



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM** POSGRADO 

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAestrÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

FUNCIÓN DE LOS DOMINIOS PPR DE LA  
PROTEÍNA Pet309p SOBRE LA EXPRESIÓN  
DEL GEN MITOCONDRIAL *COX1* DE  
*Saccharomyces cerevisiae*

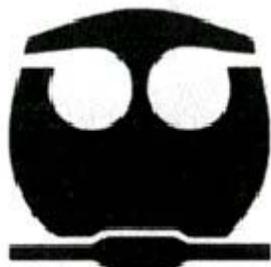
**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

**MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**

**P R E S E N T A :**

Biol. FAVIOLA ISABEL TAVARES CARREÓN



Tutor: DRA. XOCHITL PÉREZ MARTÍNEZ

MÉXICO, D. F.

Octubre 2007



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.

# FUNCIÓN DE LOS DOMINIOS PPR DE LA PROTEÍNA Pet309p SOBRE LA EXPRESIÓN DEL GEN MITOCONDRIAL *COX1* DE *Saccharomyces cerevisiae*

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Xochitl Pérez Martínez en el laboratorio 204 Oriente, en el Departamento de Bioquímica del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se agradece al Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis por sus invaluable comentarios y orientación:

Dra. Xochitl Pérez Martínez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Sobeida Sánchez Nieto	Facultad de Química, UNAM
Dr. Roberto Coria Ortega	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Se reconoce la asesoría técnica de la Dra. Yolanda Camacho Villasana en los experimentos de Northern Blot así como su invaluable colaboración para la realización de esta tesis.

Se reconoce la colaboración del Dr. Alferdo Torres Larios, del Departamento de Bioquímica del Instituto de Fisiología Celular, por la ayuda otorgada para la elaboración del modelo de los dominios PPR de Pet309p.

El proyecto fue apoyado por CONACYT (47514) y PAPITT-UNAM (IN201805).

Durante los estudios de maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

Al honorable Jurado por los comentarios realizados para enriquecer esta tesis:

Presidente	Dr. Armando Gomez Poyou	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dra. Alicia Gonzalez Manjarrez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Secretario	Dr. Roberto Coria Ortega	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dra. Sobeida Sánchez Nieto	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. Javier Plasencia de la Parra	Facultad de Química, UNAM

## **A mis padres**

Gracias por hacer de mi  
una persona independiente, tenaz y perseverante.  
Por su apoyo y amor cuando más lo necesito.

Sin ustedes no hubiera llegado hasta este momento.

## **Ángel**

Gracias corazón por todo el apoyo  
que me has dado en estos últimos años,  
por ser mi amigo incondicional  
y por las innumerables ocasiones que te has  
portado como un verdadero ángel conmigo.

## **AGRADECIMIENTOS**

A nuestra máxima casa de estudios:

**Universidad Nacional Autónoma de México.**

A la Dra. Xochitl Pérez Martínez por todo el apoyo, enseñanzas y el tiempo que ha dedicado a mi formación académica y para el desarrollo de mi proyecto de maestría, pero principalmente por su paciencia, sencillez, exigencias y por ser una excelente jefa de grupo.

A la Dra. Sobeida Sánchez y el Dr. Roberto Coria por la orientación y por sus invaluable comentarios para enriquecer este trabajo presentado.

A los investigadores que formaron parte del jurado de mi examen de grado: Dr. Armando Gómez Puyou, Dra. Alicia Gonzáles Manjarrez, Dr. Roberto Coria Ortega, Dra. Sobeida Sánchez Nieto y Dr. Javier Plasencia de la Parra por sus sugerencias y comentarios en la revisión de la tesis.

A la Dra. Yolanda Camacho por el tiempo y asesoría técnica que fue indispensable para el desarrollo del presente trabajo.

A mis compañeros de laboratorio Angélica, Aldo, Avelino, Idalia, Miguel, Olga y no podía faltar Bernardo. A todos ustedes gracias por hacer una estancia agradable en el laboratorio y un espacio ameno durante las horas de trabajo.

A los miembros del laboratorio 325 Norte: Eli, Mariana, Miguel y Raulito con ustedes he pasado muchas tardes y noches carcajeadas.

A mis hermanas Paulina y Cinthia que con sus ocurrencias me hacen ver que la vida no están difícil como uno cree.

A mis tíos y tías Nacho, Vero, Carmen, Sandra, María, Delia, Ramiro y Elizabeth. Así como mis primitos y primotes Ricardo, Miguel, Mariana, Paty, David y Ramirito.

A la Sra. Rocío Andrade por abrirme las puertas de su casa y facilitarme la vida estos últimos meses. También al pequeño Omaris, con sus travesuras se me olvidaban los momentos de tensión.

A Cristian Cárdenas y Casandra Villava por el tiempo que dedican a escucharme.

A Abel Fernando porque a pesar de la distancia sigue estando presente.

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

A la unidad de Biología Molecular: Dra Laura Ongay, Biól. Minerva Mora y Biól. Guadalupe Códiz por la asesoría en el manejo del equipo y en la ayuda otorgada para la secuenciación y síntesis de oligonucleótidos.

A Leticia García por su atención y apoyo para la realización de todos los trámites escolares que llevé a cabo durante la maestría.

# INDICE

<b>Abreviaturas.....</b>	<b>1</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>2</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>4</b>
1.1 Las mitocondrias tienen su propio material genético.....	4
1.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudio.....	5
1.3 El complejo enzimático: Citocromo c oxidasa.....	6
1.4 Expresión genético mitocondrial.....	9
1.5 Activador traduccional Pet309p.....	14
1.6 Dominios PPR.....	16
<b>2. Justificación.....</b>	<b>21</b>
<b>3. Hipótesis.....</b>	<b>22</b>
<b>4. Objetivos.....</b>	<b>23</b>
<b>5. Material y métodos.....</b>	<b>24</b>
5.1. Cepas y Medios.....	24
5.2. Construcción de la mutante de PET309.....	24
5.3. Transformación de levadura.....	27
5.4. Purificación de mitocondrias.....	27
5.5. Determinación de proteínas por Lowry.....	30
5.6. Western Blot.....	31
5.6.1 Geles de archilamida desnaturalizantes.....	31

5.6.2	Transferencia de proteínas a membrana de PDVF.....	32
5.6.3	Inmunodetección de proteínas en la membrana.....	32
5.7.	Fraccionamiento mitocondrial.....	33
5.8.	Extracción alcalina de proteínas mitocondriales.....	34
5.9.	Protección a la digestión con proteinasa K.....	34
5.10.	Traducción de proteínas mitocondriales <i>in organelo</i> .....	36
5.11.	Extracción de RNA de levadura.....	36
5.12.	Transferencia de RNA a membrana de Nylon-Hybond.....	38
5.13.	Northern blot.....	38
<b>6.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>40</b>
6.1	Complementación de $\Delta pet309$ con <i>PET309-3xHA</i> .....	40
6.2	Construcción de la mutante <i>pet309<math>\Delta</math>ppr</i> .....	41
6.3	Localización de Pet309p $\Delta$ PPR dentro de la mitocondria.....	43
6.3.1	Fraccionamiento mitocondrial.....	44
6.3.2	Extracción alcalina mitocondrial.....	45
6.3.3	Protección a la digestión con proteinasa K.....	46
6.4	Caracterización del fenotipo la mutante <i>pet309<math>\Delta</math>ppr</i> .....	47
6.5	Inmunodetección de Cox1p en la mutante de <i>pet309<math>\Delta</math>ppr</i> .....	48
6.6	Síntesis de proteínas mitocondriales <i>in organelo</i> .....	51
6.7	Análisis por northern blot del mRNA de <i>COX1</i> .....	53
6.8	ARG8m como gen reportero de la traducción.....	55

<b>7. Discusión.....</b>	<b>58</b>
<b>8. Conclusión.....</b>	<b>65</b>
<b>9. Perspectivas.....</b>	<b>66</b>
<b>10. Otros métodos.....</b>	<b>67</b>
<b>11. Literatura citada.....</b>	<b>75</b>

## **Abreviaturas**

ATP	adenosín trifosfato
<i>ATP6</i>	gen de la subunidad 6 de la ATPasa F <sub>1</sub> -F <sub>0</sub>
<i>ATP8</i>	gen de la subunidad 8 de la ATPasa F <sub>1</sub> -F <sub>0</sub>
<i>ATP9</i>	gen de la subunidad 9 de la ATPasa F <sub>1</sub> -F <sub>0</sub>
<i>COB</i>	gen del citocromo b
COX	Citocromo <i>c</i> oxidasa
<i>COX1</i>	gen de la subunidad 1 de la COX
Cox1p	subunidad 1 de la COX
<i>COX2</i>	gen de la subunidad 2 de la COX
Cox2p	subunidad 2 de la COX
<i>COX3</i>	gen de la subunidad 3 de la COX
Cox3p	subunidad 3 de la COX
Cyt b	subunidad del Complejo b-c1
Cyt c1	subunidad del complejo b-c1
DNAmt	DNA mitocondrial
G6PDH	glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
ioTL	- <i>in organelo</i> translation - siglas en inglés
PPR	- pentatricopeptide repeat- siglas en inglés
TPR	- tetratricopeptide repeat- siglas en inglés
3'UTR	región 3' no traducida
5'UTR	región 5' no traducida
3xHA	triple epítotope de hemaglutinina

## Resumen

El complejo enzimático citocromo *c* oxidasa, localizado en la membrana interna mitocondrial es un componente vital y último complejo en la cadena transportadora de electrones. En *Saccharomyces cerevisiae* está compuesta de 12 subunidades. Tres de estas subunidades, Cox1p, Cox2p y Cox3p son codificadas por el genoma mitocondrial y son el centro catalítico del complejo enzimático. La subunidad I de la citocromo *c* oxidasa (Cox1p), codificada por el gen mitocondrial *COX1*, es la subunidad más grande de este complejo respiratorio, tiene 12 cruces transmembranales por lo que es altamente hidrofóbica y parte esencial del núcleo catalítico de la enzima.

La mitocondria es un organelo complejo con un alto contenido de proteínas hidrofóbicas que posee su propio material genético así como la maquinaria necesaria para expresar su genoma. Las mitocondrias requieren de un gran número de proteínas de origen nuclear para poder llevar a cabo la correcta expresión de los genes codificados en su DNA mitocondrial. Los activadores traduccionales son proteínas que reconocen el extremo 5' no traducido de su mRNA mitocondrial blanco para activar la traducción. Se sugiere que estas proteínas pueden mediar la interacción entre la proteína mitocondrial y su sitio de ensamblaje dentro de la membrana interna mitocondrial. La proteína Pet309p es un activador traduccional, la cual tiene origen nuclear. Es específica para el mRNA de *COX1*, y está localizada en la membrana interna mitocondrial. Mutantes nulas de *pet309* son incapaces de respirar, ya que Cox1p no se sintetiza. Pet309p contiene 7 dominios PPR (de sus siglas en inglés "pentatricopeptide repeat") localizados en la parte central de la proteína. Éstos son motivos de 35 aminoácidos arreglados en serie. Se predice que cada motivo PPR forma dos  $\alpha$  hélices, y que el conjunto de motivos PPR forma una cavidad la cual podría unir RNA. Hasta el momento no se sabe cuál puede ser la función de estos motivos PPR dentro de la proteína Pet309p.

En este trabajo nos interesa analizar la importancia de los dominios PPR de la proteína Pet309p sobre la expresión del mRNA de *COX1*. Por medio de PCR se construyó

una versión del gen *PET309* en el que se eliminaron los siete dominios PPR (*pet309Δppr*). Con esta construcción se obtuvieron mutantes de *S. cerevisiae*. Se encontró que la mutante perdió su capacidad respiratoria cuando se crece en un medio no fermentable a base de etanol-glicerol como fuentes de carbono. Aún en sobreexpresión *pet309Δppr* no recobró su capacidad respiratoria. La proteína Pet309pΔPPR se detectó inmunológicamente por western blot. Se observó que se localiza en la fracción mitocondrial, y que se comporta como una proteína unida a la membrana interna mitocondrial de manera periférica, como la silvestre. Se encontró por northern blot que los niveles del mRNA de *COX1* no se ven afectados en la mutante, lo cual sugiere que el efecto de esta mutación es a nivel postranscripcional. Reportes previos han indicado que Pet309 se requiere para la estabilidad del mRNA. Mediante marcaje radioactivo de productos mitocondriales con [<sup>35</sup>S]-metionina se encontró que no hay síntesis de Cox1p en presencia de la mutante *pet309Δppr*. Para corroborar el defecto de la mutante en la traducción, se utilizó una cepa en que los codones del gen mitocondrial *COX1* se reemplazaron por el gen reportero *ARG8m*. Este reportero participa en la biosíntesis de arginina, y se emplea como reportero de la traducción del gen mitocondrial *COX1*. Arg8p codifica para una proteína soluble de matriz mitocondrial cuya expresión no se afecta por el estado de la citocromo c oxidasa. Se observó que la mutante es incapaz de crecer en medio carente de arginina, lo que indica que el fenotipo no respiratorio causado por la mutante *pet309Δppr* es debido a un defecto en la traducción del mensajero de *COX1* y no por un defecto postraduccional. Con todos los resultados obtenidos se concluyó que los dominios PPR de la proteína Pet309p son necesarios para la síntesis de Cox1p, más no para la estabilidad del mRNA de *COX1*.

## **1. Introducción**

Las transformaciones energéticas de la célula tienen lugar en dos principales organelos: mitocondrias y cloroplastos. Las mitocondrias son organelos presentes con algunas cuantas excepciones, en todas las células eucariotas. Se caracterizan por tener una autonomía genética y metabólica importante.

Las mitocondrias poseen una membrana externa que engloba al organelo y permite el libre paso de metabolitos a través de las porinas. Adicionalmente posee los receptores como a las proteínas del complejo de importación.

La membrana interna presenta un gran número de invaginaciones y tiene alta impermeabilidad y selectividad para aniones como el piruvato y para cationes como el potasio, calcio y protones. En esta membrana se establece un gradiente de iones que es esencial para llevar a cabo su función primaria, que es la síntesis de ATP. Además, en ella se encuentran alojados los complejos protéicos que participan en la fosforilación oxidativa y en procesos de transporte. Por otra parte, la matriz mitocondrial es un espacio que contiene una gran cantidad de enzimas solubles, que participan en procesos metabólicos como el ciclo de Krebs, la oxidación de los ácidos grasos, el catabolismo de los aminoácidos, la síntesis de urea, entre otros (Vázquez Memije y Tuena de Gómez-Puyou, 2002).

### **1. 1 Las mitocondrias poseen su propio material genético**

La mitocondria tiene su propio genoma y la maquinaria necesaria para expresar la información contenida en él. El DNA mitocondrial (DNAm<sub>t</sub>) de *S. cerevisiae* es una molécula circular con aproximadamente 75-85 kb. (Maleszka *y col.* 1991). El DNAm<sub>t</sub> codifica para los RNAs ribosomales 15S y 21S, un juego de 24 RNAs de transferencia y ocho proteínas. Siete de los ocho péptidos sintetizados en la mitocondria son

componentes de los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria: Cox1p, Cox2p y Cox3p son subunidades de la citocromo *c* oxidasa; Cytbp, subunidad del complejo b-c1; Atp6p, Atp8p y Atp9p subunidades de la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa. El octavo péptido sintetizado en la mitocondria es Var1, proteína soluble que forma parte de la subunidad chica ribosomal.

El DNAm<sub>t</sub> está especializado en la producción de proteínas hidrofóbicas. El papel del sistema genético mitocondrial es suplementar solo una pequeña porción de proteínas muy hidrofóbicas con dos o más regiones transmembranales, las cuales son componentes de los complejos respiratorios. Estas proteínas son sintetizadas en los ribosomas mitocondriales e insertadas en la membrana interna desde la matriz mitocondrial. A pesar de que las mitocondrias poseen su propio DNAm<sub>t</sub>, la mayor parte de la información para la función y biogénesis mitocondrial se encuentra en el genoma nuclear. La mayoría de las proteínas mitocondriales (más del 90% de ellas), están codificadas en el genoma nuclear de la célula y son sintetizadas en los ribosomas citosólicos para después ser dirigidas hacia la mitocondria y distribuidas hasta el compartimiento o membrana donde ejercerán su función. Los componentes de la cadena respiratoria y de la fosforilación oxidativa que funcionan como bombas de H<sup>+</sup>, están formados por polipéptidos sintetizados mitocondrialmente y por otros de origen citoplásmico.

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

La levadura *S. cerevisiae* ha sido utilizada como un modelo de estudio de los mecanismo de expresión del genoma mitocondrial. Las herramientas genéticas de la levadura están muy bien establecidas y han permitido estudiar la expresión de genes mitocondriales a todos los niveles. En la actualidad la levadura es uno de los pocos organismos en que se puede llevar a cabo manipulación genética del DNAm<sub>t</sub> mediante transformación del organelo (Bonney y Fox, 2001)

*S. cerevisiae*, al ser un organismo anaerobio facultativo ofrece distintas ventajas para estudiar aspectos bioquímicos y genéticos sobre el metabolismo respiratorio. La función respiratoria es dispensable por lo que las células pueden crecer por fermentación. Esto significa que se pueden obtener mutantes respiratorias totalmente viables en fuentes de carbono fermentables (Dieckmann y Staples, 1990). Adicionalmente posee un ciclo de vida que incluye una fase sexual, por lo que es posible abordar estudios con las herramientas que provee la genética formal.

Cuando se presenta alguna mutación en el genoma mitocondrial o nuclear pueden afectar las funciones que se llevan a cabo por la mitocondria. Estas mutantes crecen más lento en comparación de las silvestres y son incapaces de crecer en fuentes de carbono no fermentables como es el lactato, glicerol o etanol. Para distinguir este fenotipo característico de estas mutantes se les llamo "petite" (Sherman, 1963). Las cepas petite forman colonias blancas y pequeñas.

El genoma de las mitocondrias es llamado "*rho*", las cepas silvestres son *rho*<sup>+</sup>, las cepas con alguna supresión en el genoma mitocondrial son *rho*<sup>-</sup> y las cepas que carecen completamente del genoma mitocondrial son *rho*<sup>0</sup> (Burke y col. 2000). La levadura al ser anaerobio facultativo facilita el análisis de mutantes respiratorias lo cual contribuye a explorar con detalle los genes mitocondriales sin afectar la viabilidad de este organismo (Jones y col. 1992).

### **1.3. El complejo enzimático: Citocromo *c* oxidasa.**

La citocromo *c* oxidasa (COX) es el último complejo de la cadena respiratoria mitocondrial. Es un complejo metaloproteico que provee una función crítica en la respiración celular tanto en procariotes como en eucariotes. Está localizada en la membrana interna mitocondrial, donde se lleva a cabo la transferencia de electrones del citocromo *c* al oxígeno molecular. Este complejo cataliza la reacción  $4H^+ + 4e^- + O_2 \rightarrow 2$

H<sub>2</sub>O. La energía liberada en esta reacción exérgica es conservada como un gradiente electroquímico de protones que será usado para la síntesis de ATP.

Tsukihara *y col.* (1996) reportaron la estructura cristalina de la COX de bovino. Posee 13 subunidades, así como dos hemos tipo *a* (*a* y *a*<sub>3</sub>) y dos centros de cobre (Cu<sub>A</sub> y Cu<sub>B</sub>), un átomo de zinc y tres moléculas de fosfatil glicerol. En *S. cerevisiae* la COX está compuesta de 12 subunidades. Las subunidades Cox1p, Cox2p y Cox3p son codificadas por los genes mitocondriales *COX1*, *COX2* y *COX3* respectivamente. Éstas forman el centro catalítico de la enzima. Las subunidades I, II y III son polipéptidos muy hidrofóbicos. La subunidad I contiene 12 cruces transmembranales, mientras que las subunidades II y III, poseen 2 y 7 cruces respectivamente (Capaldi, 1990).

La COX está compuesta de varias subunidades codificadas en el núcleo, sintetizadas en el citoplasma e importadas a la mitocondria. Las 9 subunidades de origen nuclear se encuentran rodeando al centro catalítico del complejo enzimático y no son esenciales para catalizar la reducción del oxígeno y la transferencia vectorial de protones. Las funciones específicas de las subunidades nucleares aún no son completamente comprendidas, pero se conoce que están involucradas en el ensamblaje/estabilidad y dimerización de la enzima (Taanman y Capaldi, 1993). Estas subunidades nucleares también juegan un papel importante en la protección del núcleo catalítico de especies reactivas de oxígeno, así como en la modulación de la actividad catalítica de la enzima (Kadenbach *y col.* 2000).

La importancia de estas subunidades fue demostrada por la pérdida completa de actividad de la COX en cepas de levadura que portaban mutaciones nulas en los genes que codificaban para las subunidades: Cox4p, dos isoformas de Cox5p (Cox5ap y Cox5bp), Cox6p, Cox7p y Cox9p. Esto sugiere un papel esencial para el ensamblaje/estabilidad de la enzima (Fontanesi *y col.* 2006., Barrientos *y col.* 2002., Dowhan *y col.* 1985).

A pesar de que ya se conoce la estructura cristalográfica de la citocromo *c* oxidasa de bacteria y bovino (Iwata *y col.* 1995, 1999; Tsukihara *y col.* 1996), la manera mediante la cual la holoenzima es ensamblada en la mitocondria es aún poco comprendida.

