modelo bioinformático tienen propiedades fisicoquímicas y están localizados estratégicamente hacia dentro del solenoide donde pueden interactuar con el ARNm de *COXI*.

Por otro lado, modelos cristalográficos de proteínas PPR de plantas han arrojado que estas proteínas pueden encontrarse formando dímeros (Yin, et al 2013). En este trabajo también pretendemos estudiar si en condiciones *in vivo*, Pet309 puede formar dímeros, ya que la dimerización observada en estudios estructurales podría deberse a un artefacto por las altas concentraciones que deben emplearse de las proteínas PPR.

## **Hipótesis**

La función de los motivos PPR de Pet309 sobre la traducción del ARNm de *COXI* está determinada por aminoácidos básicos o aromáticos, que y que interactúan con las bases nitrogenadas de la cadena nucleotídica. Estos aminoácidos podrían formar interacciones electrostáticas o tipo stacking con el ARNm.

Pet309 es funcional como monómero en las mitocondrias

## **Objetivo general**

1. Determinar el efecto de mutaciones puntuales sobre residuos de motivos PPR de Pet309 sobre la función de la proteína.
2. Identificar si Pet309 forma dímeros *in vivo*.

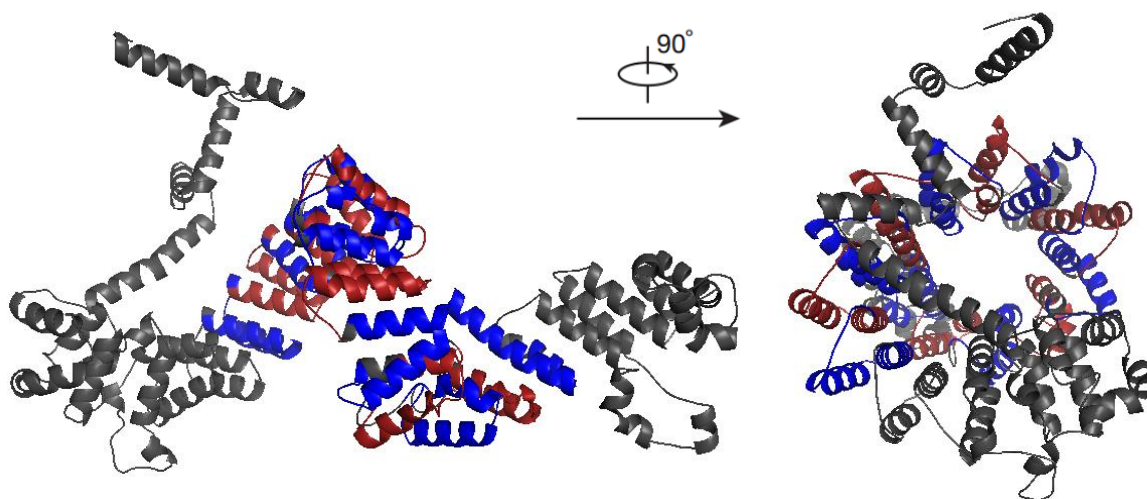
### **Objetivos particulares**

- Obtener un modelo estructural de Pet309 mediante análisis *in silico* basado en las estructuras tridimensionales de los cristales obtenidos de otras proteínas PPR.
- Identificar los residuos que de acuerdo al modelo están orientados hacia el interior del solenoide y realizar mutagénesis dirigida de algunos de estos residuos.
- Caracterizar las mutantes de levadura con las diferentes construcciones de Pet309.
- Realizar ensayos de doble híbrido y de inmunoprecipitación de Pet309 con dos diferentes epítopes para detectar si forma dímeros en mitocondrias *in vivo*.

## Resultados

### Elaboración de modelos estructurales predichos sobre la estructura de Pet309

Se crearon modelos estructurales computacionales de PET309 usando los servidores *online* I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), SWISSMODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) y ROBETTA (<http://rosetta.bakerlab.org/>) los cuales mostraron la forma helicoidal característica de las proteínas PPR (Yin P, 2013) (Figura 3). Estas predicciones permitieron visualizar los residuos pertenecientes a las hélices A orientados al centro del solenoide y que pensamos que cuentan con cadenas laterales que les permitirían interactuar con el ARNm de *COXI*. Con estos criterios y los antecedentes de residuos identificados como necesarios para la función de Pet309 (Tavares-Carreón et al, 2008), se eligieron los cambios de aminoácidos en Pet309 que supusimos nos proporcionarían información sobre el mecanismo de las proteínas PPR en levadura.



**Figura 3.** Predicción de la estructura de Pet309. En azul y en rojo se muestran los 13 motivos centrales de Pet309, originalmente analizados por nuestro grupo. (Tavares-Carreón et al, 2008, Zamudio O et al, 2014).

### **Identificación de residuos dentro de Pet309 para llevar a cabo mutagénesis dirigida**

Con el modelo de la figura 3 nos propusimos identificar residuos que presentaran las mismas características que aquellos que en estudios previos produjeron fenotipos diferentes al tipo silvestre (Tavares-Carreón et al, 2008). Nos enfocamos principalmente en aminoácidos básicos y que se localizaran hacia el interior del solenoide. También cambiamos aminoácidos aromáticos o cargados negativamente pero que estuvieran orientados hacia el interior del solenoide. Los residuos seleccionados fueron los siguientes:

<b>PPR</b>	<b>Mutación</b>	<b>PPR</b>	<b>Mutación</b>
2	Y354A	6	D496A / E500A
2	Y354L	7	K530A
2	Y354L/R358A	7	K533A
3	Y389L	7	K530A / K533A
3	Y389L / K393A	8	K564A
6	D496A	8	K568A
6	E500A	8	K564A / K568A

Las mutaciones se realizaron empleando el kit comercial QuikChange II Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies®), que introduce la mutación directamente en el plásmido de interés mediante PCR, para después eliminar el plásmido molde con la endonucleasa *DpnI* que es específica de ADN hemi-metilado y metilado.

El molde empleado fue pXP97 que contiene a *PET309* en su versión silvestre con tres epítopos de hemaglutinina en el extremo carboxilo terminal (3XHA) (Tavares-Carreón et al, 2008). De las 14 versiones mutadas de Pet309 propuestas se obtuvieron 13. La única mutante que no se pudo obtener fue la Y354L/R358A.

La presencia de las mutaciones se comprobó mediante el análisis de la secuencia de ADN con la empresa Macrogen, Inc.



### **Las mutantes de Pet309 no generaron un fenotipo respiratorio observable**

Se transformó con cada uno de los plásmidos con versiones mutadas de *PET309* en la cepa XPM232, la cual tiene al gen *pet309* eliminado con un cassette de *LEU2* (Tavares-Carreón et al, 2008).

En seguida se realizaron diluciones seriadas de las diferentes cepas en medio fermentativo y respiratorio a 25, 30 y 37 °C para evaluar el crecimiento (Figura 4). Como control de las mutaciones en Pet309 que sabemos que afectan la función de la proteína se emplearon dos mutaciones con fenotipo deficiente en crecimiento respiratorio: K424A que presenta un fenotipo poco marcado y la doble mutante K424A/R427A que muestra el fenotipo más evidente (Tavares-Carreón et al 2008).

El fenotipo de las mutantes resultó ser similar al del tipo silvestre a las tres temperaturas probadas, lo cual nos indica que los cambios de estos residuos y su posición no son indispensables para la función de Pet309.

