



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## FACULTAD DE CIENCIAS

Desarrollo de un sistema de traducción *in vitro* a partir de mitocondrias aisladas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

### TESIS

PRESENTA:

Yeniffer Ayala Abraham

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
BIÓLOGA

Tutor

Dr. Greco Hernández Ramírez  
Instituto Nacional de cancerología

Ciudad Universitaria, CD.MX. abril de 2021



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.



## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis se llevó a cabo bajo la dirección del Dr. Greco Hernández Ramírez en su laboratorio de “Traducción y Cáncer”, en la Subdivisión de Investigación Básica del Instituto Nacional de Cancerología.

Parte de esta tesis se realizó bajo la asesoría y colaboración de la Dra. Xochitl Pérez Martínez, en su laboratorio en el Departamento de Genética Molecular, del Instituto de Fisiología Celular (UNAM).

Se extiende un especial agradecimiento al Dr. Aldo E. García Guerrero y la Dra. Yolanda Camacho Villasana, miembros del laboratorio de la Dra. Xochitl Pérez, por su valiosa asesoría y apoyo durante el desarrollo del proyecto.

También se agradece a la M. en C. Alejandra García Hernández, miembro del laboratorio de “Traducción y Cáncer”, por su asesoría, recomendaciones y apoyo durante el proyecto.

Se agradece a la Dra. Angélica Raquel Zamudio Ochoa, por sentar las bases y realizar los experimentos preliminares de este proyecto.

Este trabajo fue apoyado por la Beca de Titulación Egresados Extemporáneos 2019-2020 otorgada por la Facultad de Ciencias.

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia por su apoyo y amor incondicional.

A mi madre y mis hermanos, por ser un gran ejemplo de valentía, dedicación y trabajo.

Gracias por apoyarme incondicionalmente en cada paso que doy hacia mis sueños.

## ÍNDICE

ABREVIARUTAS .....	1
ÍNDICE DE FIGURAS .....	3
ÍNDICE DE TABLAS .....	4
RESUMEN .....	5
INTRODUCCIÓN .....	6
1. Mitocondria.....	6
2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudio .....	7
3. Genoma mitocondrial en <i>S. cerevisiae</i> .....	7
4. Cadena transportadora de electrones de <i>S. cerevisiae</i> .....	8
4.1 Características de la subunidad II de la citocromo c oxidasa (Cox2) .....	10
5. Síntesis de proteínas mitocondriales en <i>S.cerevisiae</i> .....	11
5.1 Regulación de la síntesis de proteínas mitocondriales.....	12
5.2 Regulación de la síntesis de Cox2 .....	14
6 Antecedentes de sistemas de traducción mitocondrial <i>in vitro</i> .....	14
JUSTIFICACIÓN .....	19
OBJETIVO GENERAL .....	19
OBJETIVOS PARTICULARES .....	19
HIPÓTESIS .....	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
RESULTADOS.....	33
DISCUSIÓN.....	50
CONCLUSIONES.....	52
PERSPECTIVAS.....	52
ANEXO .....	53
BIBLIOGRAFÍA .....	60

## **ABREVIATURAS**

Términos

**ATP** Trifosfato de adenosina/ *Adenosine triphosphate*

**ADP** Adenosín difosfato/ *Adenosine diphosphate*

**AUG** Codón iniciador, codifica para el aminoácido metionina

**CHX** Cicloheximida

**CCCP** Carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona/ Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazine

**CcO** Citocromo c oxidasa

**CAP** cloranfenicol

**Cyt b** Citocromo b

**DEPC** Dietil pirocarbonato/ Diethylpyrocarbonate

**DNA** Ácido desoxirribonucleico/ Deoxyribonucleic acid

**DTT** Dithiothreitol

**FAD** Flavín adenín dinucleótido en su forma oxidada

**FADH<sub>2</sub>** Flavín adenín dinucleótido en su forma reducida

**GTP** Guanosina difosfato/ *Guanosine diphosphate*

**IF** Factor de iniciación

**mIF** Factor de iniciación mitocondrial

**MIM** Membrana interna mitocondrial

**MEM** Membrana externa mitocondrial

**Met-tRNA<sup>i</sup><sub>met</sub>** RNA de transferencia inicial

**mtDNA** Ácido desoxirribonucleico mitocondrial

**mRNA** RNA mensajero

**NAD** Dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma oxidada

**NADH** Dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma reducida

**PPR** *pentatricopeptide repeat*

**RNA** Ácido ribonucleico/ *Ribonucleic acid*

**rRNA** RNA ribosomal

**tRNA** RNA de transferencia

**T7** Promotor de la RNA polimerasa del bacteriófago T7

**UTR** Región no traducida del mRNA/ *Untranslated región*

**5'-UTR** Región no traducida del mRNA del extremo 5'

**3'-UTR** Región no traducida del mRNA del extremo 3'

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Trabajos reportados de sistemas de traducción mitocondrial <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> heterólogos en diferentes modelos de estudio.	17
Figura 2. Autorradiografía de ensayo de traducción <i>in organello</i> con CCCP y oligomicina.	36
Figura 3. Extracción de tRNAs mitocondriales.	37
Figura 4. Diseño del gen reportero.	38
Figura 5. Ensayo de traducción <i>in vitro</i> con tres métodos de lisis de dos experimentos independientes.	40
Figura 6. Ensayo de traducción con cicloheximida (CHX) y puromicina.	41
Figura 7. Mapa de los genes reporteros.	45
Figura 8. Extracción de la fracción mitocondrial con la metodología modificada de Pfisterer & Butow (1981).	48
Figura 9. Transcripción <i>in vitro</i> de los genes reporteros.	49

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Activadores traduccionales.	13
Tabla 2. Preparación de geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) para evaluar el ensayo de traducción <i>in organello</i> .	25
Tabla 3. Preparación de geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) para evaluar la fracción mitocondrial cruda.	25
Tabla 4. Reactivos y concentraciones utilizadas los ensayos de traducción mitocondrial <i>in vitro</i> .	31
Figura 5. Sistemas de traducción mitocondrial <i>in vitro</i> heterólogos publicados.	43
Figura 6. Resumen de las condiciones propuestas en esta tesis para el establecimiento de un sistema de traducción mitocondrial <i>in vitro</i> en <i>S. cerevisiae</i> .	47

## RESUMEN

La mitocondria es un organelo de vital importancia en casi todos los organismos eucariontes, ya que realiza varias funciones de crucial importancia en la célula. Consta de dos membranas, posee su propio genoma y sus propias maquinarias transcripcional y traduccional. La traducción se localiza en la membrana interna mitocondrial, y consta de 4 etapas: inicio, elongación, terminación y reciclaje de ribosomas. Durante el inicio de la traducción se lleva a cabo el reconocimiento codón de inicio (AUG o AUA) por medio de activadores traduccionales, que interactúan con la subunidad pequeña ribosomal y con el extremo 5'-UTR del mRNA.

Además de los activadores traduccionales, los siguientes factores traduccionales orquestan la síntesis de proteínas mitocondriales: el factor del inicio de la traducción mitocondrial 2 (mIF2); una GTPasa encargada de la selección del tRNA iniciador (Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>), así como de la unión de las subunidades ribosomales; Aim23p, ortólogo del factor del inicio de la traducción 3 (IF3), es el encargado de la selección de los tRNAs y mRNAs y de posicionar el codón de inicio en el sitio P del ribosoma, al mismo tiempo que previene la asociación prematura con la subunidad mayor del ribosoma. En la elongación participan los factores EF-Tu y Mef1. EF-Tu es una GTPasa encargada de hidrolizar una molécula de GTP, al mismo tiempo que un tRNA aminoacilado es posicionado en el sitio A del ribosoma. Mef1 es un homólogo del factor EF-G y cataliza la translocación del peptidil-tRNA del sitio A al sitio P del ribosoma. Por último, durante la terminación el reconocimiento del codón de paro se lleva a cabo por el factor Mrf1 y durante reciclaje de ribosomas participan los factores RrF1, Mef2 y Aim23p.

Durante los últimos 50 años, mediante bioquímica y manipulación genética, muchas proteínas y algunos factores traduccionales han sido identificados y estudiados. Sin embargo, su mecanismo de acción es poco conocido en la síntesis de proteínas mitocondriales, debido a la falta de un sistema de traducción mitocondrial *in vitro*. En esta tesis se probó que la traducción mitocondrial no depende del gradiente de protones, un dato importante porque nos indica que la traducción mitocondrial no depende de una membrana interna mitocondrial íntegra y, por lo tanto el desarrollo de un sistema de traducción *in vitro* es viable. También se desarrolló un protocolo para la obtención de un lisado mitocondrial traduccionalmente activo *in vitro*. Este protocolo es aún poco eficiente, pero sienta los fundamentos para el desarrollo de un sistema más eficiente en el futuro.

## INTRODUCCIÓN

### 1. Mitocondria

La mitocondria es un organelo de vital importancia en casi todos los organismos eucariontes ya que es el organelo que genera la mayor cantidad de ATP en la célula. La mitocondria tiene un origen endosimbionte a partir de una  $\alpha$ -proteobacteria y una arquea relacionada con el superphylum Asgard (Gray, 2012; Roger *et al.*, 2017).

Actualmente la mitocondria aún presenta varias características bacterianas, por ejemplo, está constituida de dos membranas, posee su propio genoma, así como, su propia maquinaria transcripcional y traduccional (Gray, 2012). La membrana externa (MEM) es permeable a pequeñas moléculas ( $M_r < 5,000$ ) e iones que pueden atravesar la membrana libremente con ayuda de proteínas intermembranales llamadas porinas. La membrana interna (MIM) es impermeable a moléculas e iones incluyendo protones ( $H^+$ ) (Nelson & Cox, 2015).

La MIM contiene a los complejos enzimáticos que conforman la cadena respiratoria, así como a la ATP sintasa. Delimita a la matriz mitocondrial que contiene enzimas esenciales para el metabolismo celular, DNA mitocondrial, mitorribosomas, ATP, ADP, fosfato inorgánico ( $P_i$ ),  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$  e intermediarios metabólicos solubles (Nelson & Cox, 2015).

El proteoma mitocondrial consta de más de 1,000 proteínas que llevan a cabo gran variedad de funciones bioenergéticas, biosintéticas y señalización celular (Chandel, 2015; Zong *et al.*, 2016). Entre estas funciones, podemos destacar la producción de ATP a través de la fosforilación oxidativa que, en resumen, consiste en la transferencia de electrones alta energía por NADH y  $FADH_2$  a la cadena transportadora de electrones, constituida por una serie de complejos respiratorios que a su vez, bombean protones ( $H^+$ ) generando un gradiente. Dicho gradiente es utilizado por la ATP sintasa para formar ATP (Tortora *et al.*, 2007).

Aunque la fosforilación oxidativa es la función por la cual la mitocondria es mayormente reconocida, en ella también se llevan a cabo otras funciones de gran importancia para la célula, como la apoptosis, la formación de grupos Hierro-azufre, quinona, la producción de precursores de macromoléculas como lípidos, proteínas, nucleótidos y el catabolismo de los ácidos grasos. Además de la producción de ROS (especies reactivas de oxígeno) y de acetil-coA implicados en la en la señalización celular mediante la acetilación y la oxidación de proteínas, que a su vez activan vías de señalización como AMPK, involucrada en la adaptación al estrés celular,

proliferación y diferenciación (Derbikova *et al.*, 2018; Zong *et al.*, 2016; Chandel, 2015).

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

*Saccharomyces cerevisiae* es un hongo unicelular que posee una pared celular (Alberts & Bray, 2006). Se encuentra principalmente en ambientes acuáticos, aire, suelo, en animales, en la superficie de plantas y en las frutas (Desiderio, 2018; Belda *et al.*, 2019). Por más de 10,000 años esta levadura ha sido aprovechada por el ser humano en su vida cotidiana para la elaboración de pan y bebidas alcohólicas como la sidra, la cerveza y el vino (Liti, 2015). Hoy en día, la elaboración de estos productos se realiza a nivel industrial, volviéndose de suma importancia en el área biotecnológica, tanto que actualmente hay muchas cepas disponibles comercialmente utilizadas para distintos fines como la farmacéutica y la producción de biocombustibles (Burgess & Powers, 2017; Belda *et al.*, 2019).

Por otro lado, desde los últimos 50 años esta levadura ha sido ampliamente utilizada como modelo experimental eucarionte en varios campos de la investigación científica como la genética, la fisiología y la bioquímica. Estudios realizados en este modelo han permitido dilucidar diferentes mecanismos celulares, como replicación, recombinación y reparación del DNA, transcripción, traducción, el procesamiento de RNA, señalización celular, la dinámica del citoesqueleto y tráfico vesicular (Siggers & Lesser, 2008; Foury & Kucej, 2002; García, 2018). También posee enzimas involucradas en el metabolismo celular y de la biogénesis mitocondrial (Foury & Kucej, 2002; García, 2018).

*S. cerevisiae* se ha convertido en uno de los organismos más explorados experimentalmente ya que presenta diferentes ventajas como un ciclo de vida corto y es capaz de crecer en diferentes condiciones; posee un genoma pequeño que permite su fácil manipulación genética nuclear y mitocondrial; y es un organismo anaerobio facultativo, lo que favorece su estudio a nivel genético y bioquímico a partir de mutantes mitocondriales sin afectar la viabilidad celular (Alberts & Bray, 2006; García, 2018).

## **3. Genoma mitocondrial en *S. cerevisiae***

El genoma mitocondrial de *S. cerevisiae* fue secuenciado completamente en 1996 (Belda *et al.*, 2019). Consiste en una molécula de DNA circular de aproximadamente 85.5Kb (Derbikova *et al.*, 2018; Belda *et al.*, 2019), capaz de transcribirse, traducirse y ensamblar sus propias proteínas (Chatterje *et al.*, 2006). Codifica dos RNAs

ribosomales (21S y 15S), 24 RNAs de transferencia (tRNA), un RNA 9S (componente de una RNasa P) y 7 mRNAs (Ott *et al.*, 2016).

Las proteínas que se codifican en el genoma mitocondrial son 8 y pertenecen a subunidades de la cadena transportadora de electrones, excepto Var1p, una proteína estructural de la subunidad pequeña del mitorribosoma (Derbikova *et al.*, 2018). Del complejo III, se codifican el apocitocromo *b* (Cob1p); del complejo IV las subunidades Cox1p, Cox2p y Cox3p y del complejo V las subunidades Atp6p, Atp8p y Atp9p. Cabe destacar que únicamente siete mRNAs son traducidos, ya que las subunidades Atp6p y Atp8p se traducen a partir de un templado bicistronico (Derbikova *et al.*, 2018).

Los genes mitocondriales de *S. cerevisiae* poseen numerosos intrones y están separados por largas secuencias intergénicas ricas en adeninas y timinas. También contienen regiones ricas en guaninas y citosinas llamadas *GC clusters*, que representan un 30% del genoma mitocondrial y se asocian con la estabilidad del mtDNA. Estos *clusters* generalmente se encuentran en regiones no codificantes, aunque también se les encuentran en genes ribosomales y en *rps3/VAR1* (Wolters *et al.*, 2015).

#### **4. Cadena transportadora de electrones de *S. cerevisiae*.**

La cadena transportadora de electrones consiste en una serie de complejos proteicos intermembranales encargados de la transferencia de electrones. Además realiza la translocación de protones al espacio intermembranal para generar un gradiente de protones, utilizado para la síntesis de ATP. A diferencia de la cadena transportadora de electrones en mamíferos, *S. cerevisiae* carece del complejo I o NADH deshidrogenasa y en su lugar posee tres NADH deshidrogenasas tipo II: NDI1, NDE1 y NDE2. La primera está ubicada en la cara interna de la MIM, en contacto con la matriz mitocondrial y las dos últimas en la cara externa de la MIM, en contacto con el espacio intermembranal (Fang & Beattie, 2003).

Se sugiere que la deshidrogenasa interna se encarga de regular el equilibrio redox a nivel de NADH mitocondrial producto de ciclo de Krebs; Asimismo oxida NADH (producto de la oxidación del etanol). Por otra parte, las dos deshidrogenasas externas vuelven a oxidar el NADH producto de la glucólisis. Sin embargo, aún no se conoce con exactitud el papel de estas deshidrogenasas y su importancia en la célula (Fang & Beattie, 2003; Malina *et al.*, 2018). Los complejos que se conservan en la cadena transportadora de electrones de *S. cerevisiae* se mencionan a continuación:

##### **Complejo II, succinato: ubiquinona oxidoreductasa o succinato deshidrogenasa.**

Complejo formado por cuatro diferentes subunidades que tiene cinco grupos prostéticos (FAD<sup>+</sup> y tres centros Fe-S) (Nelson & Cox, 2015). Además, es la única

enzima del ciclo de Krebs asociada a la membrana interna mitocondrial. Esta enzima se encarga de la oxidación de succinato a fumarato, reduciendo  $\text{FAD}^+$  a  $\text{FADH}_2$ ; los electrones son transportados a través los centros Fe-S, hacia la ubiquinona, reduciéndola a ubiquinol ( $\text{QH}_2$ ) (Rutter *et al.*, 2010; García, 2018).

