



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
BÁSICA

“Caracterización de la proteína Hah1 en mitocondrias
de *Saccharomyces cerevisiae*”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

P R E S E N T A :

ALDO EDUARDO GARCÍA GUERRERO

Tutora: DRA. XOCHITL PÉREZ MARTÍNEZ



MÉXICO, D.F.

FEBRERO 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis se realizó bajo la asesoría de la Dra. Xochitl Pérez Martínez en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se agradece la asesoría técnica de la Dra. Yolanda Margarita Camacho Villasana del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, además de su valiosa participación en el presente trabajo.

También se agradece la asesoría técnica de la Dra. María Teresa Lara Ortiz del Departamento de Bioquímica y Biología Estructural del Instituto de Fisiología Celular.

También se agradece la asesoría técnica de la Q.F.B. Teresa Ballado del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

Las cepas de la colección “YKO MAT α Strain Collection – Glycerol Stock” (Open Biosystems) de *S. cerevisiae*, fueron brindadas por el Dr. Gabriel del Río Guerra del Departamento de Bioquímica y Biología Estructural del Instituto de Fisiología Celular.

Se agradece al Dr. Salvador Uribe Carvajal del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular por el oxímetro YSI 5300 para su uso.

Agradezco la participación del jurado de titulación conformado por:

Dr. Georges Dreyfus Cortés

Dra. Xochitl Pérez Martínez

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco

Dr. Roberto Hernández Fernández

Dr. Óscar Flores Herrera

Este trabajo de tesis se llevó a cabo gracias a los apoyos financieros de CONACyT (82505) y PAPIIT (IN215008-3). Durante la elaboración de la tesis de

Licenciatura fui apoyado por las becas de PAPIIT (IN215008-3) y por la beca de Titulación de la Secretaria de Educación Pública.

CONTENIDO

ABREVIATURAS	1
NOMENCLATURA GENÉTICA	2
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	6
La mitocondria	6
La cadena respiratoria mitocondrial	6
El genoma mitocondrial	9
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudio	11
Citocromo <i>c</i> oxidasa (CcO)	13
Los activadores traduccionales del RNA mensajero de <i>COX1</i>	15
JUSTIFICACIÓN	20
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	21
MATERIALES Y MÉTODOS	22
Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas en el presente trabajo	22
Medios de cultivo	23
Generación de mutantes nucleares	24
Transformación de levadura	25
Purificación de DNA total de levadura	25
Fusión de la etiqueta de HA al carboxilo terminal de Hah1 y clonación del gen <i>HAH1-HA</i>	26
Transformación de <i>E. coli</i>	30
Obtención de la fracción mitocondrial cruda	31
Cuantificación de proteínas por el método de Lowry	34
Fraccionamiento mitocondrial	35

Ensayo de protección a proteinasa K	36
Geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes 12% (SDS-PAGE)	38
Preparación de proteína total de levadura	39
Réplica en Western blot	40
Diluciones seriadas	42
Consumo de oxígeno	43
RESULTADOS	46
LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE Hah1	46
Detección de Hah1	46
Localización subcelular de Hah1	47
Localización de Hah1 en las fracciones mitocondriales	48
Ensayo de protección a proteinasa K	50
ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE Hah1	51
Fenotipo de crecimiento en medio respiratorio de Hah1	52
Efecto de Hah1 sobre la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial y la actividad de la CcO	53
Estudio de la interacción de Hah1 con Oms1 y Fmp46	56
DISCUSIÓN	57
Hah1 es una proteína mitocondrial	57
Estudio de la función de Hah1	59
PERSPECTIVAS	64
APÉNDICE	66
BIBLIOGRAFÍA	67

ABREVIATURAS

- 3'UTR Región 3' no traducida del mRNA
- 5'UTR Región 5' no traducida del mRNA
- ADP Adenosil difosfato
- APS Persulfato de amonio
- ATP Adenosil trifosfato
- BLASTP Siglas en inglés de Basic Local Aligment Search Tool
- BSA Albumina bovina sérica
- CcO Citocromo c oxidasa
- Cox1 Subunidad 1 de la CcO
- COX1 Gen de la subunidad 1 de la CcO
- Cox2 Subunidad 2 de la CcO
- COX2 Gen de la subunidad 2 de la CcO
- Cox3 Subunidad 3 de la CcO
- COX3 Gen de la subunidad 3 de la CcO
- dH₂O Agua destilada
- DNA Ácido desoxirribonucleico
- DTT Ditioneitol
- EDTA Ácido etilendiamintetraacético
- G6PDH Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
- HA Hemaglutinina
- HEPES Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
- mp Mitoplastos
- mRNA Ácido ribonucleico mensajero
- mt Mitocondrias
- PCR Reacción en cadena en polimerasa
- PEG Polietilen glicol
- PK Proteínasa K
- PMSF Fluoruro de fenilmetilsulfonato
- PPR Repetición de pentatricopéptido
- RNA Ácido ribonucleico
- rRNA Ácido ribonucleico ribosomal
- SDS Dodecil sulfato de sodio
- SDS-PAGE Gel de acrilamida en condiciones desnaturizantes
- SL Síndrome de Leigh
- TCA Ácido tricloro acético
- TEMED N,N,N',N'-tetrametil-etano-1,2-diamina
- TLCK N α -Tosil-Lys-clorometilcetona
- TMPD N,N,N',N'-Tetrametil-*p*-fenilendiamina
- tRNA Ácido ribonucleico de transferencia
- Var1 Proteína de la subunidad chica ribosomal mitocondrial
- VAR1 Gen de la proteína de la subunidad chica ribosomal mitocondrial

NOMENCLATURA GENÉTICA (Amberg *et al*, 2005)

- Los alelos dominantes se escriben con las primeras letras del nombre del gen en mayúsculas, seguidas por un número, todo en itálicas, por ejemplo, *LEU2* o *HAH1*.
- Los alelos recesivos se escriben en minúsculas e itálicas, por ejemplo, *leu2* o Δ *hah1*.
- Las proteínas se representan con la primera letra en mayúscula y el resto en minúscula, por ejemplo, Leu2 o Hah1.
- La inserción de un gen (*LEU2*) en el locus de otro gen (*ARG8*), sin que se interrumpa la función de ninguno de los dos genes se escribe por ejemplo, *ARG8::LEU2*.
- La inserción de un gen (*LEU2*) en el locus de otro gen (*HAH1*), en donde se interrumpe la función del segundo se escribe por ejemplo, *hah1::LEU2*.

RESUMEN

La citocromo *c* oxidasa (CcO) es el último aceptor de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial, que cataliza la reducción del O₂ en H₂O. En *Saccharomyces cerevisiae*, la CcO contiene 11 subunidades, de las cuales 3 son codificadas en el DNA mitocondrial (Cox1, Cox2 y Cox3). Cox1 es la proteína más grande y más hidrofóbica de la CcO, y contiene el sitio catalítico para la reducción de oxígeno. Su síntesis y ensamblaje dentro de la mitocondria, están ampliamente regulados. La traducción del mRNA de *COX1* está regulada por los activadores traduccionales Pet309 y Mss51, los cuales están codificados en el genoma nuclear y son importados a la mitocondria. Pet309 y Mss51 están asociados a la membrana interna mitocondrial, se unen a la región 5' no traducida (5'UTR) del mRNA de *COX1* y se sugiere que sitúan al ribosoma mitocondrial en el codón de inicio de *COX1*. A partir de este mecanismo de acción se propone que los activadores traduccionales contribuyen a ensamblar a Cox1 a la membrana interna mitocondrial de manera cotraduccional.

En comparación con *S. cerevisiae*, en los mamíferos aún no es claro el mecanismo que coordina la traducción y ensamblaje de Cox1. En mamífero existe una proteína ortóloga de Pet309 denominado Lrpprc, de la cual aún no se conoce su mecanismo de acción ya que además de tener una acción sobre la síntesis de Cox1 también se ha encontrado que está involucrado en los mecanismos de regulación de RNA's citosólicos. Recientemente se encontró un posible activador traduccional (Taco1) el cual se encontraba mutado en un paciente con Síndrome de Leigh tardío. Se demostró que Taco1 se localiza en la mitocondria y que actúa sobre la síntesis de Cox1. En *S. cerevisiae* existe un homólogo de *TACO1* denominado *HAH1* (*YGR021w*), el cual tiene una identidad de 29% y una similitud de 43%.