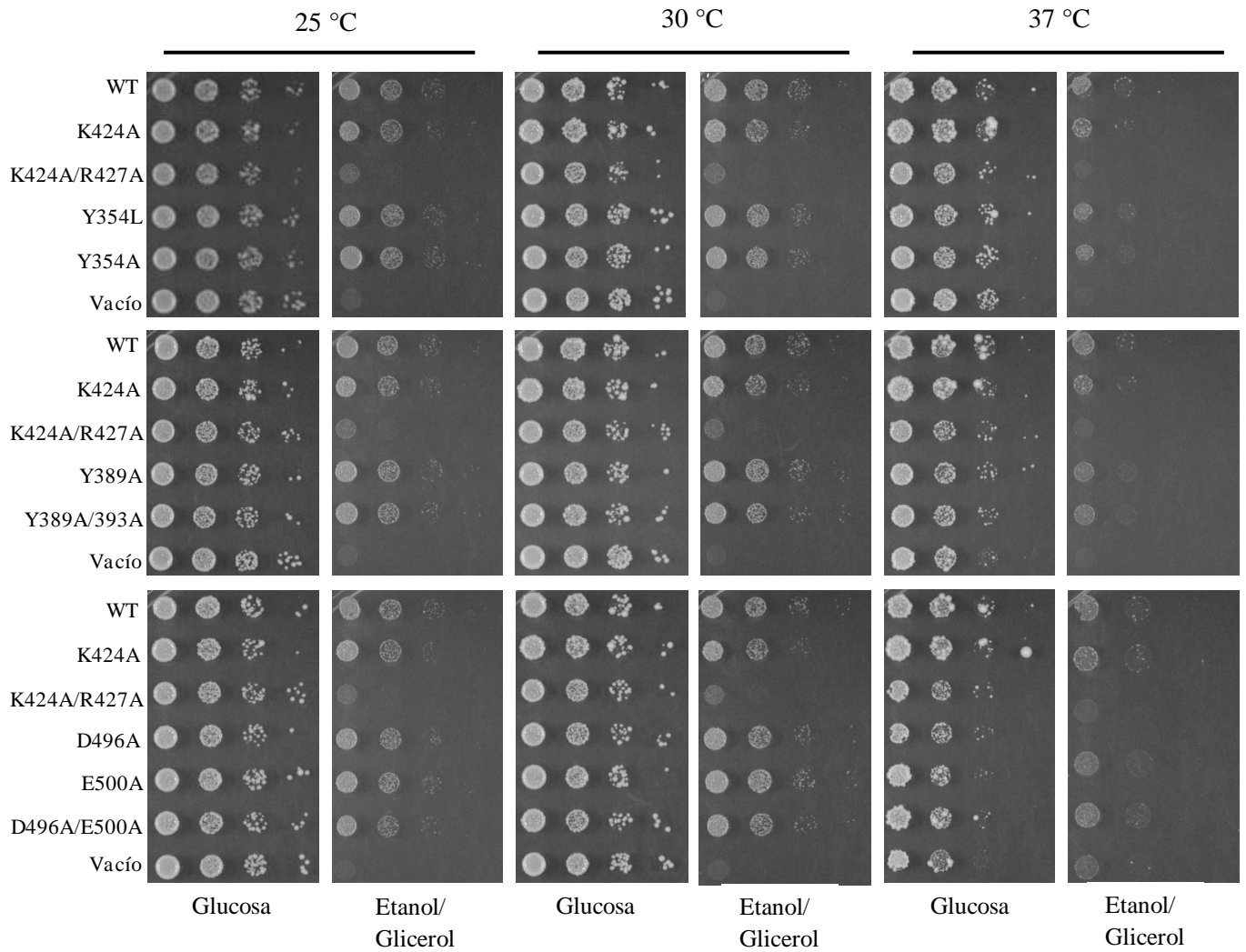


Figura 4a. Crecimiento a tres temperaturas de levaduras transformadas con las construcciones de las diferentes mutantes de *PET309*. Las diluciones seriadas se llevaron a cabo con fuente de carbono fermentable (glucosa) y sustratos oxidables (etanol/glicerol). Las cepas se crecieron 3 días a las temperaturas indicadas. Como controles se emplearon las mutaciones K424A y K424A/R427A (Tavares-Carreon et al, 2008).

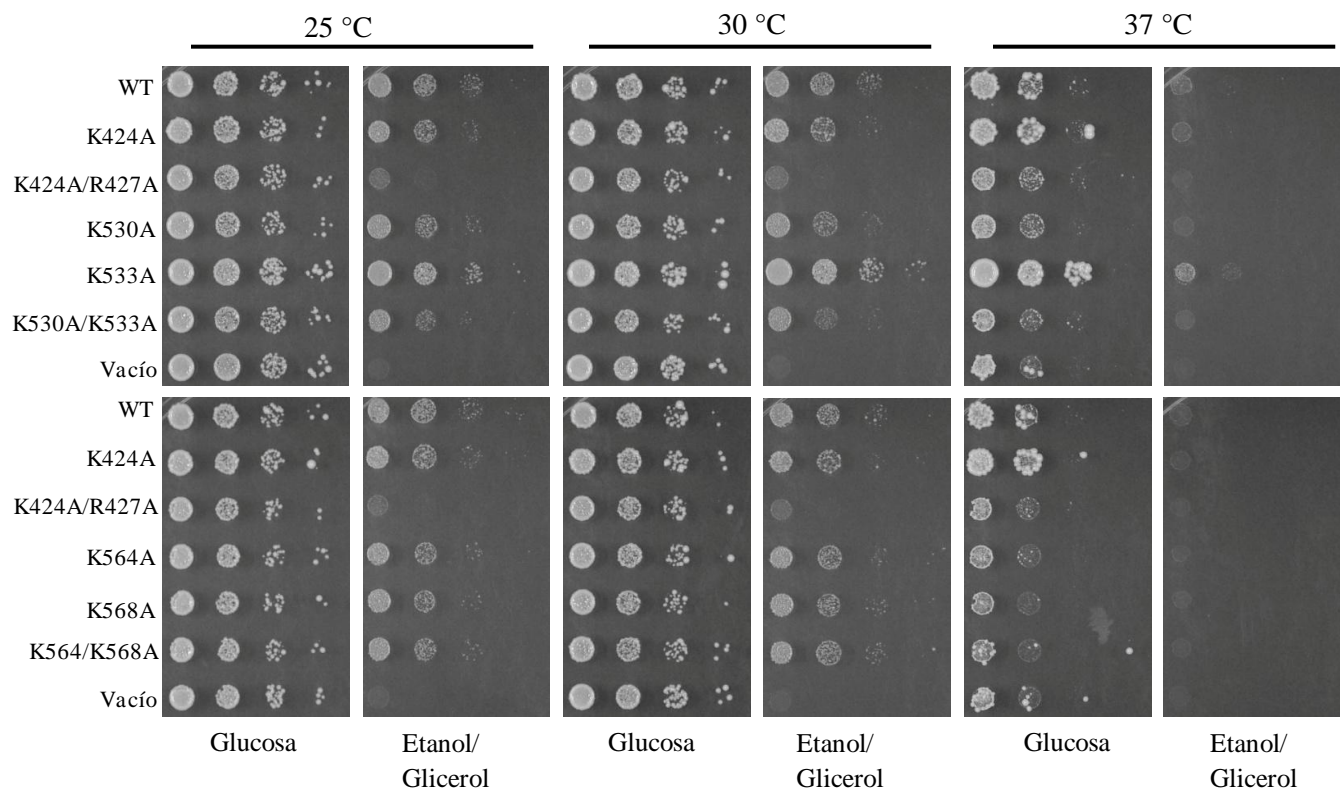


Figura 4b. Crecimiento a tres temperaturas de levaduras transformadas con las construcciones de las diferentes mutantes de *PET309*. Las diluciones seriadas se llevaron a cabo con fuente de carbono fermentable (glucosa) y sustratos oxidables (etanol/glicerol). Las cepas se crecieron 3 días a las temperaturas indicadas. Como controles se emplearon las mutaciones K424A y K424A/R427A (Tavares-Carreón et al, 2008).

### Los niveles de *Pet309* y de *Cox1* varían en cada cepa mutante

Se compararon los niveles tanto de *Pet309*-3xHA como de *Cox1* en mitocondrias aisladas de las diferentes cepas mutantes generadas. Como control empleamos las cepas con *Pet309*-K424A y *Pet309*-K424A/R427A, cepas en que la función de *Pet309* sí se ve afectada (Tavares-Carreón et al, 2008). Ver figura 5.

Se observó que la única mutante en que los niveles de *Cox1* disminuyeron dramáticamente fue en K424A/R427A, lo cual correlaciona con que esta fue la única mutante previamente reportada que presentó un fenotipo respiratorio (Tavares-Carreón et al, 2008). En el resto de las cepas se observó que los niveles de *Cox1* fueron al menos de la misma cantidad que la cepa silvestre, explicando que no hayamos encontrado fenotipo respiratorio en ningún caso. Los niveles de *Pet309*-3xHA variaron mucho entre cada mutante y no correlacionaron con la actividad respiratoria observada.