**Complejo III, Ubiquinona: citocromo c oxidoreductasa o complejo  $bc_1$ .** Este complejo está formado por 10 subunidades, de las cuales sólo el citocromo b (Cyt *b*) se encuentra codificado en el genoma mitocondrial. El centro catalítico está formado por el Cyt *b*, que alberga dos grupos hemo tipo *b* ( $b_L$  y  $b_H$ ) y el citocromo *c1* (Cyt *c1*) que alberga una grupo hemo tipo *c* (*c1*) y Rieske (Rip1) una proteína hierro-azufre (Cote *et al.*, 2015).

En el complejo III se lleva a cabo el ciclo Q, que consiste en la transferencia de dos electrones del  $\text{QH}_2$  (sustrato de bajo potencial) al citocromo (sustrato de alto potencial). Como resultado final, una molécula de  $\text{QH}_2$  es oxidada, dos moléculas de citocromo *c* son reducidas y cuatro protones son translocados al espacio intermembranal (Nelson & Cox, 2015).

**Complejo IV o citocromo oxidasa (CcO):** Es el último complejo de la cadena transportadora de electrones. Es un homo dímero formado por 12 subunidades, cinco grupos prostéticos: dos grupos hemo *a* (*a* y  $a_3$ ) y dos centro de cobre ( $\text{Cu}_A$  y  $\text{Cu}_B$ ) (García, 2018; Maréchal *et al.*, 2011). Este complejo se encarga del transporte de electrones del citocromo *c* al oxígeno molecular para formar  $\text{H}_2\text{O}$ , así como, de la translocación de dos protones al espacio intermembranal (Nelson & Cox, 2015).

**Complejo V o ATP sintasa:** Es el complejo enzimático que cataliza la formación de ATP a partir de ADP y Pi dirigido por el flujo de protones translocados por la cadena transportadora de electrones al espacio intermembranal. La ATP sintasa posee una masa molecular de 600 kDa y está formada por 13 subunidades organizadas en dos dominios principales (Velour & Arseli, 2000):

Dominio hidrofílico F<sub>1</sub>, está conformada a su vez por nueve subunidades y cinco diferentes tipos de proteínas con una composición  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ . El dominio catalítico está formado por tres dímeros  $\alpha\beta$ , sin embargo, solo las subunidades  $\beta$  tienen un sitio catalítico para la síntesis de ATP (Nelson & Cox, 2015).

El dominio hidrofóbico F<sub>0</sub>, es una proteína integral de membrana. Está compuesta por tres subunidades con una composición  $ab_2c_n$  donde *n* puede variar de 8-15 dependiendo del organismo. En levadura está formada por 10 subunidades, que forman un anillo de aproximadamente 55 Å de diámetro denominado "anillo c", que

rota como resultado del flujo de protones a través del complejo (Nelson & Cox, 2015). Esta rotación hace girar el tallo central (subunidades  $\gamma$  y  $\epsilon$ ) en movimientos sucesivos de  $120^\circ$ , provocando cambios conformacionales alternados y consecutivos en las subunidades catalíticas (subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ ); induciendo la unión de los sustratos (ADP y Pi), así como la síntesis y liberación de ATP (Sánchez & González, 2017; Velour & Arseli, 2000).

La ATP sintasa posee un mecanismo con un acoplamiento reversible, es decir, puede utilizar tanto el flujo de protones a favor del gradiente para generar ATP, como emplear la energía de la hidrólisis de ATP para bombear protones a través de la membrana. Esto depende de la magnitud del gradiente de protones presente en la membrana así como de su disponibilidad de en el medio (Alberts & Bray, 2006).

#### **4.1 Características de la subunidad II del citocromo c oxidasa (Cox2)**

Como se mencionó en el apartado anterior, el complejo CcO está compuesto por 12 subunidades en *S. cerevisiae*, de las cuales sólo la subunidad Cox2p junto con Cox1 y Cox3 se encuentran codificados en el genoma mitocondrial (Jones *et al.*, 2019). Estas tres subunidades en conjunto conforman el dominio catalítico de CcO, altamente conservado en eucariontes y procariontes (Herrmann & Funes, 2005).

Cox2 es una proteína altamente hidrofóbica, posee una masa molecular de 19,93 kDa, y está formada por dos dominios alfa hélice insertados en la membrana interna mitocondrial y un dominio globular (dominios N- terminal y C- terminal), ubicado en el espacio intermembranal. El dominio globular forma parte del sitio de acoplamiento para el citocromo c y contiene un centro metálico  $\text{Cu}_A$  dinuclear encargado de captar los electrones y de pasarlos a la subunidad Cox1 (Maréchal *et al.*, 2011; Herrmann & Funes, 2005).

En *S. cerevisiae*, Cox2 junto con la subunidad 6 de la ATP sintasa son las únicas proteínas sintetizadas como un precursor (Torello *et al.*, 1996). El precursor de Cox2 presenta una presecuencia de 15 aminoácidos en el dominio N-terminal. Esta presecuencia es reconocida por la proteína Oxa1, encargada de la translocación de Cox2 en la MIM. Posterior a su translocación, el precursor es proteolíticamente eliminado entre los aminoácidos 15 (N) y 16 (D) (Torello *et al.*, 1996; Bonnefoy *et al.*, 2001).

Torello *et al.* (1996) eliminaron los codones correspondientes a la presecuencia de COX2 de *S. cerevisiae* observando una disminución en la acumulación de Cox2, pero no de los niveles de mRNA de COX2. Concluyeron que la presecuencia promueve la traducción y la inserción de Cox2 en la membrana interna mitocondrial (Torello *et al.*, 1996; Bonnefoy *et al.*, 2001).

## 5. Síntesis de proteínas mitocondriales en *S.cerevisiae*

Las síntesis de proteínas en la mitocondria de *S. cerevisiae* es el resultado de la coordinación del genoma nuclear y mitocondrial. Casi todas las proteínas ribosomales y todos los factores traduccionales están codificados por el genoma nuclear, mientras que los RNAs ribosomales y los tRNAs están codificados en el genoma mitocondrial (Desai *et al.*, 2017).

El ribosoma mitocondrial de *S.cerevisiae* tiene un coeficiente de sedimentación de 74S. La subunidad pequeña (37S) consta del rRNA 15S y 34 proteínas y la subunidad mayor (54S) consta del rRNA 21S y 44 proteínas (Herrmann *et al.*, 2013; Desai *et al.*, 2017). El genoma mitocondrial de *S. cerevisiae* contiene genes que codifican únicamente 24 tRNAs que corresponden para 20 aminoácidos. Los tRNAs reconocen codones que difieren del código genético estándar; por ejemplo, el codón de paro UGA codifica para triptófano, el codón para isoleucina (AUA) codifica para metionina; y los codones para leucina (CUA, CUC, CUG y CUU) codifican treonina. Por último, cabe mencionar que los tRNAs mitocondriales presentan una estructura secundaria peculiar ya que no presentan la interacción entre los brazos D y T (Herrmann *et al.*, 2013).

Los mRNAs mitocondriales no presentan CAP ni cola poly (A), pero en su lugar poseen regiones 5' y 3'-UTR (*untranslated regions*) que varían en tamaño y pueden llegar a tener cientos de nucleótidos. El mRNA con el 5'-UTR más corto es el de COX2, que consta de 54 nucleótidos (Chacinska & Boguta, 2000; Costanzo & Fox, 1990). En comparación con los mRNA de *E. coli*, los mensajeros mitocondriales carecen de una secuencia Shine-Delgarno y en su lugar se propone la secuencia de un octanucleótido (JAUAAAUA), junto con estructuras secundarias formadas en el extremo 5'-UTR como los principales elementos para el reconocimiento del ribosoma durante el inicio de la traducción (Chacinska & Boguta, 2000; Herrmann *et al.*, 2013; García *et al.*, 2016; Ott *et al.*, 2016). Sin embargo, aún no se ha demostrado la función del octanucleótido como Shine-Delgarno, así como el mecanismo por el cual se lleva a cabo el reconocimiento del mRNA por el ribosoma durante el inicio de traducción (Herrmann *et al.*, 2013).

La traducción se localiza en la MIM. Por lo tanto, durante la síntesis de proteínas el ribosoma permanece unido a la MIM con ayuda Oxa1, una translocasa encargada de insertar proteínas en la membrana interna mitocondrial. Tiene un dominio C-terminal de unión a ribosoma que facilita la interacción de la proteína naciente con la membrana. Igualmente, Mba1 es una proteína periférica de membrana que funciona como receptor del ribosoma y la proteína Mdm38 coopera con Mba1 en la unión de la subunidad mayor (Kuzmenko *et al.*, 2014).

Al igual que la citosólica, la síntesis de proteínas mitocondriales consta de cuatro etapas: inicio, elongación, terminación y el reciclaje de ribosomas. En el inicio de la traducción se lleva a cabo el reconocimiento del codón de inicio (AUG o AUA) por medio de activadores traduccionales, que interactúan con la subunidad pequeña ribosomal y con el extremo 5'-UTR del mRNA (Herrmann *et al.*, 2013; Ott *et al.*, 2016; Gruschke & Ott, 2013).

Además de los activadores traduccionales, hay una serie de factores que regulan la síntesis de proteínas mitocondriales. Entre ellos se encuentran el factor del inicio de la traducción mitocondrial 2 (mIF2), una GTPasa encargada de la selección del tRNA iniciador (Met-tRNA<sup>Met</sup>) y de la unión de las subunidades mitocondriales igual que su homólogo en bacterias (IF2); y Aim23p, ortólogo del factor del inicio de la traducción 3 (IF3) y encargado de la selección de los tRNAs y mRNAs, así como del posicionar el codón de inicio en el sitio P del ribosoma al mismo tiempo que previene la asociación prematura con la subunidad mayor del ribosoma (Kuzmenko *et al.*, 2014).

En elongación participan los factores EF-Tu y Mef1. EF-Tu es una GTPasa encargada de hidrolizar una molécula de GTP, al mismo tiempo que un tRNA aminoacilado es posicionado en el sitio A del ribosoma. Mef1 es homólogo del factor EF-G y cataliza la translocación del petidil-tRNA del sitio A al sitio P del ribosoma y el factor de fidelidad Guf1, que actúa catalizando la translocación hacia atrás de un codón, cuando el tRNA está mal posicionado en el ribosoma (Chiron *et al.*, 2005; Herrmann *et al.*, 2013).

Durante la terminación, el reconocimiento del codón de paro se lleva a cabo por el factor Mrf1. Finalmente, en el reciclaje de ribosomas están involucrados los factores RrF1, Mef2 y Aim23p (Herrmann *et al.*, 2013). Cabe mencionar que, debido a la falta de un sistema de traducción mitocondrial *in vitro* aún se sabe poco acerca de los factores involucrados en la síntesis de proteínas mitocondriales y de su mecanismo de acción (Kuzmenko *et al.*, 2014; Herrmann *et al.*, 2013).

### **5.1 Regulación de la síntesis de proteínas mitocondriales**

La regulación de la síntesis de proteínas mitocondriales *S. cerevisiae* se lleva a cabo por un grupo de proteínas codificadas en el genoma nuclear denominadas activadores traduccionales. Cada mRNA mitocondriales reconocido por uno o más activadores traduccionales (Tabla 1) esenciales para la síntesis de proteínas. La eliminación de cualquiera de estos genes deriva en la pérdida de la fosforilación oxidativa (Derbikova *et al.*, 2018). En la Tabla 1 se describen los activadores traduccionales específicos que reconoce a cada mRNA mitocondrial así como sus interacciones físicas y genéticas.

**Tabla 1. Activadores traduccionales.** mRNAs mitocondriales con sus respectivos activadores traduccionales y sus interacciones genéticas y físicas durante la síntesis de proteínas mitocondriales en *S. cerevisiae* (modificado de Derbikova *et al.*, 2018).

mRNA	Tamaño del 5'-UTR (nt)	Activador traduccional	Interacciones genéticas	Interacciones físicas
<b>COB</b>	954	Cbs1p	5'-UTR	Mitoribosoma
		Cbs2p		
		Cbp1p		
		Cbp3p Cbp6p		Túnel de salida del mitoribosoma y con Cob1 recién sintetizada
<b>COX1</b>	461	Pet309p	mRNA de Cox1	Cox1 recién sintetizado
		Mss51p	5'-UTR y parte codificante del mRNA	
		Mam33p	5'-UTR	Mitoribosoma
		Mss116p		
<b>COX2</b>	54	Pet11p	5'-UTR y parte codificante del mRNA	
<b>COX3</b>	613	Pet54p	5'-UTR	
		Pet122p	5'-UTR y mitoribosoma	
		Pet494	5'-UTR	
<b>ATP8-ATP6</b>	308 o 883	Atp22p	5'-UTR	5'-UTR
		Aep3p		
		Smt1p		
<b>ATP9</b>	168	Aep1p	mRNA	
		Aep2p	Probablemente 5'-UTR	
<b>VAR1</b>	162	Sov1p		

Se propone que los activadores traduccionales regulan la traducción de diferentes maneras: (1) reconocen el extremo 5'UTR de manera específica; (2) interactúan con proteínas ribosomales, tanto de la subunidad mayor como de la subunidad menor

durante el inicio de la traducción; (3) varios activadores traduccionales son proteínas periféricas o integrales de membrana por lo que facilitan que la síntesis de proteínas se lleve a cabo cerca de la membrana interna mitocondrial; (4) hay un número limitado de activadores traduccionales en la mitocondria; y (5) en algunos casos se unen al péptido nascente y permanece unido hasta que el complejo este ensamblado (Herrmann *et al.*, 2013; Gruschke & Ott, 2013).

Cuando el ensamblaje de algún complejo de la cadena transportadora de electrones es bloqueada, ya sea por la falta de subunidades codificadas en el núcleo o factores de ensamblaje de algunos activadores traduccionales, la subunidad intermediaria es secuestrada y la síntesis de proteínas se detiene. Sin embargo, aún se sabe poco sobre las funciones que realizan todos los activadores traduccionales durante la síntesis de proteínas (Herrmann *et al.*, 2013; Gruschke & Ott, 2013).

## **5.2 Regulación de la síntesis de Cox2**

La expresión del mRNA de *COX2* está regulada por el activador traduccional Pet111, una proteína PPR (*pentatricopeptide repeat*) anclada a la membrana interna mitocondrial. El extremo 5'-UTR de este mRNA forma una estructura secundaria de tallo-bucle estable con los primeros 31 nucleótidos de la región codificante. Se propone que Pet111 podría actuar modificando el tallo-bucle del mensajero, evitando la formación del dúplex de tal manera que esta región sea monocatenaria y, por lo tanto, accesible para que el ribosoma pueda reconocer el codón de inicio (Jones *et al.*, 2019).

También se piensa que dentro de los 31 nucleótidos que forman la estructura de tallo-bucle hay dos elementos de repuesta para la síntesis de Cox2, uno positivo y otro negativo. El elemento de control positivo se encuentra dentro de los primeros catorce codones correspondientes al péptido líder, de los cuales los codones 2 al 6 son cruciales para que la traducción se lleve a cabo. Por otro lado, el elemento de control negativo se encuentra dentro de los codones 15-16 que forman un tallo-bucle que inhibe la traducción de Cox2 (Jones *et al.*, 2019).

## **6 Antecedentes de sistemas de traducción mitocondrial *in vitro***

Durante los años 50's, experimentos realizados por Hutin (1950), Keller *et al.* (1954) y Mc Lean *et al.* (1958) demostraron que mitocondrias aisladas de hígado de rata eran capaces de incorporar aminoácidos radioactivos en proteínas recién sintetizadas en estudios *in vivo*.

Posterior a esta propuesta surgió un debate sobre la síntesis de proteínas mitocondriales *in vitro*. Se argumentaba que las proteínas obtenidas eran resultado de

contaminación por bacterias en el medio o por ribosomas citosólicos (Butow & Wood, 1978). La primera hipótesis fue debatida por los trabajos de Beattie *et al.*, (1967), quienes observaron que la cantidad de bacterias presentes no era significativa para la incorporación de aminoácidos radioactivos. La segunda hipótesis fue rechazada mediante la incorporación de cloranfenicol (CAP) y cicloheximida (CHX), antibióticos capaces de inhibir la síntesis de proteínas citosólica, pero no la mitocondrial (Lamb *et al.*, 1968). Por otro lado, los ensayos de traducción llevados a cabo en condiciones de esterilidad y suplementados con antibióticos como la penicilina seguían presentando incorporación de aminoácidos radioactivos (Beattie *et al.* 1967, Butow & Wood, 1978).

Posterior a estas publicaciones, Truman (1963) aisló fragmentos submitocondriales con alta capacidad de síntesis de proteínas después de administrar aminoácidos radioactivos en ensayos *in vivo*. También, mediante diferentes procedimientos con digitonina, desoxicolato y etanol, obtuvo fracciones submitocondriales que conservaban la cadena transportadora de electrones y la fosforilación oxidativa activa a diferentes niveles. Además observó que las fracciones que se asociaban a la MIM presentaban mayor incorporación de aminoácidos radioactivos. Con base en estos estudios la síntesis de proteínas mitocondriales y biogénesis de este organelo se convirtió en un campo ampliamente estudiado (Beattie *et al.* 1966).

