



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO DE LEVADURA PARA EL ESTUDIO DE LA
TRANSLOCACIÓN A LA MITOCONDRIA DE LA HEMOXIGENASA-1 Y LA
HEMOXIGENASA-2 DE RATA**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
ERIKA NAHIWDUT VILLAMIZAR GUTIÉRREZ

TUTORES PRINCIPALES
María Elena Chánez Cárdenas
[Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía](#)
[Manuel Velasco Suárez](#)
María Soledad Funes Argüello
[Instituto de Fisiología Celular](#)

COMITÉ TUTORAL
Alejandro Sosa Peinado
[Facultad de Medicina](#)
Diego González Halphen
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Ciudad de México. Marzo, 2020



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.

En su memoria

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. María Elena Chánéz Cárdenas en el laboratorio de Patología Vascul ar Cerebral del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suarez”.

A los miembros del comité tutor por sus comentarios y apoyo para la realización de este trabajo:

Dra. María Soledad Funes Argüello	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Alejandro Sosa Peinado	Facultad de Medicina, UNAM
Dr. Diego González Halphen	Instituto de fisiología Celular, UNAM

Se agradece al Dr. Roberto Coria Ortega por el apoyo brindado en las etapas iniciales de este proyecto.

Se agradece al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca (Nº 896502) otorgada durante el Desarrollo de este trabajo.

Parte de este trabajo fue financiado por los proyectos 237344 y 21433 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), así como por el donativo IN207518 del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (PAPIIT, DGAPA, UNAM).

Se agradece al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP-UNAM) por el apoyo económico para la asistencia al XXI Congreso de Bioenergética y Biomembranas en San Luis Potosí presentando el trabajo titulado “*Identification of the*

translocation machinery responsible for the internalization of hemeoxygenase-1 and hemeoxygenase-2 to the mitochondria”.

Se agradece a la Dra. Ariann Elizabeth Mendoza Martínez y a la Dra. Laura Kawasaki Watanabe por la ayuda técnica brindada.

Se agradece a la Dra. Laura Ongay Larios, a la Biól Guadalupe Códiz Huerta y a la M. en C. Minerva Mora Cabrera, miembros de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, por la síntesis de desoxiligonucleótidos y la secuenciación de DNA requerida en este proyecto.

Se agradece a Gerardo Coello Coutiño, Juan Manuel Barbosa Castillo e Ivette Rosas Arciniega, miembros de la Unidad de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, por su ayuda técnica.

Se agradece al Ing. Aurey Galván Lobato e Ing. Manuel Ortínez Benavides del Taller de Mantenimiento del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, por su ayuda técnica.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. MARCO DE ANTECEDENTES	3
1.2. EL SISTEMA HEMOXIGENASA	6
1.2.1. El grupo hemo y la reacción catalizada por el sistema HO	7
1.2.2. Los productos de reacción del sistema HO	8
1.2.3. Las isoenzimas del sistema HO.....	9
1.3. LA IMPORTACIÓN DE PROTEÍNAS MITOCONDRIALES	16
1.3.1. Visión general de la importación de proteínas mitocondriales	16
1.4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
2. JUSTIFICACIÓN	26
3. HIPÓTESIS.....	26
4. OBJETIVO	27
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
5.1. REACTIVOS.....	28
5.2. CLONACIÓN DE LOS GENES DE LAS HEMOXIGENASAS	28
5.2.1. Cultivo de células derivadas de feocromocitoma de médula adrenal de rata PC12	29
5.2.2. Inducción de la HO-1 mediante CoCl ₂	29
5.2.3. Aislamiento de RNA total	29
5.2.4. Síntesis de cDNA.....	30
5.2.5. Amplificación por PCR	30
5.2.6. Electroforesis de DNA en gel de agarosa	31
5.2.7. Ligación de los genes HO en el plásmido pGEM-T <i>Easy Vector</i>	31
5.2.8. Subclonación de los genes hemoxigenasa en el plásmido pGAL1	32
5.2.9. Subclonación de las HOs en el plásmido pCUP1	34
5.3. MEDIOS DE CULTIVO Y CRECIMIENTO CELULAR.....	37
5.3.1. Medios de cultivo	37
5.3.2. Crecimiento de las células	37

5.3.3.	Transformación de levaduras.....	38
5.3.4.	Transformación de bacterias	38
5.4.	EXPRESIÓN DE LAS HOs DE <i>R. norvegicus</i> EN LA LEVADURA <i>S. cerevisiae</i>	39
5.4.1.	Cinética de inducción.....	39
5.4.2.	Determinación de la especificidad de los anticuerpos anti-HO1 y anti-HO2	39
5.4.3.	Extracción de proteína total	40
5.5.	LOCALIZACIÓN MITOCONDRIAL DE LAS HEMOXIGENASAS.....	40
5.5.1.	Fraccionamiento celular.....	40
5.5.2.	Extracción de proteína con carbonato de sodio	41
5.5.3.	Fraccionamiento mitocondrial	42
5.6.	MEDIACIÓN DEL COMPLEJO TIM23 EN LA INTERNALIZACIÓN DE LA HO-1 Y LA HO-2 A LA MITOCONDRIA.....	43
5.6.1.	Reducción de la expresión de la proteína Tim23	43
5.6.2.	Importación de las HOs a través de la membrana interna mitocondrial.....	44
5.7.	ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR INMUNORRÉPLICA TIPO <i>WESTERN BLOT</i>	44
5.7.1.	Electroforesis en gel de poliacrilamida 17.5%.....	44
5.7.2.	Transferencia a membranas de PVDF.....	45
5.7.3.	Inmunodetección y fotodocumentación.....	45
6.	RESULTADOS.....	46
6.1.	ANÁLISIS INFORMÁTICO DE LA SECUENCIA PRIMARIA DE LAS HOs DE <i>R. norvegicus</i>	46
6.2.	CLONACIÓN DE LOS GENES <i>HMOX1</i> Y <i>HMOX2</i> DE <i>R. norvegicus</i>	47
6.3.	CLONACIÓN DE LOS GENES <i>HMOX1</i> Y <i>HMOX2</i> DE <i>R. norvegicus</i> EN EL PLÁSMIDO pGEM-T EASY VECTOR.....	48
6.4.	SUBCLONACIÓN DE <i>HMOX1</i> Y <i>HMOX2</i> EN SISTEMAS DE EXPRESIÓN EN <i>S. cerevisiae</i>	49
6.4.1.	Subclonación de <i>HMOX1</i> y <i>HMOX2</i> en un plásmido de expresión en <i>S. cerevisiae</i>	50
6.4.2.	Subclonación de <i>HMOX1</i> y <i>HMOX2</i> en un plásmido de expresión en <i>S. cerevisiae</i> regulados por <i>CUP1</i>	52
6.5.	LA HO-1 Y LA HO-2 DE <i>R. norvegicus</i> SE EXPRESAN EN <i>S. cerevisiae</i>	53
6.6.	ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS ANTI-HO-1 Y ANTI-HO-2	54

6.7. AL EXPRESARSE EN <i>S. cerevisiae</i> , LA HO-1 Y LA HO-2 DE <i>R. norvegicus</i> SE LOCALIZAN PREDOMINANTEMENTE EN MITOCONDRIAS	56
6.8. AL EXPRESARSE EN <i>S. cerevisiae</i> , LA HO-1 Y LA HO-2 DE <i>R. norvegicus</i> SON PROTEÍNAS MEMBRANALES Y AL MENOS PARCIALMENTE SE LOCALIZAN EN LA MEMBRANA INTERNA MITOCONDRIAL	57
6.9. ESTABLECIMIENTO DE UNA ESTRATEGIA PARA DETERMINAR EL MECANISMO DE IMPORTACIÓN MITOCONDRIAL QUE INTERNALIZA A LA HO-1 Y LA HO-2 EN LA MITOCONDRIA	60
6.9.1. Análisis del crecimiento de la cepa <i>GAL10-TIM23</i>	61
7. DISCUSIÓN	64
CONCLUSIONES.....	69
PERSPECTIVAS	70
BIBLIOGRAFÍA.....	71
APÉNDICE	79

TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general de la reacción de degradación del grupo hemo a BV por la HO.....	6
Figura 2. Estructura cristalina de la HO-1 y la HO-2 de humano en complejo con el grupo hemo.	10
Figura 3. Comparación de la estructura primaria de la HO-1 y la HO-2 de humano.....	11
Figura 4. Estructura general del gen <i>HMOX1</i> de rata y su único transcrito..	12
Figura 5. Estructura general del gen <i>HMOX2</i> de rata y los múltiples transcritos.....	14
Figura 6. Visión general de la importación de proteínas mitocondriales a la membrana interna y a la matriz.	17
Figura 7. Esquema representativo de los componentes del Complejo TOM	21
Figura 8. Esquema representativo de los componentes del Complejo TIM23.....	22
Figura 9. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas HOs de <i>R. norvegicus</i>	46
Figura 10. Amplificación de los genes <i>HMOX1</i> y <i>HMOX2</i> de <i>R. norvegicus</i> a partir de cDNA obtenido de células PC12 tratadas con CoCl ₂ 0.2 mM.....	48
Figura 11. Representación esquemática de la estrategia de ligación en el plásmido pGEM-T easy vector.....	48
Figura 12. Mapa representativo de los plásmidos pGAL1-HOs y pCUP1-HOs..	50
Figura 13. Digestión de los plásmidos pGAL1-HOs utilizando enzimas de restricción..	51
Figura 14. Digestión de los plásmidos pCUP1-HO1 (A) y pCUP1-HO2 (B) utilizando enzimas de restricción.....	52
Figura 15. Cinética de inducción de la HO-1 y la HO-2 de <i>R. norvegicus</i> expresada en <i>S. cerevisiae</i>	54
Figura 16. Los anticuerpos anti-HO-1 y anti-HO-2 de rata no reconocen a la Hmx1p de levadura.....	55
Figura 17. Las HOs localizan preponderantemente en la fracción mitocondrial..	56
Figura 18. Las HOs se encuentran mayormente ancladas a las membranas mitocondriales..	58
Figura 19. Las HOs de <i>R. norvegicus</i> expresadas en <i>S. cerevisiae</i> son capaces de llegar hasta la matriz mitocondrial.	59
Figura 20. La expresión de TIM23 disminuye en ausencia de galactosa y eso repercute directamente en la viabilidad celular.....	62
Figura 21. Esquema integrativo de la localización subcelular de las HOs (A) e importación de las HOs a través de la membrana interna mitocondrial mediante la participación de la translocasa de membrana externa (TOM) y la translocasa de membrana interna 23 (TIM23).....	68

ABREVIATURAS

BR	Bilirrubina
BV	Biliverdina
BVR	Biliverdina reductasa
DO	Densidad óptica
GC	Guanilato ciclasa
HO	Hemoxigenasa
HO-1	Hemoxigenasa-1
HO-2	Hemoxigenasa-2
HMOX	Gen hemoxigenasa
HRMs	Motivos reguladores de hemo
MTS	Secuencia de localización mitocondrial
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
TIM	Translocasa de membrana interna
TOM	Translocasa de membrana externa
UTR	Región no traducida

RESUMEN

El sistema hemoxigenasa (HO) es el sistema enzimático que cataliza estereoespecíficamente la degradación del grupo hemo, donde se obtiene como producto de reacción biliverdina (BV), hierro libre en estado ferroso (Fe^{2+}) y monóxido de carbono (CO). Por mantener la homeostasis del grupo hemo, al sistema HO se le otorga un papel citoprotector; atribuyéndosele también propiedades anti-inflamatorias, antioxidantes y anti-apoptóticas. En mamíferos se han descrito dos isoenzimas conocidas como hemoxigenasa-1 (HO-1) y hemoxigenasa-2 (HO-2).

En diferentes estudios se ha descrito que la expresión de la HO-1 incrementa considerablemente en condiciones de hipoxia, hiperoxia, endotoxinas bacterianas, radicales ionizantes, citocinas, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, metales pesados, factores de crecimiento, etc., por lo que diferentes autores consideran que la HO-1 es la enzima que tiene el mayor número de estímulos capaces de inducir su expresión que cualquier otra enzima descrita hasta el momento. Por otro lado, la HO-2 se reconoce como enzima de carácter constitutivo, al no tener elementos reguladores en su promotor, excepto un elemento de respuesta a glucocorticoides.

Desde su descubrimiento en las fracciones microsomales de hígado de rata, la localización celular de las HOs ha sido tradicionalmente asignada al retículo endoplásmico (RE), ancladas a través de un segmento transmembranal hidrofóbico del extremo carboxilo bterminal comprendido por aproximadamente 20 residuos aminoacídicos. El resto de la proteína mira al citosol, compartimento donde se generan los productos de descomposición del grupo hemo. Sin embargo, desde los últimos 15 años se ha reportado que las HOs pueden estar presentes en otros compartimentos celulares, incluyendo las caveolas, las mitocondrias y el núcleo. En el núcleo, se ha estudiado particularmente la interacción de la HO-1 con diferentes factores de transcripción, donde parece estar modulando la transcripción de genes. En caveolas y mitocondrias, las HOs parecen colocalizar con la citocromo P450 reductasa y la

biliverdina reductasa (BVR), lo que sugiere que la degradación del hemo es su papel principal.

En el caso específico las HOs de la mitocondria, se ha reportado que ambas enzimas enriquecen las fracciones mitocondriales en varias líneas celulares en respuesta a distintos tipos de estrés celular. No obstante, hasta la fecha se desconoce qué maquinarias moleculares utilizan las HOs para llegar al interior de estos organelos.

En este trabajo se buscó establecer un modelo de expresión de las HOs provenientes de *Rattus norvegicus* en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con el fin de determinar qué maquinaria de importación mitocondrial está involucrada en la internalización de las HOs a la mitocondria. Se escogió este modelo de estudio ya que es el mejor conocido y más utilizado en estudios de importación mitocondrial.

Nuestros resultados indican que un sistema de sobreexpresión de la HO-1 y la HO-2 de *R. norvegicus* en la levadura *S. cerevisiae* es apto para estudiar la localización mitocondrial de ambas proteínas. Además, se determinó que ambas enzimas se encuentran mayormente ancladas a las membranas mitocondriales y son capaces de llegar hasta la matriz mitocondrial. Además, se especula que las proteínas están usando la translocasa de membrana externa (TOM, *Translocase of the Outer Membrane*) como puerta de entrada a la mitocondria y son subsecuentemente internalizadas a la matriz mediante la translocasa de membrana interna 23 (TIM23, *Translocase of the Inner Membrane*).

1. INTRODUCCIÓN

1.1. MARCO DE ANTECEDENTES

Uno de los trabajos pioneros en describir la conversión enzimática del grupo hemo a bilirrubina por el sistema hemoxigenasa (HO) fue realizado por R. Tenhunen y col. en el año 1968. En su estudio se evaluaron fracciones microsomales provenientes de tejidos de hígado, bazo y riñón de rata que en presencia de oxígeno (O_2) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida (NADPH) eran capaces de degradar el grupo hemo a bilirrubina (Tenhunen, Marver, & Schmid, 1968).

Posteriormente, el mismo grupo caracterizó con más detalle a la HO presente en microsomas de hígado y bazo de rata, reportando parámetros cinéticos como: actividad enzimática, valores aparentes de la constante de Michaelis (K_m), dependencia de O_2 y NADPH, y moléculas inhibitoras de la actividad enzimática, entre otros. La cinética y distribución tisular de esta enzima se reconoció de gran importancia en la degradación fisiológica del hemo libre proveniente de la hemoglobina y otras hemoproteínas (Tenhunen, Marver, & Schmid, 1969).

Más tarde, se reportó por primera vez la identificación de dos isoenzimas HO a partir de fracciones microsomales de hígado de rata, las que fueron denominadas como hemoxigenasa-1 (HO-1) y hemoxigenasa-2 (HO-2) (Maines, Trakshel, & Kutty, 1986). Esta distinción fue posible gracias a presencia de dos picos de elución con actividad HO observados en la purificación mediante cromatografía de intercambio aniónico. Estas proteínas presentaron diferencias en experimentos de movilidad electroforética, inmunológicos y de termolabilidad relativa. Además, los autores demostraron que estas enzimas presentan mecanismos de regulación diferente, resaltándose que solo la actividad enzimática de la HO-1 incrementa en respuesta a cobalto, cadmio, hemina y otros. En el mismo año, se reportó la purificación y caracterización de la isoenzima HO-2 de testículos de rata, mostrando valores de K_m para HO-1 y HO-2 de 0.24 y 0.40 μM , respectivamente. (Trakshel, Kutty, & Maines, 1986). A pesar del descubrimiento de la

presencia de dos formas moleculares de HO a partir de hígado y testículos de rata, los autores no pudieron distinguir si las dos formas eran: i) productos de un mismo gen donde una forma se deriva de la otra mediante modificaciones postraduccionales o ii) si las dos formas eran isoenzimas producto de dos genes diferentes. A partir del 1986, diferentes autores reportaron la secuencia de nucleótidos y organización de los genes que codifican para la HO-1 y la HO-2 en mamíferos como rata, conejo y humanos indicando que las formas HO son producto de genes diferentes. (Muller, Tagushi, & Shibahara, 1987; Rotenberg & Maines, 1991)

Está bien documentado que la actividad catalítica del sistema HO desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis del grupo hemo mediante su degradación y durante casi dos décadas, ésta fue la única función asociada al sistema HO. Sin embargo, en los últimos veinte años se han atribuido otras funciones al sistema HO, extendiéndose considerablemente su campo de investigación, donde se incluye literatura que va desde el papel de la HO-2 como sensor de oxígeno, la actividad antioxidante de la biliverdina (BV) en par con la bilirrubina (BR), y la interacción de la HO-1 con factores de transcripción, entre otras (Hori y col., 2002; Kemp, 2005; Lin y col., 2007).

Diferentes autores han descrito la presencia de HO en fracciones nucleares, mitocondriales e incluso en caveolas. Tal comportamiento se hizo particularmente atractivo debido a que las HOs se localizan intrínsecamente en el retículo endoplásmico (RE). Un ejemplo es el reportado por Lin y col. (2007), donde en una línea celular de fibroblastos de ratón fue detectada la señal inmunoreactiva de la HO-1 en el núcleo después de exponer las células a un tratamiento de hipoxia y hemo/hemopexina. Bajo estas condiciones, la HO-1 sufre un corte proteolítico en el extremo carboxilo terminal que expone una región que señala la translocación al núcleo. Con base en estos resultados, los autores propusieron que la localización nuclear de la HO-1 en condiciones hipóxicas podría mediar la estabilización de factores de transcripción como lo es la proteína activadora 1 (AP-1, *Activator Protein 1*), mejorando la respuesta ante el estrés oxidante.

Las HOs carecen de una secuencia de direccionamiento mitocondrial (MTS, *Mitochondrial Targeting Sequence*) en su extremo amino terminal que las dirige a la mitocondria. No obstante, Converso y col. (2006) describieron la presencia de la HO-1 en este organelo por primera vez. Este equipo determinó que la HO-1 se localiza en la membrana interna mitocondrial y especularon que es importada mediante la translocasa de membrana interna 23 (TIM23, *Translocase of the Inner Membrane*). La presencia de HO-1 en la mitocondria se asoció con una regulación del contenido de grupo hemo, modulación de la expresión y actividad de hemoproteínas mitocondriales y además con la modulación en la concentración de oxígeno y disminución de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*).

En su mayoría, la literatura acerca de HOs y los diferentes papeles de estas enzimas en la célula primordialmente son realizados en condiciones de estrés y particularmente enfocados a la HO-1 debido a su carácter inducible. Sin embargo, recientemente se informó la presencia de la HO-2 en niveles basales en la mitocondria (Waltz y col., 2018). En dicho trabajo los autores estudiaron el papel de la HO-2 como regulador del consumo de oxígeno y ROS producidas en condiciones de hipoxia en un cultivo primario de hepatocitos de ratón, encontrando que la HO-2 además de ser expresada a niveles basales en la mitocondria, también puede estar influenciando la respuesta temprana a perturbaciones fisiológicas y fisiopatológicas a cambios de los niveles de oxígeno.

Los informes presentados por los grupos de Converso (2006) y Waltz (2018) son ejemplos que claramente revelan la presencia de las HOs en las fracciones mitocondriales. Sin embargo, hasta la fecha existe la interrogante de qué es lo que guía el transporte de las HOs hasta la mitocondria y bajo qué maquinaria de importación mitocondrial están siendo internalizadas en estos organelos.

1.2. EL SISTEMA HEMOXIGENASA

El sistema HO está compuesto por enzimas que catalizan la degradación del grupo hemo, transformándolo en cantidades equimolares de hierro libre en estado ferroso (Fe^{2+}), monóxido de carbono (CO) y BV (Figura 1). En condiciones fisiológicas la BV es reducida por la biliverdina reductasa (BVR) y convertida en BR. La conversión de una molécula de grupo hemo en BV por el sistema HO requiere de tres moléculas de oxígeno y un total de siete electrones suministrados por la coenzima NADPH y transferidos mediante el Citocromo P450 Reductasa (Unno, Matsui, & Ikeda-Saito, 2006).

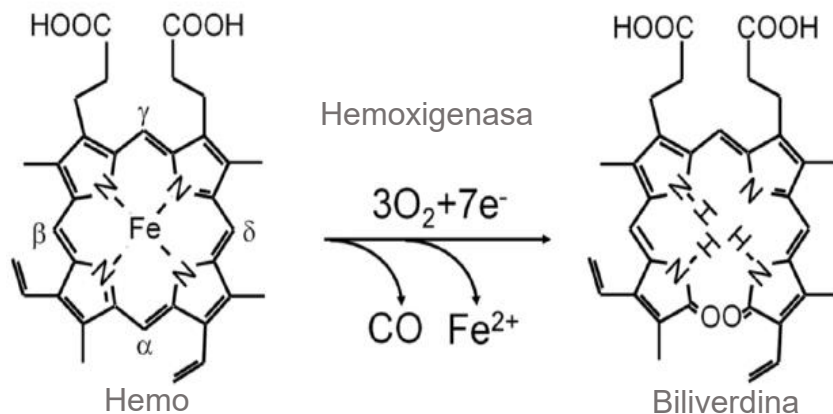


Figura 1. Esquema general de la reacción de degradación del grupo hemo a BV por la HO. La reacción tiene un requerimiento absoluto de tres moléculas de O_2 y un total de siete electrones (e^-). Como productos de reacción se obtiene CO y Fe^{2+} . Ilustración modificada de Li y col. (2009).

Los genes HO (*HMOX*, *Heme-oxygenase*) que codifican para las HOs, se expresan en la mayoría de los organismos vivos, incluidas bacterias, algas, plantas, insectos y mamíferos, lo que sugiere que la necesidad de catabolismo del grupo hemo por el sistema HO se produjo temprano durante la evolución, haciéndolas enzimas conservadas evolutivamente (Wilks, 2002).

En humanos y otros mamíferos se ha descrito la expresión de al menos dos isoenzimas de HOs, conocidas como Hemoxigenasa-1 (HO-1; EC 1.14.99.3) y Hemoxigenasa-2

(HO-2; EC 1.14.99.39), las cuales son producto de genes independientes, *HMOX1* y *HMOX2*, respectivamente (Cruse & Maines, 1988). Los genes *HMOX1* y *HMOX2* son parálogos y producen proteínas que a nivel de secuencia de aminoácidos comparten un 42% de identidad.

1.2.1. El grupo hemo y la reacción catalizada por el sistema HO

El grupo hemo es un complejo de protoporfirina de hierro de vital importancia para los sistemas biológicos debido a que actúa como el grupo prostético de diversas hemoproteínas favoreciendo procesos biológicos como el transporte de oxígeno, la transferencia de electrones y la transducción de señales. A pesar de su importancia biológica, el exceso de hemo libre en la célula es altamente tóxico y puede causar daño celular y tisular debido a su habilidad de promover estrés oxidante y peroxidación lipídica, lo que lleva a lesiones de membranas y en última instancia, a apoptosis (Chiabrando y col., 2014).

A causa de su citotoxicidad, los organismos están equipados con vías específicas para mantener la homeostasis del grupo hemo. Uno de los principales mecanismos para regular el hemo libre se lleva a cabo mediante la degradación enzimática por el sistema HO. Adicionalmente, la formación de complejos con hemopexina, albúmina, o la unión con hemoproteínas, puede eliminar o contrarresta la toxicidad del hemo libre (Kumar & Bandyopadhyay, 2005). Otro mecanismo por el cual la célula elimina grupo hemo libre es mediante la degradación no enzimática por ROS, en este caso a diferencia de la degradación estereoespecífica llevada a cabo por el sistema HO, se generan productos de reacción al azar (Nagababu & Rifkind, 2004).