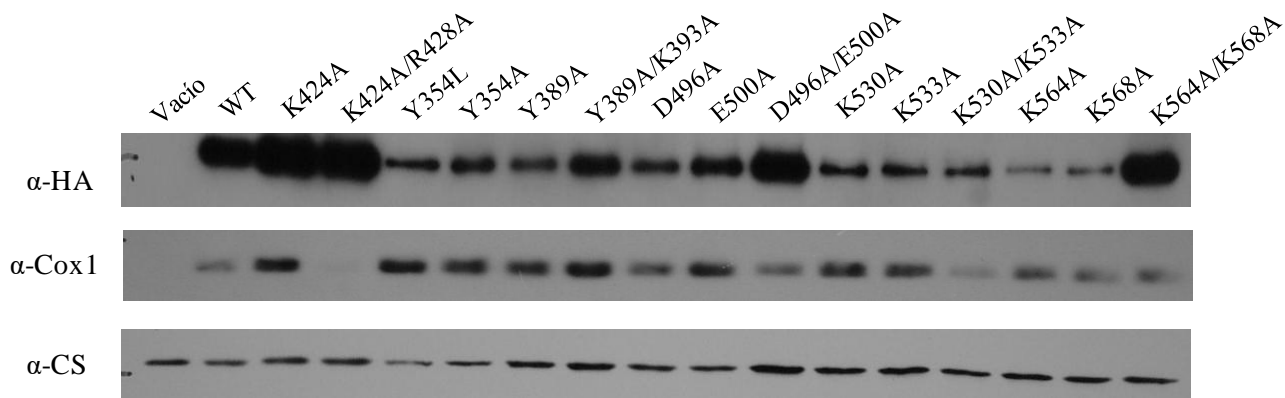


Figura 5. Análisis por western blot de las mutantes realizadas. Se muestran los niveles de Pet309-HA, Cox1 y como control de carga Citrato sintasa (CS).

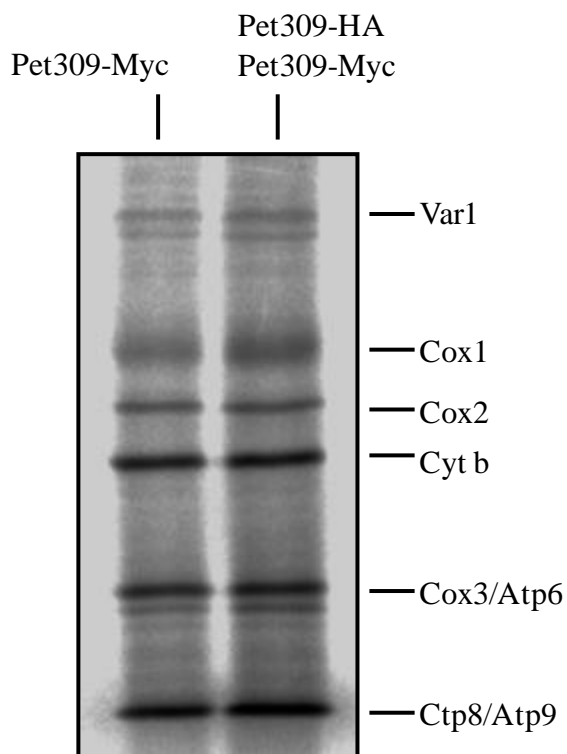
### **Análisis de Pet309 como homodímero *in vivo*.**

Con el propósito de averiguar si Pet309 forma homodímeros *in vivo*, se emplearon dos procedimientos.

Por un lado se emplearon cepas que contenían dos poblaciones distintas de Pet309. Una población tiene a Pet309 con un triple epítipo de hemaglutinina fusionado a su extremo carboxilo terminal (Pet309-3xHA), mientras que la otra población tiene a Pet309 con un triple epítipo de c-MYC fusionado a su extremo carboxilo terminal (Pet309-3xMYC). Ambas construcciones se expresaron desde plásmidos y se cotransformaron en una cepa con el gen endógeno de *pet309Δ::LEU2*. Como control negativo se empleó una cepa en que sólo Pet309-3xMYC estaba presente.

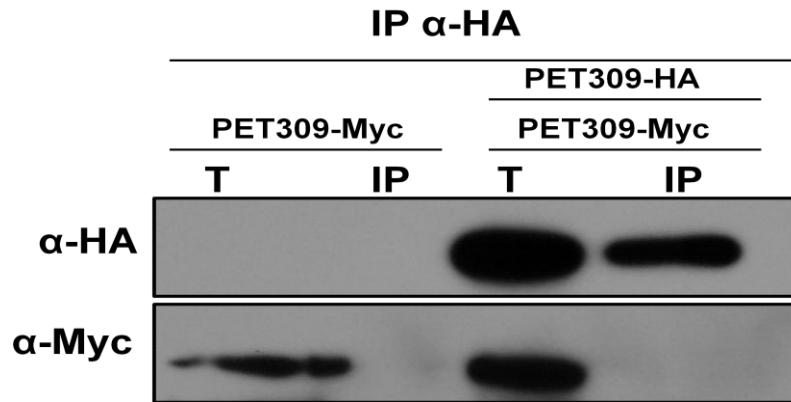
Se purificaron mitocondrias de estas cepas y se les incubó en condiciones de traducción mitocondrial (*in organello translation - ioTL*) con la finalidad de demostrar que la presencia de los epítopes no interfieren en la función de Pet309. Adicionalmente nos aseguramos de que el experimento de interacción Pet309-Pet309 se realice en condiciones de traducción activa. Las mitocondrias se incubaron con un amortiguador que contenía (<sup>35</sup>S)-metionina, la cual se incorporó a las proteínas mitocondriales recién sintetizadas.

Posteriormente, se analizaron estas proteínas mediante SDS-PAGE y autoradiografía. Demostramos que Cox1 es sintetizada cuando Pet309 tiene un epítotope 3xHA o cuando tiene dos poblaciones, una epítotope 3xHA y otra con 3xMYC (Figura 6). El experimento muestra que aún cuando existan dos poblaciones con epítotos diferentes en Pet309, Cox1 sigue traduciéndose, los epítotos no interfieren en la función de Pet309.



**Figura 6.** Resultado del IoTI donde podemos observar que Cox1 es sintetizada cuando Pet309 tiene uno o dos epítotos.

Posteriormente se solubilizaron las mitocondrias con digitonina y el lisado se incubó con perlas de proteína A-sefarosa precargadas con un anticuerpo contra el epítotope HA (Roche). La fracción total de mitocondrias y el inmunoprecipitado se analizaron por western blot con anticuerpos contra HA y contra MYC (Figura 7).



**Figura 7.** Análisis por western blot de la inmunoprecipitación de Pet309-3xHA. T=Total, IP=inmunoprecipitado.

Observamos que en la fracción total del control con Pet309-Myc se detectó correctamente la presencia de la proteína. De igual manera, en la cepa con Pet309-3xHA/Pet309-3xMyc se detectaron ambas proteínas. Sin embargo, en esta última cepa, después de inmunoprecipitar a Pet309-3xHA no se detectó la presencia de Pet309-3xMYC. Este resultado sugiere que al menos bajo estas condiciones experimentales no es posible detectar interacciones entre ambas fusiones.

Por otro lado, como segunda estrategia para analizar una posible interacción entre dos moléculas de Pet309, se llevaron a cabo ensayos de doble híbrido (Anna Brückner et al, 2009). En este caso las levaduras se co-transformaron con dos plásmidos distintos: uno en que *PET309* se fusiona a la región BD (*Binding Domain*) de Gal4 (*PET309-BD*) y el otro en que *PET309* se fusiona a la región AD (*Activating Domain*) de Gal4 (*PET309-AD*). Como controles negativos empleamos cepas en que se transformó con una copia de plásmido conteniendo ya sea a *PET309-BD* ó *PET309-AD* y el par con plásmido vacío. Las transformantes se crecieron en un medio sin adenina o sin histidina para determinar la existencia de una posible interacción entre dos monómeros de Pet309 (Figura 8).

En este experimento no fue posible detectar crecimiento alguno en los medios indicados, apoyando nuestra observación de que Pet309 no forma homodímeros *in vivo*.

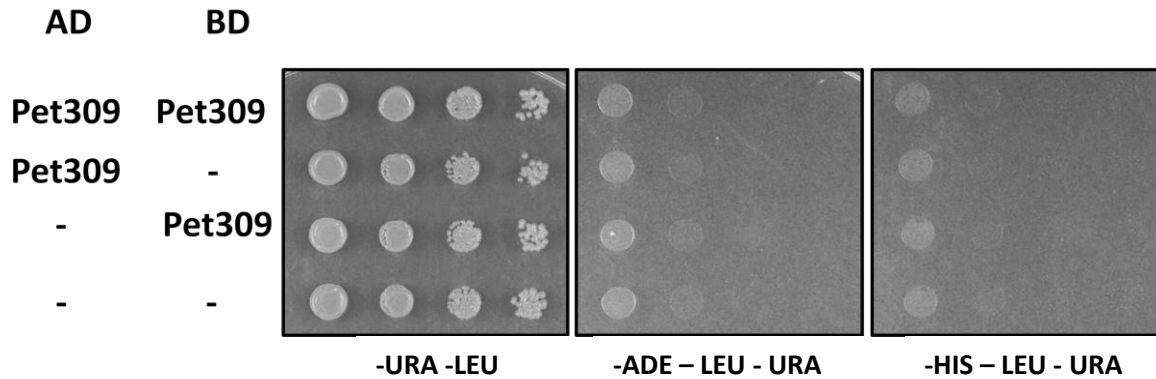


Figura 8. Pet309 no parece formar homodímeros mediante el ensayo de doble híbrido. Las cotransformantes con plásmidos codificando a Pet309-AD, Pet309-BD o plásmidos vacíos se crecieron 5 días en diluciones seriadas a 30 °C en los medios indicados. AD (Dominio de activación), BD (dominio de unión), las líneas horizontales representan plásmido vacío.