Posterior a los estudios de la síntesis de proteínas mitocondriales *in vivo* se comenzaron los intentos por desarrollar un sistema de traducción *in vitro*. Entre los primeros autores en proponer un lisado de traducción *in vitro* están Avandhani & Butow (1972). Ellos reportaron el aislamiento de ribosomas y polisomas de *Euglena gracilis* traduccionalmente activos en un lisado de traducción heterólogo, ya que contenía tRNAs y enzimas *E. coli*. Este trabajo concluyó que la traducción mitocondrial tiene naturaleza procarionte.

Blossey & Küntzel (1972) reportaron un sistema acoplado de transcripción y traducción híbrido *in vitro* en *Neurospora crassa*. Agregaron RNA polimerasa de *E. coli*, para demostrar que los productos del DNA mitocondrial pueden ser transcritos en mRNAs y a su vez traducidos en proteínas bajo un sistema submitocondrial *in vitro*. En este trabajo sólo se reportó la síntesis de cuatro proteínas con un peso molecular de 11,000 -180,000 daltons.

Avadhani & Rutman (1974) aislaron mitocondrias de células de Ehrlich libres de contaminación citosólica y traduccionalmente activas mediante lavados con digitonida. El sistema fue suplementando el lisado con tRNAs de lavadura, factores traduccionales de *E. coli*, ATP, GTP y un sistema regenerador de energía. Su sistema obtuvo alta actividad de síntesis de poli (U), detectada con fenilalanina radioactiva,

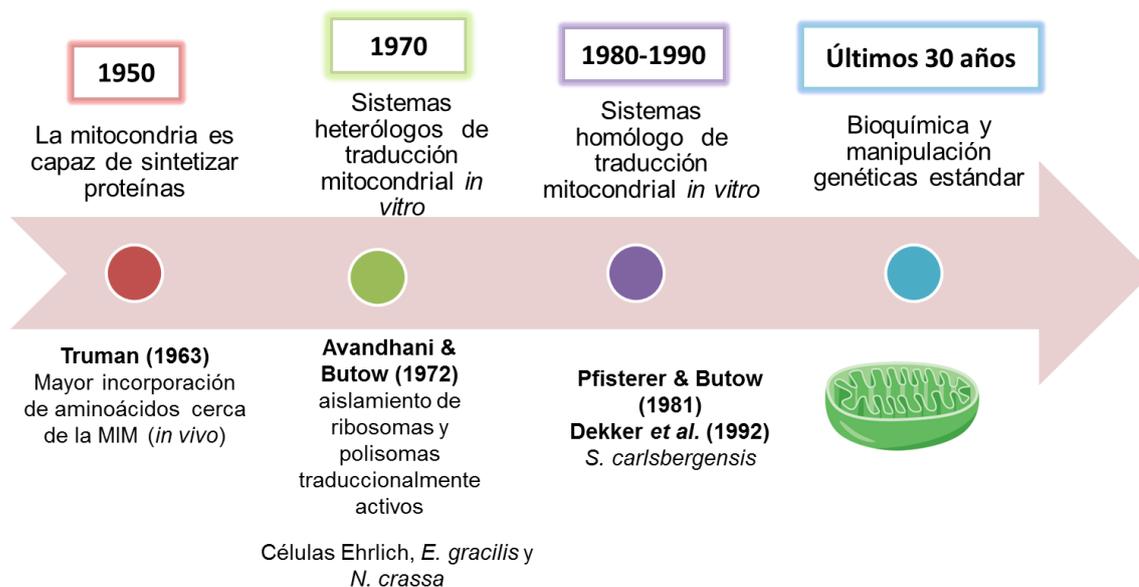
Pfisterer & Butow (1981) publicaron un sistema de traducción mitocondrial *in vitro* en *Saccharomyces carlsbergensis*, compuesto por ribosomas, tRNAs y mRNAs mitocondriales. Compararon el rendimiento de la síntesis de proteínas al agregar ribosomas, tRNAs, mRNAs de *E. coli* y obtuvieron mayor síntesis de proteínas con componentes mitocondriales en presencia 10 mM de Mg<sup>2+</sup> y 100 mM HN<sub>4</sub>Cl. Concluyeron que, debido a las características distintivas del genoma mitocondrial, así como del aparato traduccional, el desarrollo de un sistema de traducción *in vitro* podría tener componentes especializados para cada organismo.

Dekker *et al.*, (1992) demostraron en un estudio de traducción *in vitro* que la síntesis de poli (U) en un sistema homólogo *in vitro* en *S. carlsbergensis* era mucho más eficiente en comparación a los sistemas de traducción heterólogos reportados en trabajos anteriores. A partir de estas observaciones intentaron desarrollar un sistema de traducción *in vitro* homólogo mitocondrial, pero utilizaron un reportero más complejo, el mRNA de COX2. Sin embargo, su sistema no funcionó. Su hipótesis fue que hubo un fallo durante el inicio de la traducción en su sistema de traducción *in vitro* y, para comprobarlo, hicieron un experimento con formilmetionil-puromicina y un trinucleótido ApUpG, ribosomas mitocondriales, tRNAs aminoacilados y GTP. Mediante este experimento concluyeron que toda la maquinaria del inicio de la traducción se unía de manera ineficiente, por lo tanto el ribosoma no era capaz de reconocer el AUG de inicio.

Posterior estos estudios y durante los últimos 50 años, mediante bioquímica y manipulación genética, muchas proteínas y su papel en traducción mitocondrial han sido identificadas. Por ejemplo, durante el inicio de la traducción se sabe que participan mIF2 y Aim23p, ortólogos de los factores IF2 y IF3 en *E. coli*. La función que desempeñan estos factores se infiere por la función que llevan a cabo en procariontes, sin embargo, su función aún no se ha comprobada experimentalmente en mitocondrias (Kuzmenko *et al.*, 2014).

Entre las proteínas involucradas en el inicio de la traducción están los activadores traduccionales. Se ha demostrado que activadores traduccionales interactúan con el extremo 5'-UTR y promueven la traducción de mRNAs específicos. Estos ayudan a anclar el ribosoma a la MIM e interaccionan directamente con el péptido recién sintetizado hasta que este se haya ensamblado correctamente en su complejo respiratorio. Otras proteínas involucradas en el reclutamiento del tRNA iniciador son Aep3p, Rsm28p, y Rdm9. En comparación con los activadores traduccionales, estas proteínas no interactúan directamente con el mRNA (Kuzmenko *et al.*, 2014).

La Figura 1 resume en el tiempo el desarrollo de sistemas de traducción mitocondriales *in vivo* e *in vitro*.



**Figura 1. Línea de tiempo de trabajos reportados de intentos de sistemas de traducción mitocondrial *in vivo* e *in vitro* heterólogos en diferentes modelos de estudio.**

Los factores traduccionales, los activadores traduccionales son componentes importantes en la traducción mitocondrial. Sin embargo, aún hay muchos otros factores, proteínas y mecanismos que permanecen sin ser entendidos debido a la falta de un sistema de traducción *in vitro* (Lightowlers *et al.*, 2014). El desarrollo de un sistema de traducción *in vitro* nos permitiría responder preguntas clave, como: ¿Cómo reconoce el ribosoma el AUG de inicio?; ¿cuál es la función que cumplen los activadores traducciones durante el reconocimiento del AUG de inicio y su papel durante toda ronda de traducción?; ¿cómo interaccionan los activadores traduccionales, el ribosoma y el mRNA durante el inicio de la traducción?; ¿qué otras proteínas están implicadas en la regulación traduccional durante el inicio, la elongación, terminación y el reciclaje ribosomal?

Basándonos en los trabajos antes mencionados, así como de sus metodologías publicadas, en esta tesis proponemos desarrollar un sistema de traducción mitocondrial *in vitro*, aún no reportado en *S. cerevisiae* como modelo de estudio. Una metodología reproducible en este organismo sería muy útil, ya que es un modelo de estudio muy importante, tiene un bajo costo, es de fácil manejo experimental y cuenta con muchas herramientas genéticas. Además se conoce su genoma completo, del cual 30% de los genes implicados en enfermedades humanas pueden tener ortólogos en el proteoma en humanos. También es uno de los modelos que más ha

sido estudiado experimentalmente en la regulación de la expresión genética, transducción de señales, ciclo celular, metabolismo, apoptosis, desordenes neurodegenerativos y otros procesos biológicos. Además, es uno de los modelos con muchas aplicaciones biotecnológicas en diferentes ámbitos como la investigación, la industria y salud pública (Karathia *et al.*, 2011).

## **JUSTIFICACIÓN**

El desarrollo de un sistema de traducción *in vitro* en mitocondrias de *S. cerevisiae* nos permitiría dilucidar diversos pasos de la traducción mitocondrial y su regulación. También nos permitiría abordar preguntas relacionadas con el desarrollo de enfermedades de origen mitocondrial como miopatías, diabetes, cáncer y enfermedades neurodegenerativas.

## **OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar un protocolo para obtener un lisado de traducción *in vitro* en mitocondrias de *S. cerevisiae*.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Determinar si la traducción mitocondrial depende del gradiente electroquímico de protones mediante un ensayo de traducción *in organello*.
- Obtener un lisado mitocondrial traduccionalmente activo.
- Comparar condiciones experimentales reportadas de sistemas de traducción *in vitro* heterólogos y proponer un nuevo diseño experimental.

## **HIPÓTESIS**

El desarrollo de un lisado mitocondrial traduccionalmente activo dependerá de componentes homólogos, así como de condiciones óptimas de sonicación, concentración de iones y temperatura.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En la sección de Anexo se encuentran especificados todos los medios de cultivo, amortiguadores, soluciones y reactivos usados en esta tesis.

### Obtención de la fracción mitocondrial cruda

La extracción de la fracción mitocondrial se modificó de Diekert *et al.* (2001).

- Cultivo

Se partió de un precultivo de 10 ml en medio YPGal (10 g de extracto de levadura, 20 g bacto peptona, 20 g de galactosa y adenina) de la cepa YC133 de *S. cerevisiae* y se dejó incubando a 30°C con agitación (200 rpm) por 2 noches. Posteriormente del precultivo se tomaron 5 ml, se colocaron en un cultivo de un litro de medio YPGal y se incubaron a 30°C en agitación (200 rpm) por 19 horas hasta una O.D <1.0. En promedio los cultivos se dejaron hasta una O.D. de 0.880 midiendo a una absorbancia de 740.

- Extracción de mitocondrias

Las células se centrifugaron a 4,000 rpm a 4°C por 5 minutos y se lavaron con agua destilada dos veces. Las células se resuspendieron en el amortiguador TD (7 ml/g de peso húmedo); se incubaron durante 10 minutos a 30°C en agitación (200 rpm) y se centrifugaron a 3,300 rpm a 4°C por 5 minutos. El botón se resuspendió en el amortiguador MPZ (7 ml/ g de peso húmedo), se adicionó zimoliasa-20T (3 mg/g de peso húmedo), se agitó durante 60 minutos a 30°C, hasta formar esferoplastos.

A partir de este punto todo el protocolo se llevó a cabo a 4°C. Las células se centrifugaron a 2,500 rpm por 5 minutos, posteriormente se resuspendieron en el amortiguador *Dounce* (13.4 ml/g de peso húmedo) y se rompieron los esferoplastos con un homogeneizador y pistilo de vidrio estrecho. La muestra se centrifugó dos veces a 3,300 rpm por 5 minutos (se recuperó el sobrenadante), después a 12,000 rpm por 12 minutos y se desechó el sobrenadante. El botón se lavó en 2 ml de amortiguador SEH, después resuspendió completamente en 8 ml del amortiguador. La muestra con las mitocondrias se centrifugaron dos veces a 12,000 rpm por 12 minutos. Por último el botón se resuspendió en 300 µl de amortiguador SEH, se hicieron alícuotas de 50 µl y se guardaron a -70°C.

### Cuantificación de mitocondrias con el método de Lowry (Modificado Markwell *et al.*, 1978)

- Curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA)

Las curvas se realizaron con las siguientes cantidades de BSA a una concentración de 1 mg/ml: 0  $\mu$ l, 10  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 40  $\mu$ l, 50  $\mu$ l, 60  $\mu$ l, 70  $\mu$ l, 80  $\mu$ l, 90  $\mu$ l, 100  $\mu$ l. Posteriormente cada tubo se llevó a un volumen final de 1 ml con agua estéril.

Las muestras con las mitocondrias se diluyeron 1:10 con agua estéril. Posteriormente se colocaron las siguientes cantidades de la muestra: 10  $\mu$ l, 20  $\mu$ l y 20  $\mu$ l a cada tubo y se llevó a un volumen final de 1 ml con agua estéril.

A cada tubo se le adicionaron 3 ml de la solución C (100 volúmenes de la solución A y un volumen de solución B.), se mezclaron con vórtex y se dejaron incubar 10 minutos a temperatura ambiente. Después se agregaron 300  $\mu$ l de la solución D (1 volumen de reactivo de Folin y un volumen de agua) y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Por último, la OD de las muestras fue  $>1.0$  la cual se midió a una longitud de onda de 740 nm.

### Cuantificación de proteínas con el método de Bradford

Las cuantificaciones de proteínas de la fracción mitocondrial y del lisado citosólico se realizaron por el método colorimétrico, con el reactivo de Bradford *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio Rad) Las cuantificaciones se realizaron por duplicado, partiendo de una curva estándar con concentraciones conocidas de BSA (10  $\mu$ g/ml, 25  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml, 65  $\mu$ g/ml y 80  $\mu$ g/ml). Cada pozo se llevó a un volumen final de 500  $\mu$ l.

Las muestras se diluyeron a una concentración 1:500 con agua ultra pura destilada *MiliQ* (Invitrogen). A cada pozo se le adicionaron 40  $\mu$ l del reactivo de Bradford y se mezcló cuidadosamente con la una micropipeta. La reacción se dejó incubando 20 minutos y se midió en un espectrofotómetro (BioTek) a una longitud de onda de 595 nm.

### Traducción mitocondrial *in organello* (Modificado Herrmann *et al.*, 2001)

Se partieron de 50 µg de mitocondrias de la cepa YC133 con la mutación *nuc1*. En 4 tubos de 1.5 ml se colocó el volumen requerido de mitocondrias, se llevó a un volumen final de 100 µl con amortiguador SH; después se agregaron 55 µl de amortiguador 1.5X oITL. Las muestras se incubaron 5 minutos a 30°C; y se mezclaron a cada minuto con pequeños golpes con los dedos.

Se agregaron 10 µCi (reactividad específica 7.46 µCi) de [<sup>35</sup>S]- Metionina (*METRIX*) a cada muestra y se dejaron incubando 17.5 minutos a 37°C y se mezclaron cada 5 minutos con pequeños golpes con los dedos. Se tomaron 20 µg de mitocondrias de cada tubo (Pulso), se colocaron en un tubo nuevo; y se llevaron a un volumen final de 1ml con amortiguador SHP. Las muestras centrifugaron a 12,000 rpm; se les retiró el sobrenadante y se les agregaron 15 µl de amortiguador de carga 2X. Las muestras se guardaron a – 70°C.

A los 30 µg de mitocondrias restantes se les aplicó una condición experimental diferente a cada tubo: 1) control negativo; 2) 2 µl de oligomicina (50 µg/ml); 3) 1 µl de CCCP (0.1 mg/ml) y 4) 2 µl de oligomicina más 1 µl de CCCP. Las muestras se incubaron 17.5 minutos a 37°C mezclando cada 5 minutos con pequeños golpes con los dedos; se tomaron 15 µl de la reacción a los cuales se le colocaron 15 µl de amortiguador de carga 2X y se guardaron a – 70°C.

Se corrió un gel de poliacrilamida al 16 % a 300 V por 2 horas. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PDVF (Millipore) con un tamaño de 7x15 cm; a 10 V y a 158 mA por 1:5 h. La membrana se introdujo en un casete durante un día; después la señal de radiactividad se detectó con el escáner *Typhoon 700* (Amersham).

Como control de carga se usó a la encima citrato sintasa y se hizo un *Western blot*, como anticuerpo primario se usó anti citrato sintasa (Proporcionado por la Dra. Xochitl Pérez Martínez) en una concentración 1:1000 y como anticuerpo secundario se usó un anti conejo a una concentración 1:5000.

El revelado se llevó a cabo mediante la reacción de peroxidasa con el kit *ECL* (Thermo Scientific). Para la reacción se colocaron el reactivo 1 y el reactivo 2 en una relación 1:1; la membrana se colocó entre dos acetatos y se colocó en contacto con un *film* (Kodak) durante 1 minuto.

## Obtención de la fracción mitocondrial cruda, con medio YPG (Pfisterer & Butow, 1981)

- Cultivo.