La reacción de degradación del grupo hemo por el sistema HO inicia con la formación del complejo HO-hemo, este complejo se comporta como un complejo de hemoproteína, donde las propiedades espectrofotométricas se asemejan a las de la mioglobina (Yoshida, Takahashi, & Goro, Partial Purification and Reconstitution of the Heme Oxygenase System from Pig Spleen Microsomes., 1974). Para que la reacción

transcurra se requiere la presencia de O_2 y la donación de un total de siete electrones mediada por la Citocromo P450 Reductasa dependiente de NADPH. En cada proceso de reducción se forman diferentes complejos metaestables que finalmente dan como resultado BV y Fe^{2+} libre y CO. Posteriormente, la BV es convertida a BR a través de la BVR, la cual requiere de dos electrones (Kikuchi, Yoshida, & Noguchi, 2005).

1.2.2. Los productos de reacción del sistema HO

La degradación enzimática del grupo hemo por el sistema HO genera como productos de reacción BV, Fe^{2+} y CO. En el pasado, estos productos de reacción se consideraban metabolitos de desecho. Sin embargo, hoy en día se sabe que cada uno de estos productos de reacción tiene importantes efectos fisiológicos como antioxidantes, antiinflamatorios, antiapoptóticos e incluso como vasodilatadores.

Los pigmentos biliares BV y BR: La reducción enzimática de la BV por la BVR da como resultado BR (McDonagh, 2001). En tejidos intactos, bajo condiciones normales del metabolismo del grupo hemo, la BV es indetectable y raramente se acumula alcanzando apenas cantidades a niveles de traza, por lo que generalmente se piensa que el producto fisiológico de las HO es la BR (McDonagh, 2010). Ambas, la BV y la BR han sido catalogados como pigmentos biliares con alto poder reductor y funcionan como potentes antioxidantes capaces de atenuar la producción de ROS, efecto explicado mediante el mecanismo de reciclaje de la BV/BR, el cual consiste en la oxidación de la BR por las ROS formando de nuevo la BV y ésta es convertida en BR por la BVR (Sedlak & Snyder, 2004).

El Fe^{2+} : El hierro liberado de la reacción catalizada por el sistema HO es la mayor fuente de hierro en el cuerpo y en condiciones normales es neutralizado rápidamente por una serie de vías metabólicas inducidas por este mismo metal, en la que se puede incluir la inducción de la expresión de la ferritina, principal proteína de almacenamiento y reciclaje de hierro intracelular, la cual se ha visto que aumenta su expresión de la mano con la inducción de la HO-1 (Erdmann y col., 2006). Cada molécula de ferritina

tiene la capacidad de unir 4500 átomos de hierro (Li & Strocker, 2009). El hierro que está unido a la ferritina ya no puede participar en reacciones redox celulares, limitando su capacidad prooxidante.

EI CO: Estudios sugieren que el CO actúa como un mediador endógeno en procesos de señalización celular y de función vascular. En células vasculares de músculo liso se ha demostrado que el CO producido por el sistema HO tiene la capacidad de unirse al átomo de hierro del grupo prostético del guanilato ciclasa soluble (sGC, *Soluble guanylyl cyclase*), activando a esta enzima y aumentando la producción de guanosín monofosfato cíclico (cGMP, *Cyclic Guanosine Monophosphate*) intracelular, el cual es capaz de modular el tono vascular (Morita y col., 1995). Además, el CO puede modular la activación de la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos p38 (MAPK-p38, *Mitogen-Activated Protein Kinases p28*) responsable de la regulación de citocinas pro- y antiinflamatorias, inhibiendo selectivamente la expresión de citocinas proinflamatorias inducidas por la presencia de lipopolisacáridos e incrementando la expresión de la interleucina-10 (IL-10) (Otterbein y col., 2000).

1.2.3. Las isoenzimas del sistema HO

En mamíferos como humanos y ratas, el sistema HO está compuesto por dos enzimas identificadas hoy en día como la HO-1 y la HO-2. Estas enzimas, que son producto de genes diferentes, tienen muy poco en común en cuanto a su estructura primaria, regulación y distribución tisular. Sin embargo, ambas enzimas llevan a cabo la misma función catalítica, es decir la conversión de hemo a BV y comparten el mismo plegamiento (Figura 2).

La HO-1 y la HO-2 se encuentran altamente conservadas entre especies, presentando una identidad de aproximadamente el 80% y mayor al 90%, respectivamente, al comparar las secuencias de mamíferos como rata, humano y conejo (Rotenberg & Maines, 1991). Sin embargo, la identidad entre la HO-1 y la HO-2 de una misma especie es únicamente de un 42%.

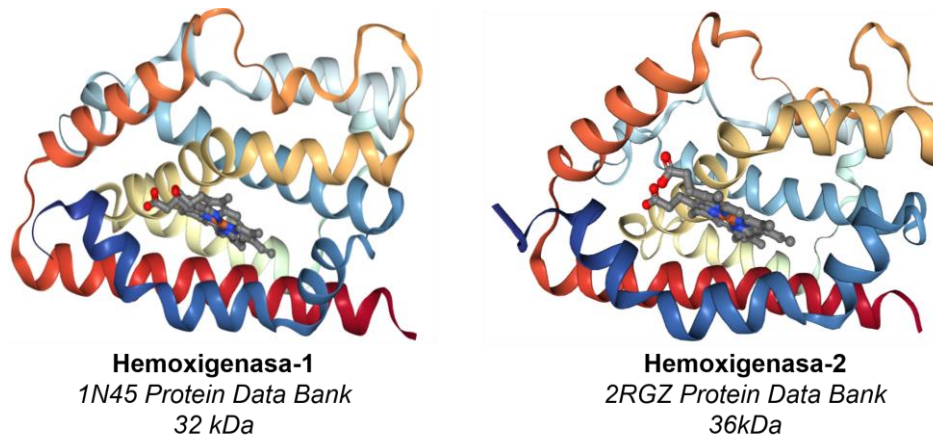


Figura 2. Estructura cristalina de la HO-1 y la HO-2 de humano en complejo con el grupo hemo. Visualizadas en la plataforma *RCSB Protein Data Bank*.

En la región media de la proteína se encuentra el bolsillo o centro catalítico, en donde los pares de residuos His132-Leu138 en HO-1 e His151-Met157 en HO-2, son de particular relevancia. Por otro lado, lejos del bolsillo catalítico, en la hélice proximal se encuentra un residuo de histidina (His25 en HO-1 y His45 en HO-2) que es de vital importancia para coordinar y estabilizar el hierro del grupo hemo y llevar a cabo la reacción catalítica (Muñoz-Sánchez & Cháñez-Cárdenas, 2014). Proteínas mutantes con una sustitución H25A son incapaces de unir el sustrato al bolsillo del hemo y de degradarlo (Hori y col., 2002) (Figura 3).

En la región del C-terminal de la HO-1 y la HO-2 se encuentra un segmento característico poco conservado entre estas proteínas. En el caso de la HO-1, esta región comprendida por los residuos 207-221 es rica en lisinas (LNIELSEELQALL) y muestra una similitud > 90% con el motivo de exportación nuclear de la proteína Rev del VIH (LX₁₋₃LX₂₋₃LXL), que permite su translocación al núcleo. Por otro lado, entre los residuos 255-287 de la HO-2 se encuentran dos de los tres motivos reguladores de hemo HRM (HRM, *Heme Regulatory Motifs*) conocidos por controlar procesos relacionados con el metabolismo del hierro y el metabolismo oxidativo en organismos desde bacterias hasta humanos.

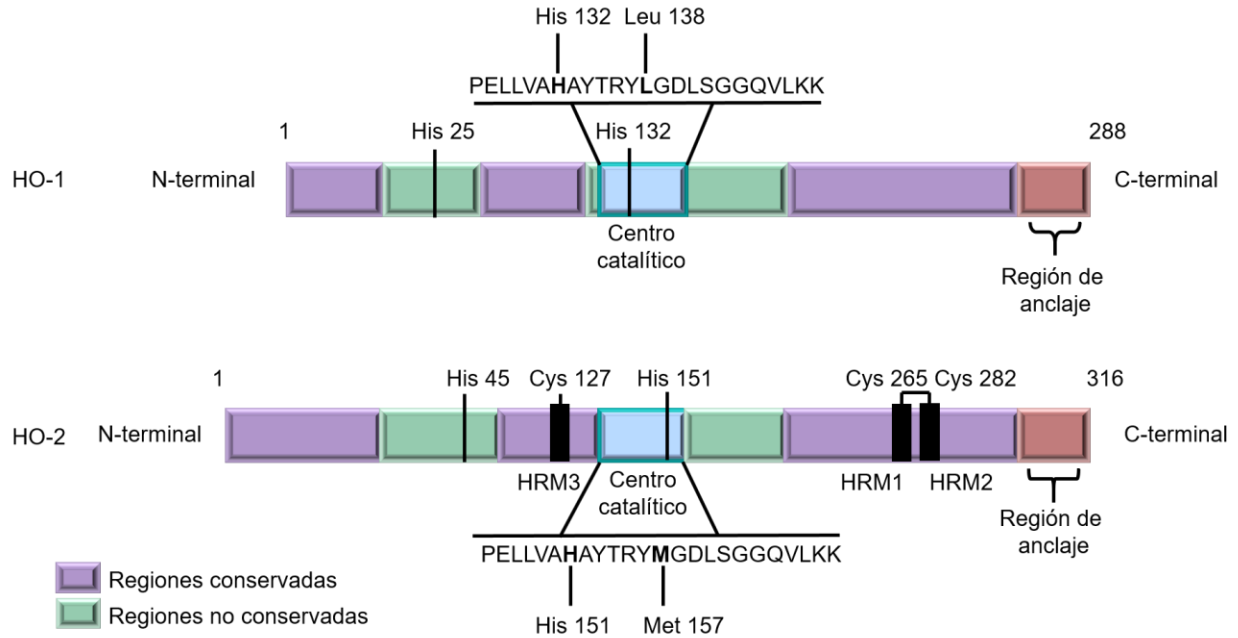


Figura 3. Comparación de la estructura primaria de la HO-1 y la HO-2 de humano. El área morada representa las regiones conservadas (45% de identidad). En azul se ubica el centro catalítico, las histidinas (His) 25 y 132 para la HO-1 y las histidinas 45 y 151 para la HO-2, son esenciales para llevar a cabo su función catalítica. El área en rojo representa la región de anclaje al retículo endoplásmico. La HO-2 posee 3 motivos reguladores de hemo (HRM). Tomado y modificado de Muñoz y col. (2014).

1.2.3.1. La HO-1

La HO-1 es una proteína de 32 kDa también conocida como proteína de choque térmico-32 (HSP32). Se expresa normalmente en niveles bajos en casi todos los tejidos. Sin embargo, en condiciones fisiológicas, la actividad de la HO-1 es más alta en el bazo, donde los eritrocitos senescentes son secuestrados y destruidos.

La HO-1 experimenta una regulación adaptativa en respuesta al hemo, un efecto que se observó inicialmente hace más de 50 años como un aumento de la actividad de esta enzima en tejido hepático y renal de rata después de un estímulo con este sustrato. Aunque el hemo es el inductor prototipo de la HO-1, estudios en la década de 1970 demostraron que la actividad de la HO-1 también puede ser estimulada por una variedad de sustancias no-hemo y su expresión puede ser regulada por muchos factores endógenos y exógenos que están asociados a estrés celular, incluidos:

metales pesados, endotoxinas, peróxido de hidrógeno (H₂O₂), radiación ultravioleta, hiperoxia, hipoxia, y hormonas, entre otros (Choi & Alam, 1996).

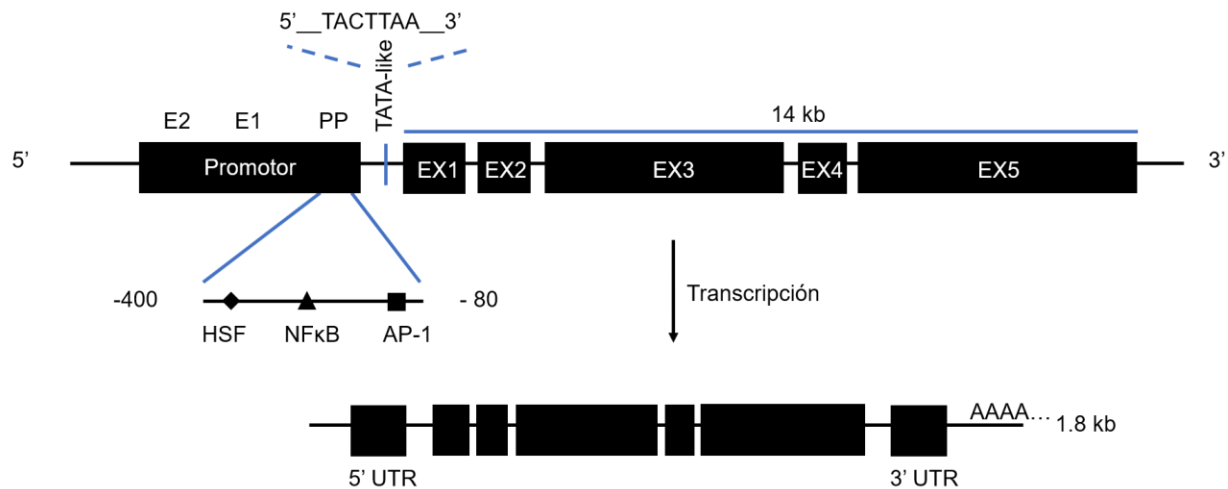


Figura 4. Estructura general del gen *HMOX1* de rata y su único transcrito. Los exones (EX) se representan con cajas negras. La caja TATA-like se encuentra en la región promotora. Se muestra el factor de transcripción de choque térmico (HSF, *Heat Shock Factor*), el factor de transcripción nuclear kappa (NfκB) y la proteína activadora 1 (AP-1, *Activator Protein 1*) en el promotor proximal (PP) (Alam & Cook, 2007; Muller, Tagushi, & Shibahara, 1987).

Varios elementos reguladores se han identificado en la región promotora del gen de la HO-1 de especies como ratón, rata y humano, entre los que se pueden nombrar los elementos de respuesta antioxidante (ARE, *Antioxidant Response Elements*), los elementos de respuesta a adenosín monofosfato cíclico (*cAMP Response Elements*) y los elementos de respuesta a hipoxia (HRE, *Hipoxia Response Elements*). Hoy en día se conoce que la transcripción del gen *HMOX1* puede ser inducida por una variedad de señales que activan diferentes factores de transcripción (por ejemplo: el factor de transcripción de choque térmico (HSF), el factor de transcripción nuclear kappa (NfκB) y la proteína activadora 1 (AP-1)); estos reconocen y se unen a elementos específicos de las secuencias del ácido desoxirribonucleico (DNA) en regiones proximales (-0.3 kb) y distales (E1 -4 kb y E2 -10 kb) del promotor del gen *HMOX1*, induciendo un único producto de transcripción de aproximadamente 1.8 kb el cual está compuesto por 5 exones y 4 intrones que traduce a una proteína de 32 kDa (Figura 4).

1.2.3.2. La HO-2

La HO-2 es considerada la isoenzima constitutiva del sistema HO. Esta enzima se encuentra altamente expresada en testículos y cerebro, y representa la gran mayoría de la actividad de las HOs en el cerebro. De hecho, en el cerebro normal, la isoenzima HO-2 es la única forma fácilmente detectable.

HMOX2 es un gen de copia única que se encuentra codificado en el cromosoma 16 (16q12) y tiene una organización compleja. En testículo de rata, se han identificado 5 diferentes transcritos de aproximadamente 1.3 a 2.1 kb. Los diferentes transcritos son el resultado de la edición alternativa en la región 5' UTR y en la selección de uno de los dos sitios de poliadenilación. Estos transcritos comparten un número de 5 exones y 4 intrones. El codón de inicio se encuentra en el exón 2, mientras que el exón 1 es parte de la región 5' UTR. A pesar de los diferentes mensajeros de ácido ribonucleico (mRNA), todos codifican una única proteína de aproximadamente 36 kDa (Figura 5).

El único elemento regulador encontrado en la región promotora del gen de la HO-2 es un elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE, *Glucocorticoid Response Element*) ubicado entre los nucleótidos -9723 y -9716. Evidencia demuestra que la administración exógena de corticosterona a ratas neonatas promueve el incremento de la expresión de la proteína HO-2 en regiones específicas del cerebro (Ewing & Maines, 1997). De forma interesante, a pesar de que la región promotora de la HO-1 contiene un gran número de elementos regulatorios funcionales, esta carece de la secuencia consenso de GRE (McCoubrey & Maines, 1994).

La secuenciación proteica de la HO-2 revela que esta proteína, a diferencia de la HO-1, tiene tres residuos de cisteína que constituyen un interruptor redox tiol/disulfuro que regula la afinidad de la enzima por su sustrato según el ambiente redox, importante en la señalización de la proteína durante estrés oxidante. Estos residuos de cisteína constituyen los tres motivos HRM presentes en la HO-2. La HO-2 se encuentra entre las seis únicas proteínas identificadas en tener motivos HRM.

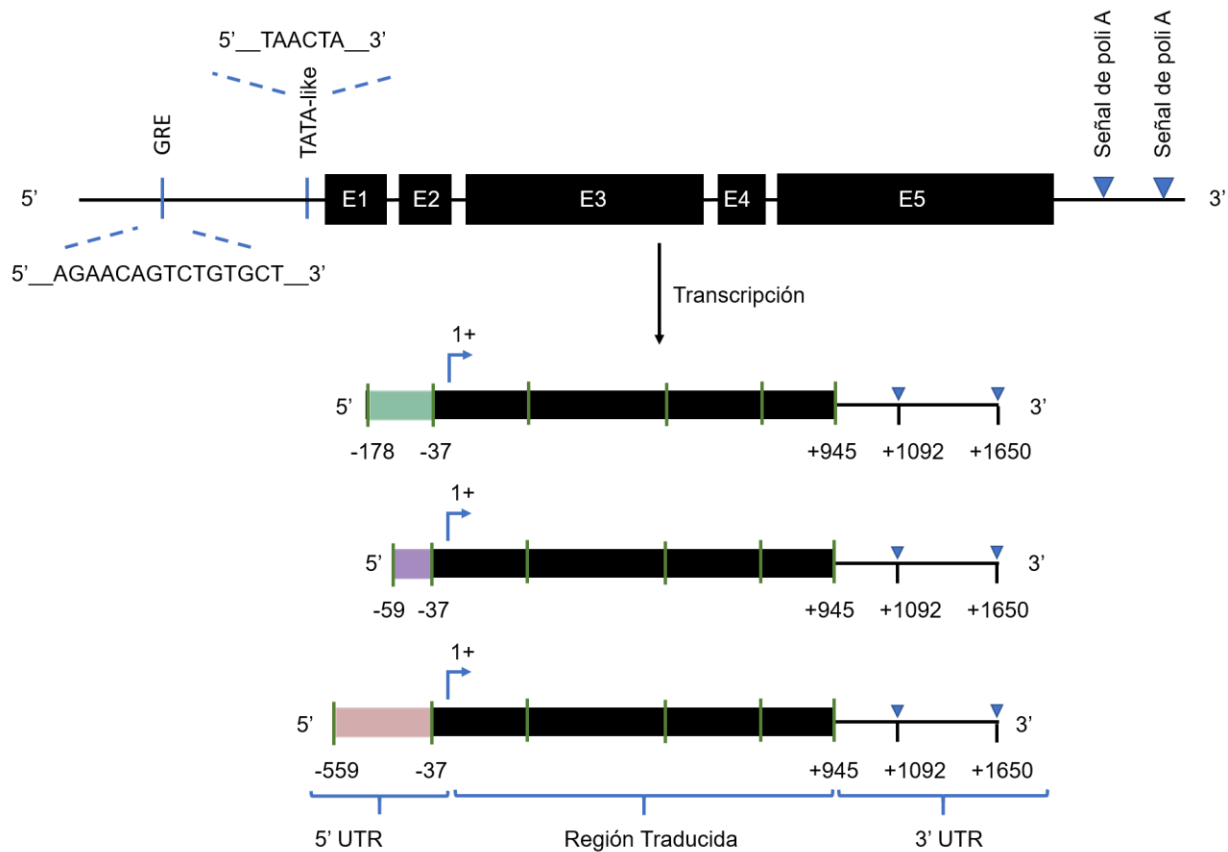


Figura 5. Estructura general del gen *HMOX2* de rata y los múltiples transcritos. Los exones (E) se representan con cajas negras. La caja TATA-like es observada en la región promotora. Se enseña la secuencia del elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE). Las dos señales de poliadenilación se localizan en el 3' UTR con flechas de color azul. El codón de inicio de muestra como 1+. Tres diferentes transcritos son identificados como resultado de la variabilidad en el inicio de la transcripción y procesamiento de la región 5' UTR (verde, morado y rosa) Ilustración tomada y modificada de Muñoz y col. (2014).

1.2.3.3. Localización subcelular de las HOs.

Desde el descubrimiento del sistema HO en microsomas de hígado de rata, las dos isoenzimas se han catalogado como proteínas integrales de membrana localizadas en el RE liso. Las HOs no tienen una secuencia de localización de RE. Estas enzimas son sintetizadas en polisomas libres e insertadas al RE de forma postraduccional y espontánea (Yoshida & Sato, 1989). Los perfiles de hidrofobicidad revelan una región

hidrofóbica en el dominio carboxilo terminal en ambas isoenzimas que es esencial para el anclaje al RE (Figura 2, indicada como “Región de anclaje”) (Gottlieb y col., 2012).

Cuando las HOs están ancladas al RE, la región soluble de cada una de las proteínas y, por lo tanto, sus sitios activos, enfrentan al citosol que es el lugar donde se generan los productos de degradación del grupo hemo. A pesar de que la localización intrínseca de las HOs es el RE, un gran número de reportes revelan la presencia de estas isoenzimas en otros compartimientos celulares, incluyendo mitocondrias y núcleo.

Se ha demostrado que la HO-1 puede migrar al núcleo en condiciones de hipoxia donde puede alterar la activación de factores de transcripción y regular su propia expresión. No obstante, esta translocación está asociada a un corte proteolítico en el extremo carboxilo terminal de la proteína que resulta en la inactivación enzimática de la HO-1 y posterior migración al núcleo. La HO-1 nuclear tiene un peso molecular de 28kDa y corresponde a los primeros 237 aminoácidos. De forma interesante, el corte proteolítico que sufre la HO-1 expone una secuencia rica en lisinas que tiene un 90% de identidad con la señal de exportación nuclear de la proteína Rev del VIH (LX₁₋₃LX₂₋₃LXL), responsable de señalar la migración de la HO-1 al núcleo en respuesta a la hipoxia. Una vez en el núcleo, la HO-1 trunca interactúa físicamente con factores de transcripción como AP-1 mediando la activación de la respuesta antioxidante (Lin, y col, 2007).

En contraste, la HO-2 difiere de la HO-1 en su localización celular durante la hipoxia. Algunos autores han demostrado que la regulación proteolítica y translocación al núcleo bajo condiciones de hipoxia es específica para la HO-1. Comportamiento que puede ser asociado a la diferencia de las secuencias de aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la HO-1 y la HO-2 (Schaefer, Moriishi, & Behrends, 2017; Linnenbaum y col., 2012).

La localización mitocondrial de la HO-1 en condiciones de estrés oxidante ha sido documentada en mucosa gástrica de ratas, así como también en líneas celulares

epiteliales de pulmón. La HO-1 mitocondrial ayuda a la desintoxicación del grupo hemo acumulado en el organelo y protege del daño por estrés oxidante, mientras que ayuda a prevenir la disfunción mitocondrial y la muerte apoptótica (Bindu y col., 2011). Por otro lado, recientemente se demostró la presencia de la HO-2 a niveles basales en la mitocondria de hepatocitos de rata, donde se cree que puede actuar como regulador crítico del consumo de oxígeno y además regular la respuesta temprana a perturbaciones fisiológicas o patológicas de los niveles de oxígeno (Kemp, 2005; Waltz y col., 2018).