Como un control positivo de nuestros ensayos de doble híbrido empleamos cepas en que sabemos que hay una clara interacción entre 2 proteínas, Pet54 y Pet122. Estas proteínas son activadores traduccionales del mRNA de *COX3* (Dimmer , et al 2002, Costanzo , et al. 1989, Kloeckener-Gruissem, et al 1988), y está reportado que interaccionan físicamente. En nuestras manos fue posible reproducir este resultado (Figura 9), indicando que nuestras condiciones de ensayo de doble híbrido son adecuadas, y validando nuestros resultados sobre la no interacción Pet309-Pet309.

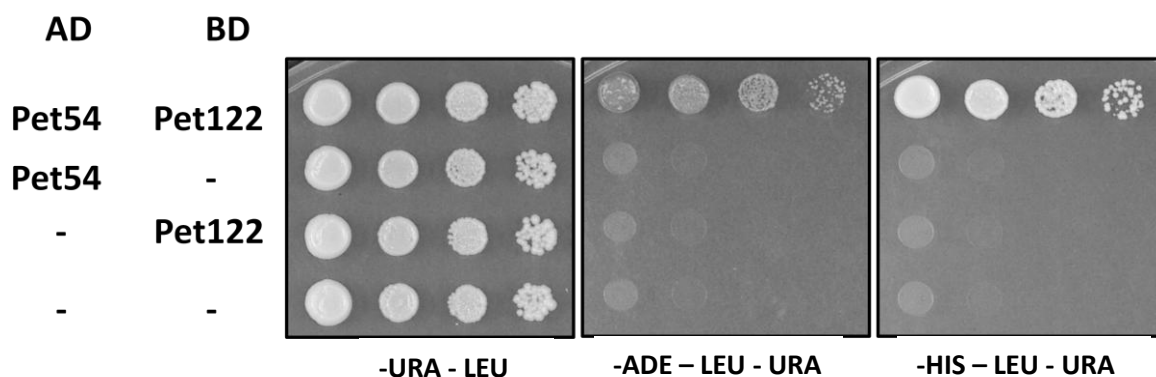


Figura 9. Ensayo de doble híbrido que muestra la interacción de Pet54 con Pet122. Se muestra el crecimiento en diluciones seriadas por 5 días a 30 °C. AD (Dominio de activación), BD (dominio de unión), las líneas horizontales representan plásmido vacío.

## Discusión

Las proteínas PPR son muy importantes en la biogénesis y función de mitocondrias y cloroplastos (Sam, et al 2015). Estas proteínas tienen entre 2 y 26 repeticiones, y nuestra proteína de interés, Pet309, tiene 22 repeticiones (Lipinsky et al, 2011). Estas proteínas tienen una alta especificidad de reconocimiento de uno o dos blancos de RNA por cada proteína. Pet309 sólo tiene como ARNm blanco a *COXI* (Zamudio et al, 2014, Manthey & McEwen, 1995).

El reconocimiento de los motivos PPR sobre sus ARN's blanco se ha estudiado principalmente en plantas, pero poco se sabe de este código en proteínas de otros eucariontes, incluida la levadura. En plantas, se conoce que las posiciones 2, 5 y 35 son importantes para la interacción y reconocimiento del ARN blanco (Yin, et al 2013, Shen, et al 2015, Barkan, et al. 2012). Mediante experimentos de diseño y síntesis de proteínas se ha demostrado la combinación de residuos que reconocen cada una de las bases nitrogenadas (Yin, et al 2013, Shen, et al 2015, Barkan, et al. 2012). Los primeros experimentos demostraron que las proteínas tienen blancos específicos (Barkan A, et al. 2012), y se obtuvo un gran avance cuando se lograron identificar las regiones de interacción proteína-ARN mediante cristalografía de rayos X (Yin, et al 2013). Aunado a esto, se llevaron a cabo análisis con proteínas y ARN blancos diseñados estratégicamente para ensayos de interacción *in vitro* (Shen et al, 2016, Guly et al, 2015). Toda esta información permitió identificar un código de reconocimiento de las proteínas PPR de plantas con su ARN blanco, en donde dos motivos en conjunto reconocen a una base nitrogenada (Yin, et al, 2013).

La especificidad que han demostrado estas proteínas PPR se debe a la estructura de solenoide que poseen. Podemos ver la ventaja que la forma de un solenoide ofrece cuando analizamos otras proteínas con esta forma. Las proteínas pertenecientes a la familia PUF adoptan forma de "C" gracias a las tres alfa hélices que conforman cada una de las repeticiones. Cada repetición consta de 36 residuos que proporcionan la estructura triangular de tres alfas hélices. De las tres alfa hélices, la del extremo N-terminal y la del extremo C-terminal son las que participan en la interacción con el extremo 3' no traducible



del ARNm. Del lado cóncavo en la forma “C” están las alfas hélices del extremo N-terminal y del extremo C-terminal, mientras que la hélice media está localizada en el lado convexo. Las dos hélices localizadas en el lado cóncavo son las que participan en la interacción con el extremo 3´no traducible del ARNm blanco. El código que se ha logrado elucidar es el siguiente: Adenina por Cisteina y Glutamato, Guanina por Serina y Glutamato, Uracilo por Arparagina y Gutamina, y por último Citosina por Arginina y Serina. Los tipos de residuo que se encuentra en las posiciones 12 y 16 proporcionan el contacto específico, mientras que la posición 13 la de apilamiento (Yin, et al 2013, Miranda RG et al, 2018)

Nosotros comparamos la preferencia de amino ácidos en cada posición de los 10 motivos PPR de la proteína de cloroplasto PPR, y la comparamos con la de los 22 motivos PPR de Pet309. Encontramos que sólo en muy pocas posiciones se encuentran aminoácidos similares entre Pet309 y PPR10. De hecho, las posiciones 2, 5 y 35 en plantas, no se encuentran muy conservadas en Pet309. Esto sugiere que el código de reconocimiento Pet309-ARNm de *COXI* es diferente al código identificado en plantas.

Por ello fue que se decidió identificar los aminoácidos que podrían contribuir al reconocimiento y afinidad de Pet309 con su ARN blanco. Para ello se llevó a cabo la mutagénesis dirigida de ciertos aminoácidos en posiciones que podrían ser clave para contribuir a entender ese código.

La lógica que siguió para elegir estas posiciones es que son las mismas posiciones que en plantas se han reportado ser importantes. En este sentido, cuando se realizan modificaciones de aminoácidos en estas posiciones, hay un resultado negativo en el fenotipo como puede ser defecto en el desarrollo de hojas, o en la fotosíntesis (Barkan et al, 1994), de semillas (Gutierrez-Marcos, et al 2007), falta de germinación (Bryan et al 2011, Dinget al 2006), o bien, un resultado negativo en la estabilidad o traducción del ARN (Shikanai , 2013). Esta lógica no fue la única que usamos para determinar qué aminoácidos mutar, ya que para se consideraron también el tipo de aminoácidos que en estas posiciones están presentes en Pet309. Los aminoácidos que en estudios se han reportado ser importantes para la función de las PPR, son aminoácidos con carga y polares que pueden formar interacciones de tipo puentes de hidrógeno o de apilamiento con las bases

nitrogenadas del ARN. Es importante mencionar que las interacciones que podrían participar en el reconocimiento también podrían ser de tipo Van de Wals (Yin et al 2013).

En el modelo que obtuvimos podemos observar que los aminoácidos mutados están orientados hacia el centro del solenoide, en la hélice A, donde el ARNm de *COXI* debe interaccionar y ser reconocido de manera específica por Pet309.

En este trabajo encontramos que las mutaciones generadas no afectaron drásticamente la función de Pet309, ya que el crecimiento de las mutantes en medios respiratorios no se afectó. Aún falta determinar la actividad de la citocromo *c* oxidasa en mitocondrias aisladas para saber si hubo algún efecto en la función de Pet309 (y por lo tanto, en la eficiencia de síntesis de Cox1). En la levadura, la actividad de la citocromo *c* oxidasa no es limitante para el crecimiento no respiratorio (Sima, 2017), por lo que nuestro análisis de crecimiento respiratorio no necesariamente refleja un defecto pequeño en la citocromo *c* oxidasa. Sin embargo, este resultado también nos puede sugerir que la función de Pet309 no fue alterada negativamente en las cepas mutantes generadas, y que el reconocimiento y activación traduccional del ARNm de *COXI* no se comprometió.