Los cultivos se crecieron a partir de la cepa Yeast Foam (*S. cerevisiae*). Las células se sembraron en una placa con medio sólido de YPD con y se incubaron toda la noche a 30°C. Se tomó una asada del cultivo anterior; se inoculó en 5ml de YPG líquido y se dejó incubando una noche a 30°C en agitación (200 rpm). Posteriormente se sembró 1 ml del precultivo en 250 ml de medio YPG (4 matraces); el cultivo se incubó a 30° C en agitación (200 rpm) hasta una OD de 0.7 -1.4 la cual se midió a una longitud de onda de 740 nm

- Extracción de mitocondrias

Se separó el medio de cultivo de las células centrifugando a 4,000 rpm a 4°C por 5 minutos y se lavaron con agua destilada dos veces. Las células se resuspendieron en el amortiguador TM (3 volúmenes), se incubaron durante 15 minutos a 30°C en agitación (200 rpm) y se centrifugaron a 3,300 rpm a 4°C por 5 minutos. Las células se resuspendieron en el amortiguador STE (3 volúmenes); centrifugaron a 3,300 rpm a 4°C por 5 minutos. El botón se respondió en amortiguador STE con 100 mM  $\beta$ -mercaptoetanol (3 volúmenes), también se adicionó zimoliasa 20T (3 mg/g de peso húmedo) y se agitaron durante 60 minutos a 30°C, hasta formar esferoplastos.

A partir de este punto todo el protocolo se llevó a cabo a 4°C. Las células se centrifugaron 3,500 rpm por 5 minutos. Posteriormente se resuspendieron en el amortiguador STE (3 volúmenes); se centrifugaron 3,500 rpm por 5 minutos; se resuspendieron en amortiguador STE pH 6.7 y se centrifugaron 3,500 rpm por 5 minutos.

Los esferoplastos se rompieron en amortiguador STEB (3 volúmenes) con un homogenizador y pistilo de vidrio estrecho (20 veces). Las muestras se centrifugaron dos veces a 1500 Xg por 10 minutos (se recuperó el sobrenadante); después se centrifugaron a 13,000 Xg por 10 minutos y se desechó el sobrenadante. El botón se lavó en 2 ml de amortiguador ATM, se centrifugó a 13,000 Xg por 10 minutos. Por último, el botón se resuspendió en 300  $\mu$ l de amortiguador STME; se hicieron alícuotas de 50  $\mu$ l y se guardaron a -80°C.

### Lisado citosólico

Los lisados citosólicos se realizaron de acuerdo con González (2016) con la cepa silvestre Yeast Foam. Las células se sembraron en una placa con medio YPD y se incubaron toda la noche a 30°C. Se tomó una asada del cultivo anterior y se inoculó en 5ml de YPD líquido y se dejó incubando una noche a 30°C en agitación (200 rpm).

Posteriormente se sembró 1 ml del precultivo en 250 ml de medio YPD, el cultivo se incubó a 30° C en agitación (200 rpm) hasta una O.D. de 1 a una longitud de onda de 740 nm. Después las células se lavaron con agua bidestilada estéril y se centrifugaron a 300rpm por 5 minutos a 4°C. Las células obtenidas se resuspendieron en 30 ml del amortiguador II y se centrifugaron a 600 rpm por 5 minutos a 4°C; el mismo procedimiento se repitió tres veces más. El botón de aproximadamente 2 g de peso húmedo se resuspendió en 1 ml de amortiguador II y fue colocado por goteo en un mortero (previamente enfriado con hielo seco); cuando las esferas se congelaron, se trituraron con el pistilo del mortero hasta formar un polvo fino. El homogenado se colocó en tubos de 1.5 ml y se centrifugaron a 13,000 rpm por 10 minutos a 4°C, el sobrenadante se colocó en una columna de exclusión molecular de plástico de 20 cm<sup>3</sup>, la cual previamente se preparó pesando 4g de Sephadex G-25 (Sigma) hidratado en 30 ml de amortiguador de hidratación durante 3 horas en agitación (4rpm) a 4°C. Finalmente se agregaron 10 ml de amortiguador de elución, se colectaron fracciones de 500 µl del lisado y se guardaron a -80°C.

### Geles de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE)

Se realizaron geles de poliacrilamida para evaluar los ensayos de traducción mitocondrial *in organello* y la fracción mitocondrial cruda, con los reactivos y en el orden mostrados en las Tablas 2 y 3.

**Tabla 2. Preparación de geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) para evaluar el ensayo de traducción *in organello*.** Los geles se prepararon al 16% (gel separador al 16% y el apilador al 4%).

	<b>Gel separador 16%</b>	<b>Gel apilador 4%</b>
<b>Acrilamida 30%</b> <b>Bisacrilamida 0.3%</b>	8 ml	650 µl
<b>Tris 2M pH 8.8</b>	2.9 ml	-
<b>Tris 2M pH 6.8</b>	-	312.5 µl
<b>SDS 20%</b>	80 µl	25 µl
<b>H2O</b>	4.87 ml	3.95 ml
<b>TEMED</b>	16 µl	5 µl
<b>APS 10%</b>	26.6 µl	50 µl

**Tabla 3. Preparación de geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) para evaluar la fracción mitocondrial cruda.** Los geles se prepararon al 15% (gel separador al 15% y el apilador al 4%).

	<b>Gel separador 15%</b>	<b>Gel apilador 4%</b>
<b>Acrilamida 30%</b> <b>Bisacrilamida 0.3%</b>	5 ml	130µl
<b>Tris 2M pH 8.8</b>	1.87ml	-
<b>Tris 2M pH 6.8</b>	-	64. 2 µl
<b>SDS 10%</b>	106 µl	10 µl
<b>H2O</b>	2.95 ml	2.78 ml
<b>TEMED</b>	10 µl	1 µl
<b>APS 10%</b>	16.6 µl	10 µl

### Western blot

Para comparar que la fracción mitocondrial estuviera libre de componentes citosólicos, se realizó un *Western blot* con el lisado citosólico y la fracción mitocondrial. Para ello, se partió de 1 ng de proteína tanto citosólica como mitocondrial. A una de las dos muestras evaluadas de mitocondrias se le agregó 1 ml de amortiguador SHP y se centrifugaron a 12,000 rpm a 4°C por 12 minutos.

Tanto a la muestra de lisado citosólico como las mitocondriales se les agregaron 10 µl de amortiguador de carga 2x (Laemmli) y se incubaron 5 min a 95°C. Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 15% con amortiguador de corrida y se dejaron corriendo a 130 V por 2 horas. Posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa con amortiguador de transferencia a 30 V por 1 h.

El bloqueo de las membranas se llevó a cabo con 10 ml de solución de bloqueo y se dejó incubando en agitación durante 1 h. Después del bloqueo se puso el anticuerpo primario; para las muestras mitocondriales se usó el anticuerpo anti citrato sintasa en una dilución 1:1000 y para las muestras citosólicas se usó en anticuerpo anti G6PDH (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa) en una dilución 1:10,000. Los anticuerpos primarios se dejaron incubando toda la noche a 4°C en agitación.

Se realizaron 3 lavados de 15 minutos cada uno con el amortiguador PBT y se colocó el anticuerpo secundario. Para las muestras mitocondriales se usó el anticuerpo anti conejo 1:5000 y para las muestras citosólicas se utilizó el anticuerpo anti ratón en una dilución 1:5000. Los anticuerpos se dejaron incubado 1 h y se realizaron 3 lavados de 15 minutos cada uno con el amortiguador PBT.

El revelado se llevó a cabo mediante la reacción de peroxidasa con el kit *ECL* (Thermo Scientific). Para la reacción se colocó el reactivo 1 y el reactivo 2 en una relación 1:1. Por último la bioluminiscencia se detectó mediante un escáner *C-DGIT*.

### Extractos mitocondriales

La metodología para obtener los extractos mitocondriales se modificó de Shrestha *et al.* (2012). Se partió de 2 mg de mitocondrias aisladas de la cepa YC133. Como primer paso, se retiró el amortiguador, centrifugando a 14,000 rpm a 4°C durante 5 minutos. Posteriormente, las mitocondrias se resuspendieron en amortiguador N (20mM HEPES-KOH pH 7.4, acetato de potasio 60 mM, acetato de magnesio 3.5 mM, DTT 1 mM e inhibidores de proteasas) y se sometieron a tres condiciones:

1. *Output 1, duty cycle 10%*, 6 pulsos 7 ciclos (sonicación).
2. *Output 5, duty cycle 40%*, 6 pulsos 3 ciclos (sonicación).
3. En un homogeneizador con pistilo de vidrio, 10 veces.

Por último, los lisados se centrifugaron a 7,000 rpm a 4°C por 3 minutos y se conservaron a -70°C.

#### Obtención de tRNAs mitocondriales

Los tRNAs mitocondriales se extrajeron de acuerdo a Farnsworth *et al.* (2004) a partir de 2 mg de mitocondrias de la cepa Yeast foam. Para obtener el RNA total se agregó 1 ml de TRIzol (Ambion), se resuspendió con la micropipeta y se dejó incubando 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 20 µl de cloroformo frío; la muestra se agitó manualmente durante 15 segundos y se dejó incubando 3 minutos a temperatura ambiente. Después se centrifugó a 12,000 Xg se recuperó el sobrenadante; se añadieron 500 µl de isopropanol, se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 Xg por 10 minutos.

El RNA total se resuspendió en amortiguador TE (100 mM Tris- HCl 6.8 y 1 mM EDTA pH 8) y se agregaron 50µl de LiCl 5M para precipitar los RNAs pesados; se recuperó el sobrenadante y los RNAs pequeños de precipitaron con isopropanol y etanol al 70%. Los tRNAs mitocondriales se cuantificaron y se corrieron en un gel de agarosa al 1% a 100 V durante 40 minutos.

#### Obtención de plásmidos

Se partió de colonias obtenidas en placas de medio LB de bacterias de la cepa DH5α (*E. coli*) transformadas con los plásmidos pUC57 pRepoter2 y pUC57 pRepoter2LL. Se tomó una asada de las colonias y se inocularon en 3 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml); los cultivos se dejaron creciendo durante 16 horas a 37°C en agitación (200 rpm). La extracción de los plásmidos se realizó con el *kit* comercial *E.Z.N.A. Plasmid DNA mini kit*, siguiendo las indicaciones del fabricante.

### Restricción / Linealización de los plásmidos

La restricción de los plásmidos pUC57 pReporter, pUC57 pRepoter2 y pUC57 pRepoter2LL se llevó a cabo con la enzima *BamHI* de acuerdo a las siguientes reacciones:

#### **Plásmido pUC57 pRepoter, para una reacción de 40 $\mu$ l**

Amortiguador 10x	8 $\mu$ l
Enzima BamHI	4 $\mu$ l
DNA	110 ng
H <sub>2</sub> O	llevar a 80 $\mu$ l

#### **Plásmido pUC57 pRepoter2, para una reacción de 40 $\mu$ l**

Amortiguador 10x	4 $\mu$ l
Enzima BamHI	3.6 $\mu$ l
DNA	3600 ng
H <sub>2</sub> O	llevar a 40 $\mu$ l

#### **Plásmido pUC57 pRepoter2LL, para una reacción de 40 $\mu$ l**

Amortiguador 10x	4 $\mu$ l
Enzima BamHI	4 $\mu$ l
DNA	4311 ng
H <sub>2</sub> O	llevar a 40 $\mu$ l

Las reacciones se dejaron incubando a 37°C por 3 horas y se verificaron mediante un gel de agarosa (Bio-Rad) al 0.8% P/V en amortiguador TBE 0.5X y 0.5  $\mu$ l de bromuro de etidio (1  $\mu$ g/  $\mu$ l). Las muestras se prepararon adicionado amortiguador de carga de Thermo Scientific, *6X DNA Loading Buffer* y *Gene Ruler 1Kb Plus Ladder* (Fermentas) como marcador de peso molecular. El gel se corrió a 120 V por 60 minutos.

### Purificación de DNA a partir de un gel de agarosa

Los geles se expusieron a luz UV evitando el contacto directo. Para ello, el gel se colocó sobre un vidrio transparente y la banda de interés se cortó con una navaja nueva. El DNA plásmidico se extrajo del gel de agarosa y se procesó con *E.Z.N.A. Gel Extraction kit* (Omega Bio-Tek), siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA obtenido fue eluído en 8 µl de *elution buffer* del *kit* y se cuantificó en un espectrofotómetro *Epoch* (Biotek).

### Transcripción de los reporteros *in vitro*

- Transcripción del gen reportero pReporter

La síntesis de mRNA del reportero pReporter se llevó a cabo mediante una retrotranscripción con la polimerasa RNA T7 de acuerdo con la siguiente reacción de PCR:

#### **Reacción de transcripción 50 µl: pReporter**

Amortiguador de transcripción 5X	10 µl
Enzima T7 RNA polimerasa	1.5 µl
GTP, ATP, UTP, CTP Mix	10 µl
DNA	2 ng
RNAsin	50 U
H <sub>2</sub> O	Llevar a 50 µl

Las reacciones se dejaron incubando durante 2 horas a 37°C. Posteriormente se agregó DNAsa de acuerdo a la siguiente reacción:

Amortiguador de DNAsa con MgCl <sub>2</sub>	6 µl
DNAsa	2 µl
H <sub>2</sub> O	2 µl

Las reacciones se dejaron incubando 30 minutos a 37°C. Posterior al tiempo de incubación se agregaron 2 µl de EDTA pH 8.0; se dejaron incubando durante 15 minutos más a 37°C. Por último, el mRNA se purificó mediante la técnica TRIzol-Isopropanol y se corrió en un gel de agarosa al 1% durante 40 minutos a 100 V.

- Transcripción de los nuevos reporteros

La síntesis de mRNA de los reporteros se realizó con el *kit MAXIscript T7* (Ambion). Se utilizaron 321 ng de DNA del reportero Repoter2 y 555 ng del reportero pRepoter2LL. La transcripción se llevó a cabo de acuerdo con la siguiente reacción:

<b>Reacción de transcripción 40 µl: pRepoter2</b>		<b>Reacción de transcripción 40 µl: pRepoter2LL</b>	
Amortiguador de transcripción 10X	4 µl	Amortiguador de transcripción 10X	4 µl
Enzima T7 Mix	4 µl	Enzima T7 Mix	4 µl
GTP	4 µl	GTP	4 µl
UTP	2 µl	UTP	2 µl
ATP	2 µl	ATP	2 µl
CTP	2 µl	CTP	2 µl
DNA	321 ng	DNA	555 ng
H <sub>2</sub> O	Llevar a 40 µl	H <sub>2</sub> O	Llevar a 40 µl

Las reacciones se incubaron 3:45 h a 37°C, pasado este tiempo se agregó 1 µl de TURBO DNase incluida en el kit y dejó incubando 15 minutos más a 37°C.

- Purificación de mRNA

La purificación del mRNA se llevó a cabo con el *kit RNase y Minielute Claeenup* (Qiagen). Las muestras se pasaron por una columna de sílice *RNeas y Minielute spin Column* (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### Determinación de la integridad de mRNA

Para ver la integridad del mRNA se realizaron geles de agarosa al 1.2% P/V con amortiguador TBE 0.5X (preparado con agua DEPC) y 0.5 µl de bromuro de etidio (1 µg/µl). Las muestras se prepararon adicionado amortiguador de carga (Ambion), *Loading Buffer II* y se utilizó *Gene Ruler 1Kb Plus Ladder* (Fermentas) como marcador de peso molecular. Los geles se corrieron a 90 V por 1:20 h.

### Traducción *in vitro*

Los ensayos de traducción *in vitro* se realizaron probando los extractos mitocondriales de la cepa YC133 (*nuc1*). Las reacciones se llevaron a cabo agregando los siguientes componentes:

**Tabla 4. Reactivos y concentraciones utilizadas los ensayos de traducción mitocondrial *in vitro*.**

	<b>Concentración final (1 reacción 10 <math>\mu</math>l)</b>
Hepes KOH pH 7.4	200 mM
DTT	1 mM
Aminoácidos	0.6 mM
Acetato de Magnesio	3.5 mM
Fosfoenol piruvato	3.5 mM
Cicloheximida	1 $\mu$ l
RNasa <i>out</i>	1U/ $\mu$ l
Extracto mitocondrial	50% de la reacción
ATP	1mM
GTP	0.03 mM
tRNAs	~60 ng
Piruvato cinasa	20 mg/ ml
mRNA	20 ng
[ <sup>35</sup> S]-Metionina	5 ng/ $\mu$ l

Las reacciones se incubaron durante 2 h a 25°C. Posteriormente, se agregaron 10  $\mu$ l amortiguador de carga (10  $\mu$ l de  $\beta$ - mercaptoetanol 5X a 100  $\mu$ l de amortiguador Laemmli 2X) y se incubaron a 65°C por 5 minutos.

- *Slot blot*

El *Slot blot* se llevó acabo activando una membrana de PDVF con amortiguador al 80% (20 ml de etanol al 100% y 80 ml de amortiguador de corrida 1X). Los pozos se lavaron con 500  $\mu$ l de amortiguador al 80%, se cargó toda la reacción de traducción *in*

*vitro* y se adhirió la muestra a la membrana con vacío. Posteriormente, la membrana se lavó con 300µl de amortiguador al 80%.