En el presente trabajo decidimos estudiar la función de Hah1. Para ello determinamos si Hah1 al igual que Taco1 se localiza en la mitocondria y su posible efecto sobre la respiración en *S. cerevisiae*.

Para estudiar la localización de Hah1 fusionamos en su extremo carboxilo terminal un epítipo de hemaglutinina (HA) para poder detectar la proteína con anticuerpos contra HA. El gen *HAH1-HA* fue clonado en dos diferentes plásmidos, uno de bajo y otro de alto número de copias, ambas versiones se expresaron en una cepa nula de *hah1*. Analizamos tanto las fracciones mitocondriales puras como las citosólicas y observamos que Hah1-HA se detecta solo en las fracciones mitocondriales, además de que por fraccionamiento mitocondrial determinamos que Hah1-HA es una proteína soluble. Para determinar la localización de Hah1-HA en la mitocondria realizamos ensayos de protección a Proteinasa K y observamos que se localiza en la matriz mitocondrial.

Una vez que determinamos que Hah1 es una proteína soluble que se localiza en la matriz mitocondrial, decidimos estudiar con mayor detalle si tiene alguna función sobre la respiración. Para este estudio utilizamos cuatro diferentes fondos nucleares de levadura: BY4742, D273-10b (*COX1* con o sin intrones en el DNA mitocondrial) y W303. Observamos que la mutante nula de *HAH1* no alteraba el crecimiento de las levaduras en medio respiratorio de ninguna cepa. A la par decidimos analizar si existía alguna alteración sobre la actividad de la cadena respiratoria, así como de la CcO. Encontramos que tampoco había ninguna alteración respecto a la cepa silvestre sobre ambas actividades en los diferentes fondos nucleares.

Dado que no habíamos encontrado ningún efecto de Hah1 sobre el consumo de oxígeno, pensamos que podría existir otra u otras proteínas que pudieran tener una función similar a Hah1. Para ello estudiamos a las proteínas Oms1 y Fmp46. En un estudio de interacciones genéticas en *S. cerevisiae* se observaron interacciones de los genes *OMS1* y *FMP46* con *HAH1*. Generamos las dobles mutantes $\Delta hah1 \Delta oms1$ y $\Delta hah1 \Delta fmp46$, y observamos una disminución importante en el crecimiento en condiciones respiratorias respecto a las mutantes sencillas $\Delta oms1$ y $\Delta fmp46$.

Con estos estudios consideramos que Hah1 podría actuar junto con Oms1 y Fmp46, aunque aún no sabemos si actúan solo las tres o existen otras proteínas que actúen junto con ellas. Oms1 es una proteína con un motivo de metiltransferasa que suprime en alto número de copias mutaciones puntuales en el translocador Oxa1. Esto crea deficiencias en el ensamblaje de los complejos respiratorios IV y V. Fmp46 es una proteína con un motivo de tioredoxina, de la cual aún no se conoce su función, pero se ha observado que se localiza en fracciones mitocondriales puras.

Aunque aún no es claro cuáles son las funciones exactas de Oms1 y Fmp46, pensamos que actúan junto con Hah1 y que éstas son importantes para la respiración mitocondrial. Será necesario realizar más estudios para confirmar si actúan en la estabilización de la proteína Oxa1 o si actúan en la translocación de las subunidades de los complejos respiratorios que se codifican en el genoma mitocondrial.

El presente trabajo nos permite observar que aunque Hah1, el homólogo de Taco1 en *S. cerevisiae*, no parece tener una la misma función que en humano, sí conserva con una función importante para la respiración celular.

INTRODUCCIÓN

La mitocondria

La mitocondria es un organelo que provee de energía a las células eucariontes mediante la producción de adenosín tri-fosfato (ATP), necesario para que se puedan llevar a cabo las diversas funciones celulares. La mitocondria posee dos membranas las cuales crean dos compartimentos mitocondriales separados: la matriz mitocondrial y el espacio intermembranal. La membrana externa es permeable a moléculas pequeñas (<5,000 Daltones) y a iones los cuales se mueven libremente a través de canales transmembranales pertenecientes a la familia de las porinas. La membrana interna es impermeable y selectiva a la mayoría de los iones y moléculas, incluyendo a los protones (H^+); las únicas especies que cruzan la membrana lo realizan mediante transportadores específicos (Alberts, 2008). Además, la membrana interna separa los intermediarios y las enzimas de las vías metabólicas citosólicas de las de la matriz mitocondrial (Nelson, 2005).

La matriz mitocondrial contiene entre otros al complejo de la piruvato deshidrogenasa, las enzimas del ciclo del ácido cítrico, de la vía de la β -oxidación de los ácidos grasos, de la vía de oxidación de los aminoácidos y síntesis de centros hierro-azufre (Fe-S) (Nelson, 2005).

La cadena respiratoria mitocondrial

La cadena respiratoria mitocondrial está formada por un grupo de complejos enzimáticos, que transporta electrones a partir de los acarreadores de electrones NADH y $FADH_2$, generados por el ciclo del ácido cítrico, los cuales son utilizados por los complejos respiratorios para generar un gradiente electroquímico de protones (H^+) entre el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial. La fuerza protón motriz es la energía resultante de un gradiente de protones y de la separación de cargas a través de la membrana interna, ésta proporciona la

energía para la síntesis de ATP, mediante el flujo de protones hacia la matriz a través de la ATP sintasa (Nelson, 2005).

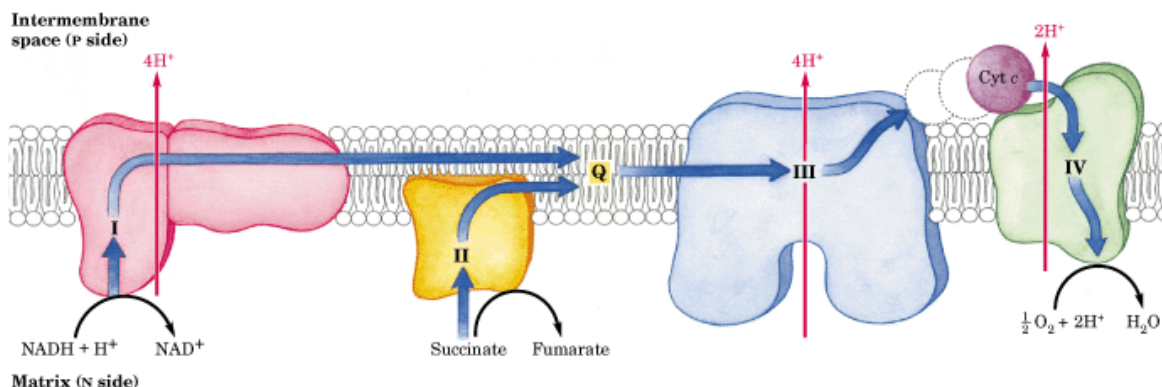


Figura 1. Representación esquemática de la cadena respiratoria mitocondrial. La cadena respiratoria mitocondrial está conformada por 4 complejos, los cuales transfieren los electrones a partir de los acarreadores NADH (complejo I) y FADH₂ (complejo II) hacia el O₂. El transporte de electrones es utilizado por los complejos I, III y IV para crear el gradiente quimiosmótico, el cual es utilizado por la ATP sintasa para la síntesis de ATP. Poza de quinonas (Q), Citocromo c (Cyt c). (Nelson, 2005)

La cadena respiratoria mitocondrial está compuesta por los siguientes complejos (Figura 1):

- Complejo I (NADH:ubiquinona oxidoreductasa o NADH deshidrogenasa). Es una enzima compuesta por alrededor de 42 diferentes subunidades dependiendo del organismo, incluyendo a una flavoproteína con el cofactor FMN (flavín nucleótido. Además contiene 6 centros Fe-S. Cataliza la transferencia de un ion hidruro del NADH a la ubiquinona (Q). Por cada 2

electrones transloca cuatro protones de la matriz al espacio intermembranal (Nelson, 2005).