El ensamblaje de la holoenzima COX requiere de un gran número de factores nucleares. En humanos las deficiencias en la actividad de la COX provocan muchas enfermedades mitocondriales. Entre las enfermedades y síntomas que afectan a los pacientes con estas afecciones están los trastornos progresivos en el sistema nervioso central, como el Síndrome de Leigh, problemas hepáticos y encefalomiopatias. Las mutaciones en los genes *COX1*, *COX2* y *COX3* que codifican para el centro catalítico son los más reportados en los pacientes, aunque varias de estas enfermedades se asocian a genes nucleares (Barrientos *y col.* 2002).

La subunidad I de la citocromo *c* oxidasa (Cox1p) está codificada por el gen mitocondrial *COX1*. Es la subunidad más grande de este complejo y parte esencial del mismo. Es una proteína altamente hidrofóbica con 12 cruces transmembranales. Cox1p contiene dos centros redox, uno formado por el hemo **a** de bajo spin y el segundo centro binuclear hemo **a<sub>3</sub>-Cu<sub>b</sub>** de alto spin.

En levadura se han caracterizado varias proteínas nucleares que facilitan la expresión del gen *COX1* (Pel *y col.* 1992). Una de las proteínas que juega un papel importante en la biogénesis de *COX1* es Mss51p. Ésta es requerida para la traducción del mRNA maduro de *COX1* e interacciona con Cox1p recién sintetizada (Decoster *y col.* 1990; Pérez-Martínez *y col.* 2003). Se han encontrado más de 100 genes que son requeridos para la biogénesis de *COX1*, sin embargo poco se comprenden los mecanismos de su biogénesis (Fox, 1996a).

#### 1.4. Expresión Genética Mitocondrial

La biogénesis mitocondrial es un proceso complejo que requiere de una variedad de factores nucleares y mitocondriales. Por análisis genético de la biogénesis mitocondrial en *S. cerevisiae* y otros modelos se han identificados numerosos genes que codifican para proteínas necesarias en la expresión genética mitocondrial. Estas proteínas son codificadas en el núcleo, traducidas en el citoplasma e importadas a la mitocondria. Algunas de ellas actúan de manera gen-específico. Estos factores gen-específicos controlan la expresión de genes mitocondriales a nivel postranscripcional, incluyendo el procesamiento de pre-mRNA mitocondriales, estabilización de los transcritos, traducción de los mRNA o ensamblaje de los productos traducidos dentro de la membrana interna y del complejo enzimático (Costanzo y Fox, 1990).

Los activadores traduccionales son una familia de proteínas codificados por genes nucleares que actúan en *trans* activando la expresión de los genes mitocondriales. Estas proteínas reconocen el extremo 5' no traducido (5'UTR) de su mRNA blanco para activar su traducción (Fox, 1996) (Figura 1).

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

Los mensajeros mitocondriales al no poseer 5'cap y carecer de cola Poly(A) contienen en su lugar extremos 5'UTR como secuencias guía para la traducción. El 5'UTR varía de tamaño desde 50 nucleótidos hasta cientos.

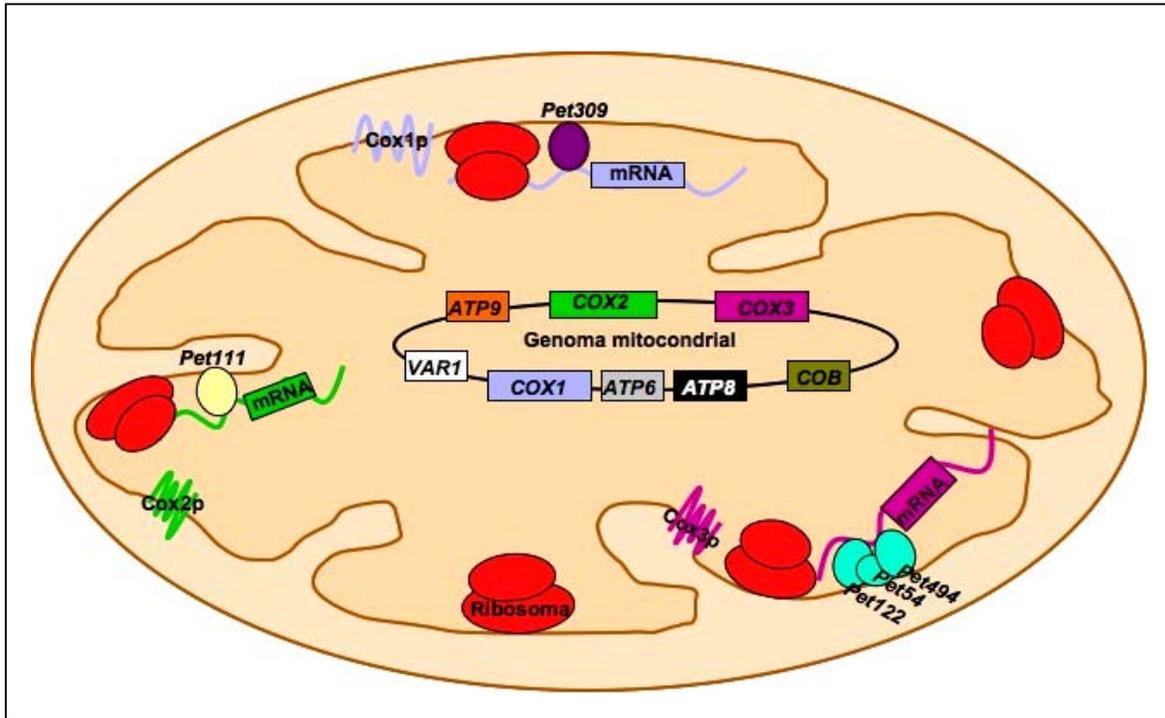
Los 5'UTRs de los diferentes mRNA son funcionalmente intercambiables. Por ejemplo, la traducción del mRNA de *COX3* partiendo de un mRNA quimérico con el 5'UTR

del mRNA de *COB* (citocromo *b*) es totalmente traducido e insertado dentro del complejo de la citocromo *c* oxidasa, permitiendo que la célula respire (Costanzo y Fox, 1986). Esto es posible debido a que la traducción del mRNA de *COX3* es dependiente de los activadores de *COB*. Se ha observado que mutantes de los genes que codifican para los activadores traduccionales muestran un fenotipo no respiratorio debido a la ausencia de la proteína para la que es específica, aunque su correspondiente mensajero esté presente (Costanzo y Fox, 1990).

La activación traduccional en las mitocondrias de levadura es un sistema muy eficiente, ya que requiere de una o más proteínas activadoras traduccionales por cada mensajero mitocondrial. Se ha encontrado que la traducción de 7 de 8 mensajeros mitocondriales depende de los activadores traduccionales debido a su alta hidrofobicidad. Las proteínas Cox1p, Cox2p y Cox3p requieren específicamente de los siguientes activadores: Pet309p activador específico de *COX1*, Pet111p activador de *COX2* (subunidad II de la COX) y Pet122p, Pet494p y Pet54p todos ellos activadores de *COX3* (subunidad III de la COX) (Grivell, 1995) (Figura 1).

Una característica importante de los activadores traduccionales es su asociación con la membrana interna mitocondrial. Los activadores Pet111p, Pet122p y Pet494p son proteínas integrales de membrana como se demostró por tratamiento con carbonato alcalino de las fracciones membranales mitocondriales (Haffter *y col.*, 1990; McMullin y Fox, 1993). En contraste, Pet54p y Pet309p son proteínas periféricas de la membrana interna (McMullin y Fox, 1993; Shingú y Pérez-Martínez, datos no publicados).

Hay evidencia que demuestra que los activadores específicos de *COX3* (Pet122p, Pet494p y Pet54p) forman un complejo (Brown *y col.* 1994). Un reporte adicional demuestra una interacción entre los activadores de *COX3* con el activador de *COX1* (Pet309p) (Naithani *y col.* 2003). Esta red de interacciones entre los activadores traduccionales indica que la maquinaria traduccional mitocondrial está perfectamente organizada y regulada.



**Figura 1.** Modelo de acción de los activadores traducciónales. Los activadores traducciónales aproximan al mRNA hacia la membrana interna donde se localizan los ribosomas mitocondriales y permitir la inserción co-traduccional de las proteínas.

Se ha demostrado que una mutación localizada en el 5'UTR de *COX3* fue suprimida por alteraciones de *PET122* o por sobreproducción del activador traduccional Pet494p. Igualmente, una mutación que afecta el 5'UTR del mRNA de *COX2* fue contrarestanda por una sola sustitución o por un incremento en la dosis del activador traduccional Pet111p. Estos aportes genéticos apoyan fuertemente la idea de una interacción directa entre el activador traduccional y el 5'UTR (Mulero y Fox, 1993b; Costanzo y Fox, 1993).

Una mutante de *PET122* provocó en la célula incapacidad respiratoria, la cual fue suprimida por una mutación en un gen que codifica para una proteína de la subunidad pequeña ribosomal (Haffter *y col.* 1990). Esto sugiere la interacción directa entre el

activador traduccional Pet122p y el ribosoma. Por lo que se propone que los activadores traduccionales acercan a los ribosomas mitocondriales con el mRNA que será traducido.

Estos datos en conjunto sugieren que existe una interacción entre el activador traduccional, el 5'UTR y el ribosoma, y de esta manera posicionar al ribosoma sobre el codón de inicio correcto del mensajero. Al estar los activadores asociados a la membrana, la traducción debería ocurrir en la superficie de la membrana interna mitocondrial. Tal acoplamiento permitiría la inserción co-traduccional de las proteínas mitocondriales dentro de los complejos respiratorios (Figura 1).

Este mecanismo tan complejo, en el cual cada mRNA requiere su propio activador para la traducción, permite distinciones topológicas entre los sitios de síntesis para cada proteína mitocondrial. Tal organización podría promover eficientemente el ensamblaje de los complejos de la cadena transportadora de electrones dentro de la membrana interna mitocondrial.

El mecanismo por el cual se selecciona el sitio correcto de inicio de la traducción es aún desconocido, pero lo que se distingue es que el inicio de la traducción requiere de los activadores traduccionales (Fox, 1996a). Los activadores específicos para cada mensajero mitocondrial pueden estar involucrados en el posicionamiento del ribosoma sobre el correcto codón de inicio.

Los extremos 5'UTR de los mensajeros contienen secuencias complementarias al extremo 3' terminal del rRNA 15S similar a la caja tipo "Shine-Dalgarno" presente en procariontes. No hay evidencia de que esta interacción sea totalmente funcional, por dos razones. La primera es que la probable secuencia "Shine-Dalgarno" esta a una distancia considerablemente alejada del codón de inicio. Segundo, un mensajero quimérico que carece de esta secuencia "Shine-Dalgarno" es traducido normalmente *in vivo* (Costanzo y Fox, 1988).

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

A pesar de ello, se han reconocido secuencias necesarias para la traducción de dos mensajeros mitocondriales. El primero, el extremo 5'UTR de *COX2*, presenta 31 nucleótidos requeridos para la traducción, tal secuencia está conservada en diversas especies de levadura (Fox, 1996b). El segundo mensajero que posee una región indispensable para la traducción es *COX3*, su región 5'UTR contiene 151 nucleótidos ubicados entre los -480 y -330 nucleótidos respectivos al codón de inicio. Estos 151 nt contienen secuencias que son suficientes para activar la traducción (Wiesenberg *y col.* 1995).

Los activadores de la traducción se encuentran a bajas concentraciones dentro de la célula (Fox, 1996b). La sobreexpresión de los activadores dan fenotipos inesperados. Ejemplo de ello, es una falla en la acumulación de Cox1p y por lo tanto un problema en la respiración celular provocado por la sobreexpresión de Pet111p el cual es el activador específico del mRNA de *COX2* (Fiori *y col.* 2005). Se propuso que Pet111p, en concentraciones altas dentro de la célula, interfiere en la traducción del mRNA de *COX1*.

Hasta la fecha los activadores traduccionales carecen de dominios de unión a RNA a excepción del activador Pet309p, único que presenta dominios PPR (ver más adelante). Igualmente las regiones 5'UTR de los mRNA mitocondriales carecen de secuencias consenso de unión a los activadores traduccionales.

### **1.5. Activador Traduccional Pet309p.**

La proteína Pet309p es el activador traduccional específico para el mRNA de *COX1*. Esta proteína que tiene origen nuclear está compuesta de 965 aminoácidos y es necesaria para la expresión del gen mitocondrial *COX1*. Pet309p se requiere para el inicio de la traducción del mRNA maduro de *COX1* y para la producción o estabilidad del precursor cuando éste tiene intrones. Se ha observado que mutantes nulas de *pet309* son incapaces de respirar debido a la ausencia de la proteína Cox1p (Manthey y McEwen, 1995).

Las evidencias genéticas indican que Pet309p actúa específicamente sobre la región 5'UTR de *COX1*. Se encontró una revertante de *pet309* que recuperó la capacidad respiratoria. Esta revertante presentaba un rearrreglo en el 5'UTR de *COX1* teniendo en su lugar el 5'UTR de *COB*. Tal rearrreglo le confería capacidad respiratoria a la levadura debido a que la traducción del mRNA de *COX1* estaba bajo el control de los activadores traduccionales de *COB* y no de Pet309p (Manthey y McEwen, 1995).

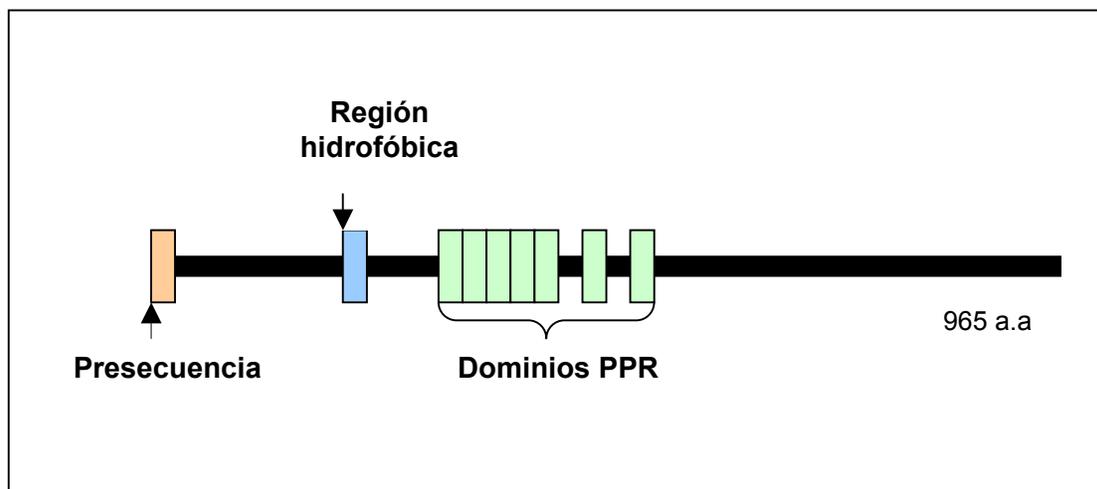
Pet309p es una proteína localizada en la membrana interna mitocondrial de manera periférica (Shingú y Pérez-Martínez, datos no publicados).

Se han encontrado posibles homólogos de Pet309p en diferentes organismos. En *Neurospora crassa* el gen *cya-5* es requerido para promover la traducción del mRNA de *COX1* (Coffin y col. 1997). En maíz la proteína CRP1 (activador traduccional en cloroplasto) presenta una secuencia muy semejante a *PET309* (Fisk y col. 1999).

Igualmente, en humano el gen *LRP130* es indispensable para llevar a cabo la expresión de los genes *COX1* y *COX3* (Xu y col. 2004). Mootha y col. (2003) describieron una mutación autosomal recesiva en el gen *LRP130* que causa una deficiencia de la COX y está asociada al Síndrome de Leigh. La mayor parte de la proteína Lrp130p se localiza en la mitocondria y tiene la capacidad de unir RNA mitocondrial *in vitro* (Mili y Piñol-Roma, 2003). A pesar de que no se conoce la función de Lrp130p en la biogénesis de la citocromo *c* oxidasa, se propone que puede desempeñar una función similar a la de Pet309p (Mootha y col. 2003).

Posiblemente *CYA-5*, *CRP1* y *LRP130* son genes homólogos de *PET309*, por lo que esta proteína está evolutivamente conservada. Todas estas proteínas tienen la característica de poseer motivos PPR en su estructura (sección de abajo). Dada la alta divergencia, es muy probable encontrar genes ortólogos a *PET309* en otras especies, sin embargo, es difícil localizarlas con solo emplear la secuencia debido a la gran degeneración de esta.

Pet309p es una de las pocas proteínas de levadura que posee dominios PPR, y es el único activador traduccional que contienen estos motivos estructurales (Fig. 2).



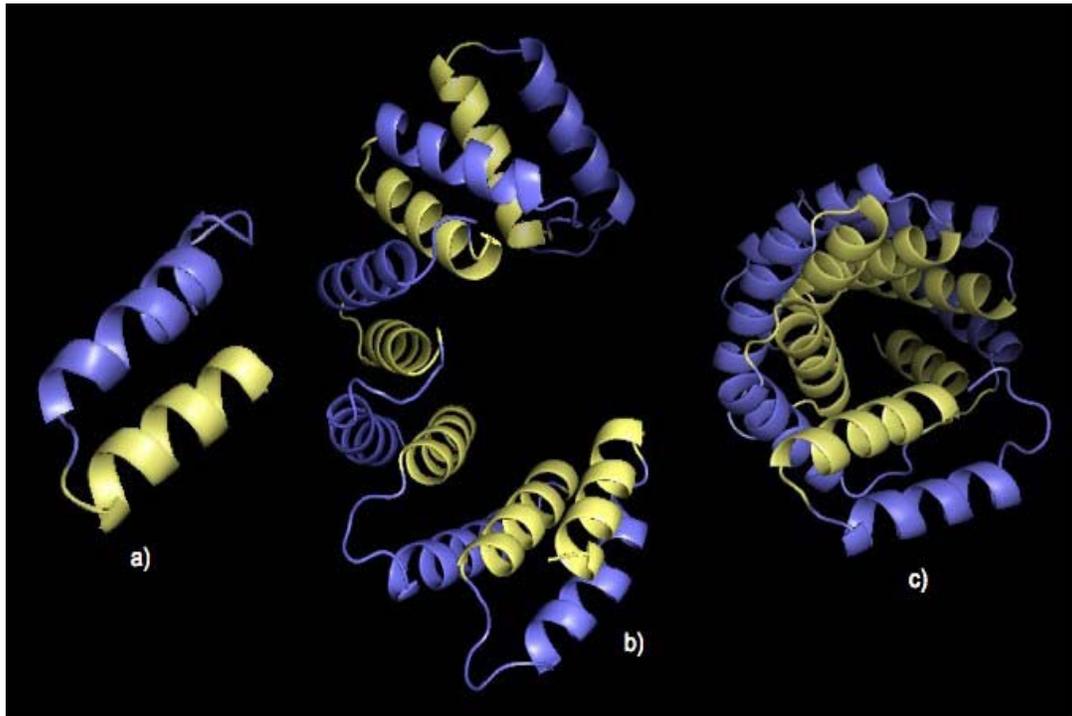
**Figura 2.** Esquema de Pet309p indicando los principales dominios para la proteína. Los cinco primeros dominios PPR están en serie (Dominios predichos por el programa InterPro Scan).

## 1.6. Dominios PPR

Recientemente se identificó una familia de proteínas con dominios PPR (de las siglas en inglés –pentatricopeptide repeat-) (Small y Peeters, 2000). Son motivos de 35 aminoácidos arreglados en serie, de 2 a 26 repeticiones. Estos motivos son poco abundantes en proteínas de animales y hongos, pero en plantas superiores son cuantiosos. Por ejemplo, el genoma de *Arabidopsis* contiene al menos 441 miembros (1-2% de todas la proteínas de *Arabidopsis*) (Small y Peeters, 2000). Igualmente, el genoma de arroz (*Oryza sativa*) contiene aproximadamente 650 proteínas con dominios PPR (Lurin y col. 2004).

Se piensa que las proteínas PPR están localizadas en organelos bioenergéticos como los cloroplastos y mitocondrias. Se predice que los PPR son motivos de unión macromoleculares que consisten de un par de alfa hélices antiparalelas. El conjunto de estas repeticiones forma una cavidad. Modelos teóricos de varias proteínas con dominios PPR muestran que en la base de esta cavidad habría un centro cargado positivamente, y podría sujetar a la hebra sencilla del RNA (Fig. 3). Se predice que estas proteínas tienen la propiedad de unirse al esqueleto fosfatado del RNA, sugiriendo que las proteínas PPR participan en el metabolismo del RNA (Small y Peeters, 2000)

Hasta el momento proteínas de la familia PPR se desconocen en procariontes y archeas, lo que sugiere que esta familia de proteínas (todas codificadas en el núcleo) han evolucionado como factores requeridos para la expresión de proteínas de organelos bioenergéticos.



**Figura 3.** Modelos teóricos de la conformación tridimensional de los dominios PPR de Pet309p basados en los cristales de los motivos TPR. a) modelo de un solo dominio PPR con su par de alfa hélices. b) conjunto de estas repeticiones forman una cavidad. c) base de la cavidad que forman los dominios PPR donde habría un centro cargado positivamente que podría sujetar a la hebra sencilla del RNA (Colaboración con el Dr. Alfredo Torres Larios).

Las estructuras repetidas formadas por los PPR están relacionados con otros motivos conocidos como TPR (tetratricopeptide repeat), la estructura cristalina refleja que estos son motivos de 34 aminoácidos (Das *y col.* 1998). Se propone que los dominios PPR forman una estructura semejante a los motivos TPR. Ambos motivos podrían ser repeticiones helicoidales que en conjunto forman un túnel o cavidad. Esta formación del túnel es determinada por la geometría de los aminoácidos hidrofóbicos presentes en posiciones conservadas de las  $\alpha$ -hélices (D'Andrea y Regan, 2003).