Las membranas se lavaron con etanol al 100% durante 10 segundos y se dejaron secar. Se cortaron solo los fragmentos donde la muestra se quedó adherida a la membrana y colocaron en frascos de vidrio con 1 ml de *Ultima Gold LSC Cocktail* (*Sigma*) y la señal de [<sup>35</sup>S]- Metionina se cuantificó en el analizador de centello *Tri-Carb 2910 TR* (Perkin Elmer).

## RESULTADOS

### **La traducción mitocondrial no depende del gradiente electroquímico de la membrana mitocondrial.**

La mitocondria es un organelo encargado de síntesis de ATP mediante la fosforilación oxidativa. Posee su propia maquinaria traduccional que se encarga de la síntesis de proteínas altamente hidrofóbicas que forman parte de complejos respiratorios de la cadena transportadora de electrones y de la ATP sintasa.

La síntesis de proteínas se localiza muy cerca de la membrana interna mitocondrial, que con ayuda de las proteínas Oxa1 y Mba1 reclutan al mitoribosoma cerca de la membrana interna mitocondrial. Estudios previos han demostrado que el ribosoma permanece anclado a la membrana interna mitocondrial incluso en ausencia de Oxa 1 y Mba 1, lo que indica que probablemente haya más proteínas o fuerzas electrostáticas implicadas en esta interacción (Pfeffer *et al.*, 2014; Liu & Spremulli, 2000).

Aunado a esto una de las principales funciones de la mitocondria es generar un gradiente de protones para la síntesis de ATP, aunque este gradiente de protones también se usa para otros procesos como la importación de proteínas, el transporte de sustratos como calcio, de moléculas pequeñas cargadas como el ATP, ADP y fósforo inorgánico, así como su participación en la actividad de diferentes enzimas (Alberts *et al.*, 2002).

Por lo tanto, en este trabajo se quiso probar si la traducción mitocondrial es un proceso que depende del gradiente de electroquímico de protones de la membrana interna mitocondrial, ya que al realizar un lisado de traducción mitocondrial se rompen tanto la membrana externa como interna y con ellas el gradiente electroquímico y probablemente es por ello que no se ha podido realizar un sistema de traducción mitocondrial *in vitro*.

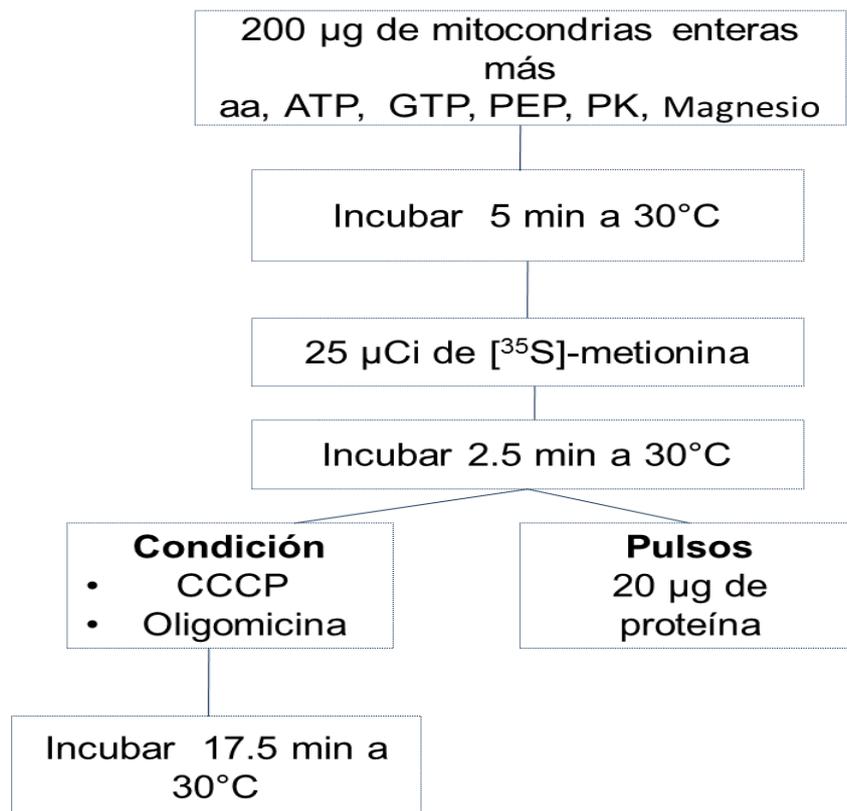
Para probar si la traducción mitocondrial depende del gradiente electroquímico de protones se realizó un ensayo de traducción *in organello* con carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP) y oligomicina (Figura 2). El CCCP es un protonóforo que disipa el gradiente de protones y con ello la síntesis de ATP (Woronowicz *et al.*, 2015). Cuando esto ocurre, la ATP sintasa también puede funcionar como una bomba de protones accionada por ATP, iniciando su acción de hidrolasa girando en dirección contraria y por lo tanto hidrolizando ATP y simultáneamente translocando protones al espacio intermembranal (Woronowicz *et al.*, 2015).

La oligomicina es un antibiótico que inhibe la síntesis de ATP actuando sobre la subunidad Fo de la ATP sintasa bloqueando la translocación de protones (Woronowicz

*et al.*, 2015). De esta forma, para poder desarrollar un sistema de traducción mitocondrial *in vitro* se espera que en presencia de CCCP y oligomicina la traducción mitocondrial no se vea afectada.

Para el ensayo de traducción *in organello*, se trabajó con mitocondrias aisladas enteras traduccionalmente activas. Las mitocondrias se resuspendieron en un amortiguador con todos los componentes necesarios para que se lleve a cabo la traducción mitocondrial (aminoácidos, fosfoenol piruvato, GTP, ATP, Magnesio, potasio, piruvato cinasa) y se dejaron incubar 3 minutos a 30°C.

Posteriormente se agregó metionina radioactiva y se dejó incubando 2.5 minutos, para permitir la entrada de todos los componentes a la matriz mitocondrial, como el ATP (Alberts *et al.*, 2002) ya que la entrada de estos componentes depende del gradiente de protones. A este tiempo le llamaremos pulso. Finalmente a cada tubo se le agregaron diferentes condiciones, oligomicina o CCCP y se dejó incubando por 17.5 minutos como se muestra en el siguiente diagrama.



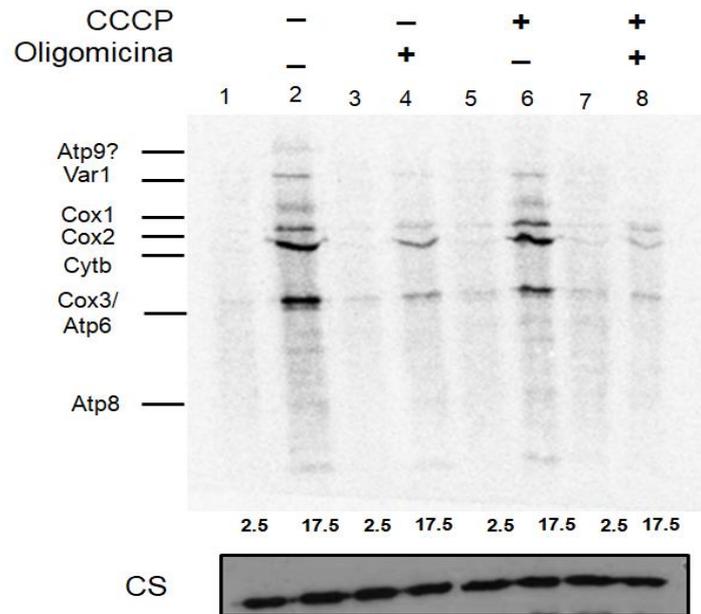
**Diagrama del ensayo *in organello*.** En este diagrama se muestra la estrategia experimental utilizada para mostrar la dependencia del gradiente electroquímico y la síntesis de proteínas mitocondriales utilizando el antibiótico oligomicina y al desacoplante CCCP.

La Figura 2A muestra un autoradiografía del ensayo *in organello*, en el que podemos observar que al tratar a las mitocondrias solo con oligomicina la síntesis de proteínas disminuye (carril 4). Por otro lado, al tratar con CCCP (carril 6) la síntesis de proteínas es similar nuestro control positivo, donde las mitocondrias no recibieron tratamiento (carril 2), sin embargo, en algunas proteínas se puede ver una ligera disminución en su síntesis, como en Var 1, Cox 1 y Cox 3.

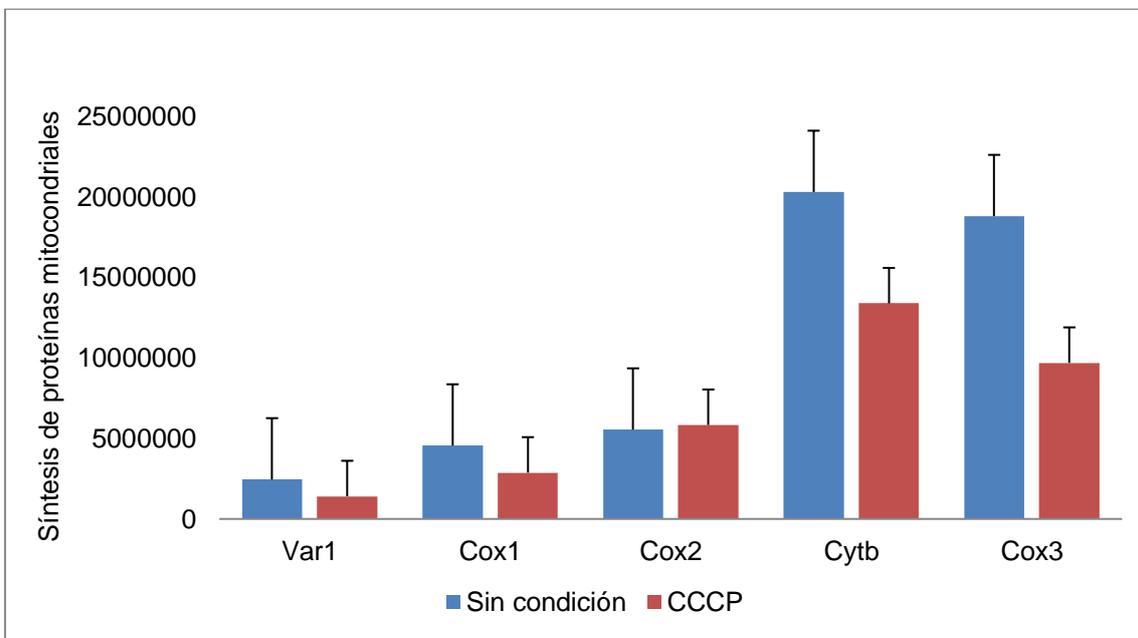
Para ver si la disminución en la síntesis de estas proteínas con CCCP es estadísticamente significativa, se realizó una densitometría y una t de *Student* ( $p$  value < 0.05) para ver si la diferencia es estadísticamente significativa (Figura 2B). La prueba indica que hay diferencia en la síntesis de Var1 y Cox1, pero no en la síntesis de Cox2, Cox3, Cytb.

Podemos concluir que la síntesis de las proteínas Cox2, Cox3 y Cytb no depende del gradiente electroquímico generado por la cadena transportadora de electrones, pero la síntesis general de proteínas si depende del suministro de ATP.

A.



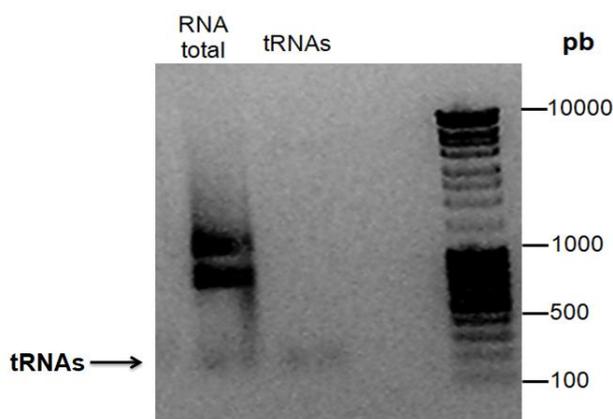
B.



**Figura 2. Ensayo de traducción in organello con CCCP y oligomycin.** A) Las mitocondrias fueron incubadas con el amortiguador 1.5X oITL, durante 2.5 minutos (pulsos: carriles 1, 3, 5 y 7) y durante 17.5 minutos con [<sup>35</sup>S]-metionina más oligomycin (carril 2), CCCP (carril 6) y oligomycin más CCCP (carril 8). Como control de carga se hizo una inmureplica tipo Western blot contra citrato sintasa (CS). B) Densitometría comparando la síntesis de proteínas mitocondriales sin tratamiento y con CCCP, las barras representan el error estándar, la diferencia se determinó a partir de triplicados con de la prueba t de Student.

### Traducción mitocondrial *in vitro*

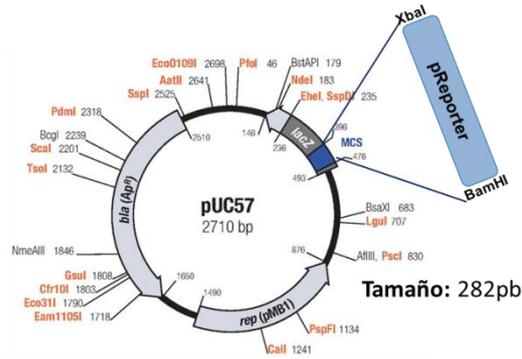
El método de lisis es uno de los puntos más importantes en un sistema de traducción *in vitro*. Por lo tanto, para hacer el lisado mitocondrial, se probaron 3 extractos obtenidos bajo tres condiciones de lisis: sonicación alta, sonicación baja y homogenizando. El diseño del amortiguador se basó en algunos de los componentes y concentraciones generamente utilizados en un sistema PURE (*Protein synthesis Using Recombinant Elements*). Cada extracto se suplementó con tRNAs mitocondriales (Figura 3), aminoácidos, magnesio, DTT, ATP, GTP, fosfoenolpiruvato, piruvatocinasa y controlando el pH del medio (Tabla 4).



**Figura 3. Extracción de tRNAs mitocondriales.** Gel de agarosa al 1% que muestra la extracción del RNA total (1218 ng/ $\mu$ l) mediante el método Trizol-isopropanol. La separación de tRNAs (25 ng/ $\mu$ l) de los RNAs grandes se llevó a cabo precipitando con LiCl 5 M.

Para la detección de síntesis de proteínas mitocondriales de *novo*, se diseñó un mRNA reportero (Figura 4). Este reportero cuenta con 282 pb, un promotor T7 y codifica en cada marco de lectura un epitope deferente (HA, FLAG y V5). En la Figura 4B se muestra que el plásmido con el gen reportero es capaz de transcribir *in vitro* un mRNA del tamaño esperado.

A.



**Promotor T7** **HA**

```

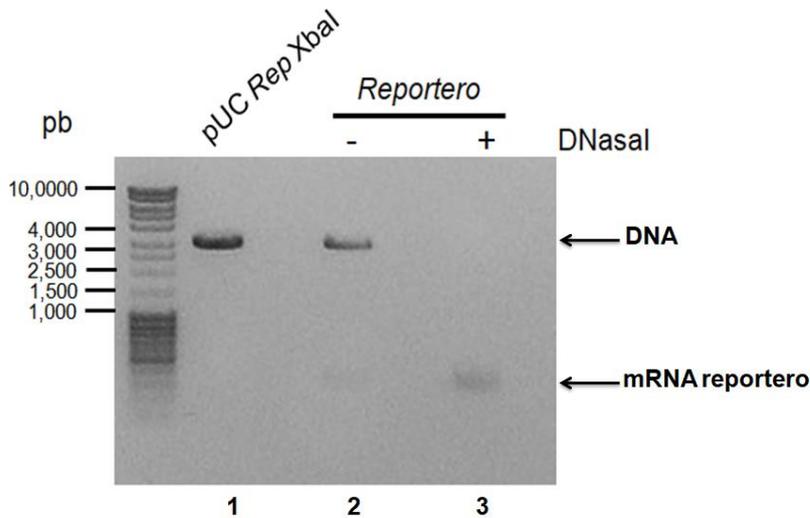
TAATACGACTCACTATAGATGAATGAATGTATATATATTGGTGGTGGTATCCATATGATGTTCTGATTATGCTTATATATATATATGGTGGTGGTGAT < 100
Y D S L W M N E C I Y I G G G Y P Y D V P D Y A Y I Y I W W W W L
N T T H Y R W M N V Y I L V V V I H M M F L I M L I Y I Y G G G D
I R L T I D E W M Y I Y W W W L S I W C S W L C L Y I Y M V V V I
  
```

**FLAG** **V5**

```

TACAAAGATGATGATGACAAGTATATATATATATGGTGGTGGTGGAAAACCTATCCAAATCCTTTATTGGGTTGGATTCAACAATAATAAATAATTAA < 200
Q R W W W Q V Y I Y M V V V E N L F Q I L Y W V W I Q H K * I I N
Y K D D D D K Y I Y I W W W W K T Y S K S F I G F G F N I N K * L I
T K M M M T S I Y I Y G G G G K P I P N P L L G L D S T * I N N *
  
```

B.