- Complejo II (Succinato:ubiquinona oxidoreductasa o succinato deshidrogenasa). Es la única enzima membranal del ciclo del ácido cítrico. Contiene 4 diferentes subunidades y cinco grupos prostéticos en los que se encuentra un FAD. El complejo II cataliza la reacción de oxidación del succinato, transfiere sus electrones al grupo prostético FAD, los cuales pasan a centros Fe-S y después a la ubiquinona, contribuyendo así a la poza de ubiquinol (QH₂) (Nelson, 2005).
- Complejo III (Citocromo *bc1* o ubiquinona:citocromo *c* oxidoreductasa). Es una enzima de 10 subunidades en *S. cerevisiae* y 11 en los mamíferos (Zara et al, 2009), cada complejo dimeriza con otro para formar a la enzima funcional. Cataliza la reacción del ciclo Q en el cual se oxida al ubiquinol en ubiquinona y se reduce al citocromo *c*. Además participa en la translocación de cuatro protones de la matriz hacia el espacio intermembranal por cada 2 electrones (Nelson, 2005).
- Complejo IV (Citocromo *c* oxidasa). En *S. cerevisiae* está conformada por 11 subunidades y 13 en mamíferos. Cataliza la reacción de oxidación del citocromo *c* y la reducción del oxígeno molecular (O₂) en agua (H₂O) y transfiere 2 protones de la matriz hacia el espacio intermembranal por cada electrón (Nelson, 2005).

El gradiente electroquímico generado por los complejos respiratorios, es utilizado por la ATP sintasa para la producción de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (Pi). La ATPsintasa está formada por dos porciones, una soluble (F₁) y una membranal (F₀) y cataliza la reacción de fosforilación del ADP para la formación de ATP (Nelson, 2005).

S. cerevisiae no contiene al complejo I, en su lugar contiene tres NADH deshidrogenasas, una interna (asociada de manera periférica a la cara interna de

la membrana interna mitocondrial) y dos externas (asociadas de manera periférica a la cara externa de la membrana interna mitocondrial) (Kerscher, 2000).

El genoma mitocondrial

La mitocondria contiene su propio material genético, así como su propia maquinaria de transcripción, traducción y recombinación.

En mamíferos, el genoma mitocondrial es circular (Figura 2). Está compuesto por 16,600pb (pares de bases), codifica para 13 proteínas que forman parte de los complejos respiratorios, dos subunidades ribosomales (16S y 12S rRNA) y 22 tRNA's. Es transcrito bajo el control de 3 promotores (Figura 2, AZUL), uno en la cadena ligera y dos en la cadena pesada (Falkenberg *et al*, 2007).

En *S. cerevisiae* el genoma mitocondrial codifica para 8 proteínas, de las cuales 7 son subunidades de los complejos de la cadena respiratoria y 1 proteína de la subunidad ribosomal 15S. Transcribe 2 RNA's ribosomales (rRNA), 24 RNA's de transferencia (tRNA) y el componente de RNA de la RNasa P (9S RNA). El genoma es transcrito por 12 promotores, de los cuales solo uno, el tRNA_{2^{thr}}, es transcrito en la cadena opuesta (Dieckmann & Staples, 1994) (Figura 3).

Los reguladores transcripcionales y traduccionales son codificados en el núcleo y son transportados hacia la mitocondria para realizar sus funciones (Dieckmann & Staples, 1994; Falkenberg *et al*, 2007).

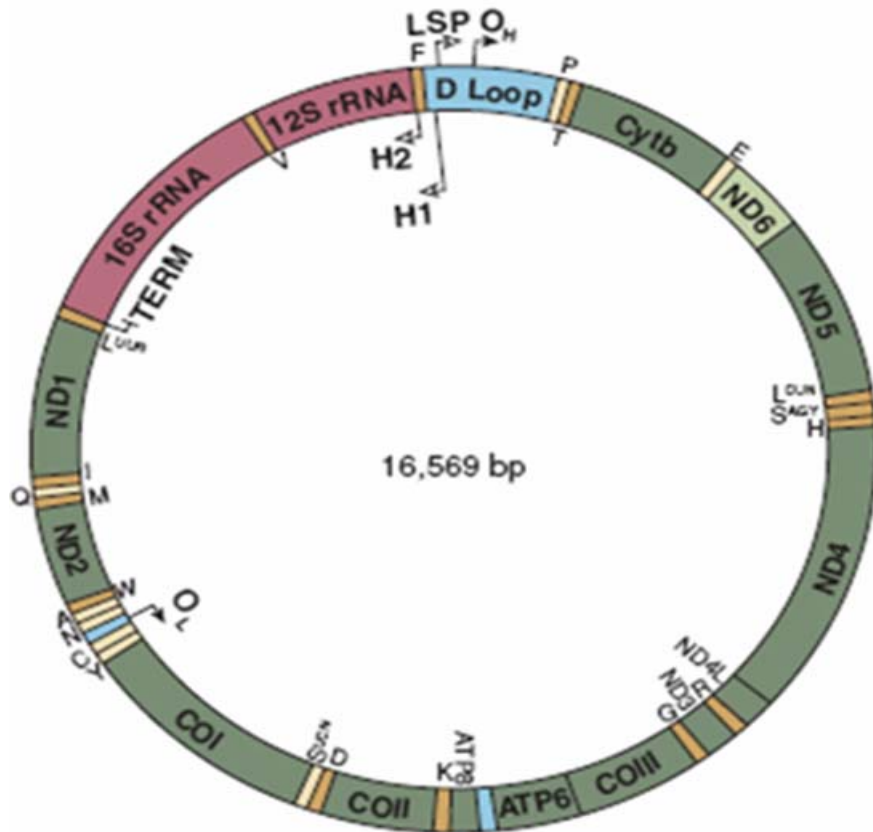


Figura 2. Representación esquemática del genoma mitocondrial de humano. El genoma mitocondrial de humano codifica para 13 proteínas, de las cuales 12 se codifican en la cadena pesada (HSP): ND1, ND2, ND4 y ND5 (Subunidades del complejo I); *Cytb* (Subunidad del complejo III); COI, COII y COIII (Subunidades del complejo IV); y ATP6 (Subunidad de la porción F1 de la ATPsintasa) (VERDE) y una en la cadena ligera (LSP): ND6 (Subunidad del complejo I) (VERDE CLARO); 2 rRNA's (VINO); 22 tRNA's de los cuales 8 se transcriben en la cadena ligera (BEIGE) y 14 en la cadena pesada (CAFÉ). El DNA mitocondrial de humano contiene tres promotores, dos en la cadena pesada (H₁ y H₂) y uno en la cadena ligera (LSP). Además contiene dos orígenes de replicación uno en la cadena ligera (O_L) y otro en la pesada (O_H) (Modificado de Falkenberg *et al*, 2007).