1.3. LA IMPORTACIÓN DE PROTEÍNAS MITOCONDRIALES

Las mitocondrias son componentes esenciales de las células eucariontes que según la hipótesis endosimbionte evolucionaron a partir de bacterias que fueron fagocitadas por una célula eucariótica ancestral. A lo largo del tiempo evolutivo, la mayoría de los genes aportados por el endosimbionte se perdieron, probablemente para eliminar procesos redundantes y la mayoría, pero no todos los genes residuales fueron transferidos desde el genoma organelar al genoma nuclear del hospedero. Como consecuencia, las mitocondrias de hoy en día están compuestas esencialmente por componentes codificados en el genoma nuclear. Sin embargo, éstas siguen conteniendo un pequeño genoma que codifica principalmente para componentes de la cadena respiratoria, así como componentes ribosomales y ácidos ribonucleicos de transferencia (tRNAs) requeridos para la traducción (Martin, Garg, & Zimorski, 2015).

En este sentido, la biogénesis mitocondrial depende de la función coordinada de dos sistemas genéticos separados: uno en el núcleo y otro en este organelo.

1.3.1. Visión general de la importación de proteínas mitocondriales

Las mitocondrias han conservado un sistema genético completo en su matriz, sin embargo, solo aproximadamente el 1% de las proteínas mitocondriales están

codificadas en el genoma mitocondrial y se sintetizan en la matriz. El 99% de las proteínas mitocondriales restantes o precursores mitocondriales es codificado por genes nucleares y tiene que ser importado a la mitocondria (Schmidt, Pfanner, & Meisinger, 2010).

La importación de proteínas a la mitocondria es un proceso complicado por el hecho de que las mitocondrias contienen cuatro subcompartimentos: dos membranas (membrana externa y membrana interna) y dos compartimentos acuosos (el espacio intermembranal y la matriz). Por ejemplo, las proteínas mitocondriales de membrana no solo tienen que alcanzar la mitocondria, además, ser integradas a la membrana correcta. Las proteínas solubles de matriz tienen que atravesar dos membranas y el espacio intermembranal antes de alcanzar su destino final (Figura 6).

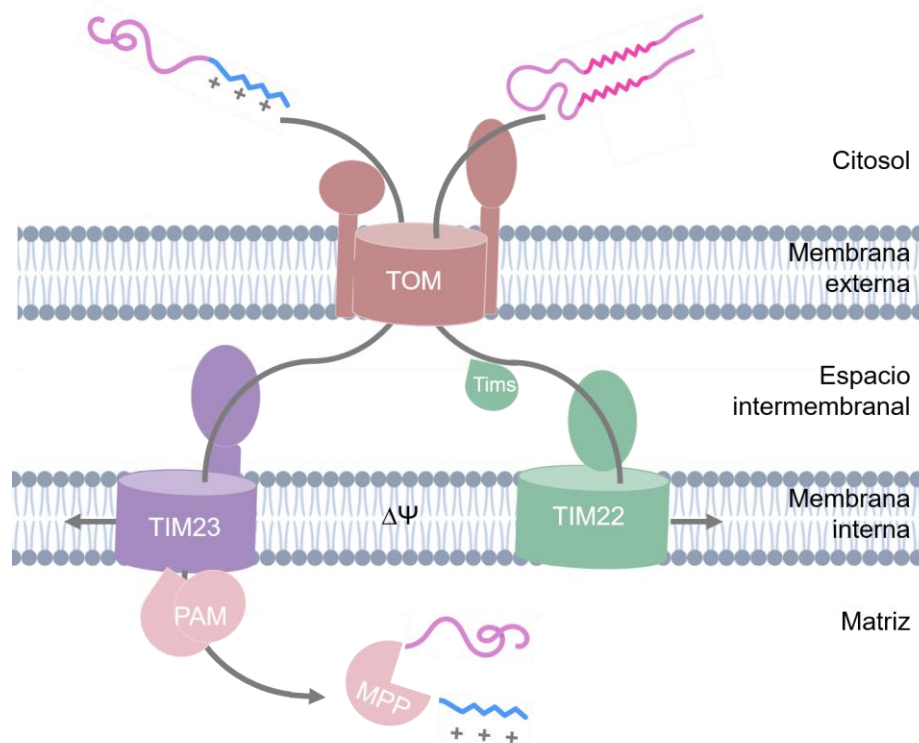


Figura 6. Visión general de la importación de proteínas mitocondriales a la membrana interna y a la matriz. Los precursores que contienen presecuencias en el extremo N-terminal o señales internas atraviesan la membrana externa mitocondrial a través de la translocasa de membrana externa (TOM, *Translocase of the Outer Membrane*). Los precursores son reconocidos inicialmente por los receptores del complejo TOM, quienes los dirigen al poro de importación. Para la posterior translocación el complejo TOM coopera con la translocasa de membrana interna (TIM23, *Translocase of the*

Inner Membrane 23), éste requiere del potencial de membrana ($\Delta\Psi$) y de la acción del motor de importación (PAM, *Presequence Translocase-Associated Motor*), dependiente de ATP. En la matriz, la presecuencia es cortada por la peptidasa de procesamiento mitocondrial (MPP, *Mitochondrial Processing Peptidase*). Los precursores con señales internas son transportados con ayuda de chaperonas pequeñas Tim a través del espacio intermembranal y entregadas a la translocasa de membrana interna 22 (TIM22, *Translocase of the Inner Membrane 22*), quien las inserta en la membrana interna mitocondrial. (Schmidt, Pfanner, & Meisinger, 2010)

Los precursores mitocondriales son traducidos por ribosomas citosólicos, se encuentran conformacionalmente desplegados y normalmente están asociados a chaperonas que previenen su agregación y degradación; además, contienen la información necesaria y suficiente que los dirige a la mitocondria. En muchos de los casos, esta información se encuentra presente como una secuencia escindible en el extremo amino terminal, rica en residuos de aminoácidos cargados positivamente que se conoce como presecuencia (Heijne, 1990). Sin embargo, muchos precursores, especialmente proteínas hidrofóbicas de la membrana interna y externa, carecen de tales secuencias y, en cambio, contienen señales de direccionamiento internas (Bolender y col., 2008).

Para que estos precursores lleguen a ser proteínas funcionales es necesario que sean reconocidos por receptores de la superficie mitocondrial, introducidos por los poros de las membranas de la mitocondria, distribuidos a los diferentes subcompartimientos mitocondriales, procesados proteolíticamente, plegados y en ocasiones insertados dentro de las membranas, así como también en algunos casos, ensamblados con cofactores y otras proteínas para formar complejos macromoleculares. Dependiendo del tipo de proteína, existen diferentes rutas de importación a la mitocondria que involucran distintos complejos proteicos.

1.3.1.1. Rutas de importación mitocondrial

Actualmente se conocen al menos cinco clases de rutas de importación de proteínas mitocondriales, cada una caracterizada por diferentes tipos de señales. La entrada principal de la mayoría de los precursores mitocondriales está formada por el complejo

de la translocasa de membrana externa mitocondrial, conocida como el complejo TOM (TOM, *Translocase of the Outer Membrane*). Una vez que los precursores han atravesado la membrana externa y dependiendo del compartimento mitocondrial al cual están destinados, estos precursores usan diferentes rutas, en la que pueden estar involucrados los complejos de translocasa de membrana interna TIM22 o TIM23 (TIM, *Translocase of the Inner Membrane*) (Schmidt, Pfanner, & Meisinger, 2010).

La ruta clásica de importación es denominada ruta de presecuencias (*Presequence Pathway*), donde la mayoría de las proteínas es sintetizada con una presecuencia en su extremo amino terminal e importada por el complejo de membrana externa TOM junto con el complejo de membrana interna TIM23 hasta la matriz o insertada a la membrana interna mitocondrial en donde la presecuencia es escindida (Schulz, Schendzielorz, & Rehling, 2015).

En las cuatro rutas de importación restantes, las proteínas precursoras no contienen presecuencias escindibles. Sin embargo, éstas contienen diferentes señales de direccionamiento internas, como es el caso de proteínas acarreadoras con múltiples pasos transmembranales localizadas en la membrana interna, las cuales utilizan la segunda ruta de importación de proteínas mitocondriales conocida como ruta de acarreadores (*Carrier Pathway*) importadas por el complejo TOM y el complejo de membrana interna TIM22 (Neupert & Herrmann, 2007).

La tercera ruta de importación de proteínas mitocondriales es conocida como ruta de barriles β (*β -Barrel Pathway*) utilizada por proteínas con estructuras de barril β que se ubican en la membrana externa y requieren la participación del complejo TOM en conjunto con ciertas chaperonas pequeñas TIM, seguidas de la inserción a la membrana externa por la maquinaria de ensamble y clasificación (SAM, *Sorting and Assembly Machinery*) (Paschen, Neupert, & Rapaport, 2005).

Muchas de las proteínas del espacio intermembranal contienen motivos de cisteína. Estas proteínas son importadas a través del complejo TOM y la maquinaria de

ensamblaje e importación mitocondrial (MIA, *Mitochondrial Import and Assembly*). Ésta representa la cuarta ruta de importación de proteínas mitocondriales y es conocida como ruta de plegamiento oxidativo (*Oxidative Folding Pathway of the Intermembrane Space*) (Stojanovski y col., 2008).

La quinta ruta de importación ha sido parcialmente caracterizada, sin embargo, se sabe que es utilizada por proteínas de la membrana externa mitocondrial que contienen segmentos transmembranas de α -hélice. Esta ruta es promovida por la maquinaria de importación mitocondrial (MIM, *Mitochondrial Import Machinery*) que funciona como insertasa de proteínas que contienen señales de anclaje en el extremo carboxilo o en el extremo amino junto con proteínas de multipaso o politópicas. En el caso de proteínas politópicas, el receptor Tom70 del complejo TOM coopera con el complejo MIM para lograr la importación eficiente de estos precursores (Wiedemann & Pfanner, 2017).

A continuación, se describen con más detalle los componentes que participan en la ruta clásica de importación de presecuencia.

1.3.1.2. Entrada principal a través del complejo TOM

El complejo TOM media la importación de prácticamente todos los precursores mitocondriales. Está conformado por siete subunidades que pueden ser agrupadas por su función en: receptores (Tom70, Tom20 y Tom22), poro de membrana (Tom40) y proteínas de ensamblaje (Tom5, Tom6 y Tom7) (Figura 7).

El reconocimiento de los precursores es llevado a cabo por los receptores Tom70 y Tom20. Mientras que Tom70 reconoce principalmente secuencias de señal internas, Tom20 tiene preferencia por precursores con presecuencias en el extremo amino terminal; sin embargo, se ha reconocido que ambos receptores pueden traslapar y sustituir su función. Ambos receptores, Tom20 y Tom70, transfieren sus ligandos a Tom22, que funciona como el receptor de importación central del complejo TOM (Bohnert, Pfanner, & Van der Laan, 2007).

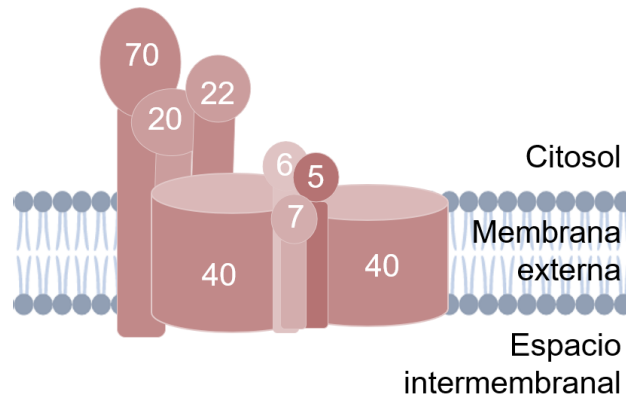


Figura 7. Esquema representativo de los componentes del Complejo TOM: translocasa de membrana externa mitocondrial que funciona como puerta de entrada general de los precursores mitocondriales. (Neupert & Herrmann, 2007)

Una vez que los precursores son entregados al receptor Tom22, éstos son dirigidos al poro de membrana formado por la proteína Tom40, por donde atraviesan la membrana como una cadena polipeptídica lineal. Las translocasas mitocondriales no permiten el paso de proteínas plegadas, por lo que los precursores tienen que estar en su forma completamente extendida para poder ingresar a los canales de translocación. Tom40 es una proteína en forma de barril β que se encuentra embebida en la membrana y existe en asociaciones de 2 y 3 barriles β que interactúan establemente gracias a la acción de las proteínas pequeñas Tom5, Tom6 y Tom7, que mantienen la integridad del complejo TOM.

A medida que el precursor atraviesa el poro de Tom40 interactúa en primera instancia con Tim50, el primer componente de la membrana interna que une a los precursores que emergen en el espacio intermembranal.

1.3.1.3. Translocación a través de la membrana interna

En la translocación de los precursores a través de la membrana interna, las preproteínas pueden seguir dos rutas diferentes: ser liberadas lateralmente a la membrana interna o ser completamente importadas hasta la matriz mitocondrial. La mayoría de las proteínas mitocondriales residen en la matriz mitocondrial y son

importadas hasta este compartimento mediante la cooperación del complejo TOM y el complejo TIM23 (Neupert & Herrmann, 2007).

Todos los precursores que contienen presecuencias y emergen del complejo TOM son dirigidos al complejo TIM23, quien los transloca en una manera dependiente del potencial de membrana a la matriz o membrana interna mitocondrial. El complejo TIM23 está conformado por las proteínas Tim17, Tim21, Tim23 y Tim50 (Figura 8). El poro del complejo está formado por las proteínas Tim23 y Tim17, ambas integradas a la membrana interna por cuatro dominios transmembranales. Los componentes Tim21, Tim50 y Tim23 exponen dominios al espacio intermembranal que conectan los complejos TOM y TIM23 (Mokranjac & Neupert, 2010).

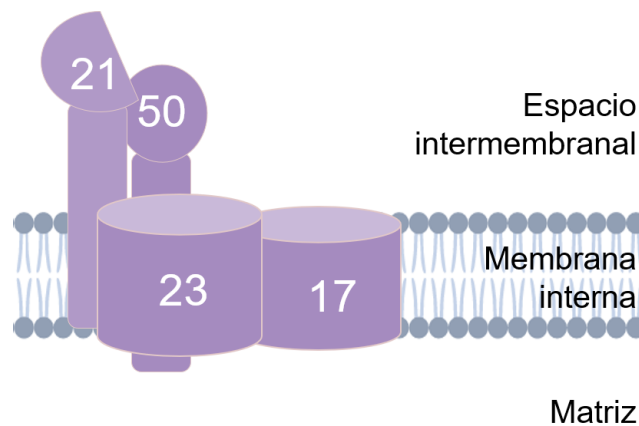


Figura 8. Esquema representativo de los componentes del Complejo TIM23: translocasa de membrana interna mitocondrial. (Schmidt, Pfanner, & Meisinger, 2010)

En el proceso de transferencia de los precursores emergentes desde el complejo TOM, Tim50 es el primer componente del complejo TIM23 en interactuar con las preproteínas. Tim50 está asociada fuertemente con el dominio intermembranal de Tim23 asegurando una entrada directa de las preproteínas al poro de importación.

Adicionalmente, Tim50 es de vital importancia en la ausencia de preproteínas en tránsito. Debido a que el poro de Tim23 es lo suficientemente grande para translocar

cadena polipeptídica en una conformación α -hélice, podría también permitir la fuga de iones a través de la membrana interna, lo que dañaría el potencial de membrana. Por lo tanto, el dominio de espacio intermembranal de Tim50 regula la apertura y cerrado del canal de Tim23 (Meinecke y col., 2006).

Por otro lado, Tim21 interactúa con el dominio de espacio intermembranal de Tom22, y contribuye con la conexión directa pero transitoria entre los complejos TOM y TIM23. Algunos reportes indican que Tim21 no interactúa con las preproteínas en tránsito, sin embargo, juega un papel regulatorio al competir por la unión con Tom22. De esta manera la interacción de Tim21 con Tom22 reduce la afinidad de Tom22 por la preproteína y conduce a la liberación y la transferencia de esta al canal de Tim23.

Mientras que los precursores que se dirigen a la matriz mitocondrial son hidrofóbicos y el extremo amino terminal contiene la información necesaria para su importación, los precursores que se integran a la membrana interna poseen al menos un segmento transmembranal hidrofóbico. Este segmento hidrofóbico funciona como señal de clasificación que detiene la translocación hacia la matriz e induce la liberación lateral de la preproteína a la fase lipídica de la membrana interna (Van der Laan, Hutu, & Rehling, 2010).

La translocación de preproteínas hidrofóbicas a la matriz requiere la función del motor de importación (PAM, *Presequence Translocase-Associated Motor*). PAM es un complejo cuya proteína central es la chaperona mitocondrial mtHSP70 dependiente de adenosín trifosfato (ATP), que une la cadena polipeptídica en tránsito y regula su translocación a la matriz. Una vez en la matriz, muchos de los precursores son proteolíticamente procesados por la enzima heterodimérica peptidasa de procesamiento mitocondrial (MPP, *Mitochondrial Processing Peptidase*). De igual forma, algunas de las proteínas insertadas en la membrana interna, además de contener un segmento hidrofóbico de clasificación que detiene la translocación en la membrana interna, contienen una etiqueta cargada positivamente que es removida por la MPP (Rehling, Brandner, & Pfanner, 2004).

El potencial de membrana a través de la membrana interna es de vital importancia para la translocación de los precursores con presecuencias a través del canal de TIM23. El efecto electroforético que impulsa la translocación de las presecuencias, cargadas positivamente, depende en gran medida de la carga negativa del lado de la matriz (Meinecke y col., 2006).

1.4. *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura *S. cerevisiae* es un hongo ascomiceto unicelular que representa uno de los organismos modelo eucarionte más estudiados y mejor caracterizados. Esta levadura comparte la organización intracelular compleja y el ciclo de vida celular de eucariontes superiores, tal y como se ha demostrado en numerosas contribuciones de estudios de procesos celulares como la señalización celular, el tráfico de membranas, el metabolismo de lípidos y la importación de proteínas mitocondriales.

La levadura *S. cerevisiae* fue el primer organismo eucarionte cuyo genoma fue secuenciado, y actualmente es el genoma eucariota mejor conocido (Goffeau y col., 1996). A primera vista, llama la atención su alta densidad génica, en la que el 72% de las secuencias corresponden a secuencias codificantes, siendo el tamaño promedio de los genes de 1.45 kb y solamente el 3.8% de los marcos de lectura abiertos (ORFs, *Open Reading Frame*) contienen intrones. Este organismo cuenta con aproximadamente 6000 marcos de lectura abiertos, de los cuales un 15 a 20% se consideran genes esenciales.

Esta levadura ha sido utilizada como modelo para estudiar el envejecimiento, la regulación de la expresión genética, la transducción de señales, el ciclo celular, el metabolismo, la apoptosis, y muchos otros procesos biológicos. De forma interesante, los componentes de la maquinaria que participan en la importación de proteínas mitocondriales generalmente se conservan evolutivamente dentro del reino eucariota

(Sokol y col., 2014). Gracias a esta conservación, *S. cerevisiae* también ha sido empleada para identificar componentes y mecanismos que impulsan el transporte y la clasificación de las proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo en otros organismos, como los humanos.

Además, *S. cerevisiae* se ha empleado durante mucho tiempo como un sistema modelo para estudiar las funciones de los genes humanos. Esto se debe en parte a que alrededor del 30% de los genes implicados en enfermedades humanas tienen ortólogos en la levadura (Karathia y col., 2011).

2. JUSTIFICACIÓN

La presencia de las HOs en la mitocondria nos resulta sorprendente ya que: i) la síntesis del grupo hemo ocurre en gran parte en la matriz mitocondrial (Ryter & Tyrrell, 2000); ii) muchos de los componentes de la cadena de transporte de electrones codificadas en el genoma mitocondrial son proteínas que contienen hemo, la síntesis y degradación de estas proteínas, así como de sus cofactores ocurre completamente dentro de la mitocondria (Hatefi, 1985); y iii) la presencia de las HOs en la mitocondria puede tener un efecto antioxidante que contrarreste las ROS producidas por la cadena transportadora de electrones bajo condiciones de estrés (Converso y col., 2006). Sin embargo, hasta la fecha no se tiene claro cuál es la localización precisa de las HOs dentro de la mitocondria, ni se ha descrito el mecanismo que las internaliza a este organelo.

3. HIPÓTESIS

Se ha observado que la HO-1 y la HO-2 se localizadan en la mitocondria en varias líneas celulares por acción de distintos tipos de estrés celular. Debido a la similitud de las maquinarias de importación mitocondrial en los organismos eucariontes, es posible plantear que al expresar a las proteínas HO-1 y HO-2 de rata en la levadura *S. cerevisiae* estas proteínas también se localizarán en la mitocondria y utilizarán uno de los sistemas de importación canónicos mitocondriales, como lo es la translocasa de membrana interna mitocondrial TIM23.

4. OBJETIVO

Establecer un sistema experimental que permita expresar y seguir la importación mitocondrial de las proteínas HO-1 y HO-2 de *R. norvegicus* en la levadura *S. cerevisiae*.

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Expresar a las proteínas HO-1 y HO-2 de *R. norvegicus* en *S. cerevisiae*.
- Determinar la localización celular de las proteínas HO-1 y HO-2 de *R. norvegicus* al ser expresadas en *S. cerevisiae*.
- Desarrollar un protocolo experimental que permita analizar el proceso de importación de las proteínas HO-1 y HO-2 a las mitocondrias en *S. cerevisiae*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. REACTIVOS

La línea celular PC12 fue obsequiada por el Dr. José Pedraza Chaverri de la Facultad de Química, UNAM, adquirida en la ATCC (*American Type Culture Collection*). El medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), el suero fetal bovino (SFB) y el suero de caballo (SC) se obtuvieron de Gibco (EUA). El cloruro de cobalto (CoCl_2), la acrilamida, la Bis N, N'-metilénbisacrilamida, el dodecil sulfato de sodio (SDS), el persulfato de amonio (PSA), el tetrametiletiléndiamina (TEMED) se obtuvieron de *Bio-Rad* (EUA). El isopropanol, el cloroformo, el *Tween*, el Tritón X-100, la enzima KAPA Taq Polimerasa (KAPA Taq PCR Kit, *KAPABIOSYSTEMS*) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (EUA). El *TriPure* se obtuvo de Roche (Alemania). La transcriptasa reversa, los desoxinucleótidos trifosfatados se obtuvieron de *Promega* (EUA). *GeneRuler* 1 kb DNA Ladder se obtuvo de *Thermo Scientific*. El anticuerpo anti-HO-1 se obtuvo de *Enzo life Sciences* (EUA). El anticuerpo anti-HO-2 se obtuvo de *abcam* (EUA). El anticuerpo anti-Hog1 se obtuvo de Santa Cruz *Biotechnology* (EUA). Los anticuerpos anti-Mdm38, anti-mtHSP70, anti-Tom20, anti-Tim17 y anti-Tim50 fueron amablemente donados por el Dr. Walter Neupert, la Dra. Dejana Mokranjac y el Dr. Johannes M. Herrmann. El anticuerpo secundario IgG *rabbit-HRP* se obtuvo de *Jackson Laboratory* (EUA). El plásmido pGEM-T Easy Vector proveniente de la casa comercial *Promega* se obtuvo generosamente del Dr. Roberto Coria Ortega.

5.2. CLONACIÓN DE LOS GENES DE LAS HEMOXIGENASAS

El ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA) sintetizado a partir de los genes *HMOX1* y *HMOX2* de *R. norvegicus* se clonó a partir de un cultivo celular PC12 tratado con CoCl_2 0.2 mM y se insertó en el plásmido pGEM-T Easy con posterior subclonación en los plásmidos de expresión en levadura pGAL1 (Yañez Falcón, 2014) y pCUP1 (Este trabajo).

5.2.1. Cultivo de células derivadas de feocromocitoma de médula adrenal de rata PC12

La línea celular PC12 se cultivó en medio DMEM suplementado con SFB al 7.5% y SC al 7.5% para su crecimiento. Las células se incubaron a 37°C, CO₂ al 5%, O₂ al 21% y 95% de humedad, hasta un 90% de confluencia.

5.2.2. Inducción de la HO-1 mediante CoCl₂

Las células PC12 con 95% de confluencia se trataron con CoCl₂ 0.2 mM con el fin de inducir hipoxia química. Las células se incubaron en agua desionizada a 37°C, CO₂ al 5%, O₂ al 21%, 95% de humedad por 24 h en la incubadora INCO 108 (*Memmert Experts in Thermostatics*). Este cultivo celular se utilizó para aislar RNA total.