Los PPR a pesar de ser muy degenerados poseen algunos residuos hidrofóbicos ubicados en posiciones semejantes a los TPR (Small y Peeters, 2000), pero su

conformación helicoidal es probablemente menos compacta debido a la presencia de aminoácidos con cadenas laterales grandes en comparación con los TPR que presentan aminoácidos pequeños (Fisk *y col.* 1999). En los motivos PPR algunos aminoácidos con carga positiva exponen sus cadenas laterales hacia el interior de la cavidad central o túnel creando una superficie positiva que podría participar en la unión a RNA (Small y Peeters, 2000).

La función de las proteínas PPR no es muy clara. Se han descubierto algunos genes que pertenecen a esta familia y poco se han caracterizado. Entre las funciones que desempeñan las proteínas PPR se encuentran el procesamiento del RNA, estabilización, traducción y edición de mensajeros localizados en los cloroplastos o mitocondrias de levadura, *N. crassa*, plantas superiores y otros organismos eucariotes , así como en la comunicación retrógrada cloroplasto-núcleo (Saha *y col.*, 2007) (Tabla 1).

Las pocas mutantes PPR existentes que se han descrito, presentan fallas sobre la expresión a nivel traduccional de transcritos específicos de organelos bioenergéticos (Manthey y McEwen, 1995; Fisk *y col.* 1999). Se propone que los miembros de esta familia son proteínas de unión a RNA secuencia-específica (Lahmy *y col.*, 2000).

**Tabla 1.** Lista de ejemplos de proteínas PPR en las que se ha caracterizado su función y su posible gen blanco.

<b>Organismo</b>	<b>Localización</b>	<b>Función</b>	<b>RNA blanco</b>	<b>Referencia</b>
<b><i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>				
<i>PET309</i>	Mitocondria	Traducción, estabilización de mRNA	COX1	Manthey y McEwen, 1995.
<b><i>Neurospora crassa</i></b>				
<i>cya-5</i>	Mitocondria	Traducción	COX1	Coffin y col, 1997.
<b><i>Zea mays</i></b>				
EMP4	Mitocondria	Desarrollo de semilla	desconocido	Gutiérrez-Marcos y col, 2007.
CRP1	Cloroplasto	Traducción	petA, psaC	Fisk y col, 1999.
PPR2	Cloroplasto	Acumulación de ribosomas cloroplásticos	petB/ petD	Williams y Barkan, 2003.
<b><i>Arabidopsis thaliana</i></b>				
LOI1	Mitocondrial	Biosíntesis de isoprenoides	desconocido	Kobayashi y col, 2007.
CCR4	Cloroplasto	Edición del RNA	ndhD	Kotera y col, 2005.
PGR3	Cloroplasto	Estabilización del RNA	petL	Yamazaki y col, 2004.
HCF152	Cloroplasto	Splicing y maduración de RNA	Pbs. Y petB	Nakamura y col, 2003.
<b><i>Oryza sativa</i></b>				
OsPPR1	Cloroplasto	Biogénesis de cloroplasto	desconocido	Gothandam y col, 2005.
Rf-1	Mitocondria	Restauración de la fertilidad	Orf79	Akagi y col, 2004.

<b>Organismo</b>	<b>Localización</b>	<b>Función</b>	<b>RNA blanco</b>	<b>Referencia</b>
<b><i>Petunia hybrida</i></b>				
Rf	Mitocondria	Restauración de la fertilidad	Pcf	Bentolila y col, 2002.
<b><i>Raphanus sativus</i></b>				
Rfo	Mitocondria	Restauración de la fertilidad	Orf138	Desloire y col, 2003.
<b><i>Physcomitrella patens</i></b>				
PPR531-11	Cloroplasto	Splicing y maduración de RNA	ClpP	Hattori y col, 2007
<b>Homo sapiens</b>				
LRPPRC	Mitocondria	Traducción	COXI y COXIII	Mootha y col, 2003., Xu y col, 2004.
<b><i>Drosophila melanogaster</i></b>				
BSF	No demostrada	Estabilización de mRNA	mRNA 3' bicoide	Mancebo y col, 2001.
<b><i>Chlamydomonas reinhardtii</i></b>				
TBC2	Mitocondria	Traducción	psbC	Auchicloss y col, 2002.
<b><i>Trypanosoma brucei</i></b>				
TbPPR1	Mitocondria	Procesamiento del maxicírculo mitocondrial	desconocido	Mingler y col, 2006.

## **2. JUSTIFICACION**

Cox1p es la subunidad más grande de la citocromo *c* oxidasa y juega un papel fundamental en el centro catalítico de la enzima, así como en las primeras etapas de su ensamblaje. Se han identificado y caracterizado un gran número de proteínas que facilitan la expresión del gen *COX1*. Pet309p es una de las proteínas que intervienen en la biogénesis de Cox1p. Pet309p es de las pocas proteínas PPR de levadura y el único activador traduccional que posee 7 dominios PPR. En la actualidad se han elevado considerablemente el número de reportes donde describen la función de proteínas PPR principalmente en plantas superiores. Sin embargo no se ha logrado esclarecer el mecanismo de acción de los dominios PPR. Pet309p ha sido muy poco caracterizada, y a la fecha se desconoce la función de sus motivos PPR. Debido a esto, en este trabajo nos interesa elucidar cual es la función de los dominios PPR de la proteína Pet309p sobre la expresión del gen mitocondrial *COX1*.

### **3. Hipótesis**

Los dominios PPR de la proteína Pet309p participan en la estabilización y/o traducción del mRNA de *COX1*.

#### **4. Objetivo**

Analizar la importancia de los dominios PPR de la proteína Pet309p sobre la expresión del mRNA de *COX1* en *S. cerevisiae*.

Particulares:

- 1.** Generar una mutante de *PET309* carente de los siete dominios PPR.
- 2.** Identificar la localización de la proteína mutante dentro de la mitocondria.
- 3.** Evaluar el efecto de esta proteína mutada sobre la expresión de *COX1*.
- 4.** Evaluar el efecto de esta proteína mutada sobre el gen reportero de la traducción *cox1Δ::ARG8m*.

## **5. Materiales y métodos**

### **5.1. Cepas y Medios.**

Para este estudio utilizamos cepas de *S. cerevisiae* congénicas a D273-10B enlistadas en la tabla de abajo.

<b>Cepa</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Referencia</b>
L SB5	<i>Mat<math>\alpha</math>, ade2, ura3<math>\Delta</math>, PET309::3xHA</i> [ $\rho^+$ ]	Sarah Broadley (sin publicar)
XPM231	<i>Mat<math>\alpha</math>, arg8::hisG, leu2-3,112, lys2, ura3-52 pet309<math>\Delta</math>::LEU2</i> [ <i>cox1<math>\Delta</math>::ARG8m, <math>\rho^+</math></i> ]	Este trabajo.
XPM232	<i>Mat<math>\alpha</math>, arg8::hisG, leu2-3,112, lys2, ura3-52, pet309<math>\Delta</math>::LEU2</i> [ <i>COX1 (<math>\rho^0</math>), <math>\rho^+</math></i> ]	Este trabajo

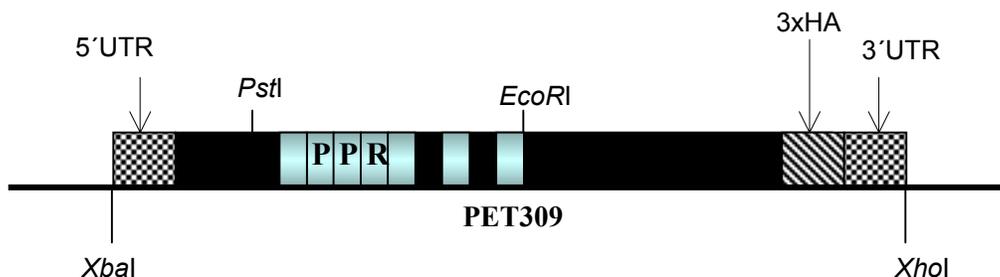
Las cepas se crecieron en medio rico fermentable YPD o YPRaf (apartado "Otros métodos") y medio rico no fermentable YPEG. Para seleccionar crecimiento usando marcadores de auxotrofia, las células se crecieron en medio mínimo suplementado con los aminoácidos requeridos.

### **5.2. Construcción de la mutante de Pet309p.**

La mutante de *PET309* se generó por PCR. Se utilizó como templado al gen *PET309* silvestre previamente clonado en un vector bacteriano (pXP96, ver figura 4). Este plásmido contiene a *PET309* con el triple epítipo de hemaglutinina (3xHA) en el extremo carboxilo terminal, con la finalidad de detectar inmunológicamente a Pet309p.

Se incluyeron 305 y 205 nucleótidos de la región 5'UTR y 3'UTR de *PET309* respectivamente. Los productos de PCR se clonaron en dos vectores de expresión en

levadura: pRS416 (vector centromérico de bajo número de copias) y en YEp352 (vector de alto número de copias), los cuales poseen el marcador de auxotrofia URA3 (Sikorski y Hieter, 1989; Hill *et al.* 1993).



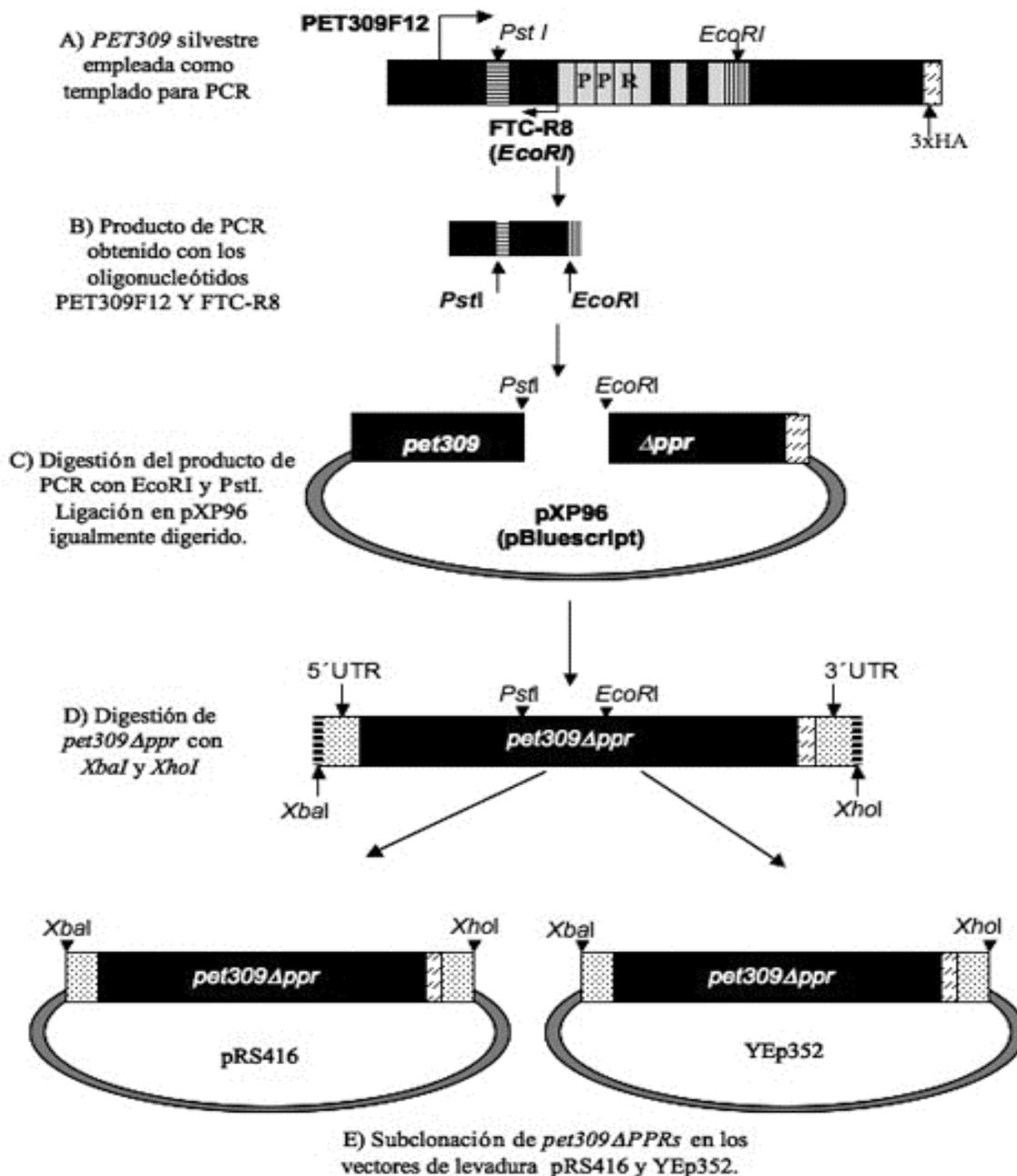
**Figura 4.** Representación esquemática de pXP96, el cual contiene a *PET309*. Se muestran los sitios *PstI* y *EcoRI* que se utilizaron para hacer la versión mutada de *pet309Δppr*.

Para el PCR se utilizaron los oligonucleótidos PET309F12 y FTC-R8 (Ver otros métodos para las condiciones de la PCR ). Estos oligonucleótidos flanquean la zona PPR y abarcan los sitios de restricción *PstI* y *EcoRI* endógenos de *PET309*. El oligonucleótido PET309F12 (sentido) ubicado en la posición 580 nt río abajo del codón de inicio de *PET309* abarca el sitio *PstI*. El oligonucleótido FTC-R8 (anti-sentido) ubicado al final del último PPR incluye el sitio *EcoRI* (Figura 5).

Primero se hizo una PCR con los oligonucleótidos arriba mencionados, el producto de PCR se digirió con las enzimas de restricción *PstI* y *EcoRI*. Posteriormente se ligó en pXP96 digerido con las mismas enzimas de restricción con el objetivo de eliminar a los 7 dominios PPR presentes en *PET309*. En la figura 5 se esquematiza como se construyó la mutante.

Una vez obtenida la mutante *pet309Δppr* clonada dentro del vector pBluescript, se hizo una segunda digestión con las enzimas *XbaI* y *XhoI* (localizadas en los extremos de *PET309*) para liberar todo el gen de *pet309* con la mutación incluida y ligarla a los

vectores de expresión de levadura pRS416 y YEp352 los cuales también contienen los sitios *XbaI* y *XhoI*.



**Figura 5.** Esquema de la construcción de *pet309Δppr*. Se hizo una PCR con los oligonucleótidos PET309F12 y FTC-R8. El producto obtenido se clonó en el plásmido pXP96, al que previamente se le eliminaron los dominios PPR. Posteriormente se subclonó el gen *pet309Δppr* en dos vectores de expresión para levadura pRS416 y YEp352.

### 5.3. Transformación de Levadura

Posteriormente las cepas XPM232 y XPM231 se transformaron con los vectores que contienen la construcción de la mutante mediante el método de Ito (1983) que se describe a continuación:

1. Crecer en 2 ml de YPD la cepa deseada a 30°C por 16 h.
2. Tomar entre 500µl y 1ml de las células del cultivo y centrifugar 1 min a 14 rpm. Eliminar totalmente el sobrenadante.
3. Resuspender las células en 52.5 µl de mezcla de transformación (hacer la mezcla en el orden que sigue):
  - 40µl PEG-3350 al 50%
  - 5µl 1M de DTT
  - 5µl 2M de Acetato de Litio
  - 2.5µl de DNA de espermatozoos de salmón 10mg/ml (previamente hervido por 10min y colocado en hielo inmediatamente)
4. Agregar el DNA a transformar (100ng)
5. Incubar a 42°C por 30 min y agitar en vortex cada 15 min
6. Plaquear la mezcla en medio selectivo.

### 5.4. Purificación de mitocondrias (Modificado de Diekert, 1999)

1. Crecer en 2 ml de medio mínimo -ura por 48 hrs a 30°C.
2. Resembrar en 50 ml de medio mínimo -uraRaf e incubar a 30°C hasta una  $A_{600}$  de 1-1.2 (fase exponencial de crecimiento).
3. Del cultivo anterior resembrar en 2 l de medio mínimo -uraRaf e incubar toda la noche a 30°C hasta una  $A_{600}$  de 1 (fase exponencial de crecimiento).
4. Centrifugar a 4,000 Rpm por 10 min a 4°C en rotor GS3.
5. Lavar una vez con agua fría (usar un volumen de 1/10), juntar todo el botón en un frasco previamente pesado.

6. Centrifugar a 4,000 rpm por 10 min a 4°C en rotor GS3. Eliminar sobrenadante y pesar.
7. Resuspender en amortiguador TD (2 ml/g de peso húmedo)
8. Agitar 10 min a 30°C.
9. Centrifugar 5 min a 3,300 rpm en rotor GS3.
10. Lavar el botón con amortiguador MP2 (7 ml/g de peso húmedo).
11. Centrifugar 5 min a 3,300 rpm en rotor GS3.
12. Resuspender el botón en amortiguador MP2 (7ml/g de peso), adicionar zimoliasa-20T (3mg/g de peso húmedo).
13. Agitar de 30 a 60 min a 30°C, hasta que los esferoplastos se formen (revisar la presencia de esferoplastos a los 30, 45 y 60 min). Para revisar la formación de esferoplastos:

En un tubo de ensayo preparar 2 ml de agua y en otro tubo de ensayo 2 ml de sorbitol 1.2 M. A cada tubo se le agregan 50 µl de células, se agitan en vortex y se comparan los dos tubos. Cuando se formen los esferoplastos el tubo con agua se verá claro debido a que la diferencia de osmolaridad romperá las células en agua, mientras que el tubo con sorbitol se observará turbio.

*A partir de este punto todo se hace a 4°C*

14. Centrifugar a 2,500 rpm por 5 min a 4°C en rotor GS3.
15. Resuspender en 1/4 del volumen requerido de amortiguador homogeneizante (13.4ml/g).
16. Homogeneizar en homogenizador de vidrio 10 veces en 40 ml de amortiguador.
17. Centrifugar 5 min a 3,300 rpm en rotor GS3 a 4°C. Recuperar el sobrenadante.
18. Centrifugar 5 min a 3,300 rpm en rotor GS3 a 4°C. Recuperar el sobrenadante.
19. Centrifugar 12 min a 12,000 rpm en rotor SS-34 a 4°C (en el botón se encuentran las mitocondrias crudas).
20. Resuspender el botón en 10 ml de amortiguador SEH (Primero resuspender en 2ml con la punta de la micropipeta cortada).

21. Centrifugar 12 min a 12,000 rpm en rotor SS-34 a 4°C (en el botón se encuentran las mitocondrias crudas).
22. Resuspender el botón en 300µl de amortiguador SEH (con la punta de la micropipeta cortada).
23. Cuantificar por espectrofotometría: 10µl de mitocondrias crudas llevarlas a 1000 µl con SDS al 0.6%, agitar en vortex brevemente. OD 280 de 0.21 = 10 mg/ml

### **Gradiente de purificación**

24. Preparar 5 ml de cada una de los siguientes porcentajes de nicodenz (w/v) en amortiguador SEH 2x.
  - 25% = 2.5 ml de nicodenz 50% + 2.5 ml de SEH 2x.
  - 20% = 2 ml de nicodenz 50% + 2.5 ml de SEH 2x + 0.5 ml de agua.
  - 15% = 1.5 ml de nicodenz 50% + 2.5 ml de SEH 2x + 1 ml de agua.
  - 10% = 1 ml de nicodenz 50% + 2.5 ml de SEH 2x + 1.5 ml de agua.
  - 5% = 0.5 ml de nicodenz 50% + 2.5 ml de SEH 2x + 2 ml de agua.
25. Hacer 2 gradientes por cultivo, cargando 2 ml de cada porcentaje de nicodenz en el siguiente orden: 25, 20, 15, 10 y 5%.
26. Cargar 0.5 ml del extracto crudo en cada gradiente (Usar punta cortada).
27. Centrifugar a 39,000 rpm por 39 min en un rotor SW40Ti. Al finalizar la centrifugación se observarán cuatro bandas :
  - 7-5% fragmentos mitocondriales
  - 12% mitoplastos
  - 16% mitocondrias
  - 19% restos celulares
28. Remover las bandas de mitocondrias con una aguja y jeringa y colocarlas en un tubo.
29. Diluir las mitocondrias con 25 ml de SEH.
30. Centrifugar 10 min a 12,000 rpm. Para eliminar completamente el nicodenz resuspender en 20 ml de SEH
31. Centrifugar 12 min a 12,000 rpm en rotor SS-34 a 4°C.

32. Resuspender el botón en 250µl de amortiguador SEH, con la punta cortada.

Cuantificar proteínas mitocondriales: 10µL muestra + 990 µL de SDS 0.6%, agitar en vortex.  $A_{280}=0.12 = 10\text{mg/ml}$

33. Congelar en nitrógeno líquido y guardar a -70°C en alícuotas de 20 µl.

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

Curva de calibración:

Usar una solución de albúmina de 1mg/ml

Agregar 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 µl de la solución de albúmina en tubos de ensayo.

1. Ajustar la muestra con agua a 1ml
2. Adicionar 3 ml de solución C y mezclar en vortex. Incubar 10 min a TA.
3. Adicionar 300 µl de solución D y mezclar en vortex e incubar 30 min a TA.
4. Medir absorbancia a  $A_{740}$  nm.