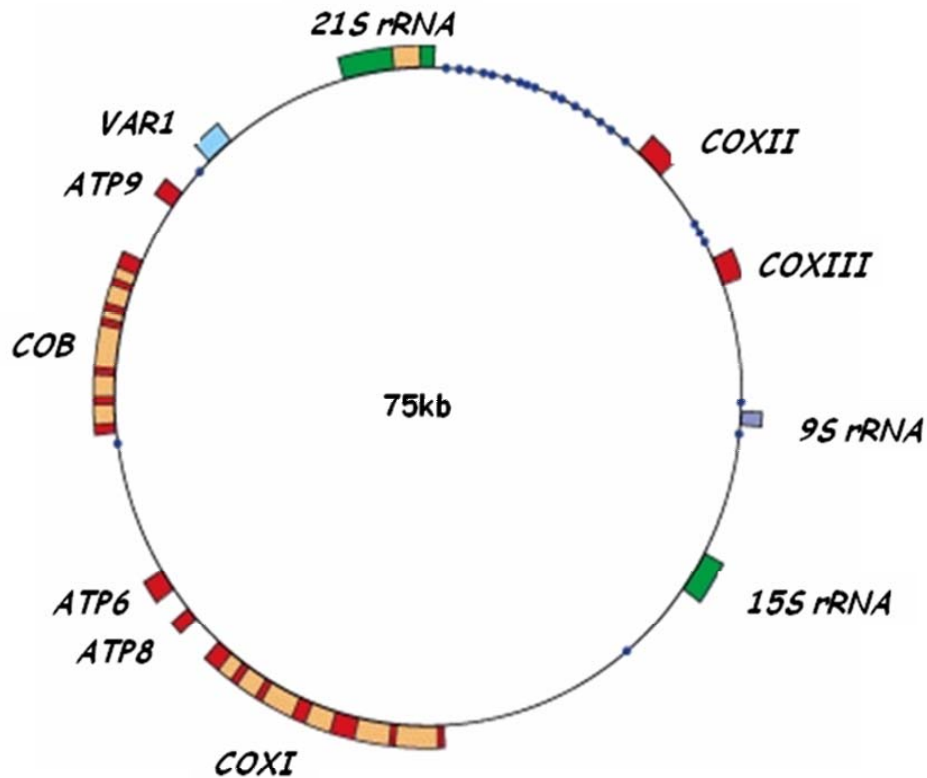


Figura 3. Representación esquemática del genoma mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae*. El genoma mitocondrial de *S. cerevisiae* codifica para 7 proteínas de los complejos respiratorios: Cob (Subunidades del complejo III); Cox1, Cox2 y Cox3 (Subunidades del complejo IV), Atp6, Atp8 y Atp9 (Subunidades de la porción F1 de la ATPsintasa) (ROJO); de los cuales los genes *COB* y *COX1* tienen en su secuencia intrones (AMARILLO). Una proteína soluble de subunidad chica (AZUL). 2 rRNA's (VIOLETA), componente de RNA de la RNasaP (VERDE) y 24 tRNA's (PUNTO AZUL). (Modificado de Brown, T.A.)

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

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* se utiliza frecuentemente en el estudio de la función mitocondrial, ya que es una levadura facultativa que no necesita respirar para mantener su viabilidad, por lo que es un modelo ideal para el estudio de los

mecanismos genéticos y bioquímicos del funcionamiento mitocondrial. Por su fácil manipulación genética, así como de su eficiente recombinación homóloga éste modelo permite crear mutantes de manera fácil y rápida (Guthrie, 1991; Guthrie, 2002).

Además, *S. cerevisiae* es de los pocos organismos en que se puede manipular genéticamente el DNA mitocondrial, permitiendo estudiar los procesos de expresión del genoma mitocondrial, por lo que se pueden crear mutantes en genes mitocondriales dado a su eficiente sistema de recombinación (Bonney & Fox, 2002)

La similitud entre las mitocondrias de levadura y humano ha permitido el uso de estudios genómicos funcionales en *S. cerevisiae* para identificar algunos de los genes nucleares humanos involucrados en enfermedades mitocondriales (Foury & Kucej, 2002).

Las deficiencias en el ensamblaje de la CcO en humano son una de las causas más comunes en enfermedades asociadas a proteínas mitocondriales. Estas deficiencias representan un grupo de enfermedades con diversas manifestaciones clínicas, incluyendo deficiencias hepáticas, encefalomiopatía y el síndrome de Leigh. Se han encontrado asociadas a estas enfermedades mutaciones en proteínas involucradas en el ensamblaje y maduración de la CcO, como es el caso de los genes *SURF1*, *COX10*, *COX15* y *LRPRRC* (Antonicka *et al*, 2003b; Papadopoulou *et al*, 1999; Tiranti *et al*, 1998; Valnot *et al*, 2000a; Valnot *et al*, 2000b; Xu *et al*, 2004; Zhu *et al*, 1998).

El síndrome de Leigh (SL) describe un grupo heterogéneo de enfermedades mitocondriales con características neuropatológicas, así como defectos morfológicos e histoquímicos en la mitocondria provocando una disminución en la producción de ATP (Leigh, 1951). La enfermedad es genéticamente heterogénea, afectando las actividades del complejo I, complejo II y de la piruvato deshidrogenasa, pero mayormente afecta a la CcO (DiMauro & De Vivo, 1996). Debido a que existe un gran número de genes humanos homólogos en *S.*

cerevisiae, éste se ha adoptado como modelo de estudio de genes homólogos que están involucrados en enfermedades mitocondriales como el SL. Por ejemplo, en el caso del gen *SURF1*, éste se encontraba mutado en un gran número de pacientes con SL asociado a deficiencias en la CcO (Tiranti *et al*, 1998; Zhu *et al*, 1998); en *S. cerevisiae* se encontró un homólogo nombrado *SHY1*, el cual codifica para una proteína de la membrana interna mitocondrial, que mutada resulta en un defecto respiratorio y en una severa disminución del ensamblaje de la CcO (Barrientos *et al*, 2002; Mashkevich *et al*, 1997).

Citocromo c oxidasa (CcO)

La citocromo c oxidasa (CcO) es la enzima terminal de la cadena transportadora de electrones en eucariontes y en algunos procariontes, la cual funciona como dímero (Frey & Murray, 1994). Se localiza en la membrana interna mitocondrial con dominios tanto en el espacio intermembranal como en la matriz (Carr & Winge, 2003; Tsukihara *et al*, 1995). Pertenece a la familia de las enzima hemo-cobre, y como todos los miembros de esta familia reduce el oxígeno molecular (O_2) en agua (H_2O), pero también actúa como una bomba de protones (Pereira *et al*, 2001).

La CcO eucarionte está compuesta de 11 subunidades (*S. cerevisiae*) a 13 subunidades (mamíferos), las subunidades están presentes en cantidades equimolares (Khalimonchuk & Rodel, 2005). Las subunidades más grandes e hidrofóbicas (Cox1, Cox2 y Cox3) son codificadas generalmente en el DNA mitocondrial y forman el núcleo catalítico de la enzima (Poyton & McEwen, 1996). Contienen dos grupos hemo (a y a_3), dos centros de cobre (Cu_A y Cu_B) y un centro hierro azufre (Fe-S) como grupos prostéticos (Tsukihara *et al*, 1995) (Figura 4).

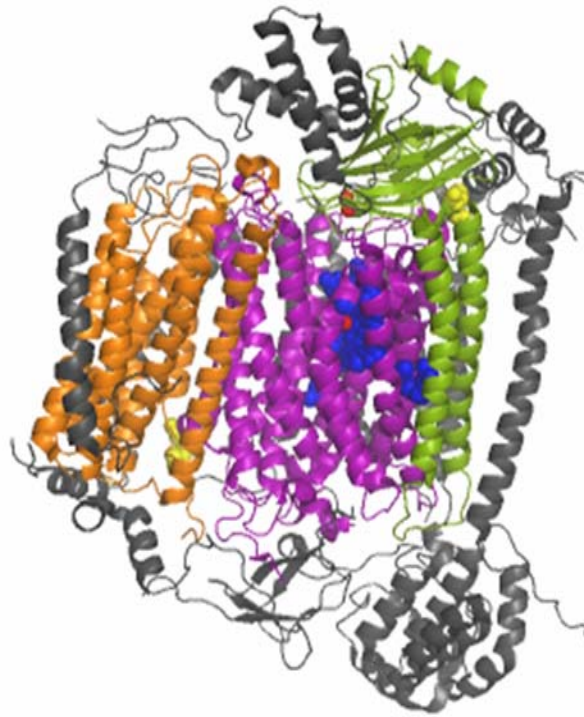


Figura 4. Estructura cristalográfica del monómero de la citocromo c oxidasa de bovino. La CcO está compuesta por 13 subunidades de la cuales solo tres son codificadas en el DNA mitocondrial: Cox1 (MORADO), Cox2 (VERDE) y Cox3 (NARANJA). Contiene los grupos prostéticos hemo a y a₃ (AZUL), los sitios Cu_A y Cu_B (ROJO) y el centro Fe-S (AMARILLO).

Cox1, es la subunidad más grande (55-57kDa) y más hidrofóbica de la CcO ya que contiene 12 cruces transmembranales. Está involucrada en el bombeo de protones por dos poros de translocación (canales D y K) (Gennis, 1998; Rich *et al*, 1998; Wikstrom *et al*, 1998). Posee en su centro catalítico los grupos hemos a y a₃, y un sitio de Cu_B. Además de formar parte del centro catalítico, Cox1 es la subunidad central para el ensamblaje de la CcO (Lemaire *et al*, 1998; Nijtmans *et al*, 1998). Es la primera en ensamblarse y alrededor de ésta se ensamblan las demás subunidades. Adicionalmente el carboxilo terminal de Cox1 está

involucrado en la regulación de su ensamblaje (Shingu-Vazquez *et al*, 2010) (Figura 5).