5.2.3. Aislamiento de RNA total

A partir de un cultivo celular en mono-capa de células PC12 tratadas con CoCl₂ 0.2 mM se aisló RNA total. Las células se trataron con 500 µL de *TriPure* y se homogenizó e incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Se adicionaron 100 µL de cloroformo, se agitó vigorosamente en vórtex y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Se procedió a centrifugar a 12,000 x g por 15 minutos a 4°C. De las fases formadas se recuperó cuidadosamente la fase acuosa (superior y transparente).

Para precipitar el RNA de la fase recuperada se adicionaron 500 µL de alcohol isopropílico frío y se mezcló vigorosamente en un vórtex, se centrifugó a 12,000 x g por 15 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante con cuidado y se lavó el botón con 500 µL de etanol al 75% en frío, se mezcló vigorosamente en un vórtex y se centrifugó a 7,500 x g por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se eliminó y el botón se dejó secar por 5 minutos a temperatura ambiente. El RNA total se resuspendió en 40 µL de agua libre de nucleasas. El RNA total se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm.

5.2.4. Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA a partir del templado de RNA se llevó a cabo a través de la reacción de la transcriptasa reversa. Se inició mezclando 5 µg de RNA total, con 50 ng de oligonucleótidos dT y se llevó a un volumen final de 17.5 µL utilizando agua libre de nucleasas. El RNA se desnaturalizó incubando por 7 min a 72°C. Terminado el tiempo de incubación se dio una centrifugación rápida, la reacción se pasó a hielo inmediatamente y se agregó a la reacción el amortiguador *First-Strand* a una concentración final de 1X, desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs, 500 µM), RNAsin (20 U) y enzima transcriptasa reversa (M-MLV-RT, 200 U), se mezcló y la reacción se colocó en un termociclador a 37°C durante 1 h. El cDNA se utilizó para amplificar los genes *HMOX1* y *HMOX2* de *R. norvergicus* utilizando desoxioligonucleótidos selectivos. Las muestras se almacenaron a -70°C hasta su uso.

5.2.5. Amplificación por PCR

A partir del cDNA sintetizado se amplificaron los genes *HMOX1* y *HMOX2* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*). Se diseñaron oligonucleótidos idénticos a las regiones flanqueantes de cada uno de los ORFs para los genes de las HOs con la adición de secuencias reconocidas por enzimas de restricción (Apéndice A). En cada reacción se utilizaron 20 pmol de cada oligonucleótido, 100 ng de cDNA molde, MgCl₂ 1.5 mM, 2.5 U de Taq Polimerasa y dNTPs 200 µM para reacciones con un volumen final de 50 µL.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo bajo el siguiente programa:

Desnaturalización inicial	10:00 min	94°C	} 30X
Desnaturalización	00:45 min	94°C	
Alineamiento	00:45 min	57°C	
Elongación	01:00 min	72°C	
Elongación final	10:00 min	72°C	

Los productos de amplificación de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v).

5.2.6. Electroforesis de DNA en gel de agarosa

La electroforesis de DNA es una técnica que se emplea para separar fragmentos de DNA por tamaño y carga. A cada muestra se adicionaron 5 μ L de GelRed 3X (*Biotium*) y 5 μ L de amortiguador de carga 6X (*Thermo Scientific*) antes de ser cargadas en pozos a un extremo de un gel de agarosa al 1% (p/v) preparada en amortiguador TAE (Apéndice B). Los geles se corrieron en amortiguador TAE 1X a 110 V y 100 mA por 45 min. Los fragmentos de DNA se visualizaron bajo luz UV y se analizaron utilizando la escalera de fragmentos de DNA de longitud conocida (*GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific*).

5.2.7. Ligación de los genes HO en el plásmido pGEM-T *Easy Vector*

Los productos de la PCR de los genes HO se insertaron en el plásmido pGEM-T *Easy Vector*, el cual representa un sistema conveniente para clonar productos de PCR generados por polimerasas termoestables que añaden desoxiadenosina (-A) en los extremos 3' de los fragmentos amplificados (Apéndice C). Este vector se encuentra previamente linealizado y contiene desoxitimidina (-T) en los extremos 3', que corresponden a los sitios de inserción compatible a los productos de PCR, lo que facilita la ligación del plásmido y el fragmento de PCR sin la necesidad de digerir previamente con enzimas de restricción.

En cada reacción de ligación se utilizaron 0.5 μ L del plásmido pGEM-T *Easy vector*, 5 μ L de amortiguador 2X, 1 μ L de enzima ligasa (T4 DNA ligase) y 3.5 μ L de producto de PCR purificado por el estuche *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)* siguiendo las recomendaciones del proveedor. Las reacciones se incubaron a 4°C durante toda la noche.

La reacción de ligación se utilizó para transformar a células de *E. coli* DH5 α como se indica en el inciso 5.3.4. El sistema de clonación con el plásmido pGEM-T *Easy Vector* contiene las regiones promotoras de la T7 y la SP6 RNA polimerasa flanqueando la región de clonación múltiple donde además se encuentra la secuencia del α -péptido para la β -galactosidasa. La inserción del producto de PCR en el plásmido inactiva al α -péptido permitiendo seleccionar clonas blanco/azul directamente. Las clonas recombinantes se probaron por digestión utilizando la enzima de restricción *EcoRI* para liberar el fragmento de los genes HO, los cuales se analizaron en un gel de agarosa al 1% como se indicó previamente.

Se tomó una de las colonias positivas para cada una de las reacciones de ligación y se realizó la purificación del plásmido utilizando el estuche comercial *Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System (Promega)* siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor. Los plásmidos se nombraron pGEM-HO1 y pGEM-HO2. Ambos plásmidos se verificaron por secuenciación en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

5.2.8. Subclonación de los genes hemoxigenasa en el plásmido pGAL1

A partir de los plásmidos pGEM-HO1 y pGEM-HO2 se amplificaron los genes de las HOs utilizando los oligonucleótidos específicos que flanquean el ORF de cada gen y fueron insertados en el plásmido pGAL1 para la expresión de los genes *HMOX1* y *HMOX2* en levadura. El plásmido pGAL1 (Yañez Falcón, 2014) es derivado del plásmido pRS316 (Sikorski & Hieter, 1989) al cual se le insertó la secuencia promotora del gen *GAL1*, lo que permite la inducción de la expresión del gen de interés que se clone río abajo del promotor al añadir galactosa al medio de cultivo (Apéndice C).

La amplificación de los genes HO se realizó por PCR como se indicó en el inciso 5.2.5. Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v).

5.2.8.1. Digestión de DNA con enzimas de restricción

Las endonucleasas de restricción reconocen y cortan secuencias específicas de DNA. En cada una de las reacciones, el producto de PCR y el plásmido a digerir se diluyó en un amortiguador específico para las enzimas de restricción (*SmartCut*, *New England BioLabs*), adicionando las enzimas de restricción *XbaI* y *BamHI*, y completando el volumen final con agua libre de nucleasas. Las reacciones se incubaron a 37°C durante 3 h.

Tabla 1. Contenido de las reacciones de digestión

	Plásmido	Producto PCR
Amortiguador SmartCut	3 µL	10 µL
Enzima de restricción	1 µL c/u	2 µL c/u
DNA	3 µg	4 reacciones purificadas
H₂O c.b.p.*	20 µL	100 µL

*c.b.p. cuanto basta para

Las digestiones de DNA fueron purificadas en geles de agarosa al 1%.

5.2.8.2. Ligación con la T4 DNA ligasa

El producto de PCR y el plásmido pGAL1 después de haber sido digeridos con las mismas enzimas de restricción fueron ligados con la ligasa del bacteriófago T4. Las reacciones de ligación se hicieron en dos diferentes relaciones plásmido:inserto tal y como se enseña en la siguiente tabla. Las reacciones se incubaron a 16°C durante toda la noche.

Las reacciones de ligación se usaron para transformar en *E. coli* DH5α como se indicó en el punto 5.3.4.

Tabla 2. Contenido de las reacciones de ligación

	Proporción		
	1:3 (µL)	1:7 (µL)	Control (µL)
Amortiguador	2	2	2
H ₂ O	13	9	16
Plásmido	1	1	1
Inserto	3	7	---
T4 DNA Ligasa	1	1	1
Volumen final	20	20	20

5.2.8.3. Selección de colonias positivas

Las colonias obtenidas se probaron por digestión. Este procedimiento incluyó la selección de 8 colonias al azar a las cuales se les extrajo DNA. Posteriormente, se digirió cada una de las muestras seleccionadas como se describe en el inciso 5.2.8.1. con las enzimas de restricción *XbaI* y *BamHI*. El producto de la reacción fue analizado en gel de agarosa al 1% (p/v) (Inciso 5.2.6.). Las colonias positivas son aquellas que liberan el ORF de los genes HO. Se tomó una de las colonias positivas y se realizó la purificación del plásmido utilizando el estuche comercial Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System (*Promega*) siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor.

Los plásmidos obtenidos se nombraron pGAL1-HO1 y pGAL1-HO2. Ambos plásmidos se secuenciaron en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

Los plásmidos purificados se transformaron en la levadura *S. cerevisiae* siguiendo el método descrito en el inciso 5.3.3.

5.2.9. Subclonación de las HOs en el plásmido pCUP1

La segunda subclonación de los genes HO se realizó en el plásmido pCUP1. Los genes HO fueron puestos bajo el control del promotor del gen *CUP1* de *S. cerevisiae* el cual es fuertemente inducido por la presencia de cobre en el medio.

5.2.9.1. Construcción del plásmido pCUP1

Un fragmento de aproximadamente 450 pb del promotor del gen *CUP1* fue amplificado desde el genoma de *S. cerevisiae* por PCR empleando oligonucleótidos específicos que contenían los sitios de reconocimiento por las enzimas de restricción *SacI* y *XmaI*. La región flanqueada por los oligonucleótidos inicia en la posición -585 y abarca hasta la posición -150 río arriba del codón de inicio del gen *CUP1* (Apéndice D).

La amplificación del segmento del promotor por PCR se realizó siguiendo las indicaciones del inciso 5.2.5. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo bajo el siguiente programa:

Desnaturalización inicial	15:00 min	94°C	} 30X
Desnaturalización	00:45 min	94°C	
Alineamiento	00:35 min	57°C	
Elongación	00:20 min	72°C	
Elongación final	10:00 min	72°C	

Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v).

Una vez que se amplificó el segmento del promotor del gen *CUP1* por PCR, se prosiguió a realizar la digestión de éste y del plásmido pRS316 utilizando las enzimas de restricción *SacI* y *XmaI* como se indicó en el punto 5.2.8.1. Posteriormente, se ligó el inserto con el plásmido siguiendo el método descrito en el inciso 5.2.8.2. El producto de ligación se utilizó para transformar a células de *E. coli* DH5 α como se describe en el punto 5.3.4. Las colonias obtenidas se probaron por digestión y evaluaron tal como se indica en el punto 5.2.8.3.

El plásmido obtenido se nombró pCUP1 y se verificó por secuenciación en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

5.2.9.2. Amplificación de los genes HO desde los plásmidos pGAL1-HOs

Para completar la construcción de los plásmidos pCUP1-HO1 y pCUP1-HO2 fue necesario amplificar por PCR los genes de las HOs a partir de los plásmidos pGAL1-HO1 y pGAL1-HO2 junto con el terminador del gen *MMF1* que codifica para la proteína mitocondrial Mmf1. La amplificación se realizó de forma similar a la descrita en el inciso 5.2.5. En este caso se utilizó un oligonucleótido en el sentido idéntico a la región 5' de las HO y un oligonucleótido contrasentido complementario a la secuencia 3' del terminador del gen *MMF1*.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo bajo el siguiente programa:

Desnaturalización inicial	10:00 min	94°C	} 30X
Desnaturalización	00:45 min	94°C	
Alineamiento	00:45 min	57°C	
Elongación	00:45 min	72°C	
Elongación final	10:00 min	72°C	

Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v).

Los productos de PCR y el plásmido pCUP1 fueron digeridos con las enzimas de restricción *XmaI* y *XhoI* como se indicó en el punto 5.2.8.1. Posteriormente, se realizó la reacción de ligación de la misma manera que se hizo en el inciso 5.2.8.2. El producto de ligación fue usado para transformar a células de *E. coli* DH5 α como se describe en el punto 5.3.4. Las colonias obtenidas se probaron por digestión y se evaluaron tal como se indica en el punto 5.2.8.3. Los plásmidos obtenidos se nombraron pCUP1-HO1 y pCUP1-HO2. Ambos plásmidos se verificaron por secuenciación en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

5.3. MEDIOS DE CULTIVO Y CRECIMIENTO CELULAR

5.3.1. Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados en este trabajo y descritos en el apéndice E, se esterilizaron en autoclave, en atmósfera de sobrepresión, a 120°C durante 20 min.

La cepa BY4741 se creció normalmente en YPD a 30°C. La mutante condicional *GAL10-TIM23* que tiene el correspondiente gen bajo el control del promotor de *GAL10* se creció en YPGal. Si se requería la reducción de la proteína Tim23, la cepa era crecida por 3 días en un medio con galactosa y después se recolectaba, se lavaba con agua estéril y se resuspendía en un medio con glucosa. Las células se crecían en medio con glucosa por los periodos de tiempo indicados hasta un máximo de 3 días.

Se utilizó YNB como medio mínimo, contiene sulfato de amonio, sales minerales y vitaminas necesarias para el crecimiento de la levadura, pero carece de aminoácidos. Tras ser esterilizado, se suplementó con los requerimientos auxotróficos de las cepas menos uracilo y finalmente se añadió la respectiva fuente de carbono a una concentración final de 2%. Los medios sólidos se prepararon añadiendo agar a una concentración final del 2%.

5.3.2. Crecimiento de las células

Las diferentes cepas se conservaron a -70°C suspendidas en glicerol al 15% (p/v). Los cultivos en medio sólido se realizaron en cajas Petri incubadas por 3 días a 30°C. Los cultivos en medio líquido se realizaron en matraces cuya capacidad era al menos 3 veces el volumen del medio de cultivo que contenía para asegurar una buena aireación a partir de inóculos de 5 mL incubados por toda la noche. La incubación se realizó a 30°C con agitación vigorosa. El crecimiento celular se evaluó midiendo la densidad óptica del cultivo a 600 nm (DO_{600}) en un espectrofotómetro. Las cepas utilizadas en este proyecto se encuentran en el apéndice F.

5.3.3. Transformación de levaduras

La transformación de levaduras se realizó siguiendo el protocolo de acetato de litio/DNA acarreador/polietilenglicol (Gietz & Schiestl, 2007) utilizando los diferentes plásmidos de interés en ambiente estéril.

Se partió de un cultivo celular de DO_{600} cercana a 1 del cual se tomó 1.5 mL de cultivo. Las células se recolectaron por centrifugación (2 min, 8,600 x g) y se lavaron con 1 mL de agua destilada y estéril. Se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones y se desechó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 1 mL de acetato de litio 0.1 M y se incubaron por 10 min a T_{amb} . Pasado el tiempo de incubación se centrifugó, se descartó el sobrenadante y se adicionaron 240 μ L de polietilenglicol 3350 al 50% (p/v), 36 μ L de acetato de litio 1 M, 10 μ L de DNA de esperma de salmón 10 mg/mL, 5 μ L de plásmido y 69 μ L de agua destilada. Se agitó la muestra en vórtex hasta resuspender las células y se incubó por 45 min a 42°C.

Finalmente, las células se centrifugaron (2 min, 8,600 x g) y se resuspendieron en 150 μ L de agua para ser sembradas en el medio sólido selectivo correspondiente. Se incubaron las células a 30°C por 3-4 días.

5.3.4. Transformación de bacterias

La transformación de *E. coli* (Apéndice G) se realizó por choque térmico. A 50 μ L de células competentes, se adicionaron 20 μ L de la reacción de ligación o plásmido a amplificar. Posteriormente, se incubaron durante 30 min en hielo, seguido de un choque térmico a 42°C por 45 segundos. A continuación, se incubaron las bacterias nuevamente en hielo durante 2 min. Se añadió 1 mL de medio LB y se incubó durante 1 h con agitación a 37°C. Terminado el tiempo de incubación se centrifugó, se retiró parte del sobrenadante y se sembraron las células transformadas en un medio sólido selectivo de LB con ampicilina (100 μ g/mL). Las células se incubaron a 37°C durante toda la noche.

5.4. EXPRESIÓN DE LAS HOs DE *R. norvegicus* EN LA LEVADURA *S. cerevisiae*

5.4.1. Cinética de inducción

La expresión de las HOs bajo el control del promotor del gen *GAL1* y del gen *CUP1* se evaluó mediante una cinética de inducción temporal. La cepa BY4741 transformada con los plásmidos de expresión en levadura pGAL1-HOs y pCUP1-HOs se crecieron en medio mínimo de sintético de rafinosa y sin uracilo (SRaf-Ura) hasta llegar a una DO₆₀₀ cercana a 1. La inducción de la expresión de los genes HO inició con la adición de galactosa al 2% (p/v) y sulfato de cobre (CuSO₄) 50 µM respectivamente; este tiempo se definió como t=0 horas. Se tomaron muestras de 2 DO₆₀₀ (2 mL de un cultivo con una DO₆₀₀ de 1) en cada tiempo evaluado (0, 0.5, 1.5, 2, y 3 horas). Con cada una de las muestras se precipitó proteína total como se describe en el inciso 5.4.3. Las muestras se analizaron por inmunorréplica tipo *Western blot*.

Además, para el caso del plásmido pCUP1-HOs fue necesario evaluar diferentes concentraciones de CuSO₄ para determinar la mejor concentración de trabajo. Apoyada del trabajo de Mascorro-Gallardo y col., (1996) las concentraciones evaluadas fueron 1 µM, 10 µM, 50 µM y 100 µM de CuSO₄ manteniendo un tiempo de inducción de 2 h. De igual forma que en la cinética temporal, se tomaron muestras de 2 DO₆₀₀ y se precipitó proteína como se describe en el inciso 5.4.3.

5.4.2. Determinación de la especificidad de los anticuerpos anti-HO1 y anti-HO2

La verificación de la especificidad de los anticuerpos anti-HO1 y anti-HO2 se realizó para confirmar que las señales obtenidas en la inmunodetección de la HO-1 y la HO-2 no estaban presentando una reacción cruzada con la HO endógena de *S. cerevisiae* Hmx1p y que eran única y exclusivamente de las proteínas HO exógenas de *R. norvegicus*. Para esto, se transformó la cepa BY4741 con los plásmidos vacíos pGAL1-MMF1ter y pRS316 como controles. Las diferentes cepas se crecieron en medio mínimo de SRaf-Ura hasta llegar a una DO₆₀₀ cercana a 1. Se adicionó galactosa al 2%

(p/v) y se incubó por 2 h. Terminado el tiempo de inducción se realizó una extracción de proteína total como se indica en el inciso 5.4.3. Las muestras se analizaron por inmunoréplica tipo *Western blot*.

5.4.3. Extracción de proteína total

El procedimiento de extracción de proteína total inició con la recolección de 2 mL de células provenientes de un cultivo fresco de DO₆₀₀ cercana a 1 (8,600 x g, 2 min). Se descartó el sobrenadante y se lavaron las células en 1 mL de agua destilada. Se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 250 µL de Tris 50 mM, pH 8; sobre éste se añadieron 50 µL de amortiguador de extracción (Apéndice B) y se incubó por 10 min en hielo.

La precipitación de proteínas se realizó adicionando ácido tricloroacético (TCA) a una concentración final de 12% con posterior agitación breve en vórtex. Las muestras se incubaron durante 30 min a -20°C. Pasado este tiempo, se centrifugó durante 30 min a 18,000 x g a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se lavó el botón con 1 mL de acetona pre-enfriada a -20°C. Se centrifugó nuevamente durante 30 min a 18,000 x g a 4°C. El botón obtenido se resuspendió en 100 µL de amortiguador de carga de LAE 2X.

5.5. LOCALIZACIÓN MITOCONDRIAL DE LAS HEMOXIGENASAS

5.5.1. Fraccionamiento celular

Con el fin de determinar la localización subcelular de las HOs de *R. norvegicus* expresadas en *S. cerevisiae* se realizó un fraccionamiento celular donde se evaluó la fracción citosólica y la fracción mitocondrial.

El fraccionamiento celular se realizó siguiendo el método de Herrmann y col. (1994) con algunas modificaciones descritas por Ponce-Rojas y col. (2017). Brevemente, las

células se crecieron en 100 mL de medio selectivo hasta llegar a una DO_{600} cercana a 1, se adicionó galactosa al 2% (p/v) para inducir los genes de interés y se incubó por 2 horas. Terminado el tiempo de incubación las células se recolectaron mediante centrifugación a 3,900 x g por 5 min, se lavaron con agua destilada y se centrifugaron en las mismas condiciones. El botón resultante se resuspendió en 10 mL de amortiguador Tris-DTT y se incubó por 10 min en agitación constante a 30°C. Las células se centrifugaron y se resuspendieron en 10 mL de amortiguador con zimoliasa para posteriormente ser incubadas en agitación constante por 1 hora a 30°C.

Los esferoplastos resultantes se centrifugaron a 3,900 x g por 5 min a 4°C y se resuspendieron en 1 mL de amortiguador de homogeneización. La homogeneización de los esferoplastos se realizó en un homogeneizador de presión en hielo por 30 ciclos, a continuación, se centrifugaron a 3,900 x g por 5 min a 4°C para descartar los restos celulares y los núcleos. El sobrenadante se centrifugó a 18,000 x g por 10 min a 4°C para separar la fracción mitocondrial y la citosólica. El botón resultante se resuspendió en amortiguador SH y corresponde a la fracción mitocondrial, mientras que el sobrenadante se recuperó y se denominó fracción citosólica. El contenido proteico fue cuantificado por el método de Bradford (Bradford, 1976).

5.5.2. Extracción de proteína con carbonato de sodio

La extracción de proteínas con carbonato de sodio se realizó con el objetivo de determinar si las HOs de *R. norvegicus* expresadas en *S. cerevisiae* se encontraban periféricas de membrana o ancladas a las membranas mitocondriales (Bauerschmitt, Funes, & Herrmann, 2008).

A partir de mitocondrias crudas obtenidas por el método descrito en la sección 5.5.1. se tomó un equivalente del 10% y se recolectaron las mitocondrias mediante centrifugación a 20,000 x g por 10 min a 4°C. La pastilla resultante se resuspendió en 10 μ L de amortiguador de carga. El 90% de las mitocondrias restante se centrifugaron en las mismas condiciones y el botón se resuspendió en 0.5 mL de solución de

carbonato de sodio (Na_2CO_3) 100 mM recién preparada y preenfriada. La muestra se incubó por 30 min a 4 ° C en agitación vigorosa. La muestra se centrifugó a 90,000 x g por 30 min a 4 ° C. El sobrenadante se recolectó y se precipitó proteína utilizando TCA (Sección 5.4.3). y resuspendiendo finalmente en 10 μL de amortiguador de carga LAE 2X. Por otro lado, el botón resultante se resuspendió en 10 μL de amortiguador de carga LAE 2X. Las muestras se analizaron inmunorréplica tipo *Western blot*.

5.5.3. Fraccionamiento mitocondrial

Las mitocondrias cuya membrana externa se ha roto se conocen como mitoplastos. La membrana externa mitocondrial puede ser rota mediante un hinchamiento de las mitocondrias por choque osmótico en una solución hipotónica que mantiene intacta la membrana interna.

La determinación de la localización sub-mitocondrial de la HO-1 y de la HO-2 de *R. norvegicus* expresadas en *S. cerevisiae* se realizó mediante un fraccionamiento mitocondrial generando mitoplastos por choque osmótico a mitocondrias crudas. Las mitocondrias se obtuvieron usando el método descrito en la sección 5.5.1.

El fraccionamiento mitocondrial contó con el tratamiento digestivo con proteinasa K (PK) de mitocondrias intactas, mitoplastos y mitocondrias completamente solubilizadas con Tritón 100-X (TX). Brevemente, en cuatro diferentes tubos tipo Eppendorf se colocaron cantidades iguales de mitocondrias crudas con un contenido de aproximadamente 5 μg de proteína. Los tubos 1 y 2 se incubaron en un medio isotónico (Hepes 20 mM pH 7.4/ Sorbitol 0.6 M) en proporción 1:10 por 30 min soportadas en un bloque de metal en hielo. Los tubos 3 y 4 se incubaron en solución hipotónica (Hepes 20 mM pH 7.4) utilizando las mismas condiciones.

Terminado el tiempo de incubación, la muestra 2, 3 y 4 se les añadió PK a una concentración final de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y solo la muestra del tubo 4 se solubilizó con TX al 0.2% (v/v), las muestras se incubaron por 20 min en hielo.