#### Solución A

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

#### Solución B

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

#### Solución C

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

#### Solución D

Mezclar 1 volumen de reactivo de Folin con 1 volumen de agua (preparar al momento)

## 5.6 Western Blot

Las inmunoreplicas tipo western blot se realizaron a las condiciones abajo descritas.

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

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

#### **Buffer de electroforesis 5x:**

0.125M Tris (1x=0.025M pH8.3)

1.25M Glicina (1x= 0.25M)

0.5% SDS (1x= 0.1%)

#### **Buffer de Laemmli 2x:**

100Mm Tris-HCl pH 6.8

4% SDS

20% de Glicerol

0.2% de Azul de Bromofenol

2% de B-mercaptoetanol

Opcional: PMSF 2 mM fresco.

Correr el gel por 30min a 60V y 2hrs a 100V. Posteriormente se transfiere a una membrana por western blot.

### **5.6.2 Transferencia de proteínas a membrana de PVDF.**

1. Hacer un sándwich de 3 papeles whatman, para la membrana y otros 3 para el gel.
2. El gel y 3 papeles whatman se sumergen en buffer (+), y son colocados en la parte inferior. La membrana de PVDF junto con 3 papeles whatman se sumergen en el buffer (-) y se colocan en la parte superior.
3. La transferencia se lleva de 1-3 hrs (dependiendo de la concentración del gel), a 1.5 mA/cm<sup>2</sup>.

### **5.6.3 Inmunodetección de proteínas en la membrana.**

-Detección de la proteína Pet309p-3xHA

1. La membrana obtenida de la transferencia se bloquea toda la noche a 4°C ó 1 h. a temperatura ambiente con la solución de bloqueo.
2. Incubar la membrana con la solución "Blotting", la cual contiene el anticuerpo anti-HA (Roche) acoplado a peroxidasa de rábano, durante 1 h a temperatura ambiente.
3. Lavar la membrana 3 veces con la solución "Wash" por 10 min
4. Revelar la presencia del anticuerpo unido a la proteína Pet309p-3xHA siguiendo las indicaciones del kit ECL plus (Amersham).
5. Detectar la luminiscencia con la película BioMax XAR Film (Kodak), exponiendo durante 1 min.

-Detección de la proteína G6PDH.

1. Eliminar el anticuerpo unido a las proteínas de la membrana incubando con la solución "Stripping" por 30 min a 50°C. Lavar la membrana 3 veces con la solución "Wash" por 10 min
2. Bloquear nuevamente con la solución "Blocking" por 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C.
3. Incubar la membrana con la solución "Blotting", la cual contiene el anticuerpo anti-G6PDH, por 1 hora a temperatura ambiente.

4. Lavar la membrana 3 veces con la solución "Wash" por 10 min
5. Incubar la membrana con la solución "Blotting", la cual contiene el anticuerpo anti-conejo acoplado a peroxidasa de rabano, durante 1 hora a temperatura ambiente.
6. Lavar 3 veces la membrana con la solución "Wash" por 10 min
7. Revelar la presencia del anticuerpo unido a la proteína G6PDH siguiendo las indicaciones del kit ECL (Amersham).
8. Detectar la luminiscencia con la película BioMAx XAR Film (Kodak). Exponiendo durante 2 min
9. Se repiten los pasos del 9 al 13 para revelar con un tercer anticuerpo como CS, Cyt b2, Cyt c1 y Yme1.

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

1. Centrifugar 5 min a 12,000 rpm a 4°C 100µg (200µg para la mutante) de mitocondrias purificadas.
2. Resuspender el botón en 400µl de amortiguador CH (NaCl + HEPES 200mM) pH 7.4
3. Incubar en hielo 10 min
4. Sonicar con 6 pulsos, "output" 5 y "duty cycle" 40% por tres veces (Sonicador Branson. Sonifier 450).
5. Centrifugar 30 min a 65,000 rpm en un rotor TLA-100.3 (Beckman).
6. Separar sobrenadante y resuspender el botón en 400µl de CH.
7. Precipitar los sobrenadantes y los botones agregando 45µl de ácido tricloroacético (TCA) al 100% (BioChemika).
8. Incubar en hielo 30 min
9. Centrifugar 10 min a 12,000 rpm a 4°C
10. Lavar una vez con 1 ml de acetona a -20°C
11. Resuspender en 50µl de buffer de Laemmli 1X y calentar a 65°C 10 min
12. Cargar 20µl en gel de poliacrilamida y analizar por Western blot la presencia de las proteínas a detectar.

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

1. Centrifugar 5 min a 12,000 rpm a 4°C 100 µg de mitocondrias purificadas.
2. Resuspender en 100µl de HEPES 20mM. Incubar en hielo 20 min
3. Adicionar 100µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100mM pH 11.5. Incubar en hielo 10 min
4. Agitar en vortex unos segundos
5. Incubar 30 min en hielo.
6. Centrifugar 30 min a 65,000 rpm en un rotor TLA-100.3 (Beckman).
7. Separar sobrenadante y resuspender el botón en 400µl de CH.
8. Precipitar los sobrenadantes y los botones agregando 45µl de ácido tricloroacético (TCA) al 100% (BioChemika).
9. Incubar en hielo 30 min
10. Centrifugar 10 min a 12,000 rpm a 4°C
11. Lavar una vez con 1 ml de acetona a -20°C
12. Resuspender en 50µl de buffer de Laemmli 1X y calentar a 65°C por 10 min
13. Cargar 20µl en gel de acrilamida y analizar por Western blot la presencia de las proteínas a detectar.

### **5.9. Protección a la digestión con proteinasa K.**

1. Agregar la cantidad necesaria de amortiguador SH para tener 800 µl de mitocondrias con una concentración final de 100 µg/ml
2. Repartir la suspensión anterior en 4 tubos, agregando 195µl de la suspensión a cada tubo.
3. Centrifugar a 11,000 rpm por 4 min a 4°C.
4. Eliminar sobrenadante
5. Adicionar 20µl de SH.

6. Preparar 200 $\mu$ l de SH o HEPES más 2  $\mu$ l de Proteinasa K (10mg/ml).
7. A cada muestra dar los siguientes tratamientos:
  - ♦ Tubo 1: Mitocondrias con 180 $\mu$ l de SH
  - ♦ Tubo 2: Mitocondrias con 180 $\mu$ l SH + Proteinasa K
  - ♦ Tubo 3: Mitoplastos con 180 $\mu$ l HEPES
  - ♦ Tubo 4: Mitoplastos con 180 $\mu$ l HEPES + Proteinasa K
8. Resuspender con la punta cortada subiendo y bajando 3 veces suavemente.
9. Incubar en hielo 30 min
10. Adicionar 2 $\mu$ l PMSF (200mM) y agitar suavemente.
11. Centrifugar a 11,000 rpm por 4 min a 4°C.
12. Transferir los sobrenadantes a un tubo nuevo\*.
13. Resuspender suavemente el botón en 500  $\mu$ l de SH más PMSF (2mM) subiendo y bajando con la punta cortada 3 veces.
14. Centrifugar a 11,000 rpm por 4 min a 4°C.
15. Resuspender la pastilla en 20 $\mu$ l de buffer de Laemmli con PMSF (2mM) y B-mercaptoethanol.
16. Calentar a 65°C por 5 min
17. Cargar en un gel SDS-Page al 12%.

**\*Tratamiento para los sobrenadantes recuperados en el paso 12.**

1. Adicionar TCA al 100% para tener una concentración final de 11%.
2. Incubar a 4°C por 30 min.
3. Centrifugar a 13,000 rpm por 5 min a 4°C.
4. Lavar dos veces con 1 ml de acetona al 100%.
5. Resuspender la pastilla en 20 $\mu$ l de buffer de Laemmli con PMSF (2mM) y B-mercaptoethanol.
6. Calentar a 65°C por 5 min.
7. Cargar en un gel SDS-Page al 12%.

### **5.10. Traducción de proteínas mitocondriales *in organelo***

1. Preparar en hielo 1ml de amortiguador 1.5x ioTL. Agregar al final de la preparación 2 $\mu$ l piruvato cinasa (0.2%) e invertir una vez.
2. Tomar 10 $\mu$ l de mitocondrias (10 mg/ml) y agregar 22 $\mu$ l de amortiguador ioTL, resuspender muy suavemente y con la punta cortada.
3. Incubar a 30°C por 5 min
4. Adicionar 2 $\mu$ l de <sup>35</sup>S-Metionina (10  $\mu$ Ci/reacción).
5. Incubar a 30°C por 20 min
6. Transferir los tubos a hielo
7. Agregar 1 ml de SH 4°C (Sorbitol 0.6M, HEPES 20mM, pH 7.4)
8. Centrifugar 10 min a 14,000 rpm a 4°C.
9. Eliminar todo el sobrenadante y resuspender en 64 $\mu$ l de buffer de Laemmli.
10. Agitar en vortex por 1 min
11. Cargar 20 $\mu$ l de muestra en gel de acrilamida al 16%/0.15%. El resto guardar a -70°C.
12. Correr el gel a 25-27 mA constantes por 4 h
13. Transferir el gel a una membrana de nitrocelulosa (PROTRAN), utilizando amortiguador de corrida al 1x con 20% de metanol. Transferir por 2 hrs, a 1.5 mA/cm<sup>2</sup>.
14. Secar la membrana y exponer de 4-6 h en pantalla de typhoon. Posteriormente exponer la autoradiografía (BioMAX XAR) toda la noche.

### **5.11. Extracción de RNA de levadura (Método TRIzol)**

1. Crecer las células en 10 ml de -ura Raf a fase exponencial (OD<sub>600</sub> = 1.0).
2. Centrifugar las células de 3-5 min a 3000 rpm. Eliminar sobrenadante.
3. Macerar las células con N<sub>2</sub> líquido. Colocar el macerado en un tubo eppendorf frío.

**Nota:** evitar que las células se descongelen durante el macerado.

4. Resuspender la células con TRIzol (1 ml de TRIzol por  $5-10 \times 10^6$  células).
5. Incubar el homogenizado 5 min a temperatura ambiente.
6. Agregar 0.2 ml de cloroformo por 1 ml de TRIzol.
7. Agitar vigorosamente por 15 seg. e incubar por 2-3 min a 15-30° C.
8. Centrifugar a 12,000 rpm por 15 min a 4° C.

Seguido de la centrifugación la mezcla se separa en una fase roja de fenol cloroformo en la parte inferior del tubo, una interfase y una fase acuosa incolora en la parte superior.

9. Transferir la fase acuosa a un tubo limpio.
10. Precipitar el RNA con 0.5 ml de isopropanol por ml de TRIzol.
11. Incubar 10 min a 15-30° C
12. Centrifugar 12,000 rpm por 10 min a 4° C. Eliminar el sobrenadante.
13. Lavar el botón de RNA con 1ml de etanol al 75%.
14. Mezclar por vortex y centrifugar a 7,500 rpm por 5 min a 4° C.
15. Dejar secar el botón de 5-10min
16. Disolver el botón con 30-50 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O-DEPC e incubar por 10 min a 55- 60° C.
17. Cuantificar el RNA sacando la relación de la medida de las absorbancias  $A_{260}/A_{280}$ .  
 $A_{260}/A_{280} = 1.7$  a  $2.0$  donde  $1.0$  es equivalente a  $40\mu\text{g/ml}$
18. Almacenar a -70° C.

### **Preparación de las muestras de RNA:**

<b>RNA</b>	<b>5 <math>\mu</math>l</b>
<b>MOPS 10X</b>	<b>2 <math>\mu</math>l</b>
<b>Formaldehído</b>	<b>6.6 <math>\mu</math>l</b>
<b>Formamida</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>

Después de preparar la muestra:

1. Calentar 15 min a 65°C.
2. Incubar en hielo 5 min
3. Agregar 5µl de amortiguador de carga + 1µl de Bromuro de etidio (preparado con H<sub>2</sub>O-DEPC).
4. Cargar en el gel y correrlo a 50V por 1hr 30 min y posteriormente a 100V por 2hr.

### **5.12. Transferencia de RNA a membrana de Nylon-Hybond.**

1. Utilizar un soporte y colocar un papel filtro de tal manera que toque el amortiguador SSC 10x para la transferencia.
2. Colocar el gel boca abajo (previamente lavado con H<sub>2</sub>O-DEPC) sobre el papel filtro.
3. Cubrir el gel con la membrana de Nylon-Hybond.
4. Arriba de la membrana colocar 3 papeles filtro prehumedecidos con SSC 10x.
5. Colocar una torre de papel con aproximadamente 7-10 cm de altura.
6. Cubrir con una superficie plana de vidrio.
7. Poner un peso de 800-1000 gr.
8. Dejar transfiriendo por capilaridad toda la noche.
9. Una vez hecha la transferencia se deja secar perfectamente bien la membrana
10. Entrcruzar la membrana con irradiación UV a 254/312 nm en un stratalinker de Stratagene.

### **5.13. Northern blot**

1. Marcar la sonda con <sup>32</sup>P, para ello se siguen las instrucciones del Kit HexaLabel™ DNA labeling (Fermentas).
2. Una vez detenida la reacción se limpia la sonda del exceso de nucleótidos radioactivos por Micro Bio-Spin Chromatography Columns (BioRad).

3. La sonda marcada y purificada se desnaturaliza incubando con 1/10 de vol. de solución 1N NaOH, 1mM EDTA por 5 min a temperatura ambiente.
4. Agregar la sonda a la solución de prehibridación donde se encuentra la membrana.

### **Hibridación**

- Prehibridar una hora a 65°C en horno rotatorio con la siguiente solución precalentada.

5x SSC

5x Denhardt´s

0.5% SDS

ssDNA 100 µg/ml

El DNA se hierve 10 min y se coloca en hielo por 10 min más.

- Agregar la sonda marcada y desnaturalizada. Hibridar a 65°C toda la noche.

### **Lavados:**

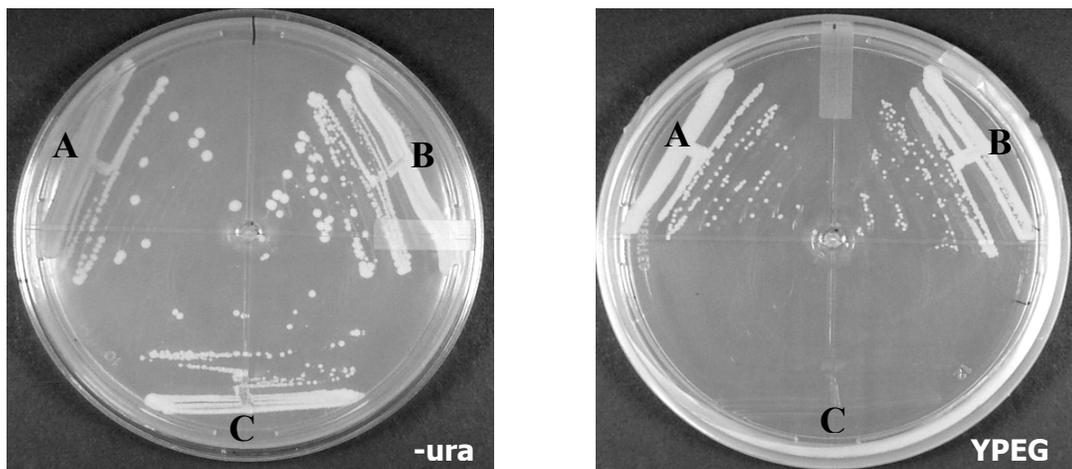
1. Desechar la solución de hibridación
2. Cada lavado se hace con 50 ml de una solución precalentada a 65°C.
3. Se hacen los siguientes lavados:
  - 1 lavado con 2x SSC, 0.2% SDS por 5 min.
  - 2 lavado con 2x SSC, 0.2% SDS por 15 min.
  - 1 lavado con 0.2x SSC, 0.2% SDS por 30 min.
4. Envolver la membrana en ega pack y exponer en la pantalla de fósforo. Leer la emisión radioactiva con un TYPHOON 8600 phosphoimager. Para cuantificar la señal se empleo el programa ImageQuant versión 5.2.

## 6. Resultados

### **6.1. Complementación de $\Delta pet309$ con *PET309-3xHA*.**

En el laboratorio se cuenta con una construcción de *PET309* con el epítipo 3xHA fusionado al extremo carboxilo terminal. Tal construcción está clonada en dos vectores de expresión para levadura: pRS416 (bajo número de copias, 1-2 copias por célula) y YEp352 (alto número de copias  $\sim 30$  copias por célula). Ambas construcciones incluyen 305 y 205 nucleótidos de la región 5' UTR y 3' UTR de *PET309* respectivamente.

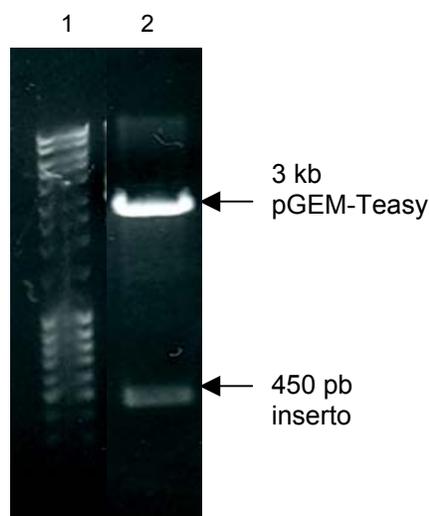
La construcción de *PET309* silvestre es capaz de complementar a la cepa XPM232, la cual tiene a *PET309* interrumpida (*pet309 $\Delta$ ::LEU2*). Como se observa en la figura 6, la cepa *pet309 $\Delta$ ::LEU2* recupera su capacidad respiratoria debido a la complementación con *PET309-3xHA*. Del mismo modo la cepa *pet309 $\Delta$ ::LEU2* transformada con el plásmido vacío pRS416 es incapaz de respirar, lo que confirma que la construcción con *PET309-3xHA* complementa adecuadamente la cepa mutante de *pet309*. Como control positivo se utilizó la cepa silvestre de *PET309-3xHA* integrada en el cromosoma.



**Figura 6.** Complementación de la cepa mutante de  $\Delta pet309$  con el plásmido que contiene a *PET309-3xHA* en dos diferentes medios de cultivo. A) Control positivo (*PET309-3xHA* en copia cromosomal); B)  $\Delta pet309$  complementada con *PET309-3xHA* silvestre clonada en el vector pRS416; C)  $\Delta pet309$  transformada con el vector pRS416. Cepas cultivadas en medio -ura (izquierda) y YPEG (derecha) durante 4 días a 30°C.

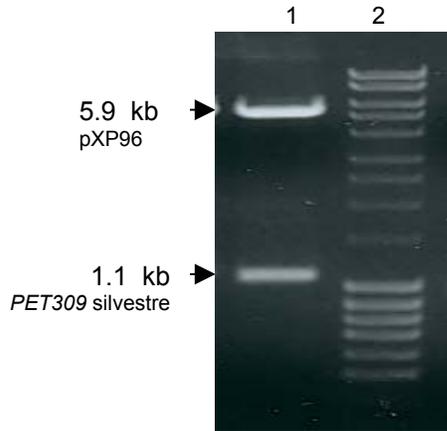
## 6.2. Construcción de la mutante *pet309Δppr*.

Mediante técnicas de PCR, se construyó una mutante de *pet309*, en la cual se eliminarón los 7 dominios PPR. Como primera estrategia de clonación, se ligó directamente el producto de PCR al vector pGEM- T Easy (Fig. 7). El producto de PCR se secuenció para verificar que se siguiera el marco de lectura y que la DNA polimerasa no introdujera errores en la secuencia (electroferograma mostrado en el apartado de "otros métodos").

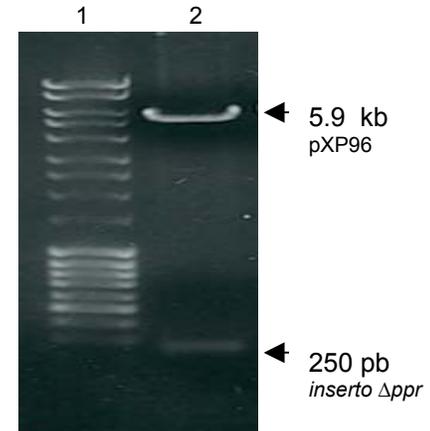


**Figura 7.** Gel de agarosa que muestra la clona pFT1, la cual posee a *pet309Δppr* dentro de pGEM-T Easy. El carril 2 muestra la colonia transformada que posee la construcción. El plásmido se digirió con *EcoRI* para liberar el inserto de 450pb.

Posteriormente, el plásmido pFT1 se digirió con las enzimas de restricción *PstI* y *EcoRI* para liberar el inserto. Éste se ligó al plasmido bacteriano (pBluescript) que contiene a *PET309-3xHA* (pXP96), igualmente digerido con *PstI* y *EcoRI*. Al digerir el vector pXP96 con éstas enzimas se libera la zona que contiene todos los dominios PPR silvestres (Figura 8). El vector digerido se purificó del gel por columna comercial y se utilizó para incluir la versión mutada de *pet309Δppr*, lo que dió por resultado el plásmido pFT2 (Fig. 9).