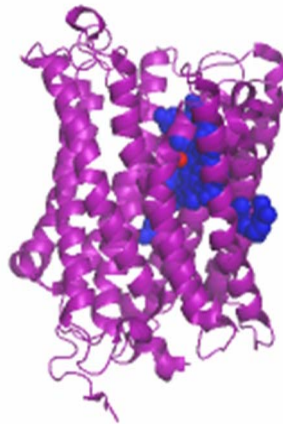


Figura 5. Estructura cristalográfica de Cox1 de bovino. En la estructura se muestran los 12 cruces transmembranales de Cox1 (MORADO), los grupos hemo a y a3 (AZUL) y los sitios CuA y CuB (ROJO)

Los activadores traduccionales del RNA mensajero de COX1

En *S. cerevisiae* muchos activadores codificados en el núcleo son necesarios para la traducción de los mensajeros de RNA (mRNA) mitocondriales. Existen dos clases de activadores traduccionales, los que se suprimen por rearrreglos en el DNA mitocondrial y que actúan en la región 5' no traducida (UTR por sus siglas en inglés) del mRNA para promover el inicio de la traducción (Dieckmann & Staples, 1994); y la segunda clase que no se suprime por rearrreglos en el DNA mitocondrial como Mss51 el cual no se suprime por intercambio de las regiones 5' y 3' no traducidas de COX1 por las de COX2, sino que actúan sobre la región codificante o en ambas regiones. Aún no se conoce una secuencia consenso de la unión de los activadores traduccionales al mRNA mitocondrial, pero se sabe que son específicos para cada mRNA. Los activadores traduccionales son en su

mayoría proteínas periféricas de la membrana interna mitocondrial (McMullin *et al*, 1990; Michaelis *et al*, 1991), por lo que se propone que localizan al mRNA en la membrana de manera que la inserción del péptido naciente sea co-traducciona, posicionando al ribosoma y facilitando el ensamblaje de los complejos respiratorios. El posicionamiento del ribosoma mitocondrial al mRNA no ocurre como en bacterias ya que no contienen una secuencia tipo Shine-Dalgarno, por lo que los activadores traduccionales posicionan al ribosoma en el sitio de inicio de la traducción del mRNA.

En el caso de Cox1 se conocen dos activadores traduccionales (Pet309 y Mss51). Pet309 pertenece al primer grupo de activadores traduccionales, que actúa en el extremo 5'UTR de *COX1*. Es una proteína periférica de membrana que contiene motivos PPR (repeticiones de pentatricopéptido por sus siglas en inglés) de unión a RNA (Tavares-Carreón *et al*, 2008). Mss51 pertenece a la segunda clase de activadores traduccionales que promueve la síntesis de Cox1 actuando sobre la región 5' no traducida e interaccionando con el péptido naciente (Perez-Martínez *et al*, 2003; Perez-Martínez *et al*, 2009) (Figura 6).

La síntesis de Cox1 está altamente regulada por proteínas que se asocian a ella, formando complejos de alto peso molecular. Las proteínas que se asocian a Cox1 como Cox14, Coa3 y Mss51 forman un complejo de regulación negativa de la activación traduccional de Mss51 (Mick *et al*, 2010; Perez-Martínez *et al*, 2009). Además existen otras proteínas que se asocian a complejos de alto peso molecular, como en el caso de Shy1 y Coa1 (Valnot *et al*, 2000b), las cuales se encuentran asociadas al complejo Cox1, Cox14 y Coa3 cuando Mss51 se libera para continuar con su actividad en la activación de la traducción de *COX1* (Mick *et al*, 2010; Mick *et al*, 2007; Pierrel *et al*, 2007). Adicionalmente, sabemos que el extremo carboxilo terminal de Cox1 funciona como sensor del ensamblaje de Cox1 regulando la función de Mss51 como activador traduccional (Shingu-Vázquez *et al*, 2010) (Figura 6).

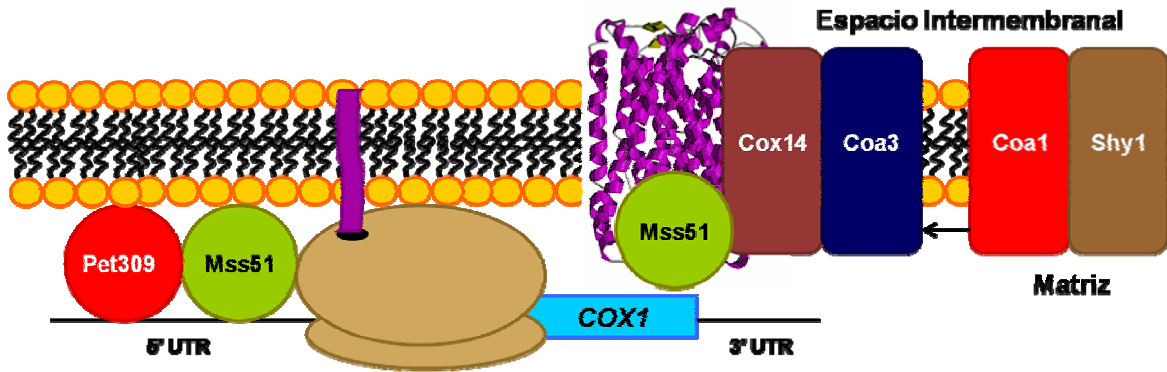


Figura 6. Modelo de acción de la regulación de la síntesis de Cox1 en *S. cerevisiae*. En levadura los activadores Pet309 y Mss51 actúan en el extremo 5'UTR del mRNA de COX1 promoviendo así su traducción. El ensamblaje y la maduración de Cox1 también están reguladas por proteínas que forman complejos de alto peso molecular como el complejo Cox1, Mss51, Cox14 y Coa3, los cuales inhiben la actividad de Mss51 en la activación de la traducción de COX1. El complejo Cox1, Cox14, Coa3, Coa1 y Shy1 están involucrados en procesos posteriores en la maduración de Cox1 y en la liberación de Mss51.

En mamífero no existen homólogos de Mss51 y de Pet309. Se ha propuesto como posible ortólogo a LRPPRC, que al igual que Pet309 también tiene dominios PPR de unión a RNA (Liu & McKeehan, 2002; Tavares-Carreón *et al*, 2008). Lrpprc está asociada a enfermedades como el síndrome de Leigh, en donde se encontró que afecta al complejo IV (Xu *et al*, 2004). A diferencia de *S. cerevisiae*, en mamíferos no se ha descrito que la regulación traduccional de los genes mitocondriales se localice en la región 5' no traducida del mRNA.

Recientemente se identificó a un posible activador traduccional de COX1 en humano conocido como Taco1. Este gen se identificó porque se encontraba mutado en un paciente con síndrome de Leigh tardío. Se demostró que su ausencia disminuye severamente el ensamblaje y actividad de la CcO. Mediante ensayos de marcaje radioactivo de proteínas mitocondriales se identificó que la

síntesis de Cox1 podría afectarse (Weraarpachai *et al*, 2009). En éste trabajo se propuso a Taco1 como posible activador traduccional, aunque se requieren más experimentos para establecer su función en la mitocondria.

Taco1 tiene un homólogo en *S. cerevisiae*, este gen está catalogado por el SGD (Base de datos del genoma de *S. cerevisiae* por sus siglas en inglés) como *HAH1* (*YGR021w*), el cual tiene una identidad de 29% con la proteína Taco1 y una similitud del 43%. Taco1 y Hah1 contienen un dominio Duf28 el cual se propone que contiene una posible función de unión a DNA (Shin *et al*, 2002). El dominio Duf28 está conformado por 3 estructuras, de los cuales la primera está conformada por 3 alfa hélices; la segunda por estructuras alfa y beta; y la tercera por estructuras alfa y beta con conformación tipo ferredoxina (Shin *et al*, 2002) (Figura 7). En estudios preliminares se observó que una mutante nula $\Delta hah1$ no tiene ningún efecto sobre la síntesis de Cox1, sin embargo a la fecha no se conoce su función en la mitocondria (Weraarpachai *et al*, 2009).