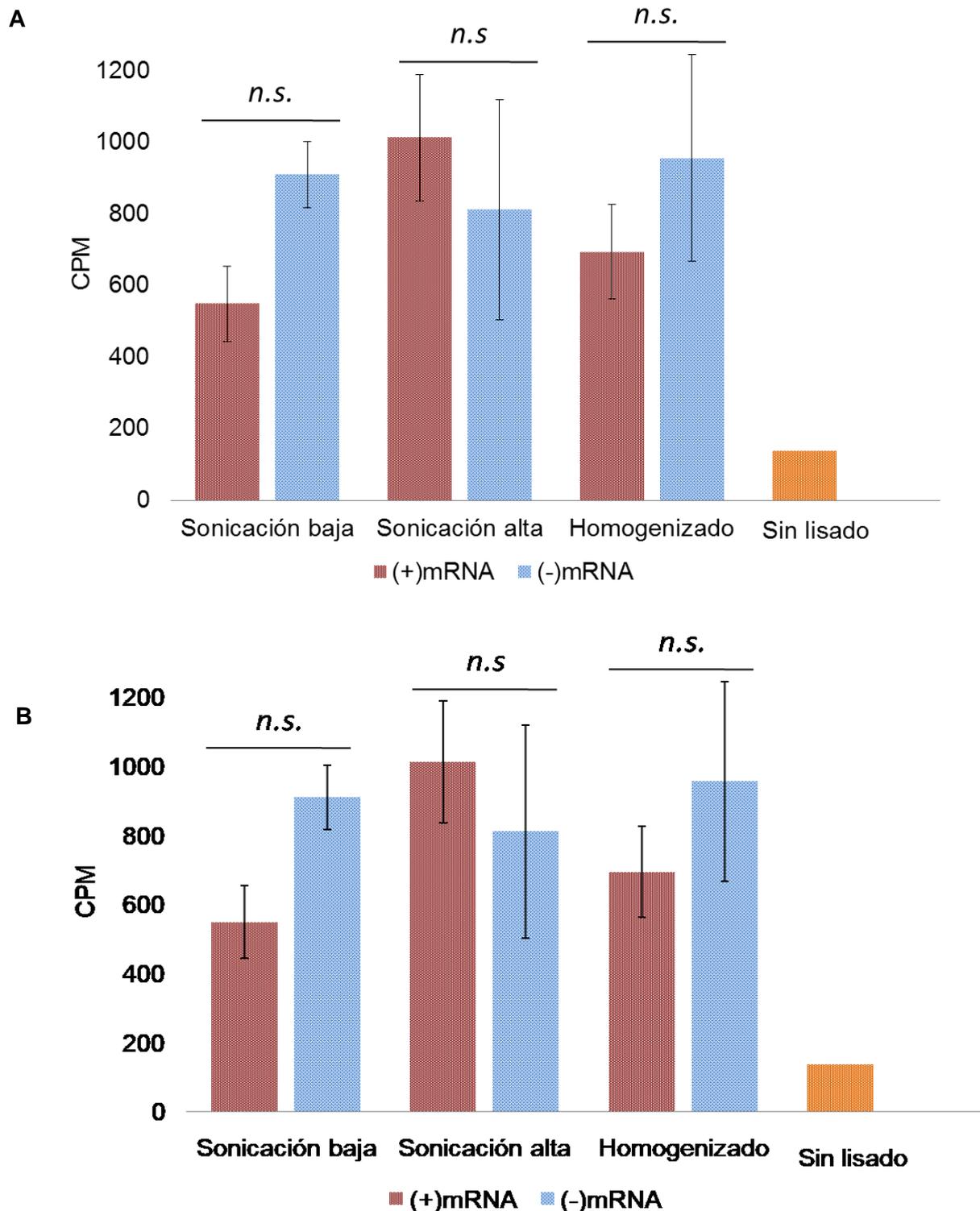
**Figura 4. Diseño del gen reportero.** A) El *gen reportero* se encuentra en el plásmido *pUC57* mide 282 pb, codifica para un *promotor T7* y codifica tres epitopes (*HA*, *FLAG* y *V5*), cada uno en un marco de lectura diferente. B) transcripción *in vitro* del gen reportero. Carril 1) DNA molde linearizado con *XbaI*; Carril 2) el DNA linearizado se transcribió con la RNA polimerasa T7 por 2 h; Carril 3) la reacción se trató con *DNase I* durante 30 min.

En la Figura 5, se muestra la incorporación de metioninas radiactivas durante la síntesis de proteínas *de novo* en los tres extractos mitocondriales de dos experimentos independientes, como molde de utilización utilizo el mRNA reportero de la Figura 4. En la Figura 5 A se observa mayor síntesis del mRNA reportero con sonicación alta, sin embargo,

podemos observar que los controles negativos (sin mRNA) presentan más cuentas por minuto que en los controles positivos.

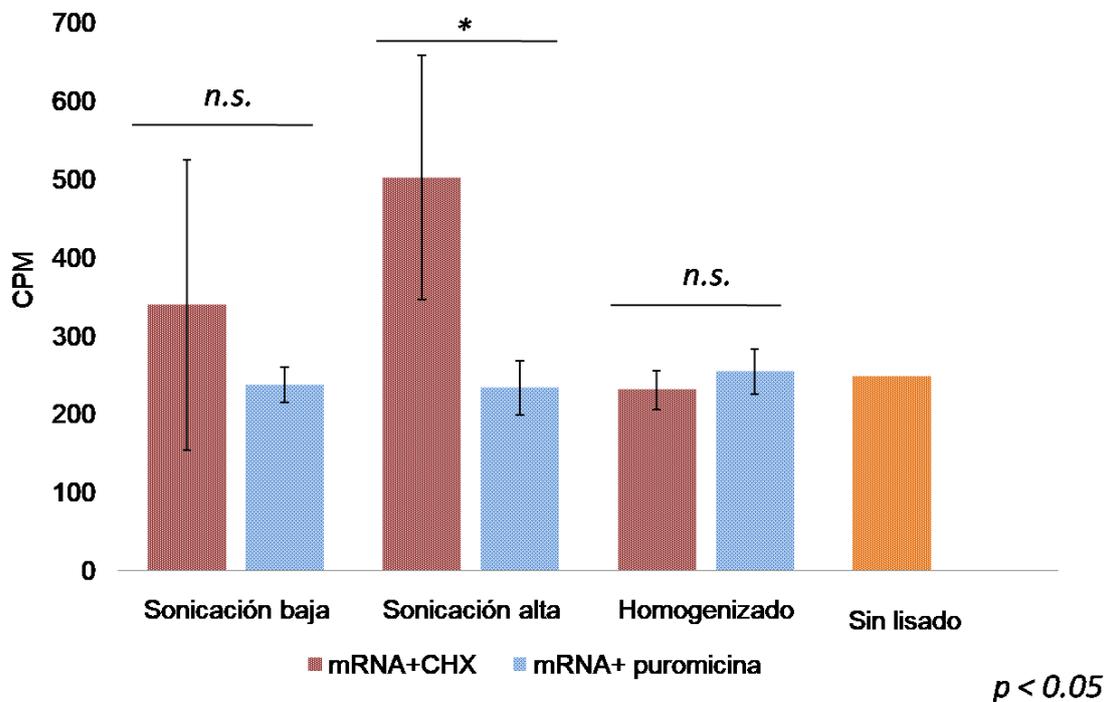
En la Figura 5 B, se observó mayor incorporación de metioninas radioactivas en el extracto obtenido mediante homogenización. Sin embargo, igual que en la Figura 5A, en sonicación baja hay mayor incorporación de metioninas radioactivas en los controles negativos que en los controles positivos. Este patrón se observó en otros ensayos de traducción realizados bajo las mismas condiciones.

Para ver si había diferencias significativas entre las condiciones con y sin el reportero, se realizó una prueba t de *Student* ( $p$  value  $<0.05$ ). Con esta prueba estadística se determinó que no hay diferencia estadísticamente significativa entre ambas condiciones. Por lo tanto, pensamos que el ribosoma no está reconociendo al reportero y que la síntesis de proteínas podría estar ocurriendo a partir de mRNA endógeno ya que la síntesis de proteínas mitocondriales depende del extremo 5'-UTR del mRNA. Pero no sabíamos si la traducción era llevada a cabo por ribosomas mitocondriales o citosólicos presentes en los extractos mitocondriales.



**Figura 5. Ensayo de traducción in vitro con tres métodos de lisis de dos experimentos independientes.** Cuentas por minuto (CPM) de incorporación de [<sup>35</sup>S]- metionina. Se observan mayores CPM con sonicación alta en A y en B con homogenización con el reportero. A y B presentan mayores CPM sin el reportero con sonicación baja (A y B) y homogenización (A). Para cada condición se hicieron 3 repetidos y se analizaron con la prueba t de *student* ( $p$  value <0.05), donde n.s. hace referencia a que no hay diferencia estadísticamente significativa.

Para descartar la posibilidad de que el mRNA se estuviera transcribiendo por ribosomas citosólicos y asegurarnos que la incorporación de metioninas radioactivas era debido a la síntesis de proteínas mitocondriales, agregamos a los tres extractos puromicina, un antibiótico que inhibe la traducción mitocondrial y cicloheximida, que inhibe la traducción citosólica y como molde, usamos el mRNA reportero de la Figura 4. En la Figura 6 se puede observar que al agregar puromicina la incorporación de metioninas radiactivas disminuye a comparación con los extractos con cicloheximida, en sonicación baja y sonicación alta. La prueba estadística *t* de *student* ( $p$  value  $<0.05$ ) nos indicó que con sonicación baja y con el homogenizado no hay diferencia significativa. Sin embargo, si hay diferencia significativa con sonicación alta con cicloheximida y puromicina. Podemos concluir que hay síntesis de proteínas de origen mitocondrial, con sonicación alta sin embargo es poco eficiente.



**Figura 6. Ensayo de traducción con cicloheximida (CHX) y puromicina. CPM de incorporación de metionina** La incorporación de [<sup>35</sup>S]-metionina, probando tres diferentes condiciones de lisis y los antibióticos CHX y puromicina. Se observan diferencias significativas con sonicación alta. Para cada condición se hicieron 3 repetidos y se analizaron con la prueba *t* de *student* ( $p$  value  $<0.05$ ), donde n.s. hace referencia a que no hay diferencia estadísticamente significativa

## **Metodología propuesta para el desarrollo de un sistema de traducción mitocondrial *in vitro* en *S. cerevisiae*.**

Mediante los ensayos de traducción *in vitro* mostrados anteriormente podemos inferir que hay traducción mitocondrial. Sin embargo, la síntesis de proteínas ocurre de manera muy ineficiente. En teoría y con las observaciones del apartado anterior, un lisado de traducción contiene los elementos necesarios (ribosomas, tRNAs aminiácidos, factores de iniciación, elongación, terminación, enzimas metabólicas, chaperonas etc.) activos para la síntesis de proteínas. Sin embargo, en un sistema de traducción *in vitro* es necesario suplementar el lisado con componentes como aminoácidos, nucleótidos, DNA o mRNA de la proteína de interés, un sistema regenerador de energía, y sales que nos ayudan a mimetizar la matriz mitocondrial para obtener una mayor eficiencia en la síntesis de proteínas (Carlson *et al.*, 2012).

En esta tesis se realizó una búsqueda bibliográfica de sistemas de traducción mitocondrial *in vitro* heterólogos reportados en diferentes especies y con base en ellos se diseñó una metodología experimental para la síntesis de proteínas en *S. cerevisiae*. En la Tabla 5 mostramos el resultado de esta búsqueda.

Como primera propuesta y de acuerdo con Pfisterer & Butow (1981), se propone crecer 10 L de cultivo con la cepa Yeast foam, a 30 °C a una O.D.  $\pm$  1.0 midiendo a una absorbancia de 740. Esto con el fin de enriquecer componentes esenciales y limitados para la traducción mitocondrial como factores y activadores traduccionales (Tabla 6).

*S. cerevisiae* es un organismo aerobio facultativo, que en presencia de glucosa prefiere fermentar en lugar de utilizar oxígeno. En estas condiciones reprime genes respiratorios (Gancedo, 1998). Por esta razón las levaduras se cultivaron en YPG, un medio respiratorio con 20% glicerol; bajo estas condiciones garantizamos que las células son completamente dependientes de la expresión de los genes mitocondriales y por lo tanto de la síntesis de proteínas en este organelo. Además, las mitocondrias cultivadas en este medio son más resistentes al daño mecánico durante el proceso de extracción, por lo que es más fácil aislarlas sin contaminación citosólica (Linnane & Lukins, 1975).

Proponemos realizar la extracción de mitocondrias siguiendo la metodología de Pfisterer & Butow (1981) con algunas modificaciones: por ejemplo, cultivar las levaduras en medio YPG y crecerlas a una O.D. 0.7-1.4 midiendo a una absorbancia de 740. Formar los esferoplastos con Zimoliasa 20 T y romper las células con un homogeneizador de vidrio

**Tabla 5. Sistemas de traducción mitocondrial *in vitro* heterólogos publicados.** Resumen de componentes utilizados en sistemas de traducción mitocondrial *in vitro* heterólogos en *Saccharomyces carlsbergensis*, *Neurosporacrassa*, *Mus musculus*, *Bostaurus* y *Euglena gracilis*.

Parámetro	Mamífero		Protista	Hongo		
Referencia bibliográfica	Narayan <i>et al.</i> , 1974	Takemoto <i>et al.</i> , 2009	Avadhani & Butow, 1972	Pfisterer & Butow, 1981	Dekker P., 1993	Blossey & Küntzel, 1972
Sistema	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i>
Organismo	<i>Mus musculus</i>	<i>Bos taurus</i>	<i>Euglena gracilis</i>	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	<i>Neurosporacrassa</i>
Lisis celular	-	Sonicación	Esferas de cristal	Prensa francesa	Sonicación	Sonicación
Lisis mitocondrial	-	-	0.3% desoxicolato de sodio	0.5% desoxicolato de sodio	Sonicación	-
pH	30mM Tris-HCl pH 7.5	50mM Tris-HCl pH 8.5	50mM Tris-HCl pH 7.6	30mM Tris-HCl pH7.8		50mM Tris-HCl pH 8.0
Temperatura	35°C	37°C	37°C	-	30°C	37°C
Tiempo (min)	30	30	30	60	30	60
K+	120mM Cloruro	30mM cloruro	25 mM cloruro	100 mM cloruro	-	50 mM cloruro
Mg2+	15mM acetato	7mM Cloruro	-	10mM acetato	15mM acetato	11mM acetato
NH4+	-	-	-	100mM Cloruro	60mM Cloruro	100mM cloruro
B-ME	7mM	-	-	-	-	-
Radiactividad	[3H]-Fenilalanina	[14C] Phe- tRNA	[14C]-aminoácidos	[35S]-Metionina	[3C]-Fenilalanina	[12C]-aminoácidos
mRNA/Reportero	Poly (U)	Poly (U)	80ug de RNA total	1mM	Poly (U) COX 2	[12C]-aminoácidos
tRNA	Levadura	0.8- 1.5mM	<i>E.coli</i>	10ug ( <i>E. coli</i> )	0.1nmol/ml	0.6 mg/ml ( <i>E.coli</i> )
DTT	-	1mM	-	2mM	-	1mM
Espermidina	-	1mM	-	-	-	-
ATP	0.5mM	-	0.0015M	1mM	-	4mM
GTP	0.1mM	0.5mM	0.003 M	20uM	1mM	2mM
Sistema regenerador de energía	3mM PEP	2U/ml PK	0.006M	-	-	20 ug/ml PK 5mM PEP

Para obtener una mayor incorporación de [<sup>35</sup>S]-metionina en un sistema *in vitro*, la composición iónica es muy importante. Uno de los iones más abundantes en la célula es el potasio. En sistemas procariontes el potasio es importante para el plegamiento de las proteínas, ya que disminuyen la repulsión de cargas. La síntesis de proteínas en estos sistemas tiene altos requerimientos de cloruro de potasio (KCl), en concentraciones alrededor de 60-120 mM (Butow & Wood, 1978). Además, cabe destacar que en las metodologías publicadas (Tabla 5) se utilizan cloruros. Por ello en esta tesis proponemos remplazarlos por acetatos ya que de acuerdo con González (2016) los cloruros inhiben la traducción durante la iniciación, debido a que se unen a la subunidad pequeña evitando la unión del mRNA cuando se usan concentraciones por encima de 50 mM. Por lo tanto, es muy importante determinar las concentraciones óptimas de potasio (Jackson, 1991; González, 2016). Para ello, proponemos hacer una curva de concentración probando 0, 50 y 100 mM de acetato de potasio.

Otro de los componentes más importantes en la célula es el magnesio. Este ion actúa estabilizando grupos cargados negativamente como los grupos fosfato en los ácidos nucleicos y como cofactor de muchas enzimas, especialmente aquellas que requieren ATP para su funcionamiento, como es el aminoacil tRNA sintetasa (Pilchova *et al.*, 2017).