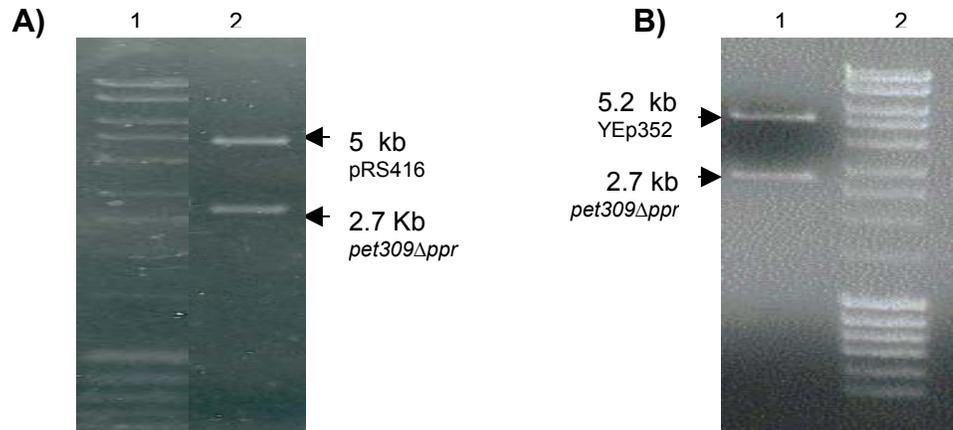


**Figura 8.** Digestión del vector pXP96. Carril 2) Marcador; carril 1) Digestión del plásmido pXP96 con *PstI* y *EcoRI*. Se observa la liberación de la zona PPR de 1.1 kb y el resto del plásmido 5.9 kb.



**Figura 9.** Plásmido pFT2, la cual posee a *pet309Δppr* dentro de pXP96. Carril 1) Marcador; carril 2) Digestión de la clona pFT2 con *PstI* y *EcoRI*. Se observa la liberación de *pet309Δppr* de 250 pb y el plásmido de 5.9 kb.

El plásmido pFT2 se digirió con las enzimas *XbaI* y *XhoI* para liberar todo el gen de *pet309Δppr* y subclonarlo dentro de los vectores para levadura pRS416 (vector centromérico y de bajo número de copias) y YEp352 (vector episomal y de alto número de copias), generando los plásmidos pFT3 y pFT4, respectivamente (Fig. 10a y 10b).

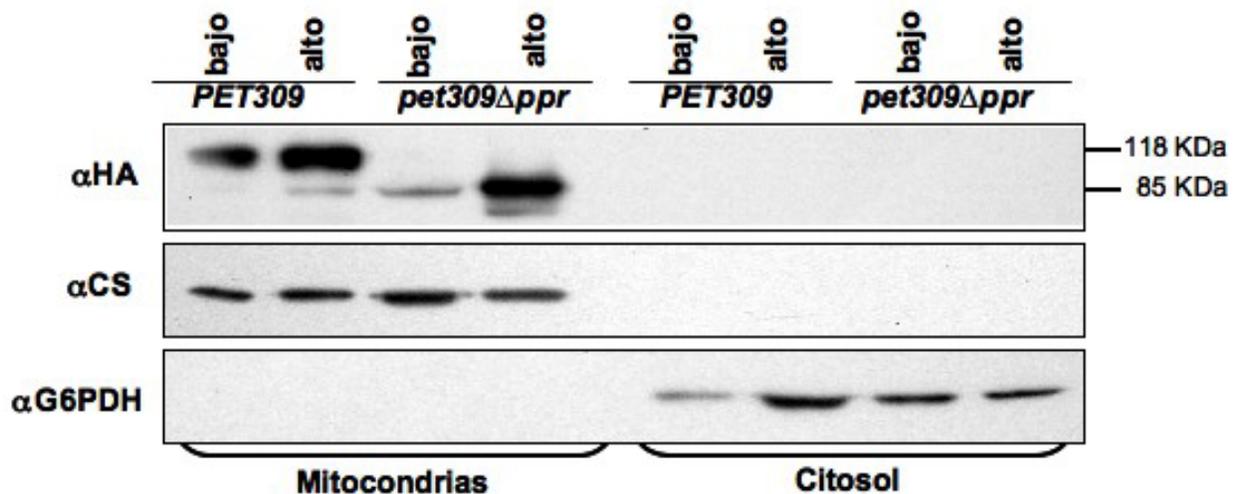


**Figura 10.** Subclonación de *pet309Δppr* dentro de dos vectores diferentes de expresión en levadura. **A)** Clona pFT3, en el carril 2 se observa la liberación del inserto de 2.7 kb y pRS416 con 5 Kb. **B)** Clona pFT4, carril 2 liberación del inserto de 2.7 Kb y YEp352 con 5.2 Kb. Ambos plásmidos se digirieron con *XbaI* y *XhoI*.

### 6.3. Localización de Pet309p $\Delta$ PPR dentro de la mitocondria.

Para detectar a Pet309p $\Delta$ PPR dentro de las mitocondrias y confirmar que la mutación no afectara su importación al organelo, se extrajeron mitocondrias de la cepa que posee esta construcción. Por western blot se detectó a Pet309p $\Delta$ PPR-3xHA únicamente en la fracción mitocondrial con una masa molecular de 85 KDa, más pequeña que la de Pet309p-3xHA silvestre (118 KDa). Este peso corresponde al esperado debido a la supresión completa de los siete dominios PPR.

Se inmunodetectó a la proteína citrato sintasa, enzima localizada en la matriz mitocondrial. Esta proteína solo fue detectada en las fracciones mitocondriales (Fig. 11). Para confirmar que Pet309p co-purifica con la fracción mitocondrial, se separó la fracción citosólica y se utilizó como control la proteína glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). Ésta es una enzima soluble del citoplasma y por tal motivo sólo debe detectarse en la fracción citosólica tal como se observa en la figura 11.



**Figura 11.** La proteína mutada Pet309p $\Delta$ PPRs-3xHA co-purifica con la fracción mitocondrial. Como controles se utilizaron anticuerpos para detectar a la proteína citrato sintasa (CS) (proteína de matriz mitocondrial) y la proteína G6PDH (enzima soluble del citosol). 10 $\mu$ g de proteína mitocondrial se separaron por SDS-PAGE al 12%. Se analizaron Pet309p y Pet309p $\Delta$ PPR en baja expresión (bajo) y en sobreexpresión (alto).

En la figura 11 se incluye a Pet309p-3xHA y Pet309p $\Delta$ PPR-3xHA en bajo número de copia (1-2 copias por célula) y en sobreexpresión (30 copias por célula). Se refleja en el western blot mayor acumulación de la proteína Pet309p silvestre como mutante en condiciones de sobreexpresión.

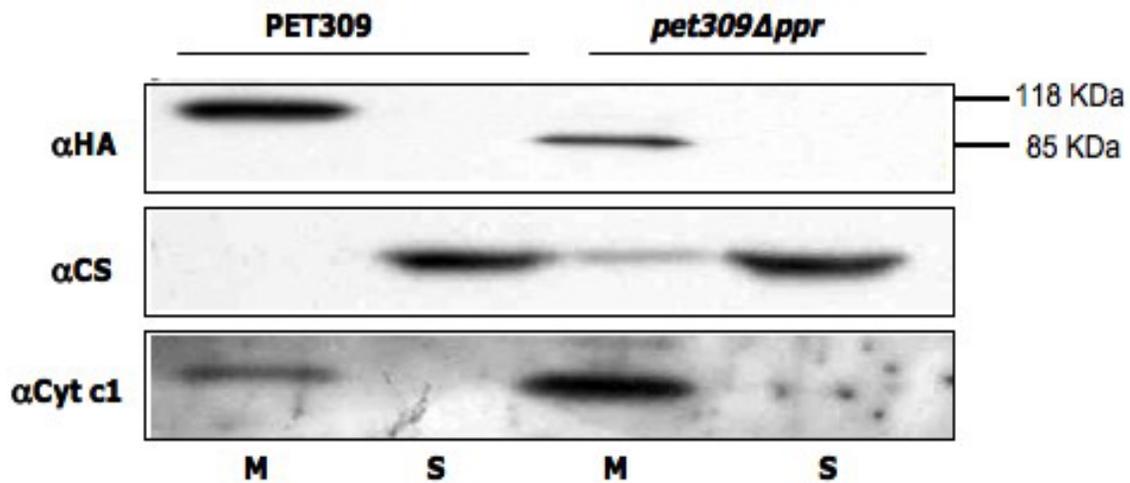
Estos resultados indican que Pet309p $\Delta$ PPR co-purifica con la fracción mitocondrial en bajo número de copias como en sobreexpresión.

### **6.3.1 Fraccionamiento Mitocondrial.**

Pet309p es una proteína localizada en la membrana interna mitocondrial, asociada de manera periférica y orientada hacia la matriz mitocondrial (Shingú y Pérez-Martínez, datos no publicados). Para comprobar si Pet309p $\Delta$ PPR tiene la misma localización que la proteína silvestre se realizaron los siguientes experimentos.

El primer experimento de localización fue el fraccionamiento mitocondrial, el cual consistió en fragmentar a las mitocondrias por medio de sonicación, seguido de una ultracentrifugación para separar las fracciones membranales (que incluyen la membrana interna y externa) de las fracciones solubles (compuesto del espacio intermembranal y la matriz mitocondrial). Se encontró que Pet309p $\Delta$ PPR se localiza en la fracción membranal, igual que Pet309p silvestre (Fig. 12) detectada con el anticuerpo anti-HA.

Como control de óptima separación se empleó a la proteína citrato sintasa localizada exclusivamente en la matriz por lo que se inmunodetectó solo en las fracciones solubles. Como control de una proteína membranal se inmunodetectó a Cit c1. Cyt c1 es una proteína integral de membrana interna que forma parte del complejo III respiratorio y sólo se detectó en la fracción membranal.

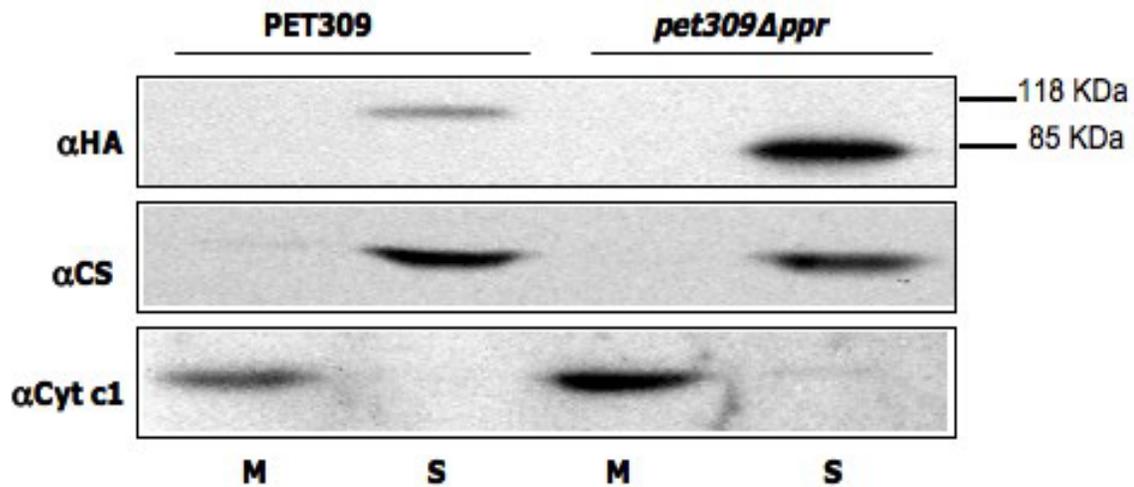


**Figura 12.** Localización de Pet309pΔPPR en fracciones mitocondriales. Se utilizaron 100  $\mu\text{g}$  y 200  $\mu\text{g}$  de proteína mitocondrial (Pet309p y Pet309pΔPPR respectivamente) separada por SDS-PAGE al 12%. M: fracción membranal; S: fracción soluble.

### 6.3.2 Extracción alcalina mitocondrial.

Se buscó determinar si Pet309pΔPPR se comporta como una proteína periférica de membrana (igual que la silvestre). Las mitocondrias se trataron con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  para extraer proteínas periféricas. Posterior al tratamiento, las mitocondrias se ultracentrifugaron para separar la fracción membranal de la fracción soluble.

En las fracciones solubles se encuentran las proteínas solubles y periféricas. Los resultados obtenidos de este ensayo indican que Pet309pΔPPR se comporta como una proteína periférica de membrana. Esto corrobora que la mutante se comporta de manera semejante a la silvestre (Fig. 13).



**Figura 13.** Separación de proteínas mitocondriales en medio alcalino. Pet309pΔPPR se detectó en la fracción soluble. Como control de proteína soluble mitocondrial se detectó la proteína citrato sintasa. Como proteína integral de membrana a Cyt c1. Se emplearon 100g de proteína mitocondrial, separada por SDS-PAGE al 12%.

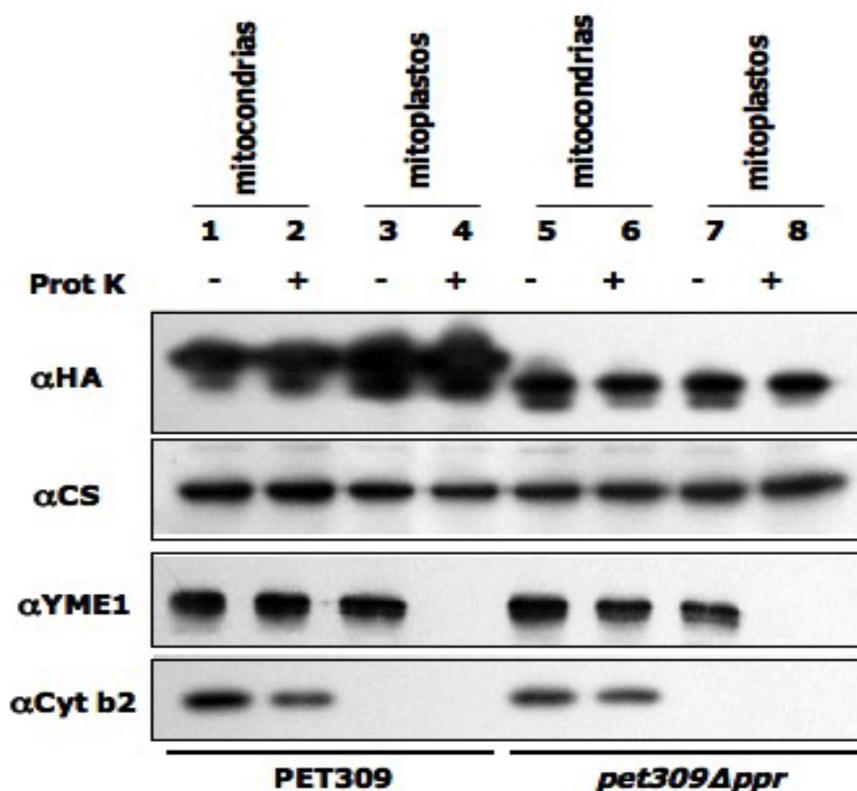
### 6.3.3 Protección a la digestión con Proteinasa K.

Para determinar la topología de Pet309pΔPPR en la mitocondria se realizó un ensayo de protección a la digestión con proteinasa K. En este ensayo se tratan las mitocondrias con un choque osmótico con el fin de generar mitoplastos (mitocondrias sin membrana externa). Las proteínas localizadas en el lado de la matriz mitocondrial permanecen intactas en presencia de la proteinasa K, debido a que las protege la membrana interna mitocondrial, mientras que las proteínas localizadas en el espacio intermembranal son degradadas. Con este ensayo podemos demostrar que la mutante Pet309pΔPPR se encuentra del lado de la matriz mitocondrial igual que la silvestre, ya que ambas proteínas resistieron la digestión con proteinasa K (Figura 14).

En este ensayo se empleó como control la proteína citrato sintasa, proteína localizada en la matriz mitocondrial. Se observó que la proteína citrato sintasa se localiza

en la matriz mitocondrial tanto en mitocondrias como en mitoplastos con y sin proteinasa K (Figura 14).

Dos proteínas más fueron empleadas como controles: Yme1 y Cyt b2. Yme1 es una proteína que participa en la translocación de proteínas y presenta un dominio localizado en el espacio intermembranal. En las mitocondrias tratadas con proteinasa K se detectó a Yme1p al igual que los mitoplastos sin tratamiento con proteínas K (Fig. 14 carriles 3 y 7). En los mitoplastos que si fueron tratados con proteinasa K se degradó la proteína Yme1p ya que quedó expuesta (Fig. 14 carriles 4 y 8). Cyt b2 es una proteína localizada en el espacio intermembranal. Una vez generados los mitoplastos esta proteína se pierde y no es detectada por western blot.



**Figura 14.** Protección a la digestión con Proteinasa K de Pet309pΔPPR. Pet309pΔPPR se detectó en el interior de la matriz mitocondrial. Como control de proteína de matriz mitocondrial se detectó la proteína citrato sintasa. Como proteína de espacio intermembranal a Yme1 y Cyt b2. Se emplearon 100µg de proteína mitocondrial para la cepa silvestre y mutante, separada por SDS-PAGE al 12%.

Con los controles de Yme1, Cyt b2 y citrato sintasa, se demuestra que las condiciones de digestión con proteinasa K fueron las correctas. Con este experimento se concluye que Pet309p $\Delta$ PPR está dentro de la matriz mitocondrial ya que se comporta como la proteína citrato sintasa al ser resistente a la digestión con proteinasa K (Figura 14).

De estos experimentos se puede concluir que a pesar de la mutación introducida a *pet309*, se localiza en la membrana interna mitocondrial orientada hacia la matriz mitocondrial y de manera periférica igual que la silvestre.

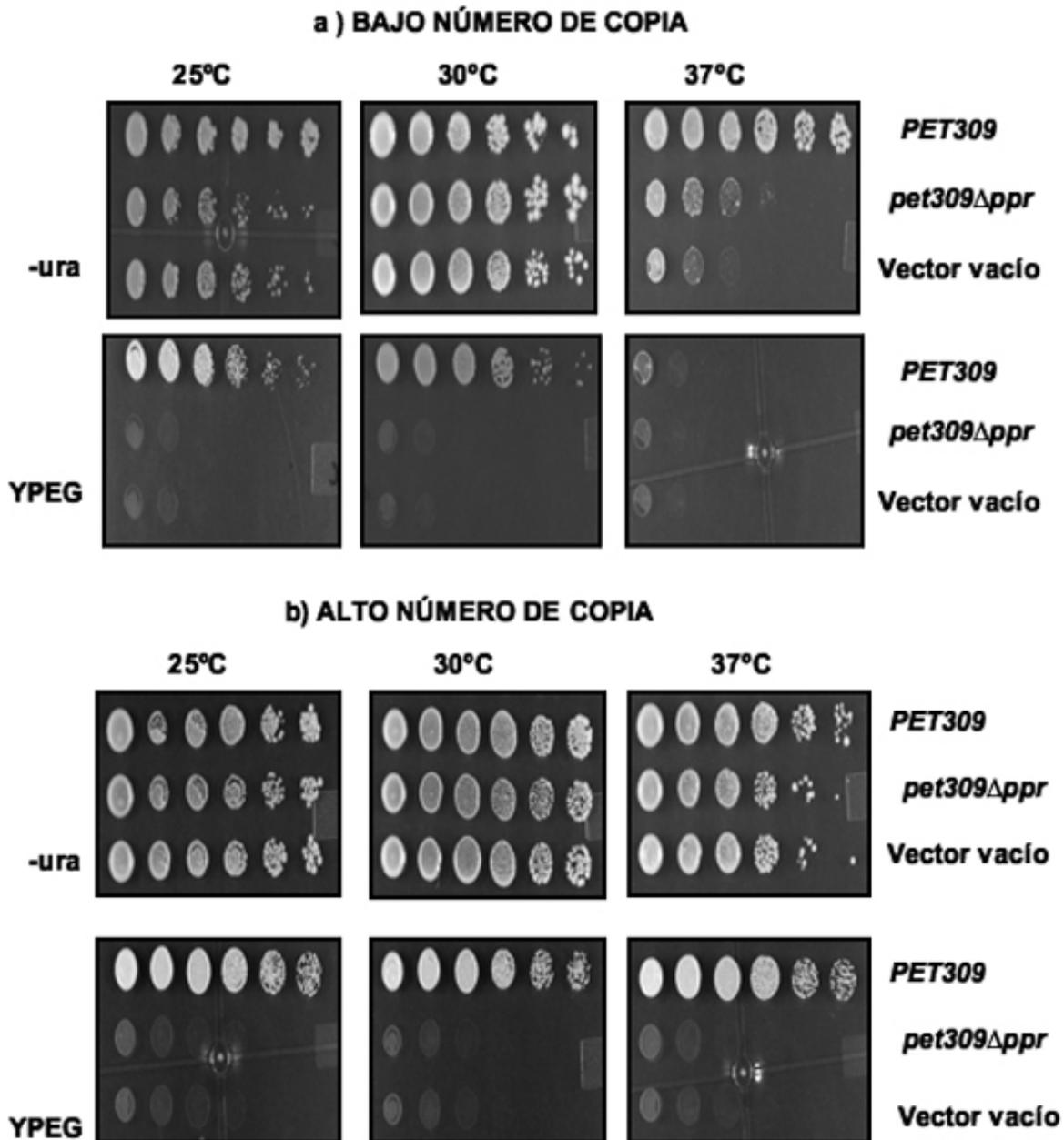
#### **6.4. Caracterización del fenotipo de la mutante *pet309* $\Delta$ *ppr*.**

La mutante *pet309* $\Delta$ *ppr* generó un fenotipo con incapacidad respiratoria en la cepa que la portaba cuando se crece en un medio no fermentable a base de etanol-glicerol (YPEG) como fuentes de carbono (Fig. 15).

Como control positivo, se empleó la cepa silvestre de *PET309-3xHA* observando un buen crecimiento en fuentes de carbono no fermentables, lo que refleja capacidad respiratoria. Como control negativo se utilizó una cepa con el vector vacío la cual carece totalmente de capacidad respiratoria en medio no fermentable por carecer de *pet309*.