Constanzo y colaboradores, recientemente realizaron un estudio de interacciones genéticas en *S. cerevisiae*, en el cuál se determinó que *HAH1* puede tener una interacción genética con los genes mitocondriales *OMS1* y *FMP46* (Constanzo *et al*, 2010). Oms1, en *S. cerevisiae*, es una proteína integral de membrana la cual contiene un dominio de metil-transferasa orientado hacia el espacio intermembranal y tiene un efecto sobre el crecimiento en medio respiratorio, además de que es un supresor en alto número de copias en mutaciones puntuales en el translocador mitocondrial Oxa1 (Lemaire *et al*, 2004). Fmp46 es una posible proteína redox la cual contiene un motivo tioredoxina (Jung *et al*, 2005), además de que se localiza en la mitocondria (Reinders *et al*, 2006; Sickmann *et al*, 2003) y aun se desconoce su función en ella.

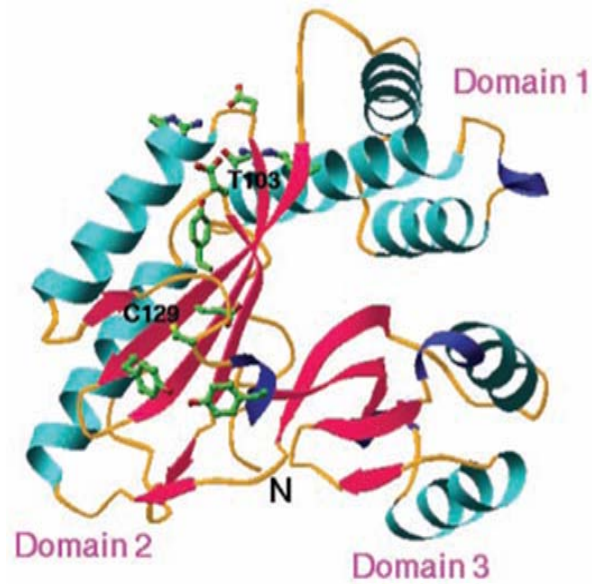


Figura 7. Estructura de la proteína Aq1575 (Duf28) de *Aquifex aeolicus*. La estructura Duf28 de Aq1575 está conformada por 3 dominios: Dominio 1 conformada por 3 alfa-hélices; Dominio 2 conformada por estructuras alfa y beta; y el Dominio 3 con estructuras alfa y beta con plegamiento tipo ferredoxina (Shin *et al*, 2002).

JUSTIFICACIÓN

Cox1 es la subunidad más grande e hidrofóbica de la CcO; la regulación de su traducción está altamente controlada por sus activadores traduccionales, así como su estado de ensamblaje en la CcO. En *S. cerevisiae*, hasta el momento, solo se conocen dos activadores traduccionales Pet309 y Mss51 (Manthey & McEwen, 1995; Siep *et al*, 2000; Tavares-Carreón *et al*, 2008). En humano se propone como posible activador traduccional a Taco1 (Weraarpachai *et al*, 2009).

La función de Taco1 como activador traduccional aún no es claro, por lo que el estudio de su homólogo en la levadura nos permitirá entender con mayor profundidad su función. Adicionalmente, en *S. cerevisiae* es posible crear mutantes nulas, así como manipular de manera eficiente su genoma mitocondrial, facilitando el estudio de las funciones mitocondriales.

Hah1 es el homólogo de Taco1 en *S. cerevisiae* de la cual aún no se conoce su función sobre la biogénesis de Cox1. Aunque parece que Hah1 en *S. cerevisiae* no tiene ningún efecto sobre la síntesis de Cox1, existe una gran probabilidad de que cumpla una función importante en la mitocondria ya que contiene un dominio Duf28, que está altamente conservado entre mamíferos, hongos y bacterias, además de ser la única proteína en *S. cerevisiae* en contenerlo. Además existen genes que tienen interacciones genéticas con *HAH1*, por lo que hay una probabilidad de que existan proteínas que participen en la misma función que Hah1.

El estudio de Hah1 en levadura nos permitirá estudiar si conserva la misma función que Taco1 en humano o si cumple una función distinta, permitiéndonos entender los mecanismos de biogénesis de Cox1 en levadura y en mamífero.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Hah1 es una proteína que se localiza en la matriz mitocondrial, que tiene una actividad conjunta con las proteínas Oms1 y Fmp46 sobre la biogénesis de la CcO

OBJETIVO

Estudiar la función de Hah1 en la biogénesis de Cox1 en mitocondrias de *S. cerevisiae*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la localización de la proteína Hah1 en mitocondrias de *S. cerevisiae*.
2. Analizar el fenotipo respiratorio de la mutante $\Delta hah1$ en *S. cerevisiae*.
3. Analizar si Hah1 tiene una función en conjunto con las proteínas Oms1 y Fmp46 sobre el crecimiento en medio respiratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

CEPAS DE *S. cerevisiae* UTILIZADAS EN EL PRESENTE TRABAJO

NOMBRE	GENOTIPO NUCLEAR (MITOCONDRIAL)	REFERENCIA
AGG1	<i>Mata</i> ; <i>arg8::HISG</i> ; <i>leu2-3,112</i> ; <i>lys2</i> ; <i>ura3-52</i> ; <i>rho</i> ⁺ ; <i>COX1(deltai)</i> ; <i>hah1::KANMX4</i> ; <i>D273-10b</i>	Este trabajo
AGG2	<i>Mata</i> ; <i>lys2</i> ; <i>arg8::HISG</i> ; <i>ura3-52</i> ; <i>leu2-3,112</i> ; <i>rho</i> ⁺ ; <i>hah1::KANMX4</i> ; <i>D273-10b</i>	Este trabajo
AGG4	<i>Mata</i> ; <i>his3-11,15</i> ; <i>ade2</i> ; <i>leu2-3,112</i> ; <i>trp1-1</i> ; <i>ura3-1</i> ; <i>rho</i> ⁺ ; <i>COX1(deltai)</i> ; <i>hah1::KANMX4</i> ; <i>W303</i>	Este trabajo
AGG7	<i>Mata</i> ; <i>arg8::HISG</i> ; <i>leu2-3,112</i> ; <i>lys2</i> ; <i>ura3-52</i> ; <i>rho</i> ⁺ ; <i>COX1(deltai)</i> ; <i>YEp352HAH1-HA D273-10b</i>	Este trabajo
AGG8	<i>Mata</i> ; <i>arg8::HISG</i> ; <i>leu2-3,112</i> ; <i>lys2</i> ; <i>ura3-52</i> ; <i>rho</i> ⁺ ; <i>COX1(deltai)</i> ; <i>pRS416HAH1-HA D273-10b</i>	Este trabajo
BY4742	<i>Mata</i> ; <i>his3-delta1</i> ; <i>leu2-delta0</i> ; <i>met15-delta0</i> ; <i>ura3-delta0</i> ; <i>rho</i> ⁺ ; <i>BY4742</i>	YKO MAT α Strain Collection- Glycerol Stock (Open Biosystems)
BY4742 Δygr021w	<i>Mata</i> ; <i>his3-delta1</i> ; <i>leu2-delta0</i> ; <i>met15-delta0</i> ; <i>ura3-delta0</i> ; <i>rho</i> ⁺ ; <i>hah1::KANMX4</i> ; <i>BY4742</i>	YKO MAT α Strain Collection- Glycerol Stock (Open Biosystems)
BY4742 Δydr316w	<i>Mata</i> ; <i>his3-delta1</i> ; <i>leu2-delta0</i> ; <i>met15-delta0</i> ; <i>ura3-delta0</i> ; <i>rho</i> ⁺ ; <i>oms1::KANMX4</i> ; <i>BY4742</i>	YKO MAT α Strain Collection- Glycerol Stock (Open Biosystems)
BY4742 Δykv049c	<i>Mata</i> ; <i>his3-delta1</i> ; <i>leu2-delta0</i> ; <i>met15-delta0</i> ; <i>ura3-delta0</i> ; <i>rho</i> ⁺ ; <i>fmp46::KANMX4</i> ; <i>BY4742</i>	YKO MAT α Strain Collection- Glycerol Stock (Open Biosystems)
NB40-36a	<i>Mata</i> ; <i>lys2</i> ; <i>arg8::HISG</i> ; <i>ura3-52</i> ; <i>leu2-3,112</i> ; <i>rho</i> ⁺ ; <i>D273-10b</i>	(Perez-Martinez <i>et al</i> , 2003)
W303	<i>Mata</i> ; <i>his3-11,15</i> ; <i>ade2</i> ; <i>leu2-3,112</i> ; <i>trp1-1</i> ; <i>ura3-1</i> ; <i>rho</i> ⁺ ; <i>COX1(deltai)</i> ; <i>W303</i>	(Barros <i>et al</i> , 2006)
XPM201	<i>Mata</i> ; <i>arg8::HISG</i> ; <i>leu2-3,112</i> ; <i>lys2</i> ; <i>ura3-52</i> ; <i>rho</i> ⁺ ; <i>COX1(deltai)</i> ; <i>D273-10b</i>	(Perez-Martinez <i>et al</i> , 2003)
YC111	<i>Mata</i> ; <i>his3-delta1</i> ; <i>leu2-delta0</i> ; <i>met15-delta0</i> ; <i>ura3-delta0</i> ; <i>rho</i> ⁺ ; <i>hah1::LEU2 oms1::KANMX4</i> ; <i>BY4742</i>	Este trabajo
YC115	<i>Mata</i> ; <i>his3-delta1</i> ; <i>leu2-delta0</i> ; <i>met15-delta0</i> ; <i>ura3-delta0</i> ; <i>rho</i> ⁺ ; <i>hah1::LEU2 fmp46::KANMX4</i> ; <i>BY4742</i>	Este trabajo