El análisis y selección de aminoácidos que se utilizó en este trabajo se basa en un modelo producido *in silico*, ya que no hay modelo cristalográfico de Pet309. Existe la posibilidad de que los aminoácidos que seleccionamos estén orientados en un lado diferente al predicho. Otra posible explicación es que los motivos PPR acomodados a los lados de un motivo mutado podrían compensar la deficiencia de ese motivo, de tal manera que el efecto de un par de amino ácidos mutados en un motivo PPR se puede compensar con los otros pares de PPR's que siguen silvestres y que están a su alrededor, esto es porque de acuerdo a los reportes de proteínas PPR que cuentan con cristales, en las interacciones y reconocimiento del ARN blanco están participando aminoácidos de motivos o repeticiones adyacentes (Yin et al 2013). El efecto sinérgico de los PPR's en Pet309 se ve cuando se eliminan los 12 motivos, donde Pet309 sigue uniéndose al ARN de *COXI* pero con menor afinidad (Zamudio et al, 2014).

Recientemente se encontró que la helicasa Mss116 se une a Pet309, posiblemente para asistir a Pet309 en su función como activador traduccional del ARNm de *COXI* (De Silva

et al, 2017). En este trabajo se propuso un modelo de la posible superficie de interacción entre ambas proteínas. Sería interesante llevar a cabo mutagénesis dirigida en Pet309 en esta región y analizar si la función de Pet309 se afecta. De acuerdo a este modelo y al obtenido en este trabajo, encontramos que las mutantes generadas de Pet309 no se localizan en esta superficie, posiblemente explicando por qué no encontramos un fenotipo dramático de dichas mutantes.

En algunos de los modelos cristalográficos obtenidos para proteínas PPR de plantas se observa que dichas proteínas forman homodímeros (Yin et al 2013). A nosotros nos interesó estudiar si en mitocondrias aisladas y en condiciones *in vivo* Pet309 podría formar homodímeros. Mediante ensayos de *in vivo* de traducción, co-inmunoprecipitación y doble híbrido no se detectó que Pet309 forme homodímeros. Tal vez en condiciones *in vivo* las proteínas PPR de plantas tampoco dimerizan. Por lo tanto lo observado en los cristales puede ser resultado de un artefacto derivado de las altas concentraciones de proteínas que se requieren para estos experimentos.

Aún falta mucho por descubrir y comprender de este fascinante grupo de proteínas. Las proteínas de hongos y plantas podrían tener mecanismos similares de acción, pero con códigos de reconocimiento e interacción con sus secuencias de ARN blanco diferentes.

## Conclusión

- Las mutaciones Y354A, Y354L, Y354L/R358A, Y389L, Y389L / K393A, D496A, E500A, D496A / E500A, K530A, K533A, K530A / K533A, K564A, K568A, K564A / K568A no afectan dramáticamente la función de Pet309 en la activación traduccional del ARNm de *COXI*.
- Pet309 *in vivo* e *in vitro* no parece formar homodímeros.

## Perspectivas

- Identificar el sitio de unión de Pet309 con el ARN de *COXI*. Actualmente sólo se tiene una propuesta basada en el conocimiento en plantas de la secuencia en *COXI* que Pet309 podría estar reconociendo (De Silva et al, 2017).
- Obtener el modelo cristalográfico de Pet309. Si se conoce la secuencia que une del ARNm de *COXI* entonces también podría intentarse cristalizar en presencia de dicho ARN.
- Generar una mutante de Pet309 que reúna todas (o un buen conjunto) de las mutaciones que se generaron en este estudio. Si la razón por la que no observamos fenotipo es porque cada motivo PPR ayuda en su función a motivos adyacentes, entonces en una mutante de este estilo podríamos encontrar un fenotipo respiratorio
- Investigar si Pet309 se fosforila. Este estudio nos podría llevar a entender mejor la función y regulación de Pet309.
- Mutar aminoácidos que se predice están en la interfase de interacción con Mss116.

## Material y métodos

Tabla de cepas empleadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Referencia
XPM232	Mata, ura3-52, COX1 (delta i), leu2-3, 112, lys2, arg::8hisG pet309Δ::LEU2, [p+,Δ <i>ai</i> ]	Tavares-Carreón et al, 2008
XMP201	Mata, ura3-52, leu2-3, 112, lys2, COX1 (delta i), arg::8hisG pet309Δ::LEU2, [p+,ΔΣ <i>ai</i> ]	Tavares-Carreón et al, 2008
Ms26	Mata, MD273-10B, ade2, ura3-52. PET309-3MYC	Este trabajo
JP-69	Mata, ura3-52, leu2-3, 112 trp1-901, his 3-200, gal4Δ, gal80Δ, GAL2-ADE2, LYS2::GAL1-HIS3, met2::GAL7-LacZ [p+]	James et al, 1996

### Transformación de levadura

1. Crecer en 2 ml de YPD la cepa deseada a 30 °C durante 1 noche con agitación.
2. Tomar 300 μl del cultivo y centrifugar en tubo de 1.5 ml durante 1 min a 14,000 rpm.
3. Eliminar completamente el sobrenadante.
4. Re-suspender las células en 52.5 μl de la siguiente mezcla:
  - 40 μl de PEG-3350 al 50%.
  - 5 μl de DTT 1 M.
  - 5 μl de Acetato de litio 2 M.
  - 2.5 μl de ADN de esperma de salmón (10mg/ml) previamente hervido a 95 °C durante 10 min y colocado en hielo.
5. Agregar 0.8 μl del ADN con el cual se transformará.
6. Incubar a 42 °C durante 30 min con agitaciones en vórtex cada 10 min.
7. Plaquear la mezcla en medio selectivo.

### Determinación de proteínas por Lowry (Markwell y cols, 1978)

Hacer curva de calibración con solución de albúmina a 1 mg/ml.

Agregar 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100  $\mu\text{l}$  de la solución de albúmina en tubos de ensaye.

Emplear 5, 10 y 20  $\mu\text{l}$  de muestra diluida 1:10 en tubos de ensaye

Ajustar los tubos de la curva y la muestra a 1 ml con agua.

Adicionar 3 ml de solución C y mezclar con movimientos de vórtice. Incubar 10 min a TA.

Agregar 300  $\mu\text{l}$  de solución D, mezclar con movimientos de vórtice e incubar durante 30 min a temperatura ambiente.

Medir absorbancia a 740 nm y obtener la concentración de cada muestra.

### Geles de acrilamida SDS PAGE (Laemmli, 1970)

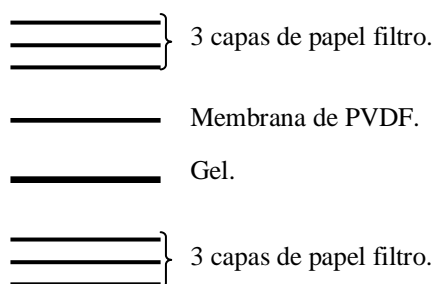
	<b>Gel separador 12 %</b>	<b>Gel concentrador 4 %</b>
Acrilamida 30 % Bisacrilamida 0.8 %	3 mL	488 $\mu\text{L}$
Tris 2 M pH 8.8	1.4 mL	--
Tris 2 M pH 6.8	--	234 $\mu\text{L}$
SDS 20 %	75 $\mu\text{L}$	19 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O	3 mL	3 mL
APS 10 %	38 $\mu\text{L}$	38 $\mu\text{L}$
TEMED	3.8 $\mu\text{L}$	3.8 $\mu\text{L}$

## Western blot

Las muestras se someten a electroforesis vertical en gel SDS-PAGE.

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

La membrana de PVDF se moja en metanol y se pasa a amortiguador de corrida 1X con 20 % de metanol. Se humedecen 6 papeles filtro dentro de la misma solución, así como el gel. En seguida, se arreglan de la siguiente manera:



Transferir de 1 a 2 horas a  $1.5 \text{ mA/cm}^2$  con voltaje menor a 10 V.