Los fenotipos se siguieron a diferentes temperaturas: 25°C, 30°C y 37°C. En ninguna condición la mutante presentó capacidad respiratoria, incluso en condiciones de sobreexpresión. Adicionalmente se encontró que la respiración de la cepa silvestre a 37°C se vio afectada cuando se expresó en bajo número de copias. Esta condición probablemente se debe a que el epítipo está impidiendo una adecuada función del C-terminal de Pet309p a 37°C.

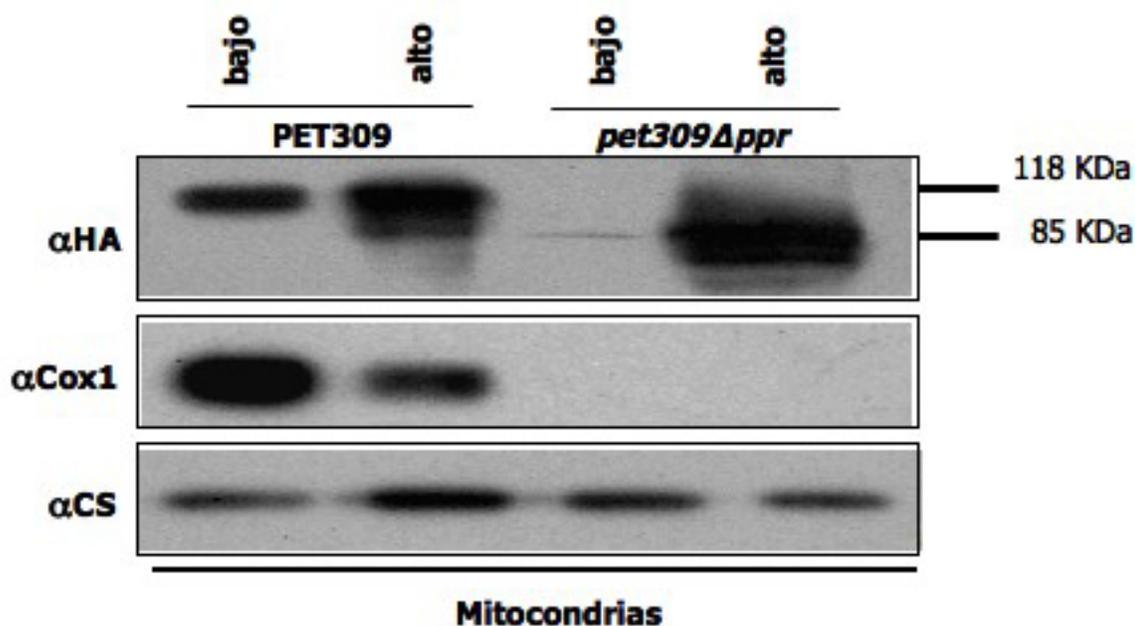
En las versiones mutantes tanto a bajo como en alto número de copia, el fenotipo es el mismo a las diferentes temperaturas, lo que sugiere que ni la sobreexpresión es capaz de restaurar la capacidad respiratoria.



**Figura 15.** Diluciones seriadas de *pet309Δppr*. Las cepas fueron crecidas en medio carente de uracilo (-ura) y medio no fermentable a base de etanol-glicerol (YPEG) e incubadas durante 4 días a 25°C, 30°C y 37°C.

## 6.5. Inmunodetección de Cox1p en la mutante de *pet309Δppr*.

Debido a que Pet309p es el activador traduccional específico del mensajero de *COX1*, y que los dominios PPR pueden estar involucrados en el metabolismo del RNA; existe la probabilidad de que la mutante este afectando la traducción de *COX1*. Para indagar la causa del fenotipo no respiratorio producido por la mutante *pet309Δppr*, por inmunoréplica tipo western se detectó a la proteína Cox1p. En este experimento no se detectó a la proteína Cox1p cuando las mitocondrias expresan a *pet309Δppr* tanto a bajo número de copia como en sobreexpresión (Fig. 16), y sólo se observo acumulación de ésta proteína en presencia de Pet309p silvestre. Estas observaciones indican que la mutación introducida en *PET309* está afectando la acumulación de Cox1p.



**Figura 16.** Acumulación de la proteína Cox1p en presencia de *pet309Δppr*. Western blot de proteínas mitocondriales de mutantes de *pet309Δppr* en bajo y alto número de copia. Como control de carga se utilizó la proteína citrato sintasa. 50 $\mu$ g de proteína mitocondrial, separada por SDS-PAGE al 12%.

Interesantemente cuando se sobreexpresa a Pet309p provoca una disminución en la acumulación de Cox1p en relación a cuando se expresa Pet309p en bajo número de copia (Figura 16). Probablemente este efecto se deba a un problema en la biogénesis de Cox1p cuando existe una sobreexpresión de su activador traduccional (Pet309p). Este fenómeno corrobora el hecho de que altos niveles de los activadores traduccionales provocan desajustes en la biogénesis de los genes mitocondriales (Fiori y col, 2005).

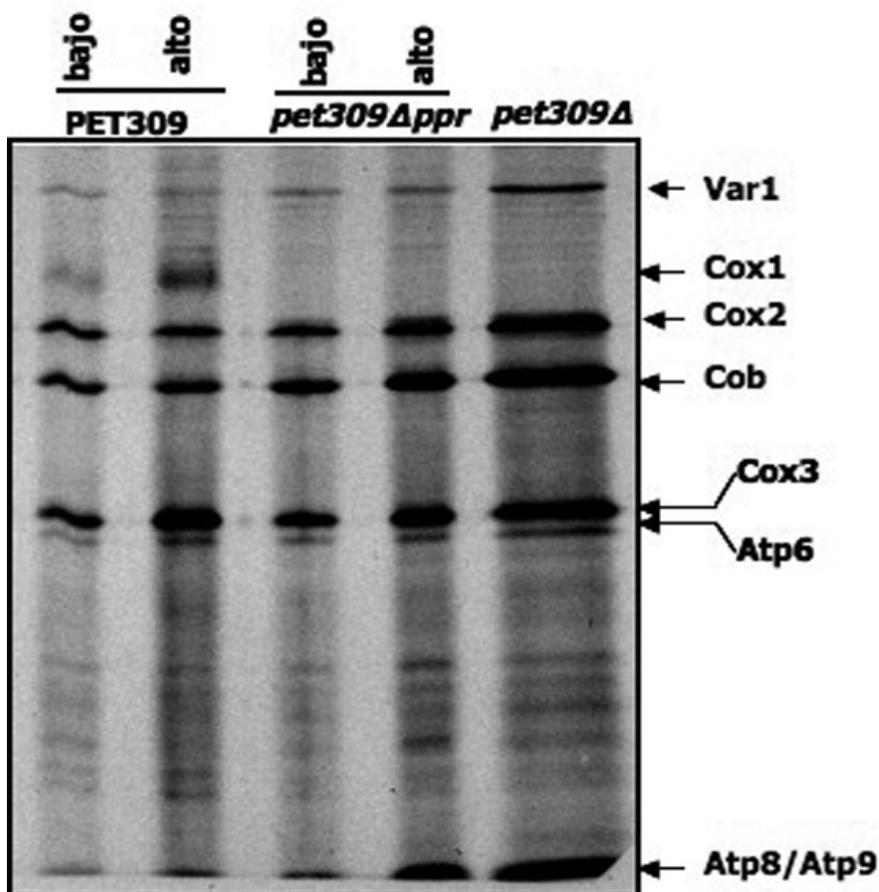
Para explicar porque baja los niveles de la proteína Cox1p, se sugieren dos razones. La primera es que no se esta sintetizando la proteína Cox1p y la segunda es que el mRNA de *COX1* esté disminuyendo sus niveles lo que se refleja en la abundancia de la proteína. Para indagar cuál de estas dos posibilidades es la responsable de la incapacidad respiratoria y la falta de acumulación de Cox1p se realizaron dos experimentos: traducción de proteínas mitocondriales *in organelo* y northern blot de los mensajeros de *COX1*.

## **6.6. Síntesis de proteínas mitocondriales *in organelo*.**

Para determinar si la ausencia de Cox1p se debe a que no hay síntesis de esta proteína, se promovió la síntesis de proteínas mitocondriales. Por este medio se puede determinar si se está sintetizando Cox1p.

Para detectar a las proteínas sintetizadas en la mitocondria se empleó el método de traducción de proteínas mitocondriales *in organelo*. Esta técnica consiste en dejar traducir a la mitocondria por 20 min en presencia de metionina marcada radioactivamente con  $^{35}\text{S}$ , con el objetivo de que todas las proteínas recién sintetizadas vayan incorporando la marca radioactiva. Posteriormente las proteínas se analizan por SDS-PAGE y por autoradiografía se observan las proteínas que se encuentran marcadas radioactivamente.

Se observo que las mitocondrias que expresan a *pet309Δppr* tanto en bajo número de copias como en sobreexpresión no sintetizaron Cox1p y el efecto fue específico para esta proteína pues los niveles del resto de las proteínas fue comparables en las cinco cepas (Fig. 17).



**Figura 17.** Síntesis de proteínas mitocondriales *in organelo*. Las proteínas fueron marcadas con [<sup>35</sup>S] Metionina por 20 minutos y analizadas por SDS-PAGE y autoradiografía. Var1 subunidad ribosomal; Cox1, subunidad I de la citocromo c oxidasa; Cox2, subunidad II; Cox3, subunidad III; Cyt b, citocromo b-c1; Atp6, subunidad 6 de la ATPasa; Atp8 subunidad 8 de la ATPasa; Atp9, subunidad 9 de la ATPasa.

Estos resultados sugieren que *Pet309pΔPPR* a baja expresión como en sobreexpresión esta afectando únicamente la síntesis de Cox1p; sin afectar la síntesis del resto de las proteínas codificadas en el genoma mitocondrial.

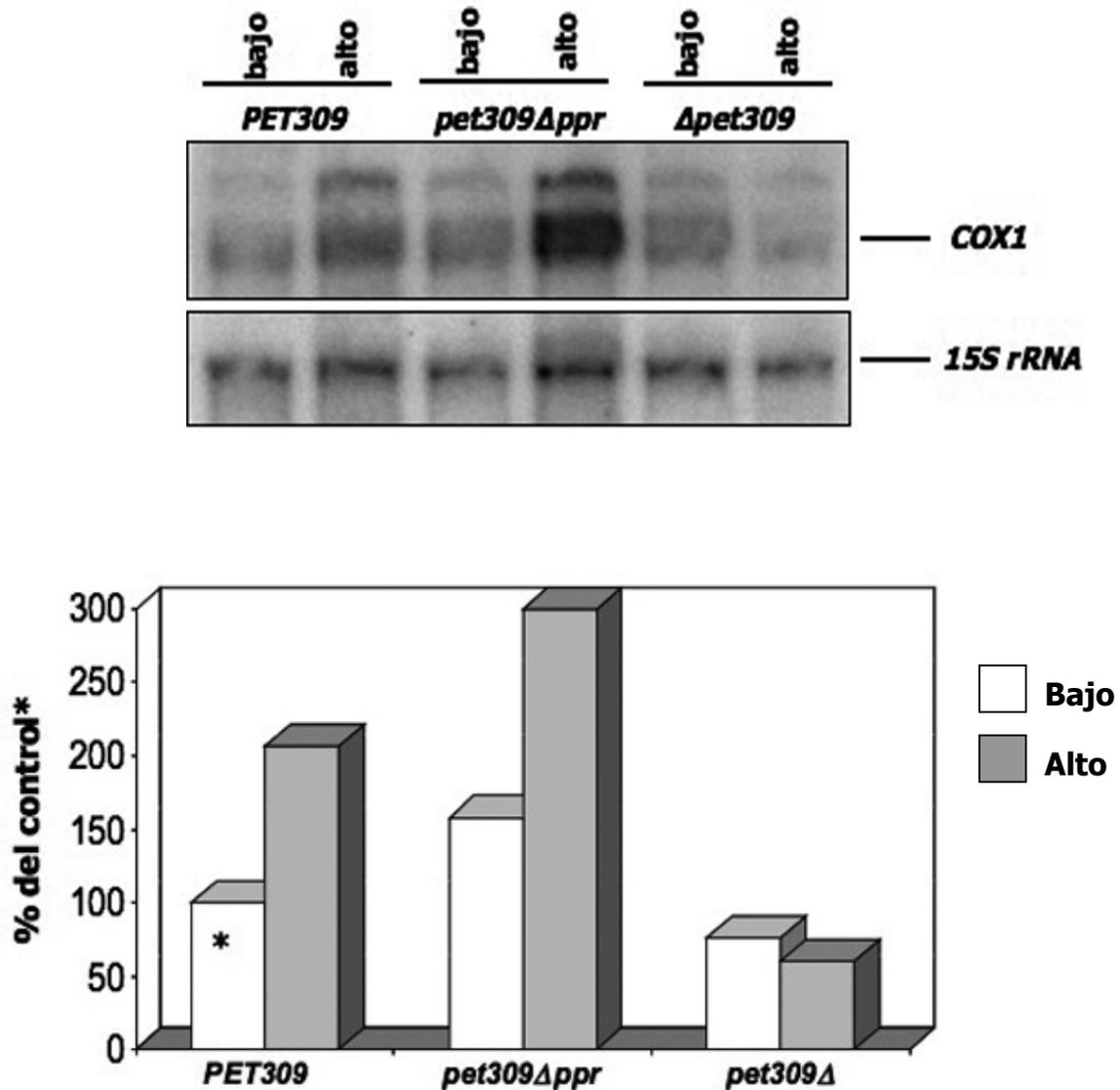
## 6.7. Análisis por northern blot del mRNA de *COX1*.

Debido a que se está afectando la traducción de Cox1p, existía la posibilidad de que la mutación que se introdujo en PET309 interfiriera con la estabilidad del mensajero de *COX1*. Se ha reportado que Pet309p también juega un papel en la estabilización del mRNA de COX1 (Manthey y McEwen, 1995; Tavares-Carreón y Pérez-Martínez, datos no mostrados). Para analizar esta posibilidad se extrajo RNA total de las cepas mutantes (*pet309Δppr*), así como de la silvestre para explorar si se está afectando la estabilidad del mRNA de *COX1*.

El análisis por northern blot de los mensajeros indicó que los mRNA de *COX1* no se ven disminuidos en la mutante *pet309Δppr*. Cuando está presente *pet309Δppr* tanto en bajo como en alto número de copia el mRNA de *COX1* se acumula de manera semejante a las versiones silvestres de *PET309* (Figura 18).

Un punto interesante es que los niveles del mensajero de *COX1* se ven incrementados cuando se presenta la sobreexpresión de Pet309p y Pet309pΔPPR (Fig. 18). Esto sugiere que Pet309pΔPPR no está afectando la acumulación del mensajero de *COX1* al comportarse igual que *PET309*. A pesar de la pérdida de los dominios PPR, Pet309p conserva la capacidad de estabilizar al mensajero de *COX1*. Fiori *y col.* (2005) han sugerido que el incremento en los niveles de los activadores traduccionales podrían estabilizar sus mensajeros blancos.

Estos resultados confirman que *PET309* actúa a nivel traduccional más que sobre la estabilización del mRNA de *COX1*.



**Figura 18.** Niveles del mensajero de *COX1* por northern blot. 10  $\mu$ g de RNA total fue utilizado de cada cepa. Las cepas fueron crecidas en -ura rafinosa. Como control de carga se empleó el 15S rRNA. Las membranas se expusieron en una pantalla de fósforo durante 5h y 2h para *COX1* mRNA y rRNA 15S respectivamente.

## 6.8. ARG8m como gen reportero de la traducción.

Los experimentos de traducción mitocondrial *in organelo* y los de northern blot muestran que Cox1p no se está sintetizando a pesar de que el transcrito está presente. Existe la posibilidad de que la ausencia de Cox1p se deba a una rápida degradación de la proteína recién sintetizada por lo que no logra detectarse en el experimento. Para descartar un proceso de rápida degradación y uno de síntesis, empleamos al gen reportero de la traducción Arg8m.

En condiciones normales la proteína Arg8p está codificada por el gen nuclear *ARG8* y se importa a la matriz mitocondrial, donde participa en la síntesis de arginina. Steele y col. (1996) recodificaron a este gen para que se expresara en el DNA mitocondrial (DNAm). Cox1p es una proteína integral de membrana y es probable que la mutante *pet309Δppr* afecte diferentes pasos de su biogénesis como: síntesis, estabilidad del producto recién sintetizado e inserción dentro de la membrana interna mitocondrial.

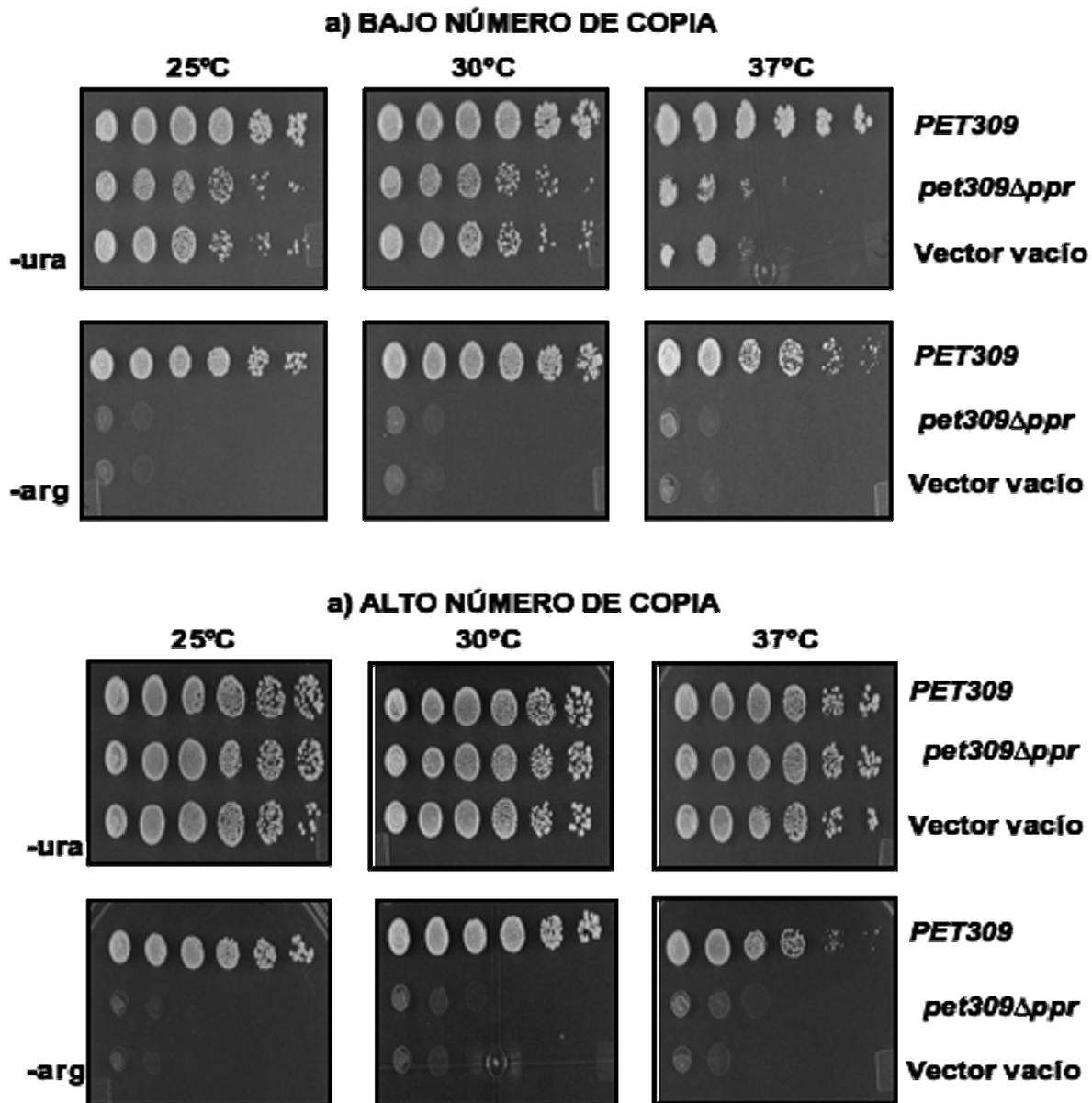
Tener a la proteína Arg8p como reportero de la traducción ofrece la ventaja de que su función no es dependiente de la capacidad respiratoria de la célula ni de la etapa de ensamblaje de la citocromo *c* oxidasa. Además Arg8p es una proteína soluble en la matriz mitocondrial, en contraste con Cox1p que es altamente hidrofóbica.

Nosotros contamos con una cepa en la cual se reemplazó la secuencia codificante de *COX1* por los de *ARG8m* en el DNAm (*cox1Δ::ARG8m*) (Pérez-Martínez y col. 2003) dejando únicamente las regiones 5' y 3' UTR de *COX1* (Fig. 19).



**Figura 19.** Construcción *cox1Δ::ARG8m*. Toda la región codificante del gen *COX1* fue eliminada y sustituida por el gen *ARG8m*, dejando los extremos 5' UTR y 3' UTR de *COX1*.