MEDIOS DE CULTIVO

YPD (1 litro)

Extracto de levadura	10 g
Peptona	20 g
Dextrosa	20 g
Adenina	0.03 g

Para medio sólido agregar 20 g de agar. Esterilizar en autoclave.

YPEG (1 litro)

Extracto de levadura	10 g
Peptona	20 g
Glicerol	30 ml

Para medio sólido agregar 20 g de agar. Esterilizar en autoclave.

Etanol (adicionar después de esterilizar, cuando la temperatura del medio sea de alrededor de 50°C)

YPG (1 litro)

Extracto de levadura	10 g
Peptona	20 g
Glicerol	30 ml

Para medio sólido agregar 20 g de agar. Esterilizar en autoclave.

YPlac (1 litro)

Extracto de levadura	10 g
Peptona	20 g
KH ₂ PO ₄	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.2 g
Lactato	20 ml

KOH (hasta ajustar a un pH 6.5)

Para medio sólido agregar 20 g de agar. Esterilizar en autoclave.

Medio Drop-out -Ura/glucosa (1 litro)

Base nitrogenada sin aminoácidos	6.7 g
Glucosa	20 g
Mezcla de suplementos –Ura	0.77 g

Para medio sólido agregar 20 g de agar. Esterilizar en autoclave.

Medio Drop-out -Leu/glucosa (1 litro)

Base nitrogenada sin aminoácidos	6.7 g
Glucosa	20 g
Mezcla de suplementos –Leu	0.69 g

Para medio sólido agregar 20 g de agar. Esterilizar en autoclave.

GENERACIÓN DE MUTANTES NUCLEARES

La generación de mutaciones nulas de las proteínas de interés se realizó mediante la eliminación del gen por cassettes de resistencia a kanamicina (*KANMX4*) o por el marcador de auxotrofia *LEU2*. Estos cassettes se construyeron mediante PCR y recombinación homóloga.

Para el cassette de resistencia a kanamicina específico para cada gen, se extrajo DNA total de levadura a partir de la colección YKO MAT α Strain Collection – Glycerol Stock (Open Biosystems) de *S. cerevisiae*. Se utilizó un juego de oligonucleótidos específicos para cada gen localizados aproximadamente a 300pb río abajo y arriba del gen (Ver Apéndice). Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 1% suplementado con bromuro de etidio y se purificaron mediante la extracción de la banda correspondiente al cassette y se purificó el DNA utilizando el paquete de extracción de DNA por banda de QIAGEN (USA).

El cassette marcador de auxotrofia *LEU2* se amplificó utilizando el juego de oligonucleótidos (Ver Apéndice) específicos para el gen de interés. *LEU2* se amplificó a partir del plásmido pXPM65.

TRANSFORMACIÓN DE LEVADURA (Burke Dan, 2000)

- Cultivar dos o tres colonias de levadura en 2 ml de medio YPD toda la noche con agitación a 30°C.
- A la mañana siguiente adicionar 2 ml más de medio YPD e incubar 2 horas más a 30°C.
- Centrifugar 750 μ l del cultivo a transformar 1 min a 13200 x *g*, a temperatura ambiente. Eliminar completamente el sobrenadante.
- Resuspender el botón celular en 52.5 μ l de amortiguador de transformación.
- Adicionar DNA (>100 ng).
- Incubar a 30°C por 30 min y posteriormente incubar 30 min a 42°C. Invertir la mezcla ligeramente cada 10 min durante el proceso de incubación.
- Adicionar 1 ml de YPD e incubar a 30°C durante 2 horas.
- Centrifugar los tubos 1 min a 13200 x *g*, a temperatura ambiente. Eliminar 900 μ l del sobrenadante.
- Plaquear la mezcla en el medio de selección necesario.

Amortiguador de transformación

PEG 3350 50%	40 μ l
DTT 1 M	5 μ l
Acetato de Litio 2 M	5 μ l
DNA de esperma de salmón 10 mg/ml	2.5 μ l (antes de usar hervir 10 min y mantener en hielo)

PURIFICACIÓN DE DNA TOTAL DE LEVADURA (Burke Dan, 2000)

- Cultivar dos o tres colonias de levadura en 2 ml de medio YPD toda la noche en agitación a 30°C.
- Centrifugar los cultivos 1 min a 13200 x *g*, a temperatura ambiente.
- Lavar las células con 500 μ l de agua destilada. Centrifugar como en el paso anterior.
- Resuspender el botón celular con 200 μ l de amortiguador de lisis.

- Adicionar 200 μ l de una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1).
- Agitar en vórtex a velocidad máxima durante 3 min.
- Centrifugar 5 min a 13200 x g a temperatura ambiente.
- Separar la fase acuosa (fase superior) y poner en tubo nuevo. Precipitar DNA adicionando 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5.3 y 3 volúmenes de etanol al 100% previamente enfriado a -20°C. Incubar 20 min a -20°C.
- Centrifugar la mezcla anterior a 13200 x g durante 10 min
- Resuspender el botón de DNA con 1 ml de etanol al 70% previamente enfriado a -20°C.
- Centrifugar 1 min a 13200 x g en a 4°C. Eliminar completamente el etanol. Dejar secar las muestras al aire.
- Resuspender en 50 μ l de agua estéril.

Amortiguador de lisis (20 ml)

Tritón X-100 100%	400 μ l
SDS 20%	1 ml
NaCl 5 M	400 μ l
Tris-HCl 2 M pH 8.0	100 μ l
EDTA-Na 0.5 M pH 8.0	40 μ l
Agua	18.06 ml

FUSIÓN DE LA ETIQUETA DE HA AL CARBOXILO TERMINAL DE Hah1 Y LA CLONACIÓN DEL GEN *HAH1-HA*

Para etiquetar al gen *HAH1* con un epítotope de hemaglutinina se realizó la siguiente estrategia (Figura 10):

- Se realizaron dos PCR independientes con dos diferentes juegos de oligonucleótidos (ver Apéndice). Las dos reacciones de PCR se separaron en gel de agarosa al 1% suplementado con bromuro de etidio y se cortaron

las bandas correspondientes a los tamaños esperados para cada reacción. Los fragmentos se purificaron empleando un paquete de purificación de bandas de QIAGEN (USA) (Figura 10, PCR 1 Y 2).

- Los fragmentos purificados de las reacciones del punto anterior, se utilizaron para realizar una reacción de PCR de fusión con un juego de oligonucleótidos (ver apéndice). La reacción se separó por gel de agarosa al 1% suplementado con bromuro de etidio y se cortó la banda correspondiente al tamaño esperado del gen *HAH1-HA*. El fragmento se purificó según las instrucciones del paquete de purificación de bandas de QIAGEN (USA) (Figura 10 PCR fusión).