El magnesio también es necesario para la asociación de las subunidades ribosomales. Por ejemplo, en *E. coli* se necesitan concentraciones de magnesio por arriba de 15mM para que se forme el complejo 70S. Por otra parte, bajas concentraciones de este ion promueven el reciclamiento de los ribosomas ya que a una concentración 1mM se disocia el complejo 70S (Nierhaus, 2014). Estudios indican que en la traducción mitocondrial se requiere una concentración del ion magnesio 5-10 mM (Butow & Wood, 1978), por lo que para el lisado proponemos usar una concentración de 10 mM de magnesio.

La temperatura es uno de los principales parámetros que determina una mayor tasa de síntesis de proteínas, así como el correcto plegamiento y la funcionalidad de la proteína recién sintetizada. La temperatura óptima para la traducción *in vitro* mitocondrial reportada va de los 30°C a los 37°C (Butow & Wood, 1978). Sin embargo, estas temperaturas están reportadas para mamíferos, protistas y hongos filamentosos. Por lo tanto, se propone hacer una curva de temperatura de los 25°C a los 30°C, para definir la temperatura óptima de síntesis de proteínas en *S. cerevisiae*.

Por último, para monitorear la síntesis de proteínas se propone utilizar los genes *Reporter2* y *Reporter2LL* como reporteros, los mapas de ambos genes se muestran en la Figura 7.



Ambos genes codifican un promotor T7, un codón de inicio (AUG), un codón de termino (UAA) y tripletes TGA en los tres marcos de lectura, que codifican paro en la traducción citosólica, pero en el código genético mitocondrial codifican para triptófano. Estos codones UGA se incluyeron para evitar el uso de antibióticos como cicloheximida, que se disuelve en etanol y podría inhibir la síntesis de proteínas.

Para detectar la posible síntesis de proteínas en alguno de los tres marcos de lectura, este gen reportero codifica para tres epitopes diferentes (HA, FLAG y V5), uno en cada marco de lectura, y que serán detectados por *Western blot*. Además, codifica para metioninas para posibilitar una mayor incorporación de [<sup>35</sup>S]-Metionina al péptido nascente, lo que facilitaría la cuantificación (CPM) del reportero en un ensayo de traducción *in vitro*.

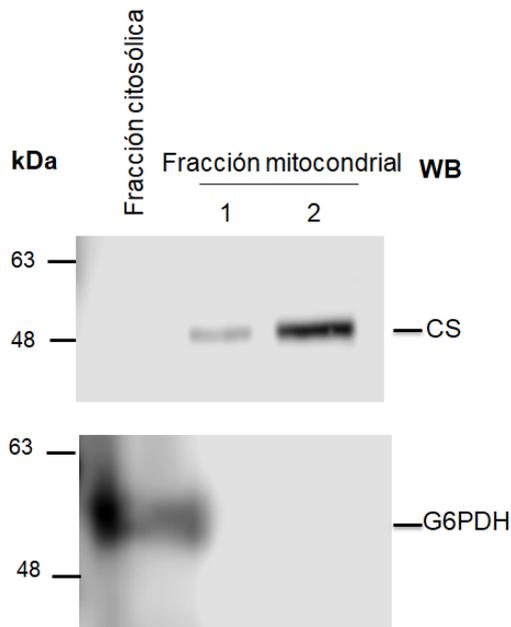
Los reporteros también presentan características distintivas del gen mitocondrial COX2, el cual se observó que su traducción no se ve afectada cuando se rompe el gradiente de protones (Figura 2). El gen *Reporter2* será nuestro control positivo, mide 348 pb, posee el extremo 5'-UTR de COX2, esencial para el reconocimiento de Pet111, y un dodecámero involucrado en procesamiento, estabilidad y traducción del mRNA (Butow *et al.*, 1989). Por otra parte, el gen *Reporter2LL* mide 294 pb, no posee el extremo 5'-UTR de COX2 ni el dodecamero y funcionará como nuestro control negativo.

**Tabla 6. Resumen de las condiciones propuestas en esta tesis para el establecimiento de un sistema de traducción mitocondrial *in vitro* en *S. cerevisiae*.**

Parámetro	Condición utilizada	Condiciones propuestas	Referencia
Medio de cultivo	YPGal	YPG	Gacedo, 1998; Linnane & Lukins, 1975
Lisis celular	Homogeneizador de vidrio	Homogeneizador de vidrio (Dounce)	
Lisis mitocondrial	Sonicación/ Homogeneizador de vidrio	Sonicación alta	
pH	200mM Hepes KOH pH 7.4	30mM Tris-acetato pH 7.8	Pfisterer & Butow, 1981
Temperatura	25°C	25°C- 30°C	
Tiempo (min)	120	60	Pfisterer & Butow, 1981
K <sup>+</sup>	-	0, 50, 100mM acetato	Butow & Wood, 1978; Pfisterer & Butow, 1981
Mg <sup>2+</sup>	3.5mM	10mM acetato	Butow & wood, 1978
Reportero	<i>Reporter</i>	Genes Reporter2 y Reporter2LL	
tRNA	60ng	10 µg	Spirin & Swartz, 2008
DTT	0.6mM	2mM	Spirin & Swartz, 2008
ATP	1mM	1mM	Spirin & Swartz, 2008
GTP	0.03 mM	20µM	Spirin & Swartz, 2008
Sistema regenerador de energía	20ug/ml PK 5mM PEP	20ug/ml PK 5mM PEP	

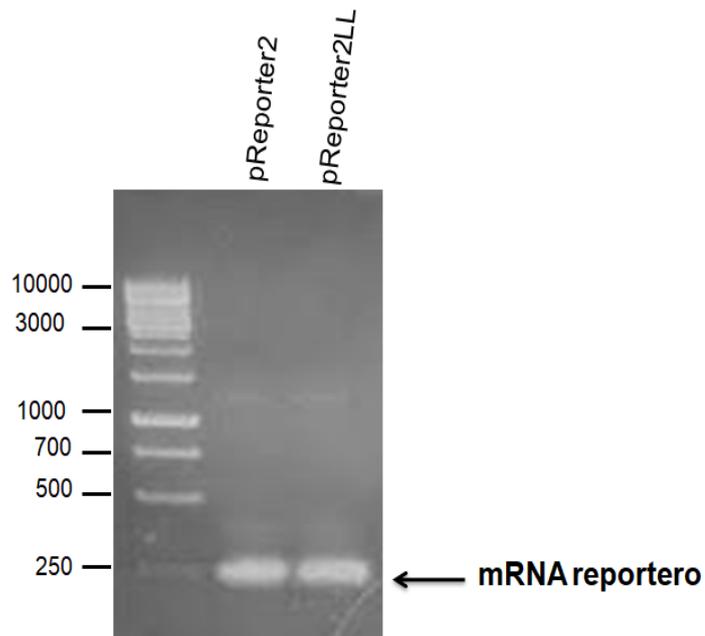
Como parte de la primera propuesta las fracciones mitocondriales se aislaron de acuerdo a Pfisterer & Butow (1981), con algunas modificaciones. Las células fueron crecidas en medio YPG con 2 % glicerol, hasta una O.D. 0.7-1.4, midiendo a una absorbancia de 740. Los esferoplastos se formaron con zimoliasa 20 T y se rompieron

con un homogeneizador de vidrio. Con estas modificaciones se obtuvo la fracción mitocondrial libre de contaminación citosólica en una concentración de 1.918 mg/ml de mitocondrias (Figura 8).



**Figura 8. Extracción de la fracción mitocondrial con la metodología modificada de Pfisterer & Butow (1981).** *Western blot* contra citrato sintasa (CS) y contra glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) para corroborar que no hay contaminación citosólica en la fracción mitocondrial. En esta tesis se corrieron dos fracciones independientes (1 y 2) de la fracción mitocondrial.

También se transcribieron *in vitro* los reporteros *Reporter2* y *Reporter2LL* utilizado para su obtención a la T7 RNA polimerasa (Figura 9). Para el reportero *Reporter2* se obtuvo una concentración de mRNA de 172 ng/ $\mu$ l y para el reportero *Reporter2LL* se obtuvo una concentración de mRNA de 174.32 ng/ $\mu$ l.



**Figura 9. Transcripción *in vitro* de los genes reporteros.** El mRNA se obtuvo en una concentración final de 172 ng/ $\mu$ l para el gen *pReporter2* y 174.32 ng/ $\mu$ l para el gen *pReporter2LL*.

En esta tesis solo logro llegar hasta este punto de la nueva metodología propuesta, debido a la falta de tiempo, reactivos y espacio para su demostración experimental. Sin embargo hasta este punto hemos observado que bajo nuestras primeras condiciones si hay traducción mitocondrial *in vitro* y se espera en un futuro poder comprobar experimentalmente las bases teóricas sentadas en esta tesis.

## DISCUSIÓN

En teoría, deber poder establecer un sistema de traducción *in vitro* de cualquier organismo a partir de un lisado, ya que este contiene todos los componentes macromoleculares necesarios como ribosomas, tRNAs, amino tRNA sintetetasas, ATP, GTP y factores de inicio, elongación y terminación (Carlson *et al.*, 2019; González, 2016). Aunque actualmente se han desarrollado sistemas de traducción citosolicos *in vitro* muy eficientes en eubacterias y eucariontes, esto no se ha conseguido lograr en mitocondria.

Se han publicado 6 trabajos que reportan haber optimizado un sistema de traducción mitocondrial *in vitro*. En ellos se reportan la síntesis de péptidos pequeños sintetizados a partir de templado poli (U) y aminoácidos radioactivos. Desafortunadamente, ninguno de estos sistemas reportados es lo suficientemente eficientes para estudios más complejos, además de ser poco reproducibles.

En su mayoría los datos reportados se obtuvieron mediante sistemas heterólogos, con componentes de origen bacteriano o de levadura. Sin embargo, debemos considerar, que debido a la divergencia de la maquinaria traduccional de este organelo con respecto a la maquinaria traduccional citosólica y bacteriana, la síntesis de proteínas en este organelo presenta características únicas. Es por esto que para el desarrollo de un sistema de traducción mitocondrial *in vitro* es muy importante que los componentes sean homólogos.

En esta tesis se intentó establecer un protocolo para la obtención de un lisado de traducción mitocondrial *in vitro* de *S. cerevisiae* con factores homólogos bajo tres condiciones de sonicación baja, sonicación alta y homogenizado. En los resultados mostrados podemos observar que el lisado presenta traducción mitocondrial a partir de RNA endógeno, pero con muy baja eficiencia. Esto podría ser debido a que alguno de los componentes utilizados está inhibiendo la síntesis de proteínas o debido a que no estamos usando las condiciones adecuadas que asemejen el ambiente óptimo para la síntesis de proteínas mitocondriales. Es por ello que en esta tesis se propone una nueva metodología basada en datos ya publicados que reportan ser útiles para un sistema de traducción mitocondrial *in vitro* y que se resume en la Tabla 6.

El primer punto clave que hay que considerar en la traducción mitocondrial es la necesidad de tener presente a la membrana interna mitocondrial. En la Figura 2 mediante un ensayo de traducción *in organello* se demostró que el gradiente electroquímico no juega un papel relévate en la traducción mitocondrial. A partir de este resultado nosotros proponemos romper ligeramente la membrana, de tal manera que se conserven los ribosomas anclados y traduccionalmente activos.

Otra característica interesante que hay que considerar es que *S. cerevisiae* es un organismo anaerobio facultativo, por lo tanto, el medio de crecimiento es un factor importante. En este trabajo se propone el aislamiento de la fracción mitocondrial a partir de un medio respiratorio como el medio YPG, esto con el fin de evitar la represión por catabolito, mantener la expresión del genoma mitocondrial y por lo tanto la maquinaria traducción viable y activa.

Dentro los componentes y parámetros más importantes dentro de un sistema de traducción *in vitro* están el pH, la composición iónica, ATP, un sistema regenerador de energía, la temperatura y el tiempo de reacción. Para proponer los intervalos aproximados de magnesio y potasio, nos basamos en los datos ya reportados en lisados mitocondriales, así como, en lisados de *E.coli*. Sin embargo, aún desconocemos cuáles van a ser la temperatura y las concentraciones definitivas para *S. cerevisiae*. Es por ello que preponemos hacer curvas de concentración para determinarlas.

Consideramos que estos son parámetros importantes en lisado, debido a que influyen directamente en el ensamblaje de la maquinaria traduccional y en la síntesis de proteínas, plegamiento de las proteínas, así como, en la actividad de las enzimas involucradas en la traducción.

Para detectar y medir la síntesis de proteínas se diseñaron y transcribieron *in vitro* dos genes reporteros (pRepoter2 y pReporter2LL), que poseen características del mRNA de COX2. Entre las que cabe destacar la secuencia de extremos 5'-UTR importante para la formación del complejo de inicio conformado por Pet111, la subunidad pequeña del ribosoma y el mRNA. Se sabe que el complejo formado por Pet111 con el extremo 5'-UTR ayuda a posicionar al ribosoma en el AUG de inicio. Consideramos que estas características del inicio de la traducción son muy importantes para el desarrollo de un sistema de traducción *in vitro* en mitocondria, debido a que, es en este punto cuando el complejo interacciona con la membrana interna y factores traduccionales y proteínas encargadas de censar el posicionamiento correcto del ribosoma; del mRNA en el ribosoma, así como, la inserción del péptido recién sintetizado en la membrana interna mitocondrial.

## CONCLUSIONES

- El gradiente electroquímico de protones no afecta la traducción mitocondrial de las subunidades Cox2, Cytb y Cox3 pero las de Var1 y Cox1.
- Los lisados de traducción *in vitro* son traduccionalmente activos, sin embargo, presentan baja eficiencia.
- Se propone nuevas condiciones para un lisado mitocondrial *in vitro* homólogo en *S. cerevisiae* como:
  - Medio de cultivo
  - Método de lisis
  - Dos mRNAs reporteros
  - Intervalos para determinar las concentraciones óptimas de potasio y temperatura.

## PERSPECTIVAS

- Determinar las condiciones óptimas lisis, de temperatura y potasio para un lisado de traducción *in vitro*, probando los mRNAs reporteros.
- Cuantificar la síntesis de proteínas de *novo* marcadas con [<sup>35</sup>S]- metionina e identificar los epitopes mediante *Western blot*.

## ANEXO

### Lista de cepas utilizadas en esta tesis.

Cepa	Genotipo	Referencia
YC133	Mat $\alpha$ , ura3 $\Delta$ ,ade2nuc1 $\Delta$ ::KanMX4[p <sup>+</sup> ]	Zamudio <i>et al.</i> 2014
Yeast Foam	<i>Wild type</i>	Colección de la Dra. Xóchitl Pérez Martínez

### Lista de medios de cultivo utilizados

- **Medio YPGal (1 L)**  
Extracto de levadura: 10 g  
Bactopeptona: 20 g  
Galactosa: 20 g
- **Medio de cultivo YPG (1 L)**  
Extracto de levadura: 10 g  
Glicerol: 20 ml  
Bacto peptona: 20 g
- **Medio de cultivo YPD (1 L)**  
Extracto de levadura: 10 g  
Peptona: 20 g  
Dextrosa: 20 g  
Agar: 20 g
- **Medio LB (1L)**  
Bactopentona: 10g  
Extracto de levadura: 5g  
NaCl: 10g

### **Amortiguadores utilizados para la purificación de mitocondrias**

- **TD (Tris-DTT)**

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

DTT: 10 mM

- **MPZ**

Sorbitol: 1.2 M

Buffer de fosfatos (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) pH 7.4: 20 mM

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

- **Homegenización (Dounce)**

Tris pH 7.4: 10 mM

EDTA pH 8.0: 1 mM

BSA: 0.2% (p/v)

TLCK: 50 µg/ml

Sorbitol: 0.6 M

PMSF: 1 mM

- **SHE**

Sorbitol: 0.6 M

Hepes: 20 mM

### **Amortiguadores utilizados para la cuantificación de mitocondrias por el método de Lowry (Modificado Markwell *et al.*, 1978)**

- **Solución A**

Na<sub>3</sub>CO<sub>3</sub>: 2% (p/v)

NaOH: 0.4% (p/v)

Na<sub>2</sub>tartrato: 0.16% (p/v)

SDS: 1% (p/v)

- **Solución B**  
Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>· 5H<sub>2</sub>O: 4% (p/v)
- **Solución C**  
Solución A/ solución B: 100/1
- **Solución D**  
Reactivo de Folin / H<sub>2</sub>O: 1/1

**Amortiguadores utilizados para la purificación de mitocondrias para el ensayo de traducción mitocondrial *in organello***

- **Amortiguador 1.5X oITL con 0.2% (v/v) de piruvatocinasa**

	<b>Solución concentrada</b>	<b>Adicionar para 1ml</b>
<b>Sorbitol</b>	2.4 M	375 µl
<b>KCl</b>	1 M	225 µl
<b>Amortiguador de fosfatos pH 7.2</b>	1 M	22.5 µl
<b>Tris-HCl pH 7.4</b>	1 M	30 µl
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	1 M	19 µl
<b>Albumina</b>	100 mg/ml	45 µl
<b>ATP**</b>	200 mM	30 µl
<b>GTP**</b>	50 mM	15 µl
<b>Aminoácidos (-met, -tyr,-cys)</b>	2 mg/ml	9.1 µl
<b>Cisteína</b>	10 mM	10 µl
<b>Tirosina</b>	1mg/ml	18.2 µl
<b>Ácido α-cetoglutarico</b>		1.7 mg
<b>Fosfoenolpiruvato</b>		3.5mg
<b>Piruvatocinasa**</b>		3.5mg

\*\* Agregar estos reactivos hasta el final.