2. Bloquear la membrana en metanol durante 10 s y secar por 10 min.
3. Mojar la membrana con solución de lavado.
4. Incubar la membrana con solución de bloqueo (ver apéndice), la cual contiene el anticuerpo adecuado, o bien, durante toda la noche a  $4^\circ\text{C}$ .
5. Lavar la membrana tres veces con solución de lavado "Wash solution" por 10 minutos.
6. Si es necesario, incubar con un segundo anticuerpo en las mismas condiciones.
7. Revelar la presencia del anticuerpo mediante una reacción de quimioluminiscencia con película BioMAX XAR Film (Kodak).
8. Eliminar el anticuerpo unido a las proteínas de la membrana incubando con la solución de eliminación de anticuerpo "Stripping solution" por 30 minutos a  $50^\circ\text{C}$  con agitación constante.
9. Eliminar completamente el  $\beta$ -mercaptoetanol con solución de lavado.
10. Volver a incubar con el siguiente anticuerpo y seguir con los pasos de revelado.

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

1. Cultivar una colonia de levadura en 2 ml de YPGal (en el caso de medios mínimos agregar rafinosa) toda la noche a 30 °C.
2. Resembrar los 2 ml en 25 ml del mismo medio e incubar a 30 °C toda la noche.
3. El cultivo anterior se pasa a 1 l de medio y se incuba toda la noche a 30 °C hasta que alcance la D.O. de entre 1.0 +- 0.1 (fase exponencial).
4. Anotar el peso de los tubos vacíos para centrifugar.
5. Obtener las células por centrifugación a 4000 rpm por 10 min a 4 °C con el rotor JA-10 (Beckman).
6. Lavar el botón con agua fría estéril y destilada.
7. Reunir todos los botones de la misma cepa y volver a obtener las células en las mismas condiciones anteriores de centrifugación. Eliminar el sobrenadante y obtener el peso húmedo de las células.
8. Re-suspender las células en amortiguador TD (2 ml/g de peso húmedo) y agitar 10 min a 30 °C.
9. Centrifugar 5 min a 3,300 rpm en rotor JA-10 (Beckman).
10. Lavar las células con amortiguador MPZ (7 ml/g peso húmedo).
11. Centrifugar 5 min a 3,300 rpm en rotor JA-10 (Beckman).
12. Re-suspender las células en amortiguador MPZ (7 ml/g peso húmedo), adicionar zomoliasa-20T (3 mg/g peso húmedo).



13. Agitar a 30 °C hasta la formación de esferoblastos (30-60 min). Los esferoblastos se forman agregando 5 ml de la mezcla en un tubo con agua y en otro con sorbitol 1.2 M. El tubo con agua se verá más claro si las células existen como esferoblastos.
14. A partir de este punto se trabaja TODO a 4 °C.
15. Centrifugar a 2,500 rpm por 5 min en rotor Ja-10 (Bechman).
16. Re-suspender las células en 70 ml de amortiguador Dounce.
17. Homogeneizar las células con homogeneizador de vidrio (Bajar 10 veces el pistilo).
18. Centrifugar 5 min a 3,300 rpm en rotor JA-10 (Beckman) y recuperar el sobrenadante (contiene las mitocondrias). El botón contiene restos celulares.
19. Centrifugar de nuevo a las mismas condiciones y recuperar el sobrenadante.
20. Centrifugar 12 min a 12,000 rpm en rotor JA-25.5. Recuperar el botón (contiene las mitocondrias).
21. Re-suspender suavemente el botón en 2 ml de amortiguador SEH (la punta de la pipeta debe estar cortada). Agregar 8 ml más de SEH al homogeneizar el botón.
22. Centrifugar 12 min a 12,000 rpm en rotor JA-25.4 (Beckman).
23. Re-suspender el botón suavemente en 200-300 µl de SEH y hacer alícuotas de 50 ul.
24. Determinar la concentración de proteínas mediante el método de Lowry.

### Crecimiento de las diferentes cepas en diluciones seriadas

1. Crecer 2 ml de cultivo de cada cepa a probar.
2. Centrifugar 1 ml de cada cultivo en tubo estéril de 1.5 ml tarado a 14,000 rpm durante 1 min. Eliminar todo el sobrenadante.
3. Pesar nuevamente los tubos para obtener el peso húmedo de las células.
4. Diluir con agua estéril hasta obtener 0.20 g/ml.
5. Se utilizan cajas para ELISA estériles. Colocar con pipeta multicanal 135  $\mu$ l de agua estéril en los pozos de las columnas 2 a 6.
6. En los pozos de la columna 1 colocar 150  $\mu$ l de las cepas. Cada fila se destina para una sola cepa.
7. Con pipeta multicanal, tomar 15  $\mu$ l de cada pozo de la columna 1 y transferirlos consecutivamente al resto de los pozos de las columnas 2 a 6. Asegurar que en cada pase las células son homogenizadas adecuadamente.
8. Esterilizar el replicador sumergiendo los postes en etanol. Para esto se emplea una caja de Petri. Encender los postes y dejar enfriar.
9. Meter cuidadosamente los postes en todos los pozos. Prestar atención en que la orientación sea la adecuada de acuerdo a las columnas y filas con las diluciones.
10. Homogeneizar con movimientos circulares y suaves. Retirar con precisión para evitar contaminación cruzada.
11. Imprimir en las cajas con los medios de prueba deseados. Incubar de 2 a 5 días a la temperatura deseada, observar crecimiento y fotografiar.

## Inmunoprecipitación de Pet309

Este procedimiento se lleva a cabo en dos pasos:

Primero se lleva a cabo síntesis de proteínas en mitocondrias aisladas.

1. Emplear 1 mg de proteína por cepa.
2. Agregar los microlitos necesarios para 1 mg de proteína en un tubo.
3. Completar a 250  $\mu$ L con amortiguador SH y adicionar 550  $\mu$ l de amortiguador ioTL 1.5X.
4. Incubar 5 min a 30 °C. Mezclar cada minuto.
5. Separar 80  $\mu$ l en un tubo y agregarles  $^{35}$ S-met (7 uCi).
6. Al resto agregar 0.7  $\mu$ l de metionina fría [0.1 M].
7. Incubar ambos tubos 20 min a 30 °C.

*Segundo paso:*

En este punto se trabajan por separado ambos tubos.  
Las centrifugaciones se realizan en centrífuga Eppendorf 5415C.

Al tubo con ( $^{35}$ S)-met agregar 1 ml de SH.

8. Centrifugar a 13,000 rpm durante 12 min.
9. Retirar sobrenadante. Centrifugar por 5 segundos y retirar el resto de sobrenadante.
10. Agregar 20  $\mu$ l Laemmli 1X- con 5 % de  $\beta$ -mercaptoetanol.
11. Calentar a 65 °C durante 5 min. Cargar 5  $\mu$ l en gel SDS-PAGE al 16 %.

Al tubo con metionina fría.

12. Centrifugar 5 min a 13,000 rpm.
13. Re-suspender con 500  $\mu$ l de SH.
14. Centrifugar 5 min a 13,000 rpm.
15. Re-suspender en 500  $\mu$ l de amortiguador de lisis. Incubar 20 min a 4 °C.

16. Centrifugar 10 min a 13,000 rpm y tomar 40  $\mu$ l del sobrenadante para la fracción total.
17. Mientras tanto, tomar 50  $\mu$ l de perlas de proteína A sefarosa (Santa Cruz Biotechnology<sup>®</sup>) y agregar 200  $\mu$ l de amortiguador SH.
18. Centrifugar 1 min a 13,000 rpm y retirar 20  $\mu$ l de sobrenadante.
19. Agregar a las perlas 10  $\mu$ l de anticuerpo anti-HA de rata (Roche<sup>®</sup>).
20. Añadir el resto del sobrenadante lisado al tubo con las perlas e incubar 2 h a 4 °C con inversiones constantes.
21. Centrifugar 1 min a 14,000 rpm a 4 °C y retirar sobrenadante.
22. Lavar dos veces la pastilla con 500  $\mu$ l de amortiguador de lisis. Invertir 5 veces y centrifugar 1 min a 14,000 rpm a 4 °C.
23. Lavar la pastilla dos veces con 1 ml de HEPES. Invertir 5 veces y centrifugar 1 min a 14,000 rpm a 4 °C.
24. Retirar completamente el HEPES con jeringa.
25. Agregar amortiguador Laemmli 1X con B-mercaptoetanol 2 %.
26. Calentar a 65 °C durante 5 min y cargar todo en un gel SDS-PAGE al 12 % con jeringa.

### Mutagénesis dirigida

Se empleó el “Kit” QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit de la marca comercial Agilent Technologies<sup>®</sup>.

Se siguieron las condiciones de PCR indicadas en el instructivo, además de DMSO al 3 % y un ciclo extra de extensión.