Para terminar la reacción digestiva de la PK se adicionó fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1mM en todas las muestras (tubo 1-4) y se agregaron 400 μ L de amortiguador SH KCl ^{80mM}. Las muestras fueron centrifugadas a 18,000 x g por 10 min a 4°C. El botón se resuspendió en 400 μ L de amortiguador SH KCl ^{80mM} y se centrifugó nuevamente utilizando las mismas condiciones.

Finalmente, el botón se resuspendió en 10 μ L de amortiguador de carga LAE 2X y las muestras se hirvieron a 96°C durante 1 min. El análisis se realizó por inmunorréplica tipo *Western blot* (Sección 5.7).

5.6. MEDIACIÓN DEL COMPLEJO TIM23 EN LA INTERNALIZACIÓN DE LA HO-1 Y LA HO-2 A LA MITOCONDRIA

La determinación de la mediación del complejo TIM23 en la importación de las HOs a través de la membrana interna mitocondrial se abordó mediante el uso de la cepa condicional GAL10-TIM23.

5.6.1. Reducción de la expresión de la proteína Tim23

La cepa silvestre YPH499 y la cepa mutante GAL10-TIM23 se crecieron en medio con galactosa, YPGal, a una temperatura de 30 ° C. Para reprimir la expresión de *TIM23*, la cepa GAL10-TIM23 fue transferida a un medio libre de galactosa, YPD, mediante diluciones consecutivas por el transcurso de 3 días. Se recolectaron células cada 24 horas y se extrajo proteína por el método descrito en el inciso 5.4.3. Los niveles de la proteína Tim23 se midieron indirectamente utilizando los anticuerpos anti-Tim17 y anti-Tim50.

5.6.2. Importación de las HOs a través de la membrana interna mitocondrial

La cepa GAL10-TIM23 se transformó con los plásmidos de expresión pCUP1-HOs como se describió en el apartado 5.3.3. Las células se crecieron en medio sintético completo de galactosa y sin uracilo a 30°C con agitación constante durante toda la noche. El cultivo se diluyó a 0.01 DO₆₀₀ en un medio sintético completo de glucosa y sin uracilo y se incubó por 15 h hasta llegar a una DO₆₀₀ de 0.7-1. Se indujo la expresión de las HOs mediante la adición de CuSO₄ 50 µM al medio. Las células se recolectaron después de 2 h y se obtuvieron mitocondrias siguiendo el protocolo descrito en el punto 5.5.1. Las mitocondrias se usaron para realizar un fraccionamiento mitocondrial (Inciso 5.5.3).

Muestras control fueron células crecidas en medio sintético completo de galactosa y sin uracilo y procesadas en las mismas condiciones.

5.7. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR INMUNORRÉPLICA TIPO *WESTERN BLOT*

La inmunorréplica tipo *Western blot* es una técnica analítica utilizada para detectar mediante el uso de anticuerpos y cuantificar de manera relativa una proteína separada por electroforesis.

5.7.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida 17.5%

Las proteínas se separaron de acuerdo con su peso molecular de forma vertical usando un sistema de SDS-PAGE. La electroforesis se llevó a cabo por el método de Laemmli utilizando geles de poliacrilamida al 17.5% (Laemmli, 1970) (Apéndice H). Las muestras se llevaron a baño María a 96°C por 1 min antes de ser cargadas en los pozos. Los geles se corrieron en amortiguador tris-glicina. La electroforesis se resolvió a 120 V y 20 mA por gel durante 2.5 horas.

5.7.2. Transferencia a membranas de PVDF

Finalizada la electroforesis, los geles se equilibraron para su posterior transferencia a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) mediante transferencia húmeda con el sistema *Mini-transblot* de *BioRad* en solución amortiguadora de transferencia tris-glicina-metanol. La membrana de PVDF fue activada en metanol por 2 min. Se preparó un sándwich que consistía en un filtro, 2 papeles Whatman, una membrana de PVDF, el gel de poliacrilamida, otros 2 papeles Whatman y otro filtro. El sándwich se colocó en la cámara de *BioRad* entre electrodos de grafito y la transferencia de proteínas a la membrana se realizó a 350 mA por 2 horas manteniendo la cámara de transferencia fría. La transferencia fue visualizada mediante una tinción de proteínas utilizando rojo de Ponceau.

5.7.3. Inmunodetección y fotodocumentación

Se bloqueó la membrana en 25 mL de solución de bloqueo por 1 h. Se incubó el anticuerpo primario* por toda la noche a temperatura ambiente y en agitación suave. Se lavó la membrana 3 veces con solución TBS-T durante 10 min en agitación rápida. Posteriormente, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario AntiRabbit IgG-HRP dilución 1:15,000 por 2 h. Se repitió el proceso de lavado. La detección de las señales inmunoreactivas de cada una de las proteínas analizadas se realizó mediante el sistema de quimioluminiscencia usando los sustratos luminol y H₂O₂.

Tabla 3. Anticuerpos y condiciones empleadas en las inmunorrélicas tipo *Western blot*

*Anticuerpo primario	Dilución	Tiempo de incubación
HO-1	1:5,000	Toda la noche
HO-2	1:5,000	Toda la noche
Hog-1	1:2,000	Toda la noche
Mdm38	1:5,000	2 horas
Tom20	1:1,000	2 horas
mtHSP70	1:2000	Toda la noche
Tim17	1:1000	Toda la noche
Tim50	1:1000	Toda la noche

6. RESULTADOS

6.1. ANÁLISIS INFORMÁTICO DE LA SECUENCIA PRIMARIA DE LAS HOs DE *R. norvegicus*

El sistema HO es el encargado de degradar el grupo hemo libre en la célula. En mamíferos como rata y humano se han descrito dos isoenzimas conocidas como HO-1 y HO-2. El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la HO-1 y la HO-2 de la especie *R. norvegicus*, el modelo animal más empleado en el estudio de estas enzimas, realizado en la base de datos de UniProt confirmó que las HOs tienen un 41% de identidad (Figura 9).

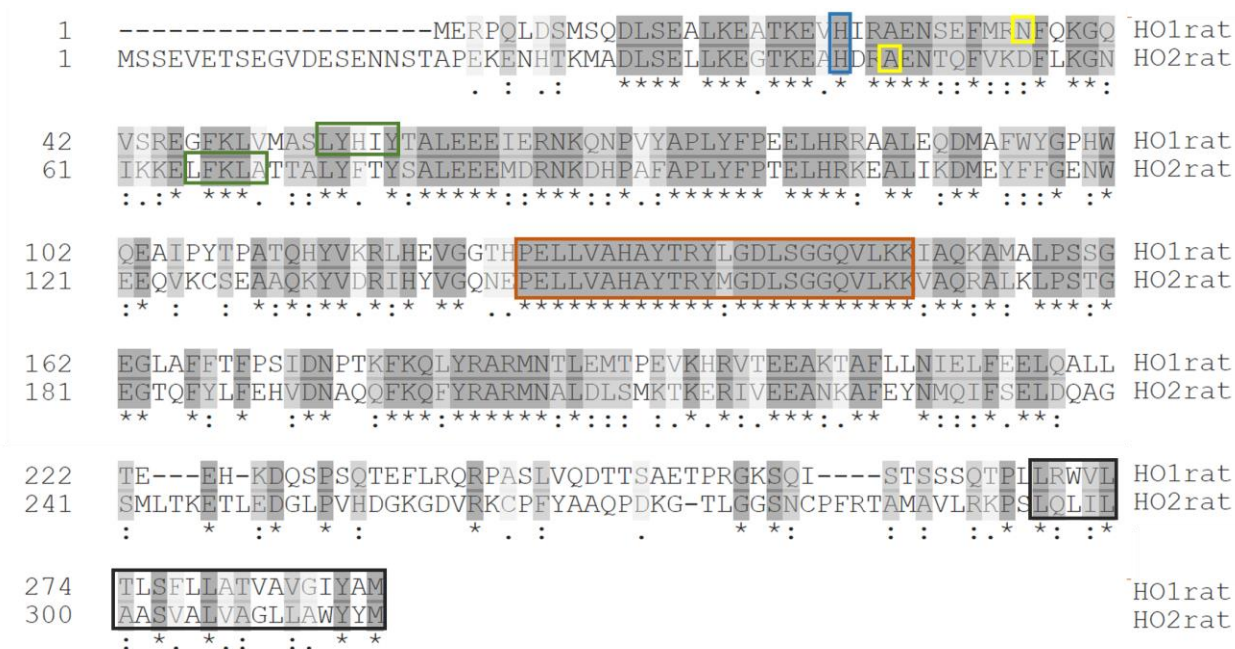


Figura 9. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas HOs de *R. norvegicus*. En color naranja se muestra la región del core catalítico, en color azul se muestra el residuo de histidina que coordina con el hierro del grupo hemo, en color negro se aprecia la región de anclaje a la membrana, en color verde se enseña la región predicha como motivo de reconocimiento del receptor Tom20 y en color amarillo se enseña el sitio predicho de corte de la MPP. El asterisco (*) indica un residuo totalmente conservado, el punto (.) indica una conservación entre grupos de aminoácidos con propiedades débilmente similares y los dos puntos (:) indica una conservación entre grupos de aminoácidos de propiedades muy similares. El

alineamiento se realizó mediante la base de datos de UniProt.

La predicción de la localización subcelular de la HO-1 y de la HO-2 se evaluó en la plataforma DeepLoc-1.0 (Almagro y col., 2017). Esta plataforma tiene la capacidad de diferenciar entre 10 diferentes localizaciones celulares de proteínas eucariontes: nuclear, citoplasmática, extracelular, mitocondrial, de membrana celular, de RE, en cloroplasto, en aparato de Golgi, en lisosoma/vacuola y en el peroxisoma. Los resultados predicen que ambas enzimas se encuentran ancladas a las membranas del RE.

Adicionalmente, el análisis de predicción de presecuencias mitocondriales de los 100 primeros aminoácidos del extremo amino terminal de ambas enzimas realizado en el programa *MitoFates* (Fukasawa y col., 2015) reveló un 0.000 de probabilidad para la existencia de una presecuencia mitocondrial. Sin embargo, en ambas proteínas se detectó un posible motivo de reconocimiento del receptor Tom20 y además un posible sitio de corte de la enzima MPP (Asn36 para la HO-1 y Ala47 para la HO-2) (Figura 9).

6.2. CLONACIÓN DE LOS GENES *HMOX1* Y *HMOX2* DE *R. norvegicus*

El material genético de la HO-1 y la HO-2 se obtuvo de células PC12 tratadas con 0.2 mM CoCl₂. La clonación de ambos genes requirió la extracción de RNA total y la síntesis de cDNA utilizando una transcriptasa reversa. Las regiones correspondientes a los transcritos de los genes fueron amplificadas selectivamente a partir de cDNA empleando oligonucleótidos específicos que se diseñaron a partir de las secuencias de los transcritos de la HO-1 (gene ID: 24451) y la HO-2 (gene ID 79239) descritos en la base de datos del NCBI.

La amplificación de los genes de la HO-1 y de la HO-2 de *R. norvegicus* por PCR se aprecia en la Figura 10. En ambos casos, se observa una única banda de producto de PCR al peso esperado, lo que confirmó la correcta amplificación de ambos genes.

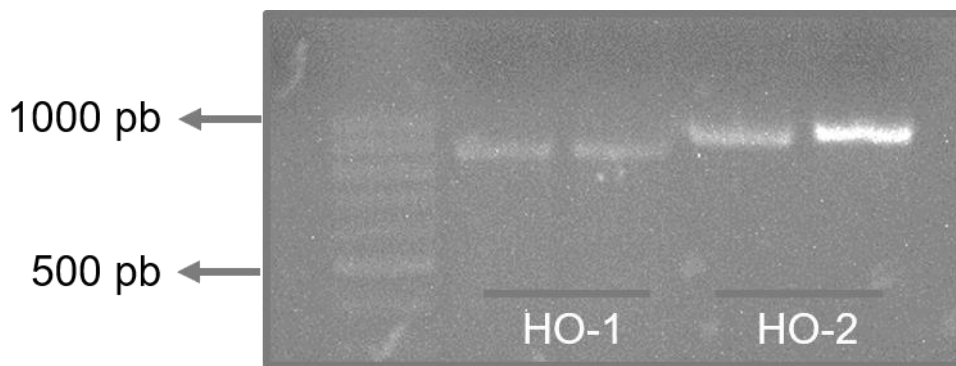


Figura 10. Amplificación de los genes *HMOX1* y *HMOX2* de *R. norvegicus* a partir de cDNA obtenido de células PC12 tratadas con CoCl_2 0.2 mM. Productos esperados en 888 pb y 966 pb para el gen *HMOX1* y *HMOX2*, respectivamente.

6.3. CLONACIÓN DE LOS GENES *HMOX1* Y *HMOX2* DE *R. norvegicus* EN EL PLÁSMIDO pGEM-T EASY VECTOR

Los productos de PCR de cada uno de los genes HO se ligaron en el plásmido pGEM-T Easy Vector (*Promega*) utilizando la T4 DNA ligasa. La ligación en este plásmido no requiere digestión previa con enzimas de restricción para generar extremos compatibles ya que el proceso de ligación se favorece gracias a los extremos de T en el plásmido complementarios a los extremos de A de los insertos (Figura 11).

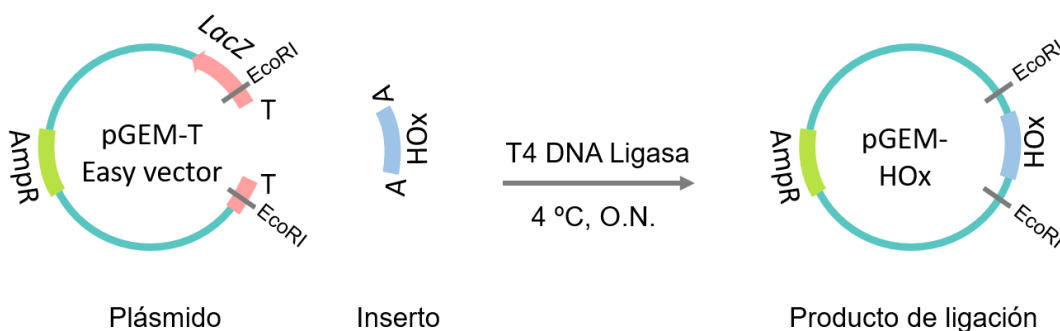


Figura 11. Representación esquemática de la estrategia de ligación en el plásmido pGEM-T easy vector. El plásmido pre-linealizado pGEM-T Easy Vector contiene 3'-T en el sitio de inserción para proporcionar un extremo compatible con los productos de PCR. Este plásmido contiene el sitio de reconocimiento de la enzima de *EcoRI*, entre otras, flanqueando el sitio de inserción para remover el inserto de DNA con una sola digestión de restricción. Los promotores de la RNA polimerasa T7 y SP6 flanquean la región de clonación múltiple. O.N.: *Over Night* (incubación de toda la noche)

El producto de ligación se utilizó para transformar *E. coli* DH5 α . La correcta ligación de los insertos interrumpió el marco de lectura del gen *LacZ* inactivando la β -galactosidasa lo que permitió seleccionar colonias blancas positivas.

La confirmación de la identidad de los plásmidos pGEM-HOs se realizó por digestión utilizando la enzima de restricción *EcoRI*, la cual flanquea los sitios de inserción. Los productos de digestión se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% confirmando la liberación de un único inserto en cada caso. La secuenciación de los plásmidos pGEM-HOs utilizando oligonucleótidos de los promotores T7 y SP6 confirmaron la correcta secuencia de los genes *HMOX1* y *HMOX2* de *R. norvegicus*.

6.4. SUBCLONACIÓN DE HMOX1 Y HMOX2 EN SISTEMAS DE EXPRESIÓN EN *S. cerevisiae*

La levadura *S. cerevisiae* es uno de los organismos eucariontes más utilizados como sistema de expresión para la producción de proteínas heterólogas. Con el fin de expresar genes exógenos, diferentes promotores constitutivos e inducibles se han empleado en la construcción de vectores. Sin embargo, sistemas de expresión que pueden regularse son particularmente útiles, ya que permiten el control sobre el tiempo y nivel de expresión génica (Maya, Quintero, Muñoz-Centeno, & Chávez, 2008).

Algunos de los promotores de levadura que se han usado en este tipo de sistemas son los promotores de los genes de *MET3* y *PHO5*, negativamente regulado por metionina y por fosfato inorgánico, respectivamente. Además, muchos promotores inducibles pueden ser activados agregando una sustancia al medio de cultivo como es el caso del promotor del gen *CUP1*, activado por iones cobre (Cu^{2+}) y los genes *GAL1*, *GAL7* y *GAL10*, activados por galactosa y reprimidos por glucosa (Koller, Velasco, & Subramani, 2000).

Para este trabajo, se decidió utilizar a los promotores *GAL1* y *CUP1* para la expresión de los genes de las HOs de *R. norvegicus* en *S. cerevisiae*. Cada uno de estos promotores se clonaron en el vector centromérico pRS316. Los vectores resultantes pueden ser amplificados en *E. coli* usando la resistencia a ampicilina como selección del plásmido y contienen el gen *URA3* como marcador selectivo en levadura. Son altamente estables sin integración al genoma huésped y se consideran vectores de bajo número de copias que pueden replicarse como si fueran pequeños cromosomas independientes (Figura 12).

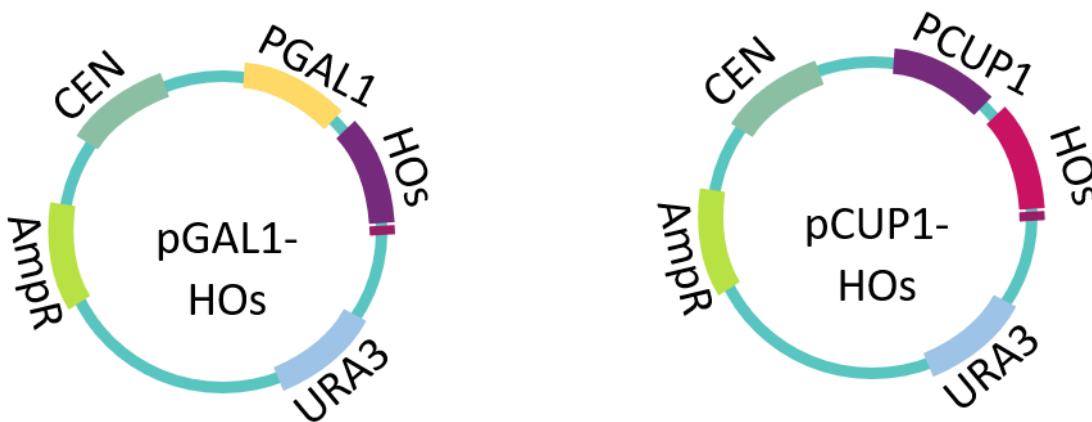


Figura 12. Mapa representativo de los plásmidos pGAL1-HOs y pCUP1-HOs. Ambos plásmidos se construyeron a partir de vector centromérico pRS316. Se representa el centrómero (CEN), los marcadores selectivos URA3 y ampR, las regiones promotoras de los genes *GAL1* (PGAL1) y *CUP1* (PCUP1) y los ORFs de los genes de las HOs.

6.4.1. Subclonación de HMOX1 y HMOX2 en un plásmido de expresión en *S. cerevisiae*

Los plásmidos pGEM-HOs se utilizaron como intermediarios para subclonar los genes de las HOs al plásmido de expresión en levadura pGAL1. La amplificación de los genes *HMOX1* y *HMOX2* de *R. norvegicus* por PCR requirió el uso de oligonucleótidos específicos y complementarios a la secuencia de los genes. Los productos de PCR y el plásmido pGAL1 se digirieron con las enzimas de restricción *XbaI* y *BamHI*. La ligación

de los productos de digestión se llevó a cabo utilizando la T4 DNA ligasa durante toda la noche a 16°C.

El producto de ligación se utilizó para transformar *E. coli* DH5α. Se seleccionaron colonias al azar y se evaluaron por digestión utilizando las enzimas de restricción *XbaI* - *BamHI* para liberar el inserto, *SacI* - *XbaI* para liberar el fragmento del promotor del gen *GAL1* y *XbaI* únicamente para linealizar el plásmido. Los productos de digestión se analizaron mediante electroforesis de gel de agarosa al 1% en los que se demostró en cada caso la liberación de un único fragmento según corresponde en el peso esperado (Figura 13).

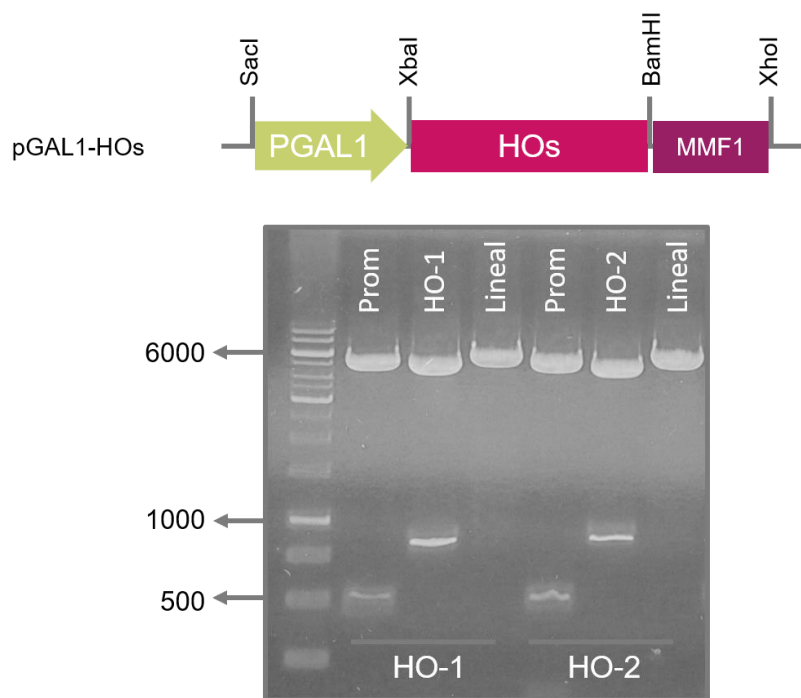


Figura 13. Digestión de los plásmidos pGAL1-HOs utilizando enzimas de restricción. Los sitios de las enzimas de restricción *SacI*-*XbaI* flanquean el promotor del gen *GAL1*, *XbaI*-*BamHI* flanquean el ORF de las HOs. Productos esperados en 510, 888 y 966 pb para el promotor del gen *GAL1*, el gen *HMOX1* y *HMOX2* respectivamente. Prom: promotor.

La secuenciación de los plásmidos pGAL1-HOs utilizando oligonucleótidos de los promotores T7 y T3 confirmaron la correcta secuencia de los genes *HMOX1* y *HMOX2* de *R. norvegicus*.

6.4.2. Subclonación de *HMOX1* y *HMOX2* en un plásmido de expresión en *S. cerevisiae* regulados por *CUP1*

Los plásmidos pGAL1-HOs se utilizaron para subclonar los genes de las HOs junto con el terminador del gen *MMF1* al plásmido de expresión en levadura pCUP1. La amplificación de los genes *HMOX1* y *HMOX2* de *R. norvegicus* por PCR requirió el uso de oligonucleótidos específicos y complementarios a la secuencia de los genes HO. Los productos de PCR y el plásmido pCUP1 se digirieron con las enzimas de restricción *XmaI* y *XhoI*. La ligación de los productos de digestión se llevó a cabo utilizando la T4 DNA ligasa durante toda la noche a 16°C.