- **Amortiguador SHP**  
Sorbitol: 0.6 M  
Hepes pH 7.4: 20 mM  
Inhibidor de proteasas (SIGMA): 6.6 µl/ 10ml de amortiguador
- **Amortiguador de carga 2X Laemmli (Laemmli, 1970)**  
Tris-HCl pH 6.8: 100mM  
SDS: 20% (p/v)  
Glicerol: 20% (v/v)  
B-mercaptoetanol 2% (adicionar al momento de cargar las muestras)  
Mantener las alícuotas a -20°C

**Amortiguadores utilizados para la obtención de la fracción mitocondrial cruda, con medio YPG (Pfisterer & Butow, 1981)**

- **Amortiguador TM**  
Tris- HCl pH 9.3: 100 mM  
EDTA: 20 mM  
B-mercaptoetanol: 15 µl por cada 100 ml de células en suspensión.
- **Amortiguador STE**  
Tris-HCl pH 5.7: 10 mM  
Sorbitol: 1.2 M  
EDTA: 1mM
- **Amortiguador STE pH 6.7**  
Tris-HCl pH 6.7: 10 mM  
Sorbitol: 1.2 M  
EDTA: 1 mM
- **Amortiguador STEB**  
Tris-HCl pH 6.7: 10 mM  
Sorbitol: 0.6 M  
EDTA: 1 mM  
BSA: 0.1% (p/v)

- **Amortiguador ATM**  
Tris- HCl pH 7.5: 10 mM  
NH<sub>4</sub>Cl: 50 mM  
MgOAc: 10 mM  
B- mercaptoetanol: 5 mM
- **Amortiguador STME**  
Tris-HCl pH 6.7: 10 mM  
Sorbitol: 0.5 M  
EDTA: 1 mM

### **Amortiguadores utilizados para el lisado citosólico**

- **Amortiguador II**  
amortiguador A:  
DTT 1X: 2 mM  
Manitol: 8.5% (p/v)  
PMSF: 0.5 mM  
Coctel de inhibidores de proteasas (Roche): 2 tabletas, agregar hasta el momento de utilizar el amortiguador
- **Amortiguador A:**  
Hepes pH 7.4: 150mM  
CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K: 500 mM  
Mg (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>: 10mM
- **Amortiguador de hidratación**  
DTT: 2mM  
PMSF: 0.5 mM
- **Amortiguador de elución**  
amortiguador A:  
DTT 2mM

Coctel de inhibidores de proteasas (ROCHE): 2 tabletas, agregar hasta el momento de utilizar el amortiguador

### **Amortiguadores utilizados para *Western blot***

- **Amortiguador SHP**

Sorbitol: 0.6 M

Hepes pH 7.4: 20 mM

Inhibidor de proteasas (SIGMA): 6.6 µl/ 10ml de amortiguador

- **Amortiguador de Corrida (1L)**

SDS: 10 g

Tris: 30.3 g

Glicina 144.1 g

- **Amortiguador de transferencia (1L)**

SDS: 0.37 g

Tris: 5.8 g

Glicina: 2.9 g

Metanol: 200ml

- **Solución de bloqueo**

Leche *Svelty*: 5% (p/v)

Aforar al volumen requerido con amortiguador PBT (amortiguador PBS + 0.2% tween 20)

- **Amortiguador PBS 10x (1L)**

NaCl<sub>2</sub>: 80 g

KCl: 2 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O: 26.8 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 2.4 g

### **Amortiguadores utilizados para la restricción / linealización de los plásmidos**

- **Amortiguador TBE 10X (1 L)**

Tris: 108 g

Ácido bórico: 55 g

EDTA: 9.3 g

### **Amortiguadores utilizados para la determinación de la integridad de mRNA**

- **Amortiguador TBE 10X (1 L)**

Tris: 108 g

Ácido bórico: 55 g

EDTA: 9.3 g

Aforar a 1 L con agua DEPC

- **Agua DEPC**

Adicionar 100 µl de dietilpírocarbonato (DEPC) por cada 100 ml de agua bidestilada. Agitar durante toda una noche

## BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts, B., & Bray, D. (2006). Introducción a la biología celular. Ed. Médica Panamericana.
2. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., *et al.* (2002). *Drosophila* and the molecular genetics of pattern formation: Genesis of the body plan. *In Molecular Biology of the Cell. 4th edition.* Garland Science.
3. Avadhani, N. G., & Butow, D. E. (1972). Protein synthesis with isolated mitochondrial polysomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 46(2): 773–778.
4. Avadhani, N. G., & Rutman, R. J. (1974). A sensitive in vitro protein synthesizing system from ehrlich ascites mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 58(1):42–49.
5. Beattie, D. S., Basford, R. E., & Koritz, S. B. (1966). Studies on the Biosynthesis of Mitochondrial Protein Components. *Biochemistry*, 5(3), 926–930.
6. Beattie, D. S., Basford, R. E., & Koritz, S. B. (1967). Bacterial contamination and amino acid incorporation by isolated mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 242(14): 3366-3368.
7. Belda, I., Ruiz, J., Santos, A., Van Wyk, N., & Pretorius, I. S. (2019). *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends in Genetics*, 35(12):956-957.
8. Bonnefoy, N., Bsat, N. & Fox, T. D. (2001). Mitochondrial Translation of *Saccharomyces cerevisiae* COX2 mRNA is Controlled by the Nucleotide Sequence Specifying the Pre-Cox2p Leader Peptide. *Molecular and Cellular Biology*. 21(7): 2359–2372.
9. Blosssey, H. C., & Küntzel, H. (1972). *In vitro* translation of mitochondrial DNA from *Neurospora crassa*. *FEBS Letters*, 24(3):335–338.
10. Butow D.E., Wood W.M. (1978). The Mitochondrial Translation System. In: Roodyn D.B. (eds) Subcellular Biochemistry. *Springer*, Boston, MA
11. Butow, R. A., Zhu, H., Perlman, P., & Conrad-Webb, H. (1989). The role of a conserved dodecamer sequence in yeast mitochondrial gene expression. *Genome*, 31: 757 – 760.
12. Carlson, E. D., Gan, R., Hodgman, C. E., & Jewett, M. C. (2012). Cell-free protein synthesis: *Applications come of age*. *Biotechnology Advances*, 30(5):1185–1194.
13. Chacinska, A. & Boguta, M. (2000). Coupling of mitochondrial translation with the formation of respiratory complexes in yeast mitochondria. *Acta Biochimica Polonica*, 47(7): 973-991.
14. Chandel, N.S. (2015). Evolution of Mitochondria as Signaling Organelles. *Cell Metabolism*. 22(2): 204-206.
15. Chatterjee, A., Mambo, E., & Sidransky, D. (2006). Mitochondrial DNA mutations in human cancer. *Oncogene*, 25(34): 4663–4674.
16. Chiron, S., Suleau, A., & Bonnefoy, N. (2005). Mitochondrial translation: elongation factor tu is essential in fission yeast and depends on an exchange factor conserved in humans but not in budding yeast. *Genetics*, 169(4), 1891–190.
17. Cote, A., Papa, B., Ferramosca, A., & Zara, V. (2015). The dimerization of the yeast cytochrome bc1 complex is an early event and is independent of Rip1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Molecular Cell Research*. 1853(5): 987-995.

18. Costanzo, M. C., & Fox, T. D. (1990). Control of Mitochondrial Gene Expression in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Annual Review of Genetics*, 24(1): 91–108.
19. Diekert, K., de Kroon, A. I., Kispal, G. & Lill, R. (2001). Isolation and subfractionation of mitochondria from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Cell Biol* 65:37-51
20. Desai, N., Brown, A., Amunts, A. & Ramakrishnan, V. (2017). The structure of the yeast mitochondrial ribosome. *Science*, 355(6324): 528-531.
21. Dennerlein, S., Wang, C., & Rehling, P. (2017). Plasticity of Mitochondrial Translation. *Trends in Cell Biology*, 27(10), 712-721.
22. Desiderio, E., Escalante, W. (2019). Perspectives and Uses of Non-Saccharomyces Yeasts in Fermented Beverages. *Frontiers and New Trends in the Science of Fermented Food and Beverages*.
23. Derbikova, K. S., Levitsky, S. A., Chicherin, I. V., Vinogradova E. N. & Kamenski P. A. (2018). Activation of Yeast Mitochondrial Translation: Who Is in Charge? *Biochemistry (Moscow)*, 83(2):87-97.
24. Dekker, P. J. T., Papadopoulou, B., & Grivell, L. A. (1993). *In-vitro* translation of mitochondrial mRNAs by yeast mitochondrial ribosomes is hampered by the lack of start-codon recognition. *Current Genetics*, 23(1): 22–27.
25. Fang, J. & Beattie, D. S. (2003). External alternative NADH dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*: a potential source of superoxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(4):478–488.
26. García A. E. (2018). Caracterización de la función de las proteínas Cbp3 y Cbp6 sobre la biogénesis de *Cytb* en mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
27. García A. E., Zamudio A., Camacho Y., García R., Reyes A., et al. (2016). *Evolution of Translation in Mitochondria. Evolution of the Protein Synthesis Machinery and Its Regulation*, 109–142.
28. Gancedo J. M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 62(2), 334–361.
29. Gruschke, S. & Ott, M. (2013). Cap.5 Mechanisms and control of protein synthesis in yeast mitochondria. En editor Anne-Marie Duchêne. *Translation in mitochondria and other organelles*. (pp.109-132). Francia: Ediciones Springer.
30. Herrmann, J. M., & Funes, S. (2005). Biogenesis of cytochrome oxidase—Sophisticated assembly lines in the mitochondrial inner membrane. *Gene*, 354:43–52.
31. Herrmann J.M., Woellhaf, M. W. & Bonnefoy, N. (2013). Control of protein synthesis in yeast mitochondria: The concept of translational activators. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics- Molecular Cell Research*, 1833(2):286-294.
32. Herrmann, J. M., Westermann, B., & Neupert, W. (2001). Analysis of protein-protein interactions in mitochondria by coimmunoprecipitation and chemical cross-linking. *Mitochondria*, 217–230.
33. Jackson, R. J. (1991). Potassium salts influence the fidelity of mRNA translation initiation in rabbit reticulocyte lysates: unique features of encephalomyocarditis virus RNA translation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1088(3): 345–358.
34. Jones, J. L., Hofmann, K. B., Cowan, A. T., Temiakov, D., Cramer, P., et al. (2019). Yeast mitochondrial protein Pet111p binds directly to two distinct targets in COX2 mRNA, suggesting a mechanism of translational activation. *Journal of Biological Chemistry*, 294(18):7528-7536.

35. Karathia, H., Vilaprinyo, E., Sorribas, A., & Alves, R. (2011). *Saccharomyces cerevisiae as a Model Organism: A Comparative Study*. *PLoS ONE*, 6(2), e16015.
36. Kuzmenko, A. V., Levitskii, S. A., Vinogradova, E. N., Atkinson, G. C., Haurlyuk, V., et al. (2013). *Protein biosynthesis in mitochondria*. *Biochemistry (Moscow)*, 78(8): 855–866.
37. Kuzmenko, A., Atkinson, G. C., Levitskii, S., Zenkin, N., Tenson, T., Haurlyuk, V., et al. (2014). Mitochondrial translation initiation machinery: conservation and diversification. *Biochimie*, 100 (100):132–140.
38. Lamb, A. J., Clark-Walker, G. D., & Linnane, A. W. (1968). The biogenesis of mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 161(2):415–427.
39. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5
40. Lightowers, R. N., Rozanska A., & Chrzanowska-Lightowers, Z. M. (2014). Mitochondrial protein synthesis: Figuring the fundamentals, complexities and complications, of mammalian mitochondrial translation. *FEBS Letters*. 588(15): 2496–2503.
41. Linnane, A. W., & Lukins, H. B. (1975). *Chapter 14 Isolation of Mitochondria and Techniques for Studying Mitochondrial Biogenesis in Yeasts*. *Yeast Cells*, 285–309.
42. Liti, G. (2015). *The fascinating and secret wild life of the budding yeast S. cerevisiae*. *eLife*, 4.
43. Liu, M., & Spremulli, L. (2000). Interaction of Mammalian Mitochondrial Ribosomes with the Inner Membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 275(38): 29400–29406.
44. Maréchal, A., Meunier, B., Lee, D., Oregno, C. & Rich, P. R. (2011). Yeast cytochrome c oxidase: A model system to study mitochondrial forms of the haem–copper oxidase superfamily. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1817(4):620-628.
45. Malina, C., Larsson C., & Nielsen, J. (2018). Yeast mitochondria: an overview of mitochondrial biology and the potential of mitochondrial systems biology. *FEMS Yeast Research*, 18(5).
46. Markwell, M. A., Haas, S. M., Bieber, L. L. & Tolbert, N. E. (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 87: 206-21
47. Nelson, D.L., Cox, M. M. (2015). *Lehninger: principios de bioquímica*. (6ª ed.). Omega
48. Nierhaus, H. N. (2014). Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, and the Ribosome. *Journal of Bacteriology*. 196 (22):3817-3819.
49. González, V. (2016). *Caracterización de la secuencia contexto del codón AUG iniciador en mRNA de diversos eucariontes*. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
50. Ott, M., Amunts, A. & Brown, A. (2016). Organization and Regulation of Mitochondrial Protein Synthesis. *Annual Review of Biochemistry*. 85:77-101.
51. Pilchova, I., Klacanova, K., Tatarkova, Z., Kaplan, P., & Racay, P. (2017). The Involvement of Mg<sup>2+</sup> in Regulation of Cellular and Mitochondrial Functions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017:1–8.
52. Pfeffer, S., Woellhaf, M. W., Herrmann, J. M., & Förster, F. (2015). Organization of the mitochondrial translation machinery studied in situ by cryoelectron tomography. *Nature Communications*, 6(1):1-8.

53. Pfisterer, J., & Butow, D. E. (1981). In vitro reconstruction of the mitochondrial translation system of yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(8):4917–4921.
54. Rutter, J., Winge, D. R., & Schiffman J. D. (2010). Succinate Dehydrogenase—Assembly, Regulation and Role in Human Disease. *Mitochondrion*, 10(4):393-401.
55. Sánchez, L. & González, D. (2017). Topología y función de las subunidades intrínsecas de la membrana de las F<sub>1</sub> F<sub>0</sub>-ATP sintasa mitocondriales. *TIP*. 20(2):29-47.
56. Shrestha P., Holland T. M. & Bundy B. C. (2012). Streamlined extract preparation for Escherichia coli-based cell-free protein synthesis by sonication or bead vortex mixing. *Biotechniques* 53:63–174.
57. Siggers, K. A., & Lesser, C. F. (2008). The Yeast *Saccharomyces cerevisiae*: A Versatile Model System for the Identification and Characterization of Bacterial Virulence Proteins. *Cell Host & Microbe*, 4(1):8–15.
58. Spirin, A. S., & Swartz, J. R. (2008). Cell-Free Protein Synthesis Systems: Historical Landmarks, Classification, and General Methods. *Cell-Free Protein Synthesis*, 1–34.
59. Torello, A. T., Overholtzer, M. H., Cameron, V. L., Bonnefoy N. & Fox, T. D. (1996). Deletion of the leader peptide of the mitochondrially encoded precursor of *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome c oxidase Subunit II. *Genetics*. 145 (4):903-10.
60. Tortora, G. J., Funke, B. R. & Case, C.L. (2007). Introducción a la Microbiología. (9<sup>a</sup> ed.). Buenos Aires. Médica Panamericana
61. Veours, J., & Geneviève, A. (2000). The *Saccharomyces cerevisiae* ATP Synthase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 32(4):383–390.
62. Wolters, John F., Chiu, Kenneth. & Fiumera, Heather L. (2015). Population structure of mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics*. 16(1):451.
63. Woronowicz, K., Olubanjo, O.B., Sha, D., Kay, J.M., and Niederman, R.A. (2015). Effects of the protonophore carbonyl-cyanide m-chlorophenylhydrazone on intracyto- plasmic membrane assembly in *Rhodobactersphaeroides*. *Biochim Biophys Acta* 1847: 1119–1128.
64. Zamudio, A., Camacho, Y., García, A. E., & Pérez, X. (2014). The Pet309 pentatricopeptide repeat motifs mediate efficient binding to the mitochondrial COX1 transcript in yeast. *RNA biology*, 11(7): 953-967.
65. Zong, W., Rabinowitz J. D. & White, E. (2016). Mitochondria and Cancer. *Molecular Cell*. 61(3):667- 676.