1. Diseñar los primers complementarios con la mutación de interés. Purificados mediante PAGE.

2. Preparar la mezcla de reacción:
  - 5  $\mu$ l de amortiguador 10 X.
  - X  $\mu$ l (5-10 ng) de de templado.
  - X  $\mu$ l (125 ng) de primer F.
  - X  $\mu$ l (125 ng) de primer R.
  - 1  $\mu$ l de la dNTP mix.
  - ddH<sub>2</sub>O para un volumen final de 50  $\mu$ l
  - 1  $\mu$ l de pfUltra HF DNA Polymerase (2.5 U/  $\mu$ l)
3. Colocar la reacción en hielo durante 2 minutos.
4. Agregar 1  $\mu$ l de Dpn (endonucleasa) a cada tubo de reacción.
5. Mezclar suave y completamente cada tubo de reacción mediante pipeteo.  
Centrifugar la reacción con una microcentrífuga durante 1 min e incubar a 3 °C durante 1 h.
6. Emplear de 1 a 5  $\mu$ l de la reacción para transformar las células termocompetentes.
7. Plaquear las células transformadas en el medio de selección e incubarlas 12 h.

### Generación de células *de E. coli* termocompetentes

Todos los pasos del siguiente protocolo en los que se destape un cultivo de células debe realizarse en condiciones de esterilidad (mechero) y las bacterias deben estar en hielo.

1. Picar una colonia de células y poner en 2 mL de LB (preinóculo). Dejar creciendo una noche a 37 °C. Preparar 50 mL de LB en un matraz y esterilizar en autoclave.
2. Inocular el matraz de 50 mL con 500  $\mu$ l del preinóculo. Dejar creciendo a 37 °C hasta que alcance una DO600 de 0.5 (alrededor de 4 horas). Mientras tanto, ir por hielo y dejar pre-enfriando en el hielo o el refrigerador tubos Eppendorf estériles, el buffer CCMB80 y los tubos de la centrífuga. También ir enfriando la centrífuga y el rotor a 4 °C.

3. Una vez que el cultivo alcance la DO600 de 0.5, pasar el cultivo a tubos de centrifuga fríos y centrifugar a 4000 rpm a 4 °C durante 10 min. A partir de este paso, las bacterias deben permanecer frías en hielo.
4. Descartar sobrenadante.
5. Resuspender el pellet suavemente en 16 mL de buffer CCMB80.
6. Incubar en hielo 20 min.
7. Centrifugar nuevamente a 4000 rpm a 4°C durante 10 min.
8. Resuspender suavemente en 2 mL de buffer.
9. Mezclar bien 20 uL de las bacterias resuspendidas con 980 uL de LB. Medir la DO600 de esta mezcla. Agregar buffer CCMB80 a las bacterias hasta que la densidad óptica alcance entre 0.1 y 0.15.
10. Alicuotar en tubos eppendorf (50 uL por tubo) y guardar a -70 °C (no es necesario congelar en nitrógeno líquido).

## APÉNDICE

### Soluciones para determinación de proteínas por Lowry (Markwell y cols, 1978).

#### **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**

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

#### **Solución D**

Reactivo de Folin diluido con agua 1:2.

### Geles de acrilamida SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

	<b>Gel separador 12 %</b>	<b>Gel concentrador 3.8 %</b>
Acrilamida 30 %	3 ml	488 µl
Bisacrilamida 0.8 %		
Tris 2 M pH 8.8	1.4 ml	--
Tris 2 M pH 6.8	--	234 µl
SDS 20 %	75 µl	19 µl
H <sub>2</sub> O	3 ml	3 ml
APS 10 %	38 µl	38 µl
TEMED	3.8 µl	3.8 µl

**Amortiguador de corrida 10 X**

Tris-HCl pH 8.3 0.250 M

Glicina 2.5 M

SDS 1 %

**Amortiguador de carga 2 X**

Tris-HCl pH 6.8 100 mM

Glicerol 20 %

SDS 4 %

 $\beta$ -mercaptoetanol 2 %

Azul de bromofenol 0.2 %

Soluciones para Western blot

## Solución de blot

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

\* Adicionar el anticuerpo indicado a la dilución apropiada.

## Solución de lavado

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



#### Solución de eliminación

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

#### Solución de bloqueo

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

#### Amortiguadores para la extracción de mitocondrias crudas.

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

Tris-SO <sub>4</sub> pH 9.4	0.1 M
DTT	10 mM

##### **MPZ**

Sorbitol	1.2 M
Amortiguador de fosfatos pH 7.4	20 mM
Zimoliasa-20 T	3 mg/g peso húmedo

(Accurate Chemical And Scientific Corporation)

##### **Dounce**

Tris pH 7.4	10 mM
EDTA	1 mM
BSA	0.2 % p/v
TLCK	50 $\mu$ g/ml



Tris-HCl pH 7.4 20 mM  
 Mini Complete Roche® † 200 µl /ml de amortiguador

† Disolver 1 pastilla en 1 ml de agua.

### SH

Sorbitol 1.2 M  
 HEPES 20 mM

HEPES para lavar precipitación 20 mM

### Diluciones de anticuerpos:

<b>Anticuerpo</b>	<b>Marca/donación</b>	<b>Dilución</b>
Anti HA	Roche	1:2,000
Anti COX1	Rodolfo García Villegas	1:10,000
Anti Citrato sintasa	Thomas Fox	1:1,000
Anti conejo	Santa Cruz	1:5,000
Anti ratón	Santa Cruz	1:5,000
Anti COB	Aldo E. García Guerrero	1:10,000

### Buffer CCMB80

	Concentración	100 mL
KOAc	10 mM	0.098 g
CaCl 2H <sub>2</sub> O	80 mM	1.176 g
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	20 mM	0.396 g
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	10 mM	0.203 g
Glicerol	10 % v/v	10 mL
Ajustar el pH a 6.4 con HCl 0.1 N y esterilizar con filtro y guardar a 4 °C		

### Medios de cultivo empleados en este trabajo

Para preparar 1 l:

#### **YPDextrosa/Rafinosa/Galactosa**

Extracto de levadura	10 g
Peptona	20 g
Fuente de carbono	20 g
Adenina	30 mg

#### **YPEG**

Extracto de levadura	10 g
Peptona	20 g
Glicerol	30 ml
Etanol	30 ml
Adenina	30 mg

#### **Medio mínimo**

Base nitrogenada sin aminoácidos	6.7 g
Medio mínimo de selección	Cantidad indicada por tipo de medio mínimo
Fuente de carbono	20 g

Secuencias de oligonucleótidos empleados.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Mutación que incorporan
PET309R30	ATTCTGGCCATAGTtgcCATCAAATACC	Y354A
PET309F29	TTGATGgcaACTATGGCCAGAATTGG	Y354A
309Y354L-F	CATTATGGTATTTTGATGctTACTATGGCCAGAATTGG	Y354L
309Y354L-R	CCAATTCTGGCCATAGTAagCATCAAATACCATAATG	Y354L
309Y354L/ R358-F	GGTATTTTGATGctTACTATGGCCgcAATTGGTGAATTGG	Y354L/ R358A
309Y354L/ R358-R	CCAATTCACCAATTgcGGCCATAGTAagCATCAAATACC	Y354L/ R358A
309Y389L-F	CGTTTTACAATCTTTACTActTGCACATTATAAAGTCG	Y389L
309Y389L-R	CGACTTTATAATGTGCAagTAGTAAAGATTGTAAAACG	Y389L
309Y389L/ K343-F	CAATCTTTACTActTGCACATTATgcAGTCGGAGATTTTCG	Y389L/ K343A
309Y389L/ K343-R	CGAAATCTCCGACTgcATAATGTGCAagTAGTAAAGATTG	Y389L/ K343A
309D496A-F	GTATCTCTGCATTGATGGcTGTATATATTGAGAGTAAC	D496A
309D496A-R	GTTACTCTCAATATATACAgCCATCAATGCAGAGATAC	D496A
309E500A-F	GATGGATGTATATATTGcGAGTAACAGGCCAACAG	E500A
309E500A-R	CTGTTGGCCTGTTACTCgCAATATATACATCCATC	E500A
309D496A/ E500A-F	CTCTGCATTGATGGcTGTATATATTGcGAGTAACAGGCCAAC	D496A/ E500A