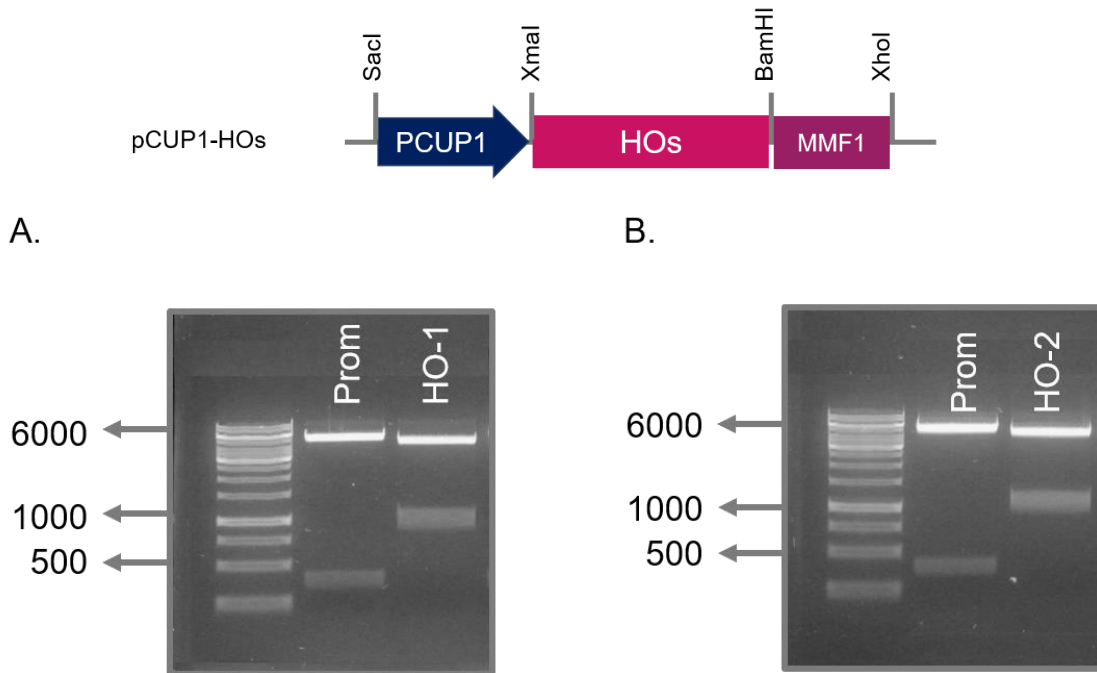


Figura 14. Digestión de los plásmidos pCUP1-HO1 (A) y pCUP1-HO2 (B) utilizando enzimas de restricción. Los sitios de las enzimas de restricción *SacI-XmaI* flanquean el promotor del gen *CUP1*, *XmaI-XhoI* flanquean el fragmento correspondiente al ORF de las HOs junto con la secuencia de terminación de la transcripción de la proteína Mmf1. Productos esperados en 450, 1000 y 1100 pb para el promotor del gen *CUP1*, el fragmento *HMOX1-MMF1TER* y *HMOX2-MMF1TER*, respectivamente.

El producto de ligación se transformó en *E. coli* DH5 α . Se seleccionaron colonias al azar y se evaluaron por digestión utilizando las enzimas de restricción *SacI* – *XmaI* para

liberar el inserto y las enzimas de restricción *XmaI* - *XhoI* para liberar el fragmento del promotor del gen *CUP1*. Los productos de digestión se analizaron mediante electroforesis de gel de agarosa al 1% en los que se demostró en cada caso la liberación de un único fragmento según corresponde en el peso esperado (Figura 14).

La secuenciación de los plásmidos pCUP1-HOs utilizando oligonucleótidos de los promotores T7 y T3 confirmaron la correcta secuencia de los genes *HMOX1* y *HMOX2* de *R. norvegicus*.

6.5. LA HO-1 Y LA HO-2 DE *R. norvegicus* SE EXPRESAN EN *S. cerevisiae*

Una vez clonados los genes *HMOX1* y *HMOX2* de *R. norvegicus* en los plásmidos de expresión pGAL1 y pCUP1 se procedió a transformar la cepa silvestre BY4741 mediante el método descrito por Gietz & Schiestl (2007) (Inciso 5.3.3.). La evaluación de la expresión de las HOs se realizó en células cultivadas en medio líquido S_{Raf}/ura en las que se indujo la expresión de las HOs, ya sea por la adición de galactosa o de cobre según el caso, y se tomaron muestras a diferentes tiempos de incubación para ser analizadas por inmunorréplica tipo *Western blot*.

En la Figura 15 se observa la cinética de inducción de las proteínas HO-1 y HO-2 bajo el control del promotor de los genes *GAL1* y *CUP1*, en esta imagen se observa que la intensidad de las bandas inmunoreactivas para cada una de las HOs aumenta a medida que aumenta el tiempo de inducción. Acorde con los resultados, se escogió como tiempo de inducción 2 h para experimentos posteriores.

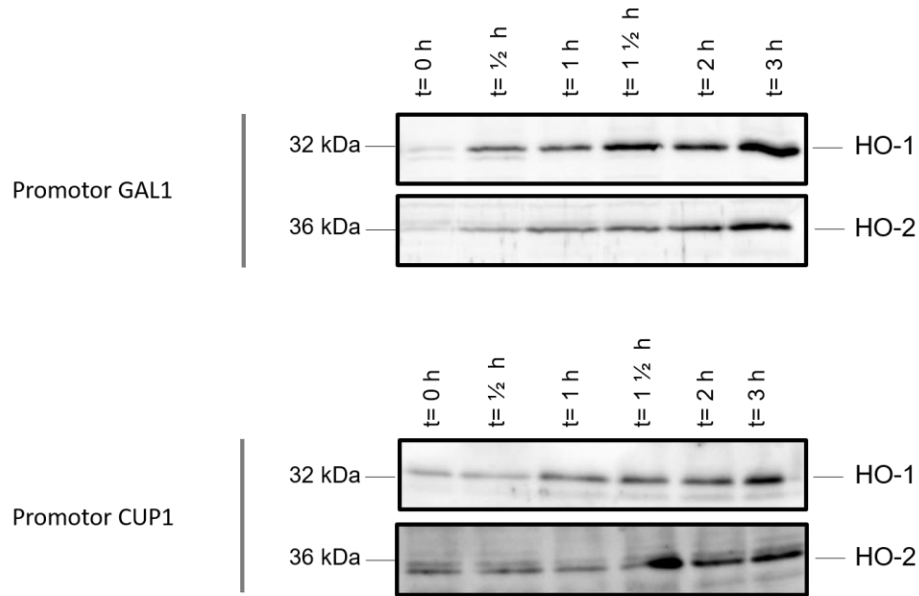


Figura 15. Cinética de inducción de la HO-1 y la HO-2 de *R. norvegicus* expresada en *S. cerevisiae*. La cepa BY4741 fue transformada con los plásmidos pGAL1-HOs o pCUP1-HOs según el caso. Ambos genes HO se encuentran bajo los promotores inducibles por galactosa y por cobre que permiten la síntesis controlada de las proteínas de interés. Las cepas se crecieron en medio líquido mínimo S_{Raf}/-ura hasta llegar a una DO₆₀₀ entre 0.7-1 y se añadió galactosa al 2% (p/v) o 50 μM CuSO₄ para inducir la expresión de los genes de interés, se tomaron muestras en los tiempos de incubación indicados.

6.6. ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS ANTI-HO-1 Y ANTI-HO-2

Debido a que en *S. cerevisiae* la proteína de 37 kDa Hmx1p es reconocida como ortóloga de las HOs de rata (Collinson y col., 2011), se realizó un análisis para demostrar que los resultados de la Figura 15 correspondieran única y exclusivamente a la detección de las HOs de rata y no se estuviera presentando una reacción cruzada con la HO endógena de levadura. Para esto, se transformó la cepa BY4741 con los plásmidos vacíos pGAL1 y pRS316 y con el plásmido pGAL1-HOs y se evaluó la especificidad de los anticuerpos anti-HO1 y anti-HO2 en extractos totales por inmunorreplica tipo *Western blot* (Figura 16).

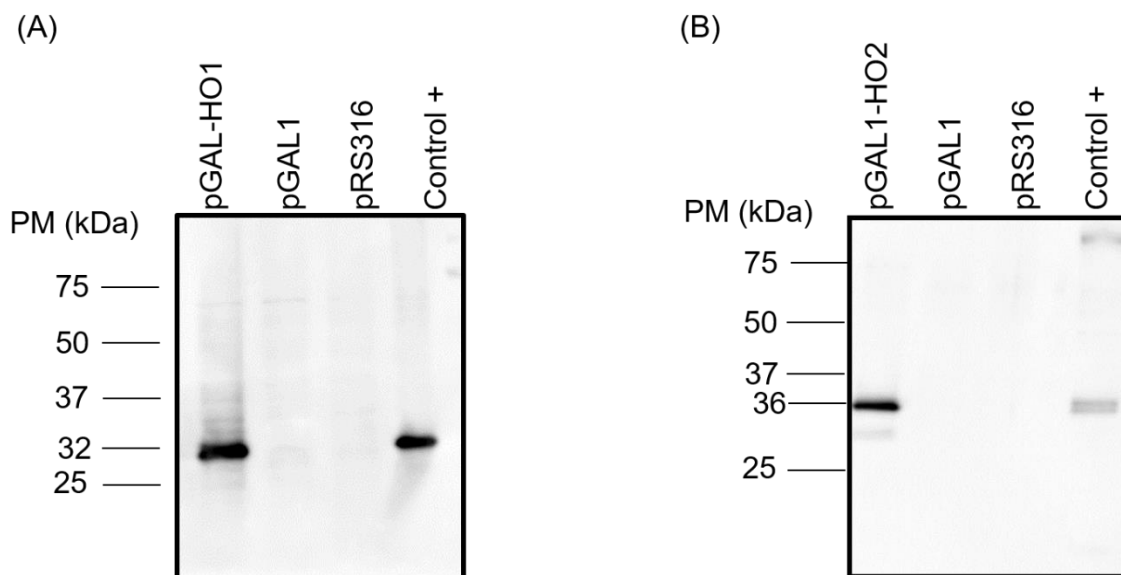


Figura 16. Los anticuerpos anti-HO-1 y anti-HO-2 de rata no reconocen a la Hmx1p de levadura. Detección por inmunorreplica tipo *Western blot* de las proteínas HO-1 (A) y HO-2 (B) en extractos totales de las cepas BY4741[pGAL1-HOs], BY4741[pGAL1] y BY4741[pRS316]. Las células se crecieron en medio líquido mínimo de S_{Raf}/-ura hasta llegar a una DO₆₀₀ entre 0.7-1. Se añadió galactosa al 2% (p/v) e incubó por 2 h, seguido de una extracción de proteína total. Los controles positivos corresponden a células PC12 tratadas con CoCl₂.

En la Figura 16 se aprecia la detección de la HO-1 (A) y la HO-2 (B) a partir de extractos totales de proteína provenientes de las cepas transformadas con los plásmidos de expresión pGAL1-HOs y de los vectores vacíos pGAL1 y pRS316. En ambos casos, se observó la presencia de bandas inmunoreactivas pertenecientes a la HO-1 y la HO-2 únicamente en las cepas transformadas con los plásmidos pGAL1-HO1 y pGAL1-HO2, respectivamente. En las cepas que se transformaron con los plásmidos vacíos no se detectó ninguna señal. Estos resultados indican que los anticuerpos primarios utilizados en ambos casos reconocen única y específicamente a las proteínas HO-1 y HO-2 de *R. norvegicus* sin presentar entrecruzamiento con la Hmx1p endógena de la levadura *S. cerevisiae*. De esta manera se comprobó que los resultados anteriores y futuros corresponden exclusivamente a las proteínas exógenas de HO de *R. norvegicus*.

6.7. AL EXPRESARSE EN *S. cerevisiae*, LA HO-1 Y LA HO-2 DE *R. norvegicus* SE LOCALIZAN PREDOMINANTEMENTE EN MITOCONDRIAS

Para determinar la localización celular de las HOs de *R. norvegicus* al ser expresadas en la levadura *S. cerevisiae* se realizó un fraccionamiento celular y se evaluó en qué fracción era posible encontrar a las HOs de rata. A partir de células transformadas con los plásmidos pGAL1-HOs se obtuvieron las fracciones citosólicas y mitocondriales como se describió en el inciso 5.5.1. Ambas fracciones se evaluaron por inmunorréplica tipo *Western blot* (Figura 17).

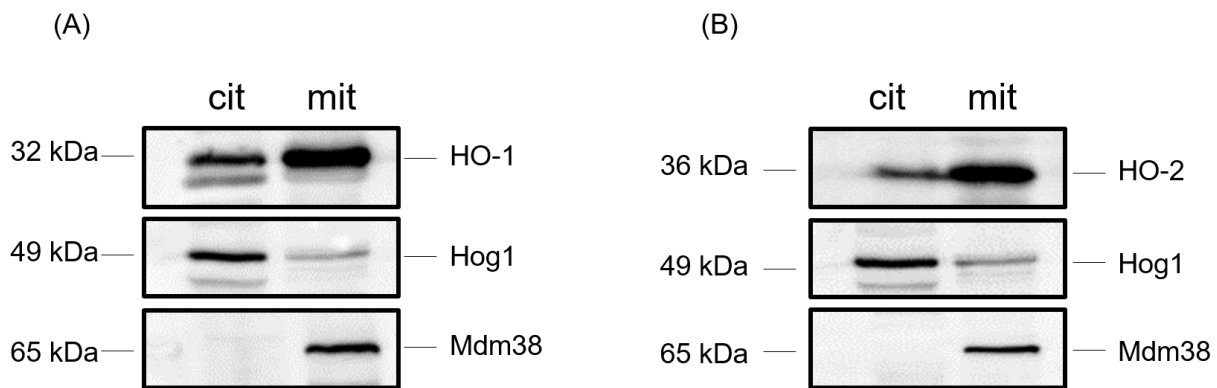


Figura 17. Las HOs localizan preponderantemente en la fracción mitocondrial. Fraccionamiento celular de levaduras que expresan la HO-1 (A) y la HO-2 (B). La cepa silvestre BY4741 transformada con los plásmidos pGAL1-HO, se crecieron en medio líquido mínimo de S_{Raf}/-ura hasta llegar a una DO₆₀₀ entre 0.7-1. Se añadió galactosa al 2% (p/v) e incubó por 2 h. Las células se sometieron a tratamiento enzimático con zimoliasa y centrifugaciones diferenciales para obtener la fracción citosólica (cit) y mitocondrial (mit). Se presentan los marcadores de citosol Hog1 y de mitocondria Mdm38.

Se detectaron bandas inmunoreactivas con una masa molecular aproximada de 32 y 36 kDa correspondientes a los pesos moleculares de la HO-1 y la HO-2 tanto en la fracción citosólica como en la fracción mitocondrial. Sin embargo, en ambos casos, el contenido de las HOs en la fracción mitocondrial es más elevado a comparación con la fracción citosólica. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de las HOs en el modelo de levaduras puede resultar en la importación de ambas proteínas a la mitocondria.

La detección de Hog-1, proteína funcional y estructural que responde a cambios extracelulares en la osmolaridad, se usó como marcador endógeno de la fracción citosólica, apareció cerca del peso correspondiente (49 kDa) como bandas fuertes en las fracciones citosólicas y muy débiles en las fracciones mitocondriales. La proteína Mdm38, proteína involucrada en la homeostasis del potasio y localizada en la membrana interna mitocondrial, sirvió como marcador endógeno de la fracción mitocondrial y se detectó alrededor de 65 kDa.

6.8. AL EXPRESARSE EN *S. cerevisiae*, LA HO-1 Y LA HO-2 DE *R. norvegicus* SON PROTEÍNAS MEMBRANALES Y AL MENOS PARCIALMENTE SE LOCALIZAN EN LA MEMBRANA INTERNA MITOCONDRIAL

Una vez corroborado que las HOs de *R. norvegicus* expresadas en la levadura *S. cerevisiae* se localizan predominantemente en la fracción mitocondrial se prosiguió a verificar la localización submitocondrial de ambas enzimas. Esta interrogante se abordó experimentalmente de dos maneras: en primer lugar, se buscó distinguir mediante una extracción de carbonato de sodio si las HOs son proteínas integrales de membrana como en el retículo endoplásmico o si se encuentran asociadas únicamente o incluso en una forma soluble. En segundo lugar, se realizó un fraccionamiento mitocondrial por choque osmótico para identificar la localización submitocondrial de las HOs.

En primera instancia, el procedimiento de extracción con carbonato de sodio inició con la obtención de mitocondrias provenientes de células que expresaban la HO-1 o la HO-2. Las mitocondrias de cada cepa se trataron con Na_2CO_3 0.1 M, y se separaron proteínas periféricas/solubles de proteínas ancladas a la membrana mediante ultracentrifugación (Figura 18).

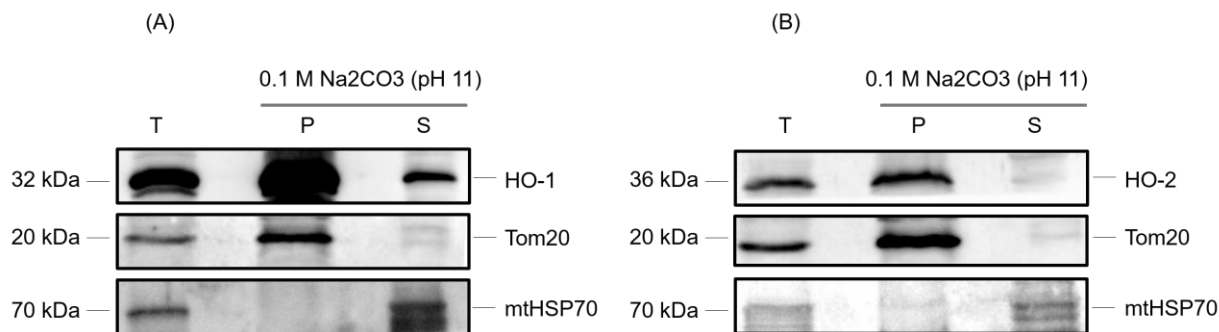


Figura 18. Las HOs se encuentran mayormente ancladas a las membranas mitocondriales. Detección de la HO-1 (A) y la HO-2 (B) a partir de mitocondrias aisladas y sometidas a extracción con carbonato de sodio (0.1 M Na₂CO₃, pH 11, 4°C, 30 min). Se observan los marcadores para la proteína soluble mtHSP70 y la proteína integral de membrana Tom20. T: total, P: *pellet* y S: sobrenadante.

Después del tratamiento y separación por ultracentrifugación de las proteínas, en el carril P se precipitaron todas las proteínas integrales de membrana, como es el caso del receptor Tom20, proteína anclada a la membrana externa mitocondrial que funciona como uno de los receptores del complejo TOM, sirvió como marcador de esta fracción. Por otro lado, en el sobrenadante o carril S se depositaron las proteínas solubles o periféricas de membrana, donde la proteína mtHSP70 se acumuló. Como se puede observar tanto para la HO-1 como para la HO-2 en ambos paneles de la Figura 18, estas dos proteínas se comportan como proteínas integrales de membrana, al precipitarse (carril P) tal y como lo hace la proteína Tom20 que en este caso se utilizó como proteína control. Una pequeña fracción de ambas enzimas se observa en la fracción soluble (carril S), lo que podría representar una población de la proteína que se encuentra de forma soluble dentro de la mitocondria sin interacciones fuertes con las membranas lipídicas.

En segunda instancia, el procedimiento de fraccionamiento mitocondrial se diseñó para localizar a las HOs dentro de los subcompartimentos mitocondriales. En este sentido, se estudió la susceptibilidad de las HOs de ser digeridas por PK en mitocondrias intactas, mitocondrias completamente solubilizadas y mitoplastos. En este experimento se incubaron mitocondrias crudas en soluciones isotónicas e hipotónicas y

posteriormente se sometieron a tratamientos digestivos con PK y solubilización con TX (Figura 19).

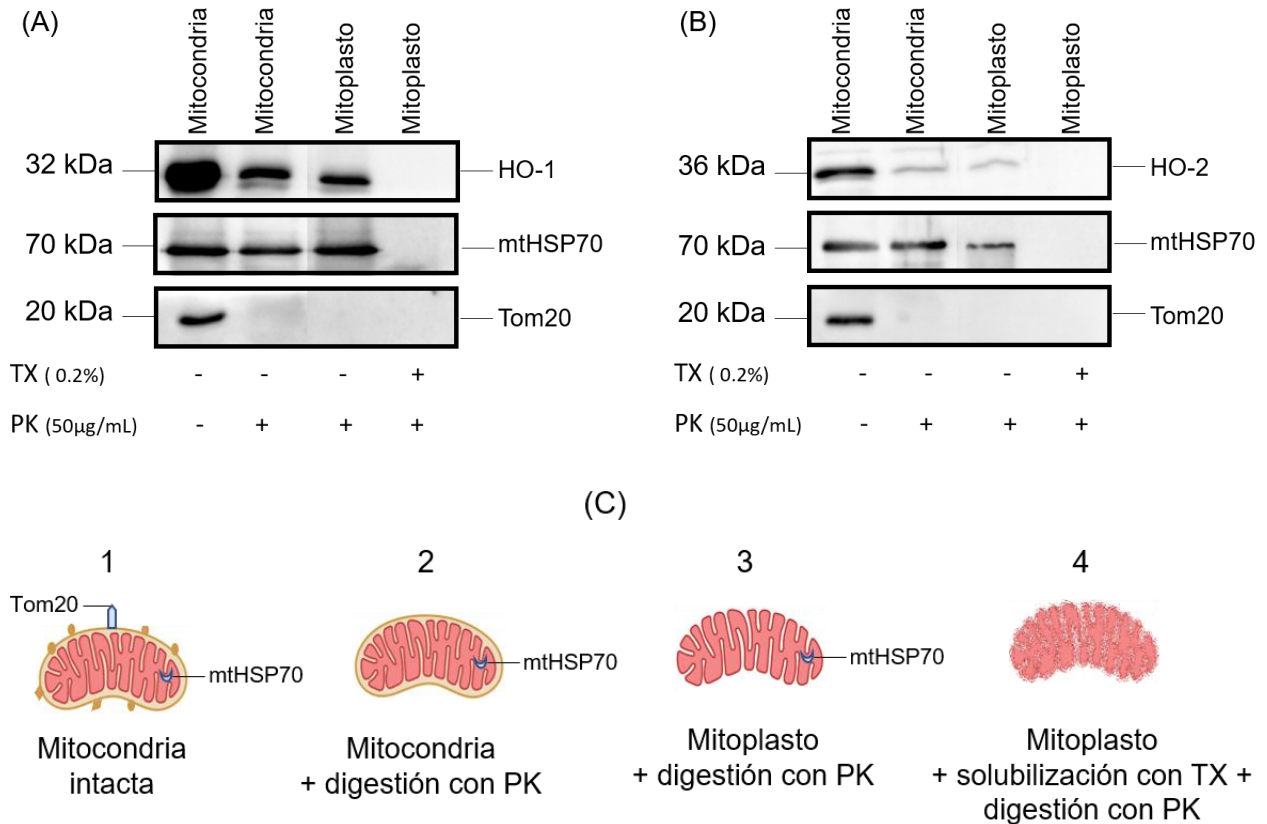


Figura 19. Las HOs de *R. norvegicus* expresadas en *S. cerevisiae* son capaces de llegar hasta la matriz mitocondrial. Las mitocondrias aisladas de la cepa BY4741[pGAL1-HO1] (A) y la cepa BY4741[pGAL1-HO2] (B) se incubaron en solución isotónica (Hepes 20mM/Sorbitol 0.6M, pH 7.4, 4°C, 30 min) y en solución hipotónica (Hepes 20mM, pH 7.4, 4°C, 30 min). Ambos grupos se sometieron a tratamiento digestivo con Proteinasa K (PK, 50 µg/mL, pH 7.4, 4°C, 20 min) y solubilización con Tritón 100-X (TX, 0.2%). 5 µg de proteína se procesaron y se cargaron en cada carril. Se usaron los marcadores de matriz mitocondrial mtHSP70 y de membrana externa Tom20. (C) Representación esquemática del tratamiento empleado.

El tratamiento digestivo con PK eliminó las proteínas que se encontraban por fuera de la membrana externa mitocondrial como es el caso del receptor Tom20. Es claro que una cantidad considerable tanto de la HO-1 como de la HO-2 es degradada al someter a las mitocondrias a un tratamiento con PK. Esto podría indicar que esta fracción degradada se encuentra expuesta hacia el citoplasma. Sin embargo, también podría

representar la fracción que se encuentra anclada a las membranas del retículo endoplásmico y que no se perdieron durante la purificación mitocondrial. Por lo tanto, las HOs al igual que la chaperona mitocondrial mtHSP70 fueron protegidas contra la digestión de la PK tanto en mitocondrias como en mitoplastos, por lo que también es claro que, al menos, una fracción tanto de la HO-1 como de la HO-2 de rata, al ser expresadas en levadura, se encuentran protegidas del tratamiento con PK, indicando que son protegidas por la acción de la proteasa por las membranas mitocondriales. Además, tras la adición de TX para solubilizar ambas membranas mitocondriales, las HOs se degradan completamente, confirmando que estas proteínas se encuentran expuestas hacia la matriz mitocondrial.