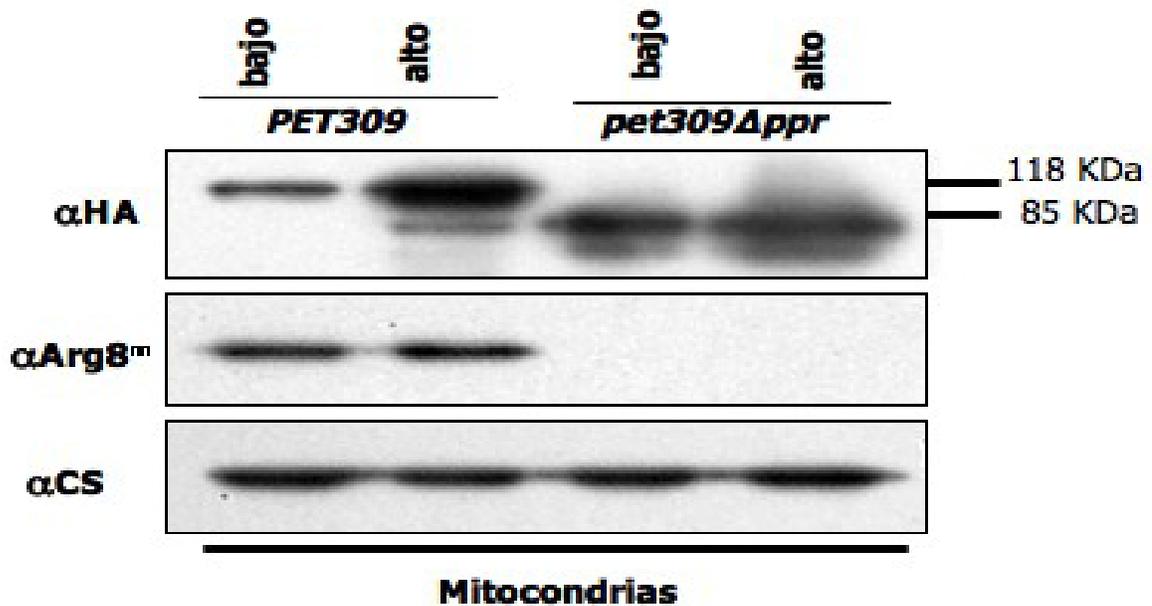
Se ha demostrado que la traducción del mensajero *cox1Δ::ARG8m* es dependiente de Pet309p (Pérez-Martínez *y col*, 2003). Se transformó a la cepa *cox1Δ::ARG8m* con *pet309Δppr* en alto y bajo número de copia. Por medio del fenotipo obtenido con estas construcciones podemos determinar si se está afectando la síntesis ó estabilidad del producto recién sintetizado.



**Figura 20.** Diluciones seriadas de *pet309Δppr*. Las cepas fueron crecidas en medio carente de uracilo (-ura) y medio carente de arginina (-arg) e incubadas durante 4 días a 25°C, 30°C y 37°C.

En condiciones de bajo número de copia como en sobreexpresión, los fenotipos se siguieron a diferentes temperaturas: 25°C, 30°C y 37°C. De esta manera se observó que el fenotipo de la mutante *pet309Δppr* es arginina menos. Lo que indica que la mutación está alterando la síntesis de Cox1p y no su ensamblaje dentro de la membrana interna mitocondrial (Fig. 20).

Como control negativo se utilizó la cepa XPM231 (*Δpet309, cox1Δ::ARG8m*) la cual no crece en medio arg- y como control positivo a una cepa silvestre la cual crece adecuadamente en medio arg-. Estas observaciones se confirmaron al observar que en la mutante no se acumula la proteína Arg8p (Figura 21).



**Figura 21.** Inmunoréplica tipo western para detectar a la proteína Arg8p. Como control se utilizó a la proteína citrato sintasa (proteína de matriz mitocondrial) y la proteína G6PDH (enzima soluble del citosol). 50 $\mu$ g de proteína mitocondrial fue empleada y separada por SDS-PAGE al 12%.

## **7. Discusión**

En este trabajo hemos examinado el papel de los dominios PPR de la proteína Pet309p sobre la expresión del RNA mensajero mitocondrial de *COX1*. Se encontró que al eliminar los siete dominios PPR que contiene este activador traduccional, las cepas de levadura pierden la capacidad respiratoria debido a que no se sintetiza la proteína Cox1p, sin que la mutante *pet309Δppr* disminuya los niveles del mRNA de *COX1*.

Como parte de la caracterización de Pet309pΔPPR, se estudio su localización dentro de la mitocondria para descartar que la mutación provocada en *pet309* interfiriera con su importación a la mitocondria. Para ello se realizaron ensayos de localización de proteínas mitocondriales. Estos resultados indicaron que la proteína mutante está asociada a la membrana interna de manera periférica, orientada hacia la matriz mitocondrial. Este comportamiento es igual al observado en la proteína Pet309p silvestre (Shingú y Pérez-Martínez, datos no publicados). Los resultados obtenidos confirman que a pesar de la mutación introducida en *pet309* no se altera su importación ni localización dentro de la mitocondria.

Uno de los resultados importantes en este estudio fue el encontrar que la pérdida de los dominios PPR de Pet309p provoca un fenotipo no respiratorio de las cepas de levadura que portan esta proteína mutada. Para indagar las causas de este efecto se encontró que la acumulación de la proteína Cox1p se afectaba, lo cual podía deberse a una falla en la síntesis de está proteína. Tal como lo revela el ensayo de traducción de proteínas mitocondriales *in organelo*, se muestra que la proteína Cox1p no se sintetiza en presencia de Pet309pΔPPR, motivo por el cual no se logra detectar a Cox1p inmunológicamente.

Con el experimento de traducción mitocondrial *in organelo* se mostró que Cox1p, no se está sintetizando. La ausencia de Cox1p se puede deber a una rápida degradación de la proteína recién sintetizada. Para descartar un proceso de rápida degradación y uno

de síntesis, empleamos al gen reportero de la traducción Arg8m. Se observó que la mutante es incapaz de crecer en medio carente de arginina y presenta una falla en la acumulación de la proteína Arg8p. Estos resultados obtenidos del reportero de la traducción reflejan un problema a nivel traduccional de Cox1p.

Estos resultados son interesantes ya que sugiere dos hechos. El primero, es la especificidad de los siete dominios PPR de Pet309p por el mRNA de *COX1* al observar que solamente se afecta la síntesis de Cox1p y mostrando una síntesis correcta del resto de las proteínas mitocondriales (Fig. 17). La segunda evidencia sugiere que el papel de los dominios PPR es únicamente a nivel traduccional, tal como lo confirma el reportero de la traducción.

Se ha reportado que Pet309p también juega un papel en la estabilización del mRNA de COX1 (Manthey y McEwen, 1995; Tavares-Carreón y Pérez-Martínez, datos no mostrados). Los datos obtenidos por northern blot reflejan que los niveles del mensajero de *COX1* no disminuyeron (Fig. 18). Adicionalmente, cuando se sobre-expresan *PET309* y *pet309Δppr* se incrementa la acumulación del mensajero de *COX1*.

Fiori *y col.* (2005) han sugerido que la estabilidad de los mensajeros mitocondriales se ven incrementados cuando los niveles de los activadores traduccionales se encuentran en concentraciones altas dentro de la célula. Estos resultados indican que a pesar de la pérdida de los dominios PPR, Pet309p conserva la capacidad de estabilizar al mensajero de *COX1*.

A la fecha se desconoce la secuencia exacta donde Pet309p se une al 5'UTR de mRNA de *COX1*, tampoco hay evidencia de la interacción directa. Sin embargo, creemos que la región PPR esta uniendo de manera específica el 5'UTR del mensajero de *COX1*.

Camacho-Villasana y Pérez-Martínez (datos no publicados) generaron mutantes en las cuales se elimino uno a uno cada PPR. El fenotipo observado fue la pérdida de la

respiración debido a que no hay síntesis de Cox1p. Esto indica que todos los dominios PPR son necesarios para traducir al mRNA de *COX1*. Probablemente esto se debe a que cada PPR debe unir una secuencia específica del 5'UTR del mRNA de *COX1*. Al estar ausente un PPR se deja desprotegida la zona del mRNA con la cual debe de hacer contacto, provocando una alteración en la unión PPR- 5'UTR de *COX1*, y por lo tanto una falla en la traducción de este mensajero

La eliminación de todos los PPR, así como de cada uno de los PPR afecto únicamente la traducción de *COX1* más no la estabilidad. Esto probablemente se debe a que Pet309 debe de tener otros dominios que son importantes para la unión con el mRNA o para una interacción con el mRNA a través de otros factores proteícos.

La función de proteínas PPR en la traducción fue inicialmente identificada en Pet309p (Manthey y McEwen, 1995) y en Crp1 de maíz (Fisk *y col.*, 1999). CRP1 es requerida para la traducción de los genes *petA* y *psaC*, genes codificados en el cloroplasto (Barkan *y col.*1994). Después de estos hallazgos se caracterizaron dos proteínas: HCF152 y PGR3, ambas proteínas PPR fueron identificadas en *A thaliana*. HCF152 está involucrada en el splicing del RNA de *petB* y la estabilización del producto recién modificado, así como de la remoción de regiones intergénicas entre *psbH*, la cual codifica para una subunidad del fotosistema II y *petB* en el cloroplasto (Nakamura *y col.* 2003; Meierhoff *y col.* 2003). PGR3 es necesaria para la estabilización del operon de *petL* (operon de RNA) y también en la traducción del gen *petL* y uno de los genes *ndh* en cloroplasto (Yamazaki *y col.* 2004). Estos resultados obtenidos de los modelos en plantas son consistentes con la idea de que las proteínas PPR están involucradas en pasos de maduración y traducción de RNA de organelos bioenergéticos.

En la actualidad se han incrementado los reportes sobre la función de proteínas PPR, principalmente en plantas superiores, aunque se han ampliado los reportes en otros organismos como protozoarios, algas, insectos y animales, (Lurin *y col.* 2004; Mingler *y*

*col.*, 2006). Sin embargo hasta la fecha hay escasos reportes en los cuales se demuestra una interacción RNA-proteína PPR.

Schmitz-Linneweber *y col.* (2005), demostraron una interacción directa entre CRP1 y la región 5' no traducida de los mensajeros de *petA* y *psaC* de *A. thaliana*. Otro ejemplo es de la proteína *HCF152* codificada en el genoma nuclear de *A. thaliana* y localizada en el cloroplasto. Esta proteína posee 12 motivos PPR. La mutante nula de *hcf152* es incapaz de actuar sobre el extremo 5' del transcrito de *petB*. Cuando se mutan diferentes motivos PPR de este gen, se refleja en una menor afinidad por el RNA de *petB*. Esto promueve la idea de que el número de motivos PPR controlan la afinidad y especificidad por el RNA (Nakamura *y col.* 2003, Nakamura *y col.* 2004).

En humano se ha descrito un proteína PPR conocida como LRP130, la cual se une a hnRNAs y RNA mitocondrial *in vitro* (Mili y Piñol-Roma, 2003). Sin embargo, no existe evidencia de la asociación *in vivo* entre la proteína PPR y su RNA específico. Se ha propuesto que LRP130 es el homólogo de Pet309p en humano. El gen *LRP130* es indispensable para llevar a cabo la expresión de los genes *COX1* y *COX3* (Xu *y col.* 2004). Mootha *y col.* (2003) describieron una mutación autosomal recesiva en el gen *LRP130* que causa una deficiencia de la COX y está asociada al Síndrome de Leigh.

Se desconoce cual es el mecanismo funcional de las proteínas PPR, probablemente el número de motivos PPR contengan la información mínima necesaria para controlar la especificidad por su RNA blanco.

Desde un punto de vista estructural, se ha propuesto que las proteínas PPR son proteínas con repeticiones helicoidales similares a las que se encuentran en los motivos TPR (Das *y col.* 1998). A pesar de no existir cristales de proteínas PPR, otras proteínas en las cuales su estructura terciaria está representada con repeticiones helicoidales han sido reportadas: la  $\beta$ -catenina con 12 motivos armadillo (Hubert *y col.* 1997); la subunidad A

de la fosfatasa 2A con 15 motivos HEAT (Groves *y col.* 1999); Pumilio con 8 motivos Puf (Edwards *y col.* 2001) y la proteína fosfatasa 5 con tres motivos TPR (Das *y col.* 1998).

Todos estos motivos consisten de dos o tres  $\alpha$ -hélices con un giro entre cada hélice. Todas estas proteínas con repeticiones helicoidales forman una estructura cóncava. Los motivos Armadillo, HEAT y TPR están involucrados en interacciones proteína-proteína y la superficie cóncava es la responsable de esta interacción. La estructura Pumilio usa la misma superficie para interactuar con RNA (Messias y Sattler, 2004).

No se tiene a la fecha antecedentes de la función biológica de las proteínas PPR, pero se sugiere que están implicadas en la unión con macromoléculas (específicamente ácidos nucleicos) a través de una superficie formada por una cavidad de varias unidades repetidas de alfa hélices. Probablemente los dominios PPR de Pet309p adopten una conformación semejante a las familias de proteínas de unión a RNA o a las proteínas anteriormente mencionadas.

Los motivos PPR de Pet309p se encuentran ubicados en la parte central de la proteína. Para muchas proteínas PPR de plantas se han identificados otros motivos diferentes de los PPR, localizadas en el extremo C-terminal, los cuales son conocidos como E, E+ y DYW (Lurin *y col.*, 2004). Probablemente estos motivos tengan una función adicional e independiente de los motivos PPR. Okuda *y col.* (2007) intercambiaron los extremos C-terminales (con motivos E/E+) de dos proteínas PPR: CCR4 y CCR21. Ambas proteínas están involucradas en la edición de RNA en cloroplasto. Los C-terminales de ambas proteínas tiene una función en común sobre la edición del RNA más no estuvieron involucrados en el reconocimiento secuencia-específica del RNA. Este último papel es el que se propone desempeñan los dominios PPR.

La proteína Pet309p no presenta ninguno de los motivos antes mencionados, sin embargo, cuenta con un extremo carboxilo terminal de 300 aminoácidos. Estos últimos

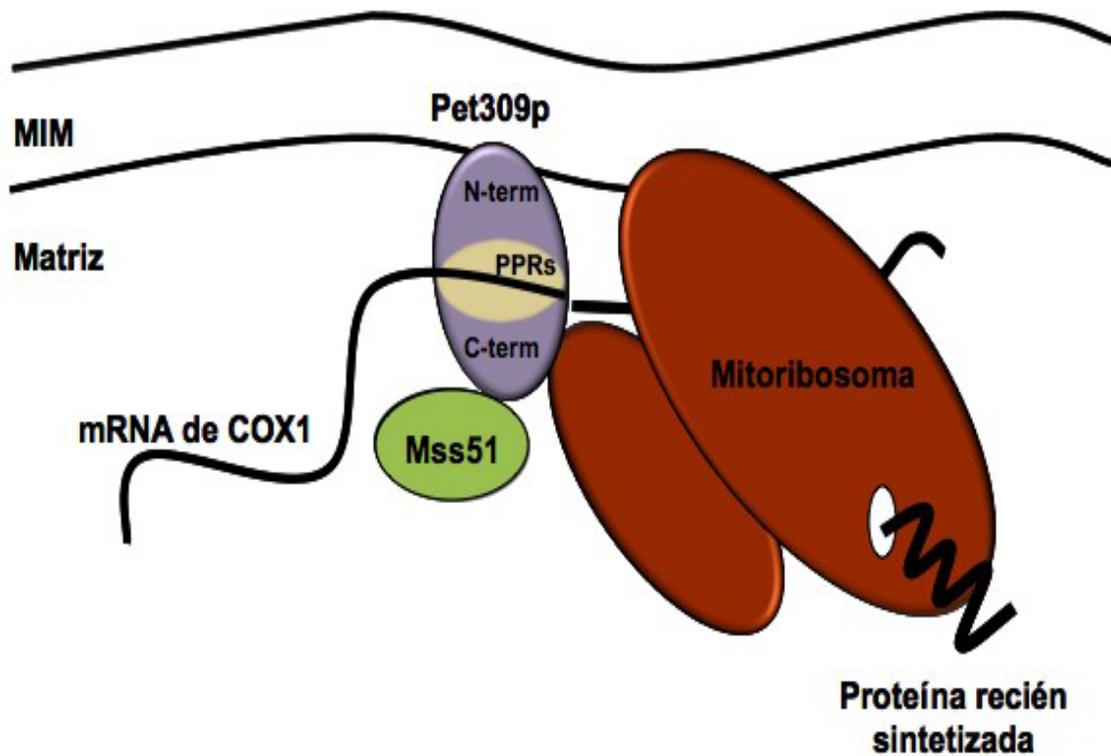
aminoácidos podrían formar regiones importantes para su función sobre la expresión de *COX1*.

Zamudio y Pérez-Martínez (datos no publicados) crearon una mutante de *pet309* carente del extremo carboxilo terminal. Esta mutación en *pet309* provocó en *S. cerevisiae* incapacidad respiratoria debido a una falla en la traducción del mRNA de *COX1*.

Se propone que los dominios PPR de Pet309p son necesarios para unir de manera específica el 5'UTR del mensajero de *COX1* y con ayuda de la porción C-terminal de Pet309p se llevaría a cabo una interacción con los ribosomas mitocondriales para así promover el comienzo de la traducción de *COX1*.

Pet122p activador traduccional específico del mensajero de *COX3* interactúa funcionalmente con el ribosoma mitocondrial. Mutaciones en las cuales se eliminaba el extremo C-terminal provocaban la pérdida de la función (Haffter *y col*, 1990). Sin embargo, estas mutaciones pueden ser suprimidas por mutaciones en genes nucleares que codifican para tres proteínas de la subunidad pequeña ribosomal mitocondrial: PET123, MRP1 y MRP17 (McMullin *y col*, 1990; Myers *y col*, 1987; Haffter y Fox, 1992)

Es posible que los motivos PPR de Pet309 sujeten al mensajero de *COX1* y promuevan el inicio de su traducción (Figura 23). Probablemente los siete dominios PPR presentes en Pet309p se unen a una porción específica del 5'UTR del mRNA de *COX1*, ayudando al ribosoma a reconocer el ATG adecuado para comenzar la traducción. Tal vez la porción C-terminal de Pet309p esté interaccionando con proteínas localizadas en los ribosomas mitocondriales o con otros factores que estén involucrados en la síntesis de Cox1p y que actúen específicamente sobre el extremo 5'UTR de *COX1*. Tal es el caso de Mss51 proteína involucrada en la síntesis de Cox1p. Mss51 se une a la porción 5'UTR del mRNA de *COX1* así como a Cox1p recién sintetizada (Pérez-Martínez *y col*, 2003). Se desconoce si Mss51 tiene la capacidad de unir al RNA, y en caso afirmativo si Pet309p y Mss51 se unen a la misma región del mRNA de *COX1*.



**Figura 23.** Modelo de acción de los dominios PPR de la proteína Pet309p. Los dominios PPR localizados en la parte central de Pet309p están sujetando al mensajero de *COX1*. El extremo C-terminal podría estar interactuando con proteínas localizadas en los ribosomas mitocondriales o con Mss51, otro factor involucrado en la síntesis de Cox1p.

## **8. Conclusión**

- Los dominios PPR de Pet309p son necesarios para que se lleve a cabo la traducción de Cox1p sin afectar la estabilidad del mRNA de Cox1p.

## **9. Perspectivas para este trabajo**

- Caracterizar las mutantes a las que se les ha eliminado cada uno de los PPR. Para esto se realizará: *in organelo translation* y control respiratorio por medio de oxímetrosias.
- Buscar revertantes respiratorias de alguna de las mutantes que carecen de un sólo PPR. Así se podría obtener información de la zona sobre la cual actúa cada uno de los dominios PPR. Por ejemplo a que región del 5' UTR de *COX1* se unen los PPR. Alternativamente se podrían identificar otros factores interactuantes con Pet309 o con el mRNA de *COX1*.
- Realizar experimentos de interacción del mRNA de *COX1* con Pet309p, por medio de inmunoprecipitación de RNA.

## 10. Otros Métodos

### 10.1. Medios de cultivo

<b>YPD o YPRaf</b>	<b>YPEG</b>	<b>Medio Mínimo</b>
1% de extracto de levadura	1% de extracto de levadura	0.67% base nitrogenada de levadura sin aminoácidos
2% de bactopectona	2% de bactopectona	2% de glucosa ó 2% de rafinosa
2% de glucosa o rafinosa	2% de etanol	
	3% de glicerol.	