Nombre	Secuencia 5'-3'	Mutación que incorporan
309D496A/ E500A-R	GTTGGCCTGTTACTCgCAATATATACAgCCATCAATGCAGAG	D496A/ E500A
309K530A-F	CTAATTTTCAGTGTATAACgcAGCCATCAAAGCTTATATTGG	K530A
309K530A-R	CCAATATAAGCTTTGATGGCTgcGTTATACACTGAAATTAG	K530A
309K533A-F	GTGTATAACAAAGCCATCgcAGCTTATATTGGTTTACG	K533A
309K533A-R	CGTAAACCAATATAAGCTgcGATGGCTTTGTTATACAC	K533A
309K530A/ K533A-F	CAGTGTATAACgcAGCCATCgcAGCTTATATTGGTTTACG	K530A/ K533A
309K530A/ K533A-R	CGTAAACCAATATAAGCTgcGATGGCTgcGTTATACACTG	K530A/ K533A
309K564A-F	CAGTGAATTTTACgcGATGATGATAAAAATTTTATAG	K564A
309K564A-R	CAGTGAATTTTACgcGATGATGATAAAAATTTTATAG	K564A
309K568A-F	CAAGATGATGATAgcATTTTTAGTTACACTGAACG	K568A
309K568A-R	CGTTCAGTGTAACATAAAAATgcTATCATCATCTTG	K568A
309K564A/ K568A-F	CAGTGAATTTTACgcGATGATGATAgcATTTTTAGTTACAC	K564A/ K568A
309K564A/ K568A-R	GTGTAACATAAAAATgcTATCATCATCgcGTAAAATTCAGT	K564A/ K568A

## REFERENCIAS

- Ban T, Ke J, Chen R, Gu X, Tan MH, et al 2013. Structure of a PLS-class pentatricopeptide repeat protein provides insights into mechanism of RNA recognition. *J. Biol. Chem.* 8:e1002910.
- Barkan A, Rojas M, Fujii S, Yap A, Chong YS, et al. 2012. A combinatorial amino acids code for RNA recognition by pentricopeptide repeats proteins. *PLoS Gene.* 8: e1002910.
- Barkan A, Walker M, Nolasco M, 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.* 13:3170–81
- Bryant N, Lloyd J, Sweeney C, Myouga F, Meinke D. 2011. Identification of nuclear genes encoding chloroplast-localized proteins required for embryo development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 155:1678–89
- Cushing DA, Forsthoefel NR, Gestaut DR, Vernon DM (2005) *Arabidopsis* emb175 and other ppr knockout mutants reveal essential roles for pentatricopeptide repeat (PPR) proteins in plant embryogenesis. *Planta* 221(3): 424-436
- Ding YH, Liu NY, Tang ZS, Liu J, Yang WC. 2006. *Arabidopsis* GLUTAMINE-RICH PROTEIN23 is essential for early embryogenesis and encodes a novel nuclear PPR motif protein that interacts with RNA polymerase II subunit III. *Plant Cell* 18:815–30
- Filipovska A, Rackham O (2012) Modular recognition of nucleic acids by PUF, TALE and PPR proteins. *Mol Biosyst* 8(3): 699-708
- Fujii S, Bond CS, Small ID (2011) Selection patterns on restorer-like genes reveal a conflict between nuclear and mitochondrial genomes throughout angiosperm evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(4): 1723-1728
- Gobert A, Gutmann B, Taschner A, Gossringer M, Holzmann J, Hartmann RK, Rossmannith W, Giege P (2010) A single *Arabidopsis* organellar protein has RNase P activity. *Nat Struct Mol Biol* 17(6): 740-744
- Gutierrez-Marcos JF, Dal Pra M, Giulini A, Costa LM, Gavazzi G, et al. 2007. empty pericarp4 encodes a mitochondrion-targeted pentatricopeptide repeat protein necessary for seed development and plant growth in maize. *Plant Cell* 19:196–210
- Hayes ML, Giang K, Mulligan RM (2012) Molecular evolution of pentatricopeptide repeat genes reveals truncation in species lacking an editing target and structural domains under distinct selective pressures. *BMC Evol Biol* 12: 66

Herrmann JM, Funes S (2005) Biogenesis of cytochrome oxidase-sophisticated assembly lines in the mitochondrial inner membrane. *Gene* 354: 43-52

Howard MJ, Lim WH, Fierke CA, Kuotmos M. 2012. Mitochondrial robonuclease P structure provides insight into the evolution of catalytic strategies for precursor-tRNA 5' processing. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 109:16149-54.

James, P, Halladay, J, and Craig, E.A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144, 1425–1436.

Karpenahalli MR, Lupas AN, Soding J (2007) TPRpred: a tool for prediction of TPR-, PPR- and SEL1-like repeats from protein sequences. *BMC Bioinformatics* 8: 2

Ke J, Chen RZ, Ban T, Zhou XE, Gu X, et al. 2013. Structural basis for RNA recognition by a dimeric PPR-protein complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20:1377-82.

Kobayashi K, Kawabata M, Hisano K, Kazama T, Matsuoka K, Sugita M, Nakamura T (2011) Identification and characterization of the RNA binding surface of the pentatricopeptide repeat protein. *Nucleic Acids Res* 40(6): 2712-2723

Kobayashi K, Suzuki M, Tang J, Nagata N, Ohyama K, Seki H, Kiuchi R, Kaneko Y, Nakazawa M, Matsui M, Matsumoto S, Yoshida S, Muranaka T (2007) Lovastatin insensitive 1, a Novel pentatricopeptide repeat protein, is a potential regulatory factor of isoprenoid biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 48(2): 322-331

Kotera E, Tasaka M, Shikanai T (2005) A pentatricopeptide repeat protein is essential for RNA editing in chloroplasts. *Nature* 433(7023): 326-330

Koussevitzky S, Nott A, Mockler TC, Hong F, Sachetto-Martins G, Surpin M, Lim J, Mittler R, Chory J (2007) Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science* 316(5825): 715-719

Lipinski KA, Puchta O, Surendranath V, Kudla M, 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

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 ML, Mireau H, Peeters N, Renou JP, Szurek B, Taconnat L, Small I (2004) Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* 16(8): 2089-2103

Maleszka R, Skelly PJ, Clark-Walker GD (1991) Rolling circle replication of DNA in yeast mitochondria. *EMBO J* 10(12): 3923-3929



Manthey GM, McEwen JE (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(16): 4031-4043

Mingler MK, Hingst AM, Clement SL, Yu LE, Reifur L, Koslowsky DJ (2006) Identification of pentatricopeptide repeat proteins in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 150(1): 37-45

Perez-Martinez X, Broadley SA, Fox TD (2003) Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. *EMBO J* 22(21): 5951-5961

Pfalz J, Bayraktar OA, Prikryl J, Barkan A (2009) Site-specific binding of a PPR protein defines and stabilizes 5' and 3' mRNA termini in chloroplasts. *EMBO J* 28(14): 2042-2052

Prikryl J, Rojas M, Schuster G, Barkan A (2011) Mechanism of RNA stabilization and translational activation by a pentatricopeptide repeat protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(1): 415-420

Ringel R, Sologub M, Morozov YI, Litonin D, Cramer P, Temiakov D (2011) Structure of human mitochondrial RNA polymerase. *Nature* 478(7368): 269-273

Ringel R, Sologub M, Morozov YI, Litonin D, Cramer P, Temiakov D (2011) Structure of human mitochondrial RNA polymerase. *Nature* 478(7368): 269-273.

Sam M (2015). An overview of pentatricopeptide repeat proteins and their applications. *Biochimie*. 113: 93-99.

Schmitz-Linneweber C, Small I (2008) Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. *Trends Plant Sci* 13(12): 663-670

Schmitz-Linneweber C, Williams-Carrier RE, Williams-Voelker PM, Kroeger TS, Vichas A, Barkan A (2006) A pentatricopeptide repeat protein facilitates the trans-splicing of the maize chloroplast rps12 pre-mRNA. *Plant Cell* 18(10): 2650-2663

Sima Sariaslani, Geoffrey Michael Gadd. Chapter One - Yeast Petites and Small Colony Variants: For Everything There Is a Season. *Advances in Applied Microbiology*. Vol. 85. United States. ACADEMIC PRESS; 2013, p 1-41

Small ID, Peeters N (2000) The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem Sci* 25(2): 46-47

Takenaka M, Zhermann A, Brennicke A, Graiche K. 2013. Improved computational target site prediction for pentatricopeptide repeat RNA recognition editors factors. *PLoS ONE*. 8:e65343.

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(3): 1472-1479

Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R, Yoshikawa S (1996) The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* 272(5265): 1136-1144

Williams-Carrier R, Kroeger T, Barkan A (2008) Sequence-specific binding of a chloroplast pentatricopeptide repeat protein to its native group II intron ligand. *RNA* 14(9): 1930-1941

Yamazaki H, Tasaka M, 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(1): 152-163

Yin P, Li Q, Yan C, Liu Y, Liu J, et al. 2013. Structural basis for the modular recognition of single stranded RNA by PPR protein. *Nature* 504: 168-71.

Zsigmond L, Rigo G, Szarka A, Szekely G, Otvos K, Darula Z, Medzihradsky KF, Koncz C, Koncz Z, Szabados L (2008) *Arabidopsis* PPR40 connects abiotic stress responses to mitochondrial electron transport. *Plant Physiol* 146(4): 1721-1737