De ambas estrategias experimentales, es posible concluir que cuando la HO-1 y la HO-2 de rata se expresan en levadura, son capaces de ingresar a la y al menos parcialmente se encuentran ancladas a la membrana interna con su dominio catalítico está expuesto a la matriz mitocondrial.

6.9. ESTABLECIMIENTO DE UNA ESTRATEGIA PARA DETERMINAR EL MECANISMO DE IMPORTACIÓN MITOCONDRIAL QUE INTERNALIZA A LA HO-1 Y LA HO-2 EN LA MITOCONDRIA

Una estrategia ampliamente utilizada en levadura para determinar si una proteína está involucrada en algún proceso celular particular, es la generación de mutantes que abatan por completo la función de un gen particular. Sin embargo, los genes que codifican para la mayoría de los componentes que forman parte de las maquinarias de importación mitocondrial son esenciales. Es decir, que la interrupción o la eliminación de tales genes causa la muerte celular, lo que indica que estos realizan funciones biológicas necesarias para que una célula o el organismo sobreviva (Zhang & Ren, 2015).

Sin embargo, las limitaciones experimentales de trabajar con genes esenciales pueden ser abordadas con la introducción de mutaciones condicionales, donde el gen de interés esté bajo el control de promotores que pueden apagar el gen dependiendo de la

condición experimental al adicionar una sustancia particular al medio o en presencia de una fuente de carbono específica.

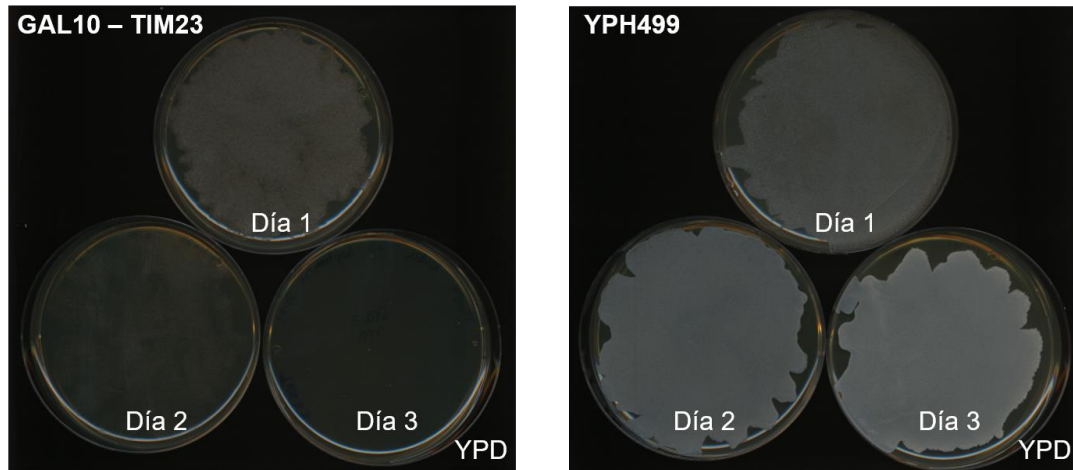
En la cepa *GAL10-TIM23*, la expresión de Tim23 está controlada por el promotor del gen *GAL10*. Esta cepa fue construida mediante el reemplazo del promotor endógeno del gen *TIM23* 100 pb río arriba del marco de lectura por el promotor del gen *GAL10* mediante el uso de un casete de integración por recombinación homóloga en la cepa silvestre YPH499 (Popov-Čeleketić y col., 2008). Por lo tanto, con el propósito de determinar si las proteínas HO-1 y HO-2 son capaces de llegar a la matriz mitocondrial utilizando el complejo de importación TIM23, nos propusimos evaluar la presencia de HO-1 y de HO-2 en células en las que se ha abatido la expresión del gen *TIM23* y por lo tanto la función del complejo TIM23 se encuentra comprometida.

6.9.1. Análisis del crecimiento de la cepa *GAL10-TIM23*

A pesar de que el fenotipo de la mutante *GAL10-TIM23* ha sido estudiado previamente, se buscó determinar en nuestro laboratorio las condiciones adecuadas de tiempos de crecimiento que permitieran evaluar la presencia de la HO-1 y de la HO-2 de rata en mitocondrias de levadura en la que se encuentre disminuida la expresión de Tim23.

Por lo tanto, se analizó el fenotipo de crecimiento de la mutante *GAL10-TIM23* utilizando diferentes fuentes de carbono (galactosa y glucosa) a una temperatura de 30°C. En este ensayo, la cepa silvestre YPH499 y la cepa mutante *GAL10-TIM23* se crecieron en medio líquido con galactosa, YPGal, durante toda la noche. De este cultivo se tomó una alícuota y se pasó a medio líquido y sólido con glucosa, YPD. Pasadas 24 horas se recolectaron células del medio líquido para analizar indirectamente el decaimiento de la proteína Tim23 al evaluar la presencia de las proteínas Tim17 y Tim50 que forman parte también del complejo TIM23 (Figura 20). El mismo procedimiento se repitió durante 3 días.

(A)



(B)

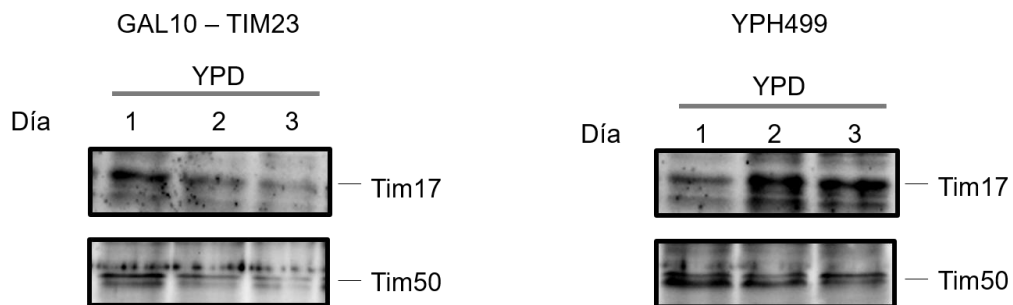


Figura 20. La expresión de TIM23 disminuye en ausencia de galactosa y eso repercute directamente en la viabilidad celular. (A) El decaimiento de Tim23 afecta el crecimiento de las células. Células que expresan Tim23 bajo el control del promotor del gen *GAL10* (GAL10-TIM23) y células silvestres (YHP499) fueron crecidas en medio libre de galactosa haciendo diluciones consecutivas durante 3 días. (B) Decaimiento de Tim23 muestra niveles reducidos de otras proteínas mitocondriales. Las células GAL10-TIM23 y YHP499 fueron colectadas cada 24 h después del cambio a medio libre de galactosa y los niveles proteicos fueron analizados por inmunorréplica tipo *Western blot*.

El fenotipo de las cepas *GAL10-TIM23* y YPH499 se evaluó mediante el cambio de medio con fuente de carbono de galactosa (YPGal) a un medio con fuente de carbono con glucosa (YPD). Este cambio condujo a una drástica reducción en el crecimiento de la cepa *GAL10-TIM23* en comparación con la cepa YPH499 que se observó desde el día 1. Mientras que la cepa YPH499 continuó creciendo normalmente durante todos los días evaluados, la cepa *GAL10-TIM23* dejó de crecer completamente en el día 3 del cambio a YPD (Figura 20A).

La disminución de Tim23 se evaluó indirectamente a través de la detección de otras proteínas de membrana interna mitocondrial, para las cuales su propia biogénesis va de la mano con la biogénesis de Tim23. Los niveles basales de Tim17 y de Tim50 disminuyen a lo largo de los días luego del cambio de YPGal a YPD para la cepa *GAL10-TIM23*. La cepa YPH499 no presentó fluctuaciones significativas para estas proteínas (Figura 20B).

Estos resultados indican que la cepa *GAL10-TIM23* tiene un requerimiento por galactosa para su correcto crecimiento. Sin embargo, es importante hacer notar que no es posible llevar a cabo estudios en tiempos superiores a 24 horas después del cambio a un medio libre de galactosa, ya que el número de células vivas disminuye a menos del 50%. Es importante considerar también que, en este tipo de cepa, donde la expresión de un gen esencial es regulada por un promotor inducible por galactosa, es imposible utilizar las construcciones realizadas en los plásmidos que regulan la expresión del gen de interés (en este caso *HMOX1* y *HMOX2*) también por galactosa. Por lo tanto, será indispensable realizar los experimentos de importación y localización en ausencia de TIM23 utilizando las construcciones para las HOs reguladas bajo la acción del promotor *CUP1* también realizadas en este trabajo.

7. DISCUSIÓN

En este estudio proponemos que la expresión de las isoenzimas que conforman el sistema HO de *R. norvegicus*, la HO-1 y la HO-2, en la levadura *S. cerevisiae* resulta en un modelo apto para el análisis de la localización mitocondrial de ambas enzimas y la identificación de la maquinaria de translocación empleada en el proceso de importación. El determinar con precisión este mecanismo podría ayudar a comprender con mayor profundidad la funcionalidad del sistema HO y cómo es que modula la degradación de los grupos hemo.

La función principal del sistema HO en todas las especies es la degradación del grupo hemo, lo que ha llevado a la conservación de los genes *HMOX* a lo largo de la evolución. Sin embargo, la variación de las enzimas y la localización subcelular indican un amplio repertorio de funciones. Un gran número de revisiones indican que las isoenzimas de HO son proteínas que se pueden localizar en diferentes organelos celulares como: el RE, el núcleo y las mitocondrias, por lo que es apropiado considerarlas como proteínas dinámicas (Dunn y col., 2014).

La localización subcelular de las HOs define en gran medida la función proteica de estas isoenzimas. Por ejemplo: en el RE, donde las HOs se encuentran ancladas por un único dominio transmembranal del extremo carboxilo terminal, la función principal es la degradación del grupo hemo. En el núcleo, la función catalítica de la HO-1 es despreciable, mientras que la interacción y la estabilización de factores de transcripción parece ser la función primordial de esta enzima. De forma interesante, en las mitocondrias la HO-1 colocaliza con la BVR, enzima que completa la conversión de la BV a la BR, por lo que una de las funciones en este organelo parece estar asociada con la regulación del contenido de hemo mitocondrial (Converso y col., 2006). Poco se conoce del mecanismo involucrado en la importación de las HOs a la mitocondria, por lo que en este trabajo nos propusimos abordar el tema preguntándonos si las HOs eran internalizadas a este organelo mediante alguno de los sistemas canónicos de importación de proteínas mitocondriales.

Para cumplir con este objetivo, inicialmente estudiamos la secuencia de aminoácidos de ambas isoenzimas en busca de una MTS que señalizara el tránsito de las HOs a la mitocondria. Tal como indican los resultados del análisis *in silico*, las HOs carecen de una MTS típica que las dirija a la superficie de la mitocondria. No obstante, en la literatura existen pruebas contundentes de la presencia de estas enzimas en la mitocondria vistas por diferentes técnicas bioquímicas como: análisis por *Western blot*, microscopía inmunoelectrónica, e inmunofluorescencia confocal, entre otras (Bansal, Biswas, & Avadhani, 2014; Bindu y col., 2011; Waltz y col., 2018). En conjunto, esta información indica que a pesar de la ausencia de una MTS conocida en el extremo amino terminal las HOs localizan en la mitocondria.

Adicionalmente, el análisis *in silico* mostró la presencia de posibles motivos de reconocimiento por el receptor Tom20 en el extremo N-terminal para cada una de las isoenzimas. La presencia de estos motivos sugiere que Tom20, especializado en reconocer precursores destinados a la membrana interna y matriz mitocondrial, funcionaría como el receptor de las HOs en la superficie de la mitocondria conduciéndolas al poro del complejo TOM para la posterior importación dentro de la mitocondria. Nosotros especulamos que una de las posibles formas en que las HOs pueden ser acercadas a la superficie mitocondrial desde el RE está mediada por las zonas de contacto entre los dos organelos, conocidas como membranas asociadas a las mitocondrias (*MAM*, *Mitochondrial-Associated Membranes*) (Giorgi y col., 2009). En publicaciones previas, la inhibición de la palmitoilación produce un movimiento de la HO-1 desde las MAM hacia el RE. A pesar de que la palmitoilación es una modificación postraduccional que no ocurre en todas las especies, esta información sugiere que la HO-1 puede ir y venir entre estos organelos (Lynes y col., 2012).

Como segundo acercamiento quisimos evaluar si la expresión de las HOs de *R. norvegicus* en la levadura *S. cerevisiae* podría resultar en una localización mitocondrial que permitiera un análisis más profundo al análisis *in silico*. Para abordar este objetivo, los genes *HMOX1* y *HMOX2* de *R. norvegicus* se clonaron en plásmidos de expresión bajo promotores inducibles que permitieron la expresión controlada de cada uno de los

genes. Los resultados obtenidos mediante el análisis por inmunorréplica tipo *Western blot* en fracciones totales confirmaron la correcta expresión heteróloga de las HOs en *S. cerevisiae* vistas como bandas alrededor de 32 kDa para la HO-1 y 36 kDa para la HO-2. Además, nuestros experimentos indican que las bandas obtenidas corresponden única y exclusivamente a las HOs exógenas, sin presentar reacción cruzada con el homólogo Hmx1p presente en *S. cerevisiae*.

Los experimentos de localización subcelular revelaron que tanto la HO-1 como la HO-2 se acumulan en mayor medida en la fracción mitocondrial con respecto a la fracción citosólica. La distribución asimétrica se puede explicar debido a que la mayoría de las HOs son proteínas de membrana a excepción de las bacterias, donde se presentan en forma soluble y más pequeña (Frankenberg-Dinkel, 2004). La presencia del extremo hidrofóbico en el carboxilo terminal en ambas enzimas ancla a estas proteínas a las bicapas lipídicas, haciendo más probable encontrarlas en la fracción mitocondrial que en forma soluble en el citosol. Se publicaron previamente resultados similares en células animales, en las que la HO-1 se concentra principalmente en la fracción mitocondrial en comparación de la fracción citosólica ante un estímulo con extracto de humo de cigarrillo (Slebos y col., 2007). De forma interesante, a diferencia de experimentos previos realizados en células animales, la expresión de las HOs en *S. cerevisiae* resultó en una localización mitocondrial sin la necesidad de adicionar un factor que genere estrés a las células, por ejemplo, hipoxia, lipopolisacáridos, y extracto de humo de cigarrillo, entre otros.

Los resultados sugieren que el modelo de expresión de las HOs en *S. cerevisiae* puede resultar en la importación de ambas proteínas a la mitocondria. En efecto, los datos obtenidos en la extracción con carbonato indican que ambas isoenzimas se encuentran como proteínas integrales a las membranas mitocondriales. Sin embargo, debido a la presencia de una membrana interna y una externa en estos organelos, no es posible asegurar con este experimento la localización submitocondrial exacta. En contraste, el fraccionamiento mitocondrial por choque osmótico y accesibilidad de la PK nos permitió discernir el tipo de membrana al cual las HOs se encuentran ancladas. De acuerdo con

los resultados, las HOs son capaces de atravesar la membrana interna mitocondrial protegiéndose de la degradación con PK y anclarse posiblemente a esta membrana mediante el extremo carboxilo terminal dejando el resto de la proteína enfrentando la matriz mitocondrial. Esta localización submitocondrial concuerda con los datos descritos por Converso y col., (2006) en el que se demostró por inmunorréplica tipo *Western blot* de fracciones submitocondriales de hígado de rata que la HO-1 localiza principalmente en la membrana interna mitocondrial.

Considerando que las HOs logran internalizarse hasta la membrana interna y que la importación de proteínas mitocondriales está compuesta de mecanismos finamente regulados en los que participan las translocasas de membrana interna, nos interesó determinar la participación del complejo TIM23 en la internalización de las HOs a este organelo. El complejo TIM22 se descartó inicialmente puesto que ambas enzimas carecen de múltiples pasos transmembranales, característica primordial de las proteínas que utilizan la ruta de importación de acarreadores (*Carrier Pathway*). En el modelo de estudio planteado se utilizó la cepa condicional *GAL10-TIM23*. Nuestros resultados indican que la expresión de *TIM23* disminuye en ausencia de galactosa, reflejando un abatimiento del crecimiento celular incluso desde el primer día del cambio de medio. A pesar de que no se determinó la mediación del complejo TIM23 en la importación de las HOs a la membrana interna mitocondrial, se dejó establecido el método, las cepas transformadas y las condiciones necesarias a seguir para alcanzar este objetivo. Pese a que el mecanismo exacto de importación permanece sin elucidarse, nosotros proponemos que la integración de las HOs a la membrana interna mitocondrial ocurre a través de los complejos TOM-TIM23 (Figura 21). Esta ruta involucra un reconocimiento inicial de las HOs por el receptor Tom20. Las HOs ingresan a través del poro del complejo TOM, la proteína Tom40, puerta de entrada de virtualmente todos precursores mitocondriales. A continuación, las HOs serían entregadas al complejo TIM23 quien media la translocación a través de la membrana interna mitocondrial hasta toparse con el segmento hidrofóbico del C-terminal que detiene la importación y guía la liberación lateral hacia la membrana interna mitocondrial.

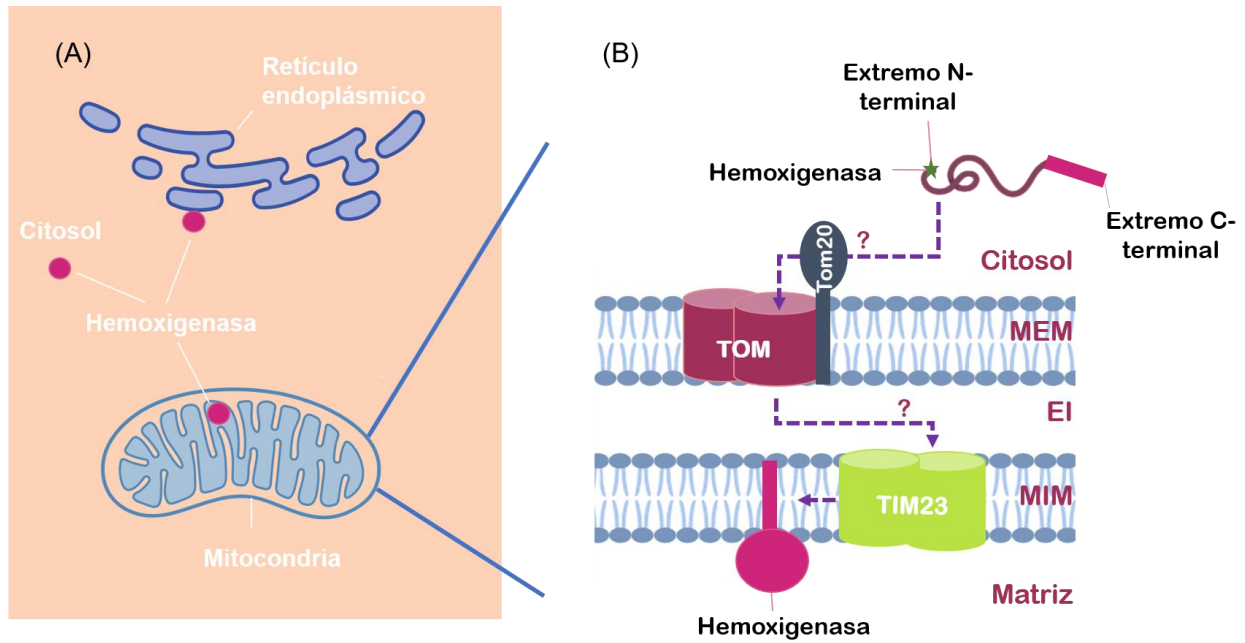


Figura 21. Esquema integrativo de la localización subcelular de las HOs (A) e importación de las HOs a través de la membrana interna mitocondrial mediante la participación de la translocasa de membrana externa (TOM) y la translocasa de membrana interna (TIM23) (B). Se representa el posible motivo de reconocimiento del receptor Tom20 en forma de estrella (color verde) en el extremo N-terminal. El extremo C-terminal se representa anclado a la membrana interna mitocondrial (MIM) mientras que la parte soluble se ubica en la matriz mitocondrial. MEM: membrana externa mitocondrial, EI: espacio intermembranal.

CONCLUSIONES

- En este estudio se expresó exitosamente a las proteínas HO-1 y HO-2 de rata en células de *S. cerevisiae*.
- A pesar de que ninguna de las HOs contiene una presecuencia escindible mitocondrial, ambas proteínas se internalizan a la mitocondria en condiciones normales de crecimiento.
- Una proporción de las proteínas llaga hasta la matriz mitocondrial.
- Cuando se localizan en mitocondrias de levadura, ambas proteínas HO de rata, se encuentran ancladas en la membrana interna y la región soluble se encuentra expuesta hacia la matriz mitocondrial.

PERSPECTIVAS

En el transcurso del desarrollo del presente trabajo se fueron acumulando diferentes perspectivas que de ser abordadas aportarían información valiosa para dilucidar el sistema responsable de la translocación de las HOs a la mitocondria.

- Determinar la intervención del complejo TIM23 en la importación de las HOs a la membrana interna mitocondrial utilizando la cepa *GAL10-TIM23*.
- Evaluar la autenticidad del posible motivo de reconocimiento por Tom20 mediante la construcción de mutantes de las HOs en el extremo N-terminal.
- Realizar pretratamientos con tripsina a las mitocondrias para valorar la participación de los receptores de membrana externa en el proceso de internalización de las HOs en ensayos de importación *in vitro*.
- Investigar si las HOs pueden ser procesadas por la MPP. Purificar MPP e incubarla directamente con HO marcada radiactivamente y analizar por SDS-PAGE y autoradiografía.
- Evaluar el contenido de grupo hemo mitocondrial en células en las que se expresen las HOs mediante ensayos de actividad enzimática de las HO en fracciones mitocondriales y comparar con células control.

BIBLIOGRAFÍA

- Alam, J., & Cook, J. (2007). How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene? *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. Vol. 32 (2), Pág. 166-174.
- Almagro, J., Kaae, C., Kaae, S., Nielsen, H., & Winther, O. (2017). DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. *Bioinformatics*. Vol. 33 (21), Pág. 3387-3395.
- Bansal, S., Biswas, G., & Avadhani, N. G. (2014). Mitochondria-targeted heme oxygenase-1 induces oxidative stress and mitochondrial dysfunction in macrophages, kidney fibroblasts and in chronic alcohol hepatotoxicity. *Redox biology*. Vol. 2 , Pág. 273-283.
- Bauerschmitt, H., Funes, S., & Herrmann, J. M. (2008). Synthesis and Sorting of Mitochondrial Translation Products. Membrane Trafficking. *Humana Press*. Vol. 457, Pág. 95 -112.
- Bindu, S., Pal, C., Dey, S., Goyal, M., Alam, A., Iqbal, M. S., . . . Bandyopadhyay, U. (2011). Translocation of Heme Oxygenase-1 to Mitochondria Is a Novel Cytoprotective Mechanism against Non-steroidal Anti-inflammatory Drug-induced Mitochondrial Oxidative Stress, Apoptosis, and Gastric Mucosal Injury. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 286, Pág. 39387-39402.
- Bohnert, M., Pfanner, N., & Van der Laan, M. (2007). A dynamic machinery for import of mitochondrial precursor proteins. *FEBS Letters*. Vol. 581, Pág. 2802- 2810.
- Bolender, N., Sickmann, A., Wagner, R., Meisinger, C., & Pfanner, N. (2008). Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins. *EMBO Reports*. Vol. 9 (1), Pág. 42-49.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. Vol 72 (1), Pág. 248-254.
- Chiabrando, D., Vinchi, F., Fiorito, V., Mercurio, S., & Tolosano, E. (2014). Heme in pathophysiology: a matter of scavenging, metabolism and trafficking across cell membranes. *Frontiers in pharmacology*. Vol. 5, 24 Pág.
- Choi, A. M., & Alam, J. (1996). Heme Oxygenase-1: Function, regulation, and implication of novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. Vol 15 (1), Pág. 9-19.
- Collinson, E. J., Wimmer-Kleikamp, S., Gerega, S. k., Hwa Yang, Y., Parish, C. R., Dawes, I. W., & Stocker, R. (2011). The Yeast Homolog of Heme Oxygenase-1 Affords Cellular Antioxidant Protection via the Transcriptional Regulation of

- Known Antioxidant Genes. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 286, Pág. 2205-2214.
- Converso, D. P., Taillé, C., Carreras, M. C., Jaitovich, A., Poderoso, J. J., & Boczkowski, J. (2006). HO-1 is located in liver mitochondria and modulates mitochondrial heme content and metabolism. *The FASEB Journal*. Vol. 20, Pág. 482-492.
- Cruse, I., & Maines, M. D. (1988). Evidence Suggesting That the Two Forms of Heme Oxygenase Are Products of Different Genes. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 263, pág. 3348-3353.
- Donzeau, M., Kaldi, K., Adam, A., Paschen, S., Wanner, G., Guiard, B., . . . Brunner, M. (2000). Tim23 links the inner and outer mitochondrial membranes. *Cell*. Vol. 101(4), Pág. 401-412.
- Dunn, L. L., Midwinter, R. G., Ni, J., Hamid, H. A., Parish, C. R., & Stocker, R. (2014). New insights into intracellular locations and functions of heme oxygenase-1. *Antioxidants & Redox Signaling*. Vol. 20 (1), Pág. 1723-1742.
- Erdmann, K., Grosser, N., Schipporeit, K., & Schroder, H. (2006). The ACE inhibitory dipeptide Met-Tyr diminishes free radical formation in human endothelial cells via induction of heme oxygenase-1 and ferritin. *The Journal of Nutrition*. Vol. 136 (8), Pág. 2148-2152.
- Ewing, J. F., & Maines, M. D. (1997). Histochemical localization of heme oxygenase-2 protein and mRNA expression in rat brain. *Brain Research Protocols*. Vol. 1 (2), Pág. 165- 174.
- Frankenberg-Dinkel, N. (2004). Bacterial Heme OXygenase. *Antioxidants & Redox Signaling*. Vol. 6 (5), Pág. 825-834.
- Fukasawa, Y., Tsuji, J., Fu, S., Tommi, K., Hoton, P., & Iami, K. (2015). MitoFates: improved prediction of mitochondrial targeting sequences and their cleavage sites. *Molecular & cellular proteomics*. Vol. 14 (4), Pág. 1113-1126.
- Gietz, R. D., & Schiestl, R. H. (2007). Frozen competent yeast cells that can be transformed with high efficiency using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nature Protocols*. Vol. 2, Pág. 1-4.
- Giorgi, C., De Stefani, D., Bononi, A., Rizzuto, R., & Pinton, P. (2009). Structural and functional link between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. Vol. 41 (10), Pág. 1817-1827.
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., . . . Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 Genes. *Science*. Vol. 274, pág. 546-567.