### 10.2. Oligonucleótidos y condiciones de PCR para la generación de *pet309Δppr*

#### **PET309F12**

5' GTGAATGGACATTGTGAATTTACG

#### **FTC-R8:**

5' CCGgaattcGCTATGGAAGGTAGCTTACCG

sitio *EcoRI*, mostrado en minúsculas

<b>Condiciones de la PCR</b>		
3 min	94°C	5 ciclos
45 seg	94°C	
1 min	50°C	
3 min	72°C	
45 seg	94°C	20 ciclos
1 min	54°C	
3 min 20 seg	72°C	
3 min 20 seg	72°C	

S/N G:121 A:94 T:136 C:90

KB\_3100\_POP6\_BDTV3.mob

Jan 24, 2006 04:02PM, PST

KB.bcp

Pls 1377 to 14543 Pk1 Loc:1377

Jan 24, 2006 04:47PM, PST

KB 1.1.1 Cap:13

Version 5.1.1 HISQV Bases: 782 FAVIOLA TAVARES

Spacing: 17.77 Pls/Panel150C

1 A TTTTAT G GAG A CTTGATGTTT TGA GAACTTT TTTATCATTCATGAGGCA TCAAAT GTT CGCCCGGATTTTATCTTATTT GAAAACAATTCAGCTAACGCNA GGCCCGCAATGCGT

133 CTCAATTT GCAACTAGTGTGTTGTTCTTATTAACCTTATTTAGGAATTTTCTCTGCGAAGCA GTTTGGAA TTTACAGTGGCAATAACCTGCCGATAGT GAGTTCTGACCTGACGTGATTC

253 FAAGACGTTTGTCCATGCGAAGTAAATTTGTTTCGCAACAATTTGGAATACCCGTGCTCGACGACCAAA CCAATTTGATTTCTTTGGTGGCTCTTAGGCTCTAAGGCTGATTAATTC

385 GGCACGCTTAAACAACAAGTTCATGCTCTTTTCG GATTCGGTAACTACCTTCCATA GCGAATTCGGGAATCACTAGTGAATTCGGCCCGCTGCAGTCCGACATTTGGGAAAGCTCCCAACG

505 GTTGGATGCATAGCTTGAATTTCTAATA GTGTCACCTAAATA GCTTGGCCGTAATCATGG TCAATA GCTGTTTCTTGTGAAATTTGTTATCCGCTCACAAATTCACACACAACTTACGAGCCGAAAGCAT

Printed on d Jan 25 2006 10:42AM, PST

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

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

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

10mM DTT

##### **MP2**

1.2M Sorbitol

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

3mg de zimoliasa

##### **SEH**

20mM HEPES pH 7.4

1mM EDTA

0.6M sorbitol

##### **2xSEH**

40mM HEPES pH 7.4

2 mM EDTA

1.2M sorbitol

##### **Buffer Homogenizador**

10M Tris pH 7.4

1mM EDTA

0.2% BSA

1mM PMSF

0.6M sorbitol

50 ug/ml TLCK

##### **Nicodenz**

50% con H<sub>2</sub>O



**Wash solution:**

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

**Stripping solution:**

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

**Dilución de anticuerpos**

Anti Arg8p	1: 10,000
Anti Cyt b <sub>2</sub>	1: 2000
Anti Cyt c1	1: 1000
Anti CS	1: 1000
Anti Cox1p	1: 200
Anti G6PDH	1: 10,000
Anti Yme1	1: 1000
Anti HA/peroxidasa	1: 2000
Anti conejo/peroxidasa	1: 5000
Anti ratón/peroxidasa	1: 3000

**10.7. Amortiguadores para el fraccionamiento mitocondrial.**

**Solución CH:** NaCl 100mM; HEPES pH 7.4 20mM

**10.8. Amortiguadores para extracción alcalina de mitocondrias.**

**Solución Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** 200mM pH 11

### 10.9. Amortiguadores para sensibilizada a proteinasa K en mitocondrias.

**Solución SH:** Sorbitol 0.6M; HEPES pH 7.4 20mM

**Solución HEPES:** HEPES pH 7.4 20mM

### 10.10. Amortiguador ioTL 1.5X (Preparar a 4 °C)

<b>375 µl</b>	<b>2.4M Sorbitol</b>
<b>225 µl</b>	<b>1 M KCl</b>
<b>22.5 µl</b>	<b>1 M KPi 7.2 M</b>
<b>30 µl</b>	<b>1 M Tris-HCl pH 7.4</b>
<b>19 µl</b>	<b>1 M MgSO<sub>4</sub></b>
<b>45 µl</b>	<b>100 mg/ml BSA (libre de ácidos grasos)</b>
<b>30 µl</b>	<b>200 mM ATP<sup>&amp;</sup></b>
<b>15 µl</b>	<b>50 mM GTP<sup>&amp;</sup></b>
<b>9.1 µl</b>	<b>Aminoácidos (-Met, -Tyr, -Cys) 2 mg/ml de cada uno</b>
<b>10 µl</b>	<b>10 mM Cisterna</b>
<b>18.2 µl</b>	<b>1 mg/ml Tirosina</b>
<b>1.7 mg</b>	<b>Acido cetoglutarico*</b>
<b>3.5 mg</b>	<b>Fosfoenol piruvato*</b>
	<b>Ajustar a 1 ml con H<sub>2</sub>O *</b>

\* pesar y disolver en 200 µl de H<sub>2</sub>O. Agregar a la mezcla para completar 1 ml de volumen final.

& Adicionar hasta el final de la preparación.

Agregar piruvato cinasa a una concentración final de 0.2%, antes de comenzar la reacción.

### 10.11. Geles desnaturizantes SDS-PAGE para ioTL

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

Para 250 µl de 2X buffer Laemmli agregar 6.25 µl de B-mercaptoetanol y llevar a 500 µl con H<sub>2</sub>O

### 10.12. Preparación de geles para RNA

Todas las soluciones acuosas se preparan con H<sub>2</sub>O-DEPC

	<b>Gel de 150 ml</b>
<b>Agarosa</b>	<b>1.5 g</b>
<b>H<sub>2</sub>O-DEPC</b>	<b>134.3 ml</b>
<b>Hervir para disolver completamente.</b>	
<b>MOPS 10X</b>	<b>15 ml</b>
<b>Formaldehído</b>	<b>26.7 ml</b>
<b>Agitar y vaciar en campana</b>	
<b>Correr el gel con MOPS al 1x hasta <math>^{3}/_{4}</math> V/cm</b>	

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

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

### **Amotiguador SSC 10X para transferencia de RNA**

NaCl	175.3g
Citrato de Sodio	88.2g
Ajustar pH 7.0 con HCl	

### **Solución Denhardt's 50X**

1% w/v BSA

1% w/v Ficoll

1% w/v PVP

Filtrar con membrana de 0.45  $\mu\text{m}$ .

## **11. Literatura Citada**

- ♦ Akagi H., Nakamura A., Yokozeki-Misono Y., Inagaki A., Takahashi H., Mori K., and Fujimura T. 2004. Positional cloning of the rice *Rf-1* gene, a restorer of BT-type cytoplasmic male sterility that encodes a mitochondria-targeting PPR protein. *Theor Appl Genet.* 108: 1449-1457.
- ♦ Auchincloss A., Zerges W., Perron K., Girard-Bascou J., and Rochaix JD. 2002. Characterization of Tbc2, a nucleous-encoded factor specifically required for traslation of the chloroplast psbC mRNA in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Cell Biol.* 157: 953-962.
- ♦ Barrientos A., Barros M.H., Valnot I., Roting P., and Tzagoloff A. 2002. Cytochrome oxidase in health and disease. *Gene* 286: 53-63.
- ♦ Barkan A., Walker M., Nolasco M., and Johnson D. 1994. A nuclear mutation in maize blocks the processing and translation of several chloroplast mRNAs and provides evidence for the differential translation of alternative mRNA forms. *EMBO J.* 13: 3170-3181.
- ♦ Bentolila S., Alfonso A. A., and Hanson M.R. 2002. A pentatricopetide repeat-containing gene restores fertility to cytoplasmic male-sterile plants. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99: 10887-10892.
- ♦ Bonnefoy N., and Fox T. D. 2001. Genetics transformation of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Meth Cell Biol.* 65: 381-396.
- ♦ Brown N. G., Costanzo M. C., and Fox T. D. 1994. Interactions among three proteins that specifically activate translation of the mitochondria *COX3* mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 14: 1045-1053.
- ♦ Burke D., Dawson D., and Stearns T. 2000. *Methods in yeast genetics.* Cold Spring Harbord Laboratory Press, Cold Spring Harbord N York. U.S.A.
- ♦ Capaldi, R.A. 1990. Structure and functions of cytochrome *c* oxidase. *Annu. Rev. Biochem.* 1990. 59: 569-96.

- ♦ Coffin J.W., Dhillon R., Ritzel R., and Nargang F.E. 1997. The *Neurospora crassa* *cya-5* nuclear gene encodes a protein with a region of homology to the *Saccharomyces cerevisiae* PET309 protein and is required in a post-transcriptional step for the expression of the mitochondrial encoded *COX1* protein. *Curr Genet.* 32: 273-280.
- ♦ Costanzo M.C., and Fox T.D. 1986. Product of *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene *PET494* activates translation of a specific mitochondrial mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 6: 3694-3703.
- ♦ Costanzo M C., and Fox TD. 1988. Specific translational activation by nuclear gene products occurs in the 5' untranslated leader of a yeast mitochondrial mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 2677-2681.
- ♦ Costanzo M.C., and Fox T.D. 1990. Control of mitochondrial gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* 24: 91-113.
- ♦ Costanzo M.C., and Fox T.D. 1993. Suppression of a defect in the 5'-untranslated leader of the mitochondrial *COX3* mRNA by a mutation affecting an mRNA – specific translational activator protein. *Mol Cell Biol.* 13: 4806-4813
- ♦ D'Andrea L.D., and Regan L. 2003. TRP proteins: the versatile helix. *TRENDS Biochem Sci.* 28: 655-662.
- ♦ Das A.K., Cohen P.T.W., and Barford D. 1998. The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO J.* 17: 1192-1199.
- ♦ Decoster E. Simon M. Hatat D. and Faye G. (1990) The MSS51 gene product is required for the translation of the COX1 mRNA in yeast mitochondria. *Mol. Gen. Genet.* 224:111-118.
- ♦ Desloire S., Gherbi H., Laloui W., Marhadour S., Clouet V., Cattolico L., Falentin C., Giancola S., Renard M., Budar F., Small I., Caboche M., Delourme R., and Bendahmane A. 2003. Identification of the fertility restoration locus *Rfo* in radish as a member of the pentatricopeptide repeat protein family. *EMBO Rep.* 4: 588-594.

- ♦ Dieckmann C., and Staples R. 1994. Regulation of mitochondrial gene expresión in *Saccharomyces cerevisiae*. Int Rev Cytol. 152: 145-181.
- ♦ Diekert K., Kispal G., Guiard B., and Lill R. 1999. An internal targeting signal directing proteins into the mitochondrial intermembrane space. Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 11746-11751.
- ♦ Dowhan W, Bibus CR, and Schatz G. 1985. The cytoplasmically-made subunit IV is necessary for assembly of cytochrome *c* oxidase in yeast. EMBO J. 4: 179-184.
- ♦ Edwards T.A., Pyle S.E., Wharton R.P., and AggarwallA.K. 2001. Structure of pumilio reveals similarity between RNA and peptide binding motif. Cell. 105: 281-9
- ♦ Fiori A., Pérez-Martínez X., and Fox T.D. 2005. Overexpression of the *COX2* translational activator, Pet112p, prevents translation of *COX1* mRNA and cytochrome *c* oxidase assembly in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Microbiol. 56: 1689-1704.
- ♦ Fisk D.G., Walker M.B., and Barkan A. 1999. Molecular cloning of the maize gene *crp1* reveals similarity between regulators of mitochondrial and chloroplast gene expression. EMBO J. 18: 2621-2630.
- ♦ Fontanesi F., Soto IC., Horn D., and Barrientos A. 2006. Assembly of mitochondrial cytochrome *c* oxidase, a complicated and highly regulated cellular process. Am J Physiol Cell Physiol. 291:C1129-C1147.
- ♦ Fox T. D. 1996. Genetics strategies for identification of mitochondrial translation factors in *Saccharomyces cerevisiae*. Methods Enzymol. 264: 228-237.
- ♦ Fox T. D. (1996-a) Genetics in mitochondrial translation. Translational control. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 25:733-758.
- ♦ Fox T. D. (1996-b) Translational control of endogenous and recorded nuclear genes in yeast mitochondria: regulation and membrane targeting. Experimentia (Basel). 52:1130-1135.

- ♦ Fujiki Y., Hubbard A., Fowler S., and Lazarrow P. 1982. Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 93: 97-102.
- ♦ Glick B., and Pon L. 1995. Isolation of highly purified mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in enzymology.* 260: 213-223.
- ♦ Gothandam K M., Kim E S., Cho H., and Chung Y. 2005. OsPPR1, a pentatricopeptide repeat protein of rice is essential for the chloroplast biogenesis. *Plant Mol Biol.* 58: 421-433.
- ♦ Grivell L.A. 1995. Nucleo-mitochondrial interactions in mitochondrial gene expression. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30: 121-164.
- ♦ Groves M.R., and Barford D. 1999. Topological characteristics of the helical repeat proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9:383-389.
- ♦ Gutiérrez-Marcos JF, Dal Prà M, Giulini A, Costa LM, Gavazzi G, Cordelier S, Sellam O, Tatout C, Paul W, Perez P, Dickinson HG, Consonni G. 2007. Empty pericarp4 encodes a mitochondrion-targeted pentatricopeptide repeat protein necessary for seed development and plant growth in maize. *Plant Cell.* 19:196-210.
- ♦ Haffter P., McMullin T.W., and Fox T.D. 1990. A genetic link between an mRNA-specific translational activator and the translational system in yeast Mitochondria. *Genetics.* 152: 495-503.
- ♦ Haffter P., and Fox T.D. 1992. Suppression of carboxy-terminal truncation of the yeast mitochondrial mRNA-specific translational activator PET122 by mutations in two new genes, MRP17 and PET127. *Genetics.*
- ♦ Hattori M., Miyake H., and Sugita M. 2007. A pentatricopeptide repeat protein is required for RNA processing of clpP Pre-mRNA in moss Chloroplasts. *J Biol Chem.* 282: 10773-10782.
- ♦ Hill J.E., Myers A.M., Koerner T.J. and Tzagoloff A. 1993. Yeast/E. coli shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast.* 163-167.
- ♦ Huber A.H., Nelson W.J., and Weis W.I. 1997. Three dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell.* 90: 871-882.

- ♦ Ito H., Fukuda Y., Murata K., and Kimura A. 1983. Transformation intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol.* 153: 163-168.
- ♦ Iwata S., Ostermeir C., Ludwig B and Michel H. 1995. Structure at 2.8 Å of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature.* 376: 660-669.
- ♦ Jones E., Pringle J.R., and Broach J. R. 1992. The molecular and cell biology of *Saccharomyces cerevisiae*, Vol 2. Gene Expression. Cold Spring Harbord Laboratory Press, Cold Spring Harbord N York. U.S.A.
- ♦ Kadenbach B, Huttemann M, Arnold S, Lee I, and Bender E. 2000. Mitochondrial energy metabolism is regulated via nuclear-coded subunits of cytochrome c oxidase. *Free Radic Biol Med.* 29: 211-221.
- ♦ Lahmy S., Barnèche F., Derancourt J., Filipowicz W., Delseny M., and Echeverria M. 2000. A chloroplastic RNA-binding protein is a new member of the PPR family. *FEBS Letters.* 480:255-260.
- ♦ Lurin C., Andrés C., Aubourg S., Bellaoui M., Bitton F., and Bruyere C. 2004. Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell.* 16: 2089-2103.
- ♦ Maleszka R., Skelly P J., and Clark-Walker G D. 1991. Rolling circle replication of DNA in yeast mitochondria. *EMBO J.* 10:3923-3929.
- ♦ Manthey G M., and McEwen J E. 1995. The product of the gene *PET309* is required for translation of mature mRNA and stability or production of intron-containing RNAs derived from the mitochondrial *COX1* locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14: 4031- 4043.
- ♦ Manthey G M., Przybula-Zawislak B D., and McEwen J E. 1998. The *Saccharomyces cerevisiae* Pet309p protein is embedded in the mitochondrial inner membrane. *Eur J Biochem.* 255: 156-161.
- ♦ Markwell M., Haas S., Bieber L., and Tolbert N. 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem.* 87: 206-210.

- ♦ McMullin T., and Fox T D. 1993. *COX3* mRNA-specific translational activator proteins are associated with the inner mitochondrial membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem. 268: 11737-11741.
- ♦ McMullin T., Haffter P., and Fox T D. 1990. A novel small subunit ribosomal protein of yeast mitochondria that interacts functionally with an mRNA-specific translational activator. Mol. Cell. Biol. 10: 4590-4595.
- ♦ Messias A., and Sattlet M. 2004. Structural basis of single-stranded RNA recognition. 37: 279-287.
- ♦ Mashkevich G., Reppetto B., Moira Glerum D., Jin C., and Tzagoloff A. 1997. SHY1, the yeast homolog of the mammalian SURF-1 gene, encodes a mitochondrial protein required for respiration. J Biol Chem. 272: 14356-14364.
- ♦ Mili S., and Piñol-Roma S. 2003. LRP130, a pentatricopeptide repeat motif protein a noncanonical RNA-binding domain, is bound in vivo to mitochondrial and nuclear RNAs. Mol Cell Biol. 23: 4972-4982.
- ♦ Mingler M K., Hingst A M., Clement S L., Yu L E., Reifur L., and Koslowsky. 2006. Identification of pentatricopeptide repeat protein in *Trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol. 150:37-45.
- ♦ Mootha V.K., Lepage P., Miller K., Bunkenborg J., Reich M., Hjerrild M., Delmonte T., Villeneuve A., Sladek R., Xu F., Mitchell G A., Morin C., Mann M., Hudson T J., Robinson B., Rioux J D., and Lander. E.S. 2003. Identification of a gene causing human cytochrome c oxidase deficiency by integrative genomics. Proc Natl Acad Sci USA. 100: 605-610.
- ♦ Mulero J., and Fox T D. 1993b. PET111 acts in the 5'-leader of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial *COX2* mRNA to promote its translation. Genetics. 133: 509-516.
- ♦ Mulero J., and Fox T D. 1994. Reduced but accurate translation from a mutant AUA initiation codón in the mitochondrial COX3 mRNA of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Gen Genet. 242: 383-390.

- ♦ Myers A M., Crivellone M D., and Tzagaloff A. 1987. Assembly of the mitochondrial membrane system: MRP1 and MRP2 two yeast nuclear genes coding for mitochondrial ribosomal proteins. *J Biol Chem.* 262: 3388- 3397.
- ♦ Naithani S., Saracco S A., Butler C A., and Fox T D. 2003. Interactions among COX1, COX2, and COX3 mRNA-specific translational activator proteins on the inner surface of the mitochondrial inner membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 14: 324-333.
- ♦ Nakamura T., Meierhoff K., Westhoff P., and Schuster G. 2003. RNA-binding properties of HCF152, an Arabidopsis PPR protein involved in the processing of chloroplast RNA *Eur J Biochem.* 270: 4070-4081.
- ♦ Nakamura T., Schuster G., Sugiura M., and Sugita M. 2004. Chloroplast RNA-binding and pentatricopeptide repeat proteins. *Biochem Soc.* 32: 571-574.
- ♦ Nijtmans L G., Artal Sanz M., Bucko M., Farhoud M.H., Feenstra M., Hakkaart G.A., Zeviani M., and Grivell L A. 2001. Shy1p occurs in a high molecular weight complex and is required for efficient assembly of cytochrome c oxidase in yeast. *FEBS Lett.* 498: 46–51.
- ♦ Okuda K., Myouga F., Motohashi R., Shinozaki K., and Shikanai T. 2007. Conserved domain structure of pentatricopeptide repeat proteins involved in chloroplast RNA editing. *PNAS.* 104:8178-8183.
- ♦ Pel H., Tzagoloff A., and Grivell L. 1992. The identification of 18 nuclear genes required for the expression of the yeast mitochondrial gene encoding cytochrome c oxidase subunit 1. *Curr Genet.* 21:139-146.
- ♦ Pérez-Martínez X., Broadley S A., and Fox, T D. 2003. Mss51 promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. *EMBO J.* 22: 5951-5961.
- ♦ Saraste M. 1990. Structural features of cytochrome oxidase. *Q Rev Biophys* 23: 331-366.
- ♦ Schmitz-Linneweber C., Williams-Carrier R., and Barkan A. 2005. RNA immunoprecipitation and microarray analysis show a chloroplast

pentatricopeptide repeat protein to be associated with the 5' region of mRNAs whose translation it activates. *Plant Cell*. 17: 2791-2804.

- ♦ Sherman F. 1963. Respiration-deficient mutants of yeast I genetics. *Genetics*. 48: 375-385.
- ♦ Shingú Vazquez A. Análisis de la asociación de la proteína Pet309p a la membrana interna mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Maestría. 2006.
- ♦ Sikorski R S., and Hieter P. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 122: 19-27.
- ♦ Small I.D., and Peeters N. 2002. The PPR motif – a motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem Sci*. 25: 46-47.
- ♦ Steele D F., Butler C A., and Fox T D. 1996. Expression of a recoded nuclear gene inserted into yeast mitochondrial DNA is limited by mRNA-specific translational activation. *Proc Natl Acad Sci*. 93: 5253-5257
- ♦ Taanman J W., and Capaldi R A. 1993. Subunit VIa of yeast cytochrome c oxidase is not necessary for assembly of the enzyme complex but modulates the enzyme activity. Isolation and characterization of the nuclear-coded gene. *J Biol Chem* 268: 18754-18761.
- ♦ Tsukihara T., Aoyama H., Yamashita E., Tomizaki T., Tamaguchi H., Shinzawa-Itoh K., Nakashima R., Yaono R., and Yoshikawa S. 1996. The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science*. 272: 1136-1144.
- ♦ Vazquez Memije ME., y Tuena de Gomez Poyou. 2002. Mitocondria, una Mirada a la evolución de los conceptos básicos y modernos. Ed Prado. México.
- ♦ Williams P M., and Barkan A. 2003. Chloroplast -localized PPR protein required for plastid ribosome accumulation. *Plant J*. 36: 675-686.
- ♦ Xu F., Morin C., Mitchell G., Ackerley C., and Robinson B H. 2004. The role of the LRPPRC (leucine-rich pentatricopeptide repeat cassette) gene in

cytochrome oxidase assembly: mutation causes lowered levels of COX (cytochrome *c* oxidase) I and COXIII mRNA. *Biochem J.* 382: 331-336.

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