- Gottlieb, Y., Truman, M., Cohen, L. A., Leichtmann-Bardoogo, Y., & Meyron-Holtz, E. G. (2012). Endoplasmic reticulum anchored heme-oxygenase 1 faces the cytosol. *Haematologica*. Vol. 97(10), Pág. 1489-1493.
- Hatefi, Y. (1985). The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annual review of biochemistry*. Vol 54 (1), Pág. 1015-1069.
- Hayashi, S., Omata, Y., Sakamoto, H., Higashimoto, Y., Hara, T., Sagara, Y., & Noguchi, M. (2004). Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene*. Vol 336, pág. 241-250.
- Heijne, G. V. (1990). Protein targeting signals. *Current Opinion in Cell Biology*. Vol. 2 (4), Pág. 604-608.
- Herrmann, J. M., Fölsch, H., Neupert, W., & Stuart, R. A. (1994). Isolation of yeast mitochondria and study of mitochondrial protein translation. *Cell Biology: a laboratory handbook*. Vol. 1, Pág. 538-544.
- Hori, R., Kashiba, M., Toma, T., Yachie, A., Goda, N., Makino, N., . . . Suematsu, M. (2002). Gene transfection of H25A mutant heme oxygenase-1 protects cells against hydroperoxide-induced cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 277 (12), Pág. 10712-10718.
- Hovland, P., Flick, J., Johnston, M., & Sclafani, R. A. (1989). Galactose as a gratuitous inducer of GAL gene expression in yeasts growing on glucose. *GENE*. Vol. 83, Pág. 57-64.
- Kapturczak, M. H., Wassefall, C., Brusko, T., Campbell-Thompson, M., Ellis, T. M., Atkinson, M. A., & Agarwal, A. (2004). Heme oxygenase-1 modulates early inflammatory responses: evidence from the heme oxygenase-1-deficient mouse. *The American Journal of Pathology*. Vol. 165 (3), Pág. 1045-1053.
- Karathia, H., Vilaprinyo, E., Sorribas, A., & Alves, R. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* as a Model Organism: A Comparative Study. *Plos One*. Vol. 6, 10 pág.
- Kemp, P. J. (2005). Hemeoxygenase-2 as an O₂ sensor in K⁺ channel-dependent chemotransduction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 338, Pág. 648-652.
- Kikuchi, G., Yoshida, T., & Noguchi, M. (2005). Heme oxygenase and heme degradation. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. Vol. 338., pág. 558-567.
- Koller, A., Velasco, J., & Subramani, S. (2000). The CUP1 promoter of *Saccharomyces cerevisiae* is inducible by cooper in *Pichia pastoris*. *Yeast*. Vol. 16 (7), Pág. 651-656.

- Kumar, S., & Bandyopadhyay, U. (2005). Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicology Letters*. Vol. 157, Pág. 175-188.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* Vol. 227 (5259), Pág. 680-685.
- Lee, P. J., Jiang, B.-H., Chin, B. y., Iyer, N. V., Alam, J., Semenza, G. L., & Choi, A. M. (1997). Hypoxia-inducible Factor-1 Mediates Transcriptional Activation of the Heme Oxygenase-1 Gene in Response to Hypoxia . *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 272, pág. 5375-5381.
- Li, C., & Strocker, R. (2009). Heme oxygenase and iron: from bacteria to humans. *Redox Report*. Vol. 14, Pág. 95-101.
- Lin, Q., Weis, S., Yang, G., Weng, Y.-H., Helston, R., Rish, K., . . . Dennerly, P. (2007). Heme Oxygenase-1 Protein Localizes to the Nucleus and Activates Transcription Factors Important in Oxidative Stress. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 282, Pág. 20621- 20633.
- Linnenbaum, M., Busker, M., Kraehling, J. R., & Behrends, S. (2012). Heme Oxygenase Isoforms Differ in Their Subcellular Trafficking during Hypoxia and Are Differentially Modulated by Cytochrome P450 Reductase. *PLoS One*. Vol. 7 (4), Pág. e35483.
- Lynes, E. M., Bui, M., Yap, M. C., Benson, M. D., Schneider, B., Ellgaard, L., . . . Simmen, T. (2012). Palmitoylated TMX and calnexin target to the mitochondria-associated membrane. *The EMBO journal*. Vol. 31 (2), Pág. 457-470.
- Maines, M. D., Trakshel, M., & Kutty, R. K. (1986). Characterization of Two Constitutive Forms of Rat Liver Microsomal Heme Oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible*. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol 261, Pág. 411-419.
- Martin, W. F., Garg, S., & Zimorski, V. (2015). Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. Vol. 370 (1678), Pág. 20140330.
- Mascorro-Gallardo, J., Covarrubias, A., & Gaxiola, R. (1996). Construction of a CUP1 promoter-based vector to modulate gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. Vol. 172 (1), Pág. 169-170.
- Maya, D., Quintero, M. J., Muñoz-Centeno, M. d., & Chávez, S. (2008). Systems for applied gene control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology letters*. Vol. 30(6), Pág. 979-987.
- McCoubrey, J. W., Huang, T. J., & Maines, M. D. (1997). Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *European Journal of Biochemistry*. Vol. 247, Pág. 725-732.

- McCoubrey, W. J., & Maines, M. D. (1994). The structure, organization and differential expression of the gene encoding rat heme oxygenase-2. *Gene*. Vol. 139, Pág. 155-161.
- McDonagh, A. (2001). Turning green to gold. *Nature Structural Biology*. Vol. 8, Pág. 198-200.
- McDonagh, A. F. (2010). The biliverdin-bilirubin antioxidant cycle of cellular protection: Missing a wheel? *Free Radical Biology & Medicine*. Vol. 49, Pág. 814-820.
- Meinecke, M., Wagner, R., Kovermann, P., Guiard, B., Mick, D. U., Hutu, D. P., . . . Rehling, P. (2006). Tim50 Maintains the Permeability Barrier of the Mitochondrial Inner Membrane. *Science*. Vol. 312 (5779), Pág. 1523-1526.
- Mokranjac, D., & Neupert, W. (2010). The many faces of the mitochondrial TIM23 complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. Vol. 1797(6-7), Pág. 1045-1054.
- Morita, T., Perrella, M. A., Lee, M.-E., & Kourembanas, S. (1995). Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 92 (5), Pág. 1475-1479.
- Muller, R. M., Tagushi, H., & Shibahara, S. (1987). Nucleotide sequence and organization of the rat heme oxygenase gene. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 262 (14), Pág. 6795-6802.
- Muñoz Sánchez, J. (2015). Caracterización de la respuesta del sistema hemoxigenasa en un modelo de hipoxia química inducida por CoCl₂. *Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. Tesis de Maestría. CDMX*, Pág. 90.
- Muñoz-Sanchez, J., & Chánez-Cárdenas, M. E. (2014). A Review on Hemeoxygenase-2: Focus on Cellular Protection and Oxygen Response. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Vol. 2014, 16 pág.
- Murphy, B., Laderoute, K., Short, S., & Sutherland, R. (1991). The identification of heme oxygenase as a major hypoxic stress protein in chinese hamster ovary cells. *British Journal of Cancer*. Vol. 64, Pág. 69-73.
- Nagababu, E., & Rifkind, J. (2004). Heme Degradation by Reactive Oxygen Species. *Antioxidants & Redox Signaling*. Vol. 6, Pág. 967-978.
- Neupert, W., & Herrmann, J. M. (2007). Translocation of Proteins into Mitochondria. *Annual Review of Biochemistry*. Vol. 76, Pág. 723- 749.
- Ortiz De Montellano, P. R., & Wilks, A. (2000). Heme Oxygenase Structure and Mechanism. *Advances in Inorganic Chemistry*. Vol 51, Pág. 359-407.

- Otterbein, L. E., Bach, F. H., Alam, J., Soares, M., Lu, H. T., Wysk, M., . . . Choi, A. M. (2000). Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nature Medicine*. Vol 6 (4), Pág. 422-428.
- Paschen, S. A., Neupert, W., & Rapaport, D. (2005). Biogenesis of b-barrel membrane proteins of mitochondria. *Trends in Biochemical Sciences*. Vol. 30 (10), Pág. 575-582.
- Ponce-Rojas, J. C., Avendaño-Monsalve, M. C., Yañez-Falcón, A. R., Jaimes-Miranda, F., Gary, E., Torres-Quiroz, F., . . . Funes, S. (2017). $\alpha\beta'$ -NAC cooperates with Sam37 to mediate early stages of mitochondrial protein import. *The FEBS journal*. Vol. 284 (5), Pág. 814-830.
- Popov-Čeleketić, D., Mapa, K., Neupert, W., & Mokranjac, D. (2008). Active remodelling of the TIM23 complex during translocation of preproteins into mitochondria. *The EMBO journal*. Vol. 27 (10), Pág. 1469-14800.
- Rehling, P., Brandner, K., & Pfanner, N. (2004). Mitochondrial Import and The Twin-Pore Translocase. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Vol. 5 (7), Pág. 519-530.
- Rotenberg, M. O., & Maines, M. (1991). Characterization of a cDNA-encoding rabbit brain heme oxygenase-2 and identification of a conserved domain among mammalian heme oxygenase isozymes: possible heme-binding site? *Archives of biochemistry and biophysics*. Vol. 290 (2), Pág. 336-344.
- Ryter, S. W., Kvan, E., & Tyrrell, R. M. (2000). Heme oxygenase activity current methods and applications. *Stress response*. Vol. 99, Pág. 369-391.
- Ryter, S., & Tyrrell, R. (2000). The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity: heme oxygenase has both pro and antioxidant. *Free Radical Biology and Medicine*. Vol. 28 (2), Pág. 289-309.
- Schaefer, B., Moriishi, K., & Behrends, S. (2017). Insights into the mechanism of isoenzyme-specific signal peptide peptidase-mediated translocation of heme oxygenase. *PloS one*. Vol. 12, 20 pág.
- Schmidt, O., Pfanner, N., & Meisinger, C. (2010). Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nature reviews Molecular cell biology*. Vol. 11, Pág. 655-667.
- Schulz, C., Schendzielorz, A., & Rehling, P. (2015). Unlocking the presequence import pathway. *Trends in Cell Biology*. Vol. 5 (5), Pág. 265-275.
- Sedlak, T. W., & Snyder, S. (2004). Bilirubin Benefits: cellular protection by a biliverdin reductase antioxidant cycle. *Pediatrics*. Vol. 13, Pág. 1776-1782.

- Sikorski, R. S., & Hieter, P. (1989). A System of Shuttle Vectors and Yeast Host Strains Designed for Efficient Manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Genetics Society of America*. Vol. 122, Pág. 19-27.
- Sikorski, R. S., & Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. Vol. 122 (1), Pág. 19-27.
- Slebos, D.-J., Ryter, S. W., van der Toorn, M., Liu, F., Guo, F., Baty, C. J., . . . Choi, A. M. (2007). Mitochondrial localization and function of heme oxygenase-1 in cigarette smoke-induced cell death. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. Vol. 36 (4), Pág. 409-417.
- Sokol, A. M., Sztolsztener, M. E., Wasilewski, M., Heinz, E., & Chacinska, A. (2014). Mitochondrial protein translocases for survival and wellbeing. *FEBS Letters*. Vol. 588, Pág. 2484-2495.
- Stojanovski, D., Müller, J. M., Milenkovic, D., Guiard, B., Pfanner, N., & Chacinska, A. (2008). The MIA system for protein import into the mitochondrial intermembrane space. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. Vol. 1783 (4), Pág. 610-617.
- Tenhunen, R., Marver, H. S., & Schmid, R. (1968). The Enzymatic Conversion of Heme to Bilirubin by Microsomal Heme Oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 61, Pág. 748- 755.
- Tenhunen, R., Marver, H. S., & Schmid, R. (1969). Microsomal Heme Oxygenase. Characterization of the Enzyme*. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 244, Pág. 6388-6394.
- Trakshel, G. M., Kutty, R. K., & Maines, M. D. (1986). Purification and Characterization of the Major Constitutive Form of Testicular Heme Oxygenase. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 261, Pág. 11131-11137.
- Unno, M., Matsui, T., & Ikeda-Saito, M. (2006). Structure and catalytic mechanism of heme oxygenase. *Natural product reports*. Vol. 24 (3), Pág. 553-570.
- Van der Laan, M., Hutu, D. P., & Rehling, P. (2010). On the mechanism of preprotein import by the mitochondrial presequence translocase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Molecular Cell Research*. Vol. 1803 (6), Pág. 732-739.
- Waltz, P. K., Kautza, B., Luciano, J., Dyer, M., Stolz, D. B., Loughran, P., . . . Zuckerbraun, B. S. (2018). Heme Oxygenase-2 Localizes to Mitochondria and Regulates Hypoxic Responses in Hepatocytes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Vol. 2018.
- Wiedemann, N., & Pfanner, N. (2017). Mitochondrial machineries for protein import and assembly. *Annual review of biochemistry*. Vol. 86, Pág. 685-714.

- Wilks, A. (2002). Heme Oxygenase: Evolution, Structure, and Mechanism. *Antioxidants & Redox Signaling*. Vol. 4., Pág. 603-614.
- Winzler, E. A., Showmaker, D. D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., . . . Whelen, S. (1999). Functional Characterization of the *S. cerevisiae* Genome by Gene Deletion and Parallel Analysis. *Science*. Vol. 285 , Pág. 901-906.
- Yañez Falcón, R. (2014). Estudio del papel de NAC y Sam37 en la importación co-traduccional de la proteína mitocondrial Mmf1 en *Saccharomyces cerevisiae*. *Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. Tesis de Maestría. CDMX*.
- Yoshida, T., & Kikuchi, G. (1979). Purification and Properties of Heme Oxygenase from Rat Liver Microsomes. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 254, Pág. 4487-4491.
- Yoshida, T., & Sato, M. (1989). Posttranslational and direct integration of heme oxygenase into microsomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 163 (2), Pág. 1086-1092.
- Yoshida, T., Takahashi, S., & Goro, K. (1974). Partial Purification and Reconstitution of the Heme Oxygenase System from Pig Spleen Microsomes. *The Journal of Biochemistry*. Vol. 75, Pág. 1187-1191.
- Yosida, T., Ishikawa, K., & Sato, M. (1991). Degradation of heme by a soluble peptide of heme oxygenase obtained from rat liver microsomes by mild trypsinization. *European Journal of Biochemistry*. Vol. 199, Pág. 729-733.
- Zhang, Z., & Ren, Q. (2015). Why are essential genes essential? -The essentiality of *Saccharomyces* genes. *Microbial cell*. Vol. 2 (8), Pág. 280.

APÉNDICE

A. Oligonucleótidos usados en la clonación de los genes hemoxigenasa

Nombre	Secuencia (5' a 3')	Tm
HO1F (Xbal)	ccctctagaATGGAGCGCCACAGCTCGAC	59.1
HO1R (BamHI)	aaaggatccTTACATGGCATAAATTCCCACCGTCAC	58.4
HO2F (Xbal)	ccctctagaATGTCTTCAGAGGTGGAGACCTC	57.4
HO2R (BamHI)	aaaggatccTCACATGTAGTACCAGGCCAAGAG	57.7
HO1_SmaI_F	aatcccgggATGGAGCGCCACAGCTCGAC	86.2
HO1_NotI_R	aatgcgccgcTTACATGGCATAAATTCCCCTGCCCAC	85.5
HO2_SmaI_F	aatcccgggATGTCTTCAGAGGTGGAGACCTCG	81.7
HO2_NotI_R	aatgcgccgcTCACATGTAGTACCAGGCCAAGAGTC	83.9
MMF1terR-XhoI	gcgctcgagCAAAGTTGTGACGAAAAC	75.9

B. Soluciones y amortiguadores

i. Amortiguador de extracción

185 μ L de NaOH 10 N, 74 μ L de β -mercaptoetanol, 100 μ L de PMSF 200 mM y 641 μ L de H₂O.

ii. Soluciones para fraccionamiento celular

- **Amortiguador Tris-DTT:** Tris 100 mM (no pH), DTT 10 mM.
- **Amortiguador Zimoliasa:** Sorbitol 1.2 M, KH₂PO₄ 20 mM (pH 7.4), Zimoliasa 3-5 mg por g de peso húmedo.
- **Homogeneización:** Sorbitol 0.6 M, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, BSA 0.2 %, PMSF 1 mM.
- **SH:** Sorbitol 0.6 M, Hepes 20 mM (pH 7.4).

iii. Soluciones para análisis de proteínas por WB

- **Amortiguador Tris-Glicina:** Glicina 385 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8.4, SDS 0,1%.
- **Amortiguador Tris-Glicina-Metanol:** Glicina 385 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8.4, SDS 0,1%, Metanol 20%.
- **TBS:** NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.5.
- **TBS-T:** NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.5, Tween 20 0.1%.
- **Solución de bloqueo:** Leche en polvo descremada 5%, TBS.
- **Laemmli 2X (LAE 2X):** Tris-HCl 60 mM pH 6.8, glicerol 10%, SDS 2%.

iv. Soluciones para geles de ácidos nucleicos

- **TAE 50X:** Tris 242 g/L, ácido acético glacial 57.1 mL/L, 100 mL de EDTA 0.5 M pH=8.
- **Amortiguador de carga 6X:** Azul de bromofenol al 0.25%, xileno cianol al 0.25%, glicerol al 30%.

C. Plásmidos empleados

Plásmido	Característica	Resistencia en <i>E. Coli</i>	Selección en levadura	Referencia
pGEM-T Easy Vector	Vector linealizado	Ampicilina		<i>Promega</i>
pGEM-HO1	Vector intermediario en la clonación de la HO-1	Ampicilina		Este trabajo
pGEM-HO2	Vector intermediario en la clonación de la HO-1	Ampicilina		Este trabajo
pGAL1	Control negativo (no	Ampicilina	Uracilo	Yañez Falcón,

	contiene ningún gen)			2014
pGAL1-HO1	Expresión de la proteína HO-1 bajo el promotor inducible por galactosa	Ampicilina	Uracilo	Este trabajo
pGAL1-HO2	Expresión de la proteína HO-2 bajo el promotor inducible por galactosa	Ampicilina	Uracilo	Este trabajo
pRS316-	Control negativo (no contiene ningún gen)	Ampicilina	Uracilo	Sikorski & Hieter, 1989
pCUP1-		Ampicilina	Uracilo	Este trabajo
pCUP1-HO1	Expresión de la proteína HO-1 bajo el promotor inducible por cobre	Ampicilina	Uracilo	Este trabajo
pCUP1-HO2	Expresión de la proteína HO-2 bajo el promotor inducible por cobre	Ampicilina	Uracilo	Este trabajo
* pGAL1= pRS316-PGAL1-MMF1TER pGAL1-HOs= pRS316-PGAL1-HOs- MMF1TER pCUP1= pRS316-PCUP1 pCUP1-HOs= pRS316-PCUP1-HOs- MMF1TER				

D. Oligonucleótidos usados en la clonación del promotor del gen CUP1

Nombre	Secuencia (5' a 3')	Tm
CUP1_F_Sacl	aatgagctcTCCATTACCGACATTTGGGC	77.0
CUP1_R_Xmal	taaccgggTACAGTTTGTTCCTTAATATCTATTTTCG	72.1

E. Medios de cultivo

Tipo de medio	Ingredientes
YPD	Extracto de levadura 1%, bactopectona 2%, glucosa 2%.
YPGal	Extracto de levadura 1%, bactopectona 2%, galactosa 2%.
LB	Extracto de levadura 0.5%, bactopectona 1%, NaCl 1%.
LB+ampicilina	Extracto de levadura 0.5%, bactopectona 1%, NaCl 1%, ampicilina 0.1%.
SRaf-Ura (1L)	1.7 g de base nitrogenada sin aminoácidos, 5 g de sulfato de magnesio, adenina 20 mg, triptófano 100 mg, histidina 100 mg, leucina 100 mg, lisina 100 mg, metionina 100 mg, rafinosa 2%.
SGal-Ura (1L)	1.7 g de base nitrogenada sin aminoácidos, 1 g de ácido glutámico, 2 g de suplemento (dropout -Ura), galactosa 2%.
SD-Ura (1L)	1.7 g de base nitrogenada sin aminoácidos, 1 g de ácido glutámico, 2 g de suplemento (dropout -Ura), glucosa 2%.
Suplemento (completo)	3 g L-adenina, 2 g uracilo, 2 g inositol, 0.2 g ácido p-aminobenzoico, 2 g L-alanina, 2 g L-asparagina, 2 g L-ácido aspártico, 2 g L-cisteína, 2 g L-ácido glutámico, 2 g L-glutamina, 2 g L-glicina, 2 g L-histidina, 2 g L-isoleucina, 10 g L-leucina, 2 g L-lisina, 2 g L- metionina, 2 g L-fenilalanina, 2 g L-prolina, 2 g L-serina, 2 g L-treonina, 2 g L-triptófano, 2 g L-tirosina y 2 g valina.

Para medios sólidos se añadió agar al 2%

F. Cepas de levaduras utilizadas

Cepa	Fondo	Genotipo	Referencia
BY4741		MATa, his3 Δ 1, lue2 Δ 0, met15 Δ 0, ura3 Δ 0	Winzeler y col., 1999
YPH499		MATa, ura3-52, Lys2-801amber, ade2-101ochre, trp1- Δ 63, his3- Δ 200, leu2- Δ 1	Sikorski & Hieter, 1989
<i>GAL10-TIM23</i>	YPH499	MATa, ura3-52, Lys2-801amber, ade2-101ochre, trp1- Δ 63, his3- Δ 200, leu2- Δ 1, HIS3::TIM23-GAL10	Donzeau y col., 2000

G. Cepas de bacterias utilizadas

Escherichia coli DH5 α

F- Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZY A-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rk-, mK+) *phoA supE44 λ -thi-1 gyrA96 relA1*

H. Recetas para geles de acrilamida al 17.5% (1 gel 1 mm espesor)

Stock	Gel separador	Gel concentrador
Acrilamida 30% Bisacrilamida 0.2%	3.1 mL	320 μ L
Tris 1.875 M pH 8.8	1.16 mL	---
Tris 0.6 M pH 6.8	---	200 μ L
Agua	1.16 mL	1.44 mL
SDS 10%	55,66 μ L	20 μ L
AMPS 10%	33,3 μ L	10 μ L
TEMED	3,3 μ L	2 μ L