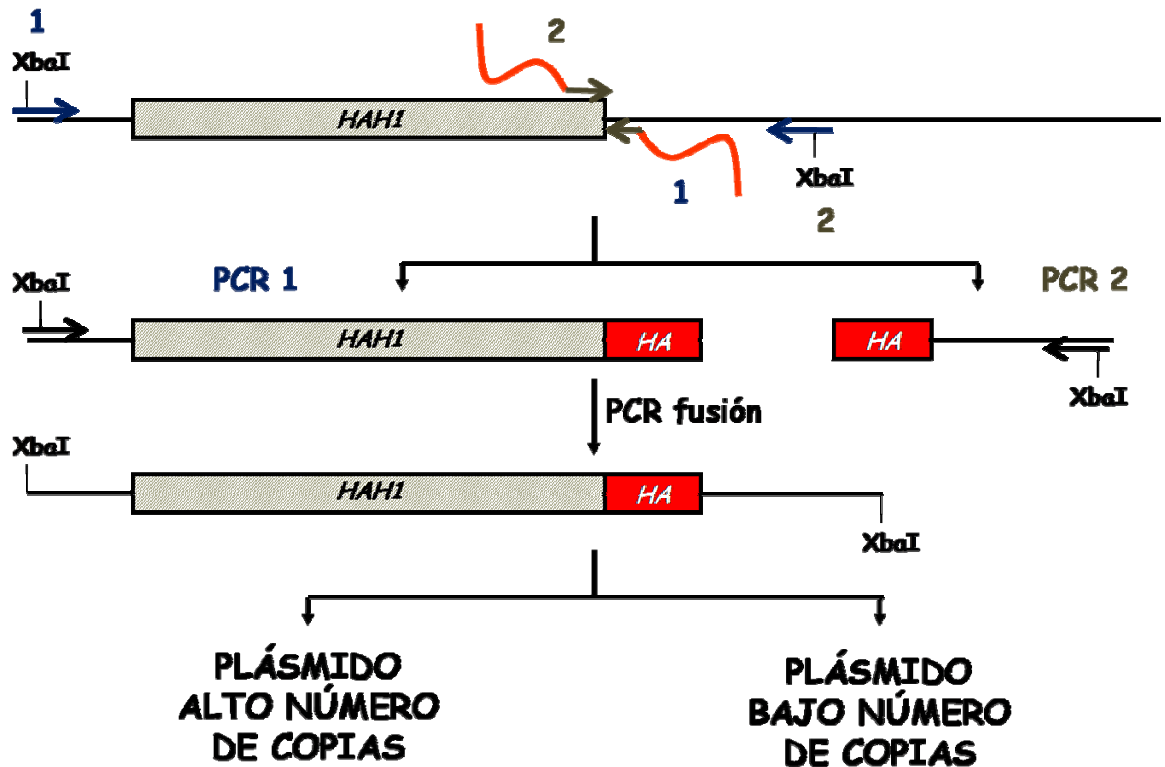


Figura 10. Esquematización de estrategia para fusionar un epítipo de HA al carboxilo terminal de Hah1. Como primer paso se realizaron dos diferentes reacciones de PCR, para integrar al epítipo de HA y agregar sitios de restricción para XbaI. Para el segundo paso se realizó un PCR de fusión de los fragmentos del primer paso para generar el gen completo *HAH1-HA* con los sitios de restricción a XbaI. La construcción se clonó en dos diferentes plásmidos, en uno de alto (YEp352) y uno de bajo (pRS416) número de copias.

- A partir del producto de PCR del punto anterior se realizó una de reacción digestión con la enzima de restricción XbaI. Paralelamente se realizó la reacción de digestión con la enzima de restricción XbaI del plásmido de alto número de copias YEp352. Las dos reacciones de digestión se separaron en gel de agarosa al 1% suplementado con bromuro de etidio y se cortaron las bandas correspondientes a los tamaños esperados para cada reacción.

Los fragmentos se purificaron según las instrucciones del paquete de purificación de bandas de QIAGEN (USA).

- A partir del plásmido y del gen, digeridos con XbaI, se realizó una reacción de ligación con la enzima LigasaT4 (Invitrogen) a 16°C por una noche. (para éste proceso se consideró la cantidad de DNA en nanogramos de cada una de las muestras así como su tamaño expresado en kilobases).
- Al siguiente día, la reacción de ligación se utilizó para transformar a la cepa DH5 α de *Escherichia coli* según el protocolo de transformación de *E. coli* por electroporación.

Para la clonación de *HAH1-HA* en el vector de bajo número de copias (pRS416) se realizó la siguiente estrategia:

- Se llevaron a cabo dos reacciones de digestión con la enzima de restricción XbaI (Invitrogen), la primera del plásmido pAG3 (YEp352*HAH1-HA*) y la segunda del plásmido pRS416. Las dos reacciones de digestión se separaron en gel de agarosa al 1% suplementado con bromuro de etidio y se cortaron las bandas correspondientes a los tamaños esperados para cada reacción. Los fragmentos se purificaron según las instrucciones del paquete de purificación de bandas de QIAGEN.
- A partir del plásmido y del gen, digeridos con XbaI, se realizó una reacción de ligación con la enzima LigasaT4 (Invitrogen) a 16°C por 12 horas. (Para éste proceso se consideró la cantidad de DNA en nanogramos de cada una de las muestras así como su tamaño expresado en kilobases).
- La reacción de ligación se utilizó para transformar a la cepa DH5 α de *E. coli* según el protocolo de transformación de *E. coli*.

TRANSFORMACIÓN DE *E. coli* (Cohen *et al*, 1972)

Preparación de células competentes

- Tomar 1 colonia de *E. coli* y cultivar en LB durante una noche en agitación a 37°C.
- Al siguiente día tomar 100 µl del cultivo y pasarlo a 10 ml de LB. Incubar a 37°C hasta que el cultivo haya alcanzado una densidad óptica de 0.5.
- Centrifugar el cultivo a 7700 x *g* durante 6 min. Decantar sobrenadante suavemente.
- Resuspender el botón celular con 10 ml cloruro de calcio 0.1 M. Incubar en hielo durante 30 min.
- Centrifugar a 7700 x *g* durante 6 min. Decantar sobrenadante suavemente.
- Resuspender el botón celular en 600 µl de cloruro de calcio al 0.1 M. Incubar a 4°C durante una noche.

Transformación de las células competentes de *E. coli* por choque térmico

- A partir de las células competentes se toman 200 µl y se mezclan con la reacción de ligación. Incubar en hielo durante 30 min.
- Incubar durante 2 min a 42°C (Choque térmico).
- Agregar 800 µl de LB e incubar a 37°C por 1 hora.
- Centrifugar durante 1min a 13200 x *g* a temperatura ambiente.
- Quitar 900 µl del sobrenadante y resuspender el botón celular con el sobrante y plaquear en medio de selección.

OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN MITOCONDRIAL CRUDA (Glick & Pon, 1995)

- Crecer una colonia de levadura en 2 ml de medio YPGal (en el caso de medios drop-out agregar como fuente de carbono galactosa) toda la noche a 30°C.
- Reinocular los 2 ml en 25 ml del mismo medio e incubar a 30°C toda la noche.
- Del cultivo anterior reinocular en 1 l del mismo medio e incubar toda la noche a 30°C hasta una A_{600} entre 1.4 y 1.6 (fase exponencial de crecimiento).
- Centrifugar a 2800 x *g* por 10min a 4°C.
- Lavar el botón con dH₂O fría, juntar todo el botón en un tubo de centrifuga previamente pesado.
- Centrifugar a 2800 x *g* por 10 min a 4°C. Eliminar el sobrenadante y pesar.
- Resuspender el botón en amortiguador TD (2 ml/g de peso húmedo).
- Agitar 10 min a 30°C.
- Centrifugar 5 min a 1900 x *g*.
- Lavar el botón con amortiguador MP2 (7 ml/g de peso húmedo).
- Centrifugar 5 min a 1900 x *g*.
- Resuspender el botón en amortiguador MP2 (7 ml/g peso húmedo), adicionar zimoliasa-20T (3 mg/g peso húmedo).
- Agitar de 30-60 min a 30°C, hasta que los esferoplastos se formen (revisar la formación de esferoplastos a los 30, 45 y 60 min). Para determinar la formación de los esferoplastos se emplea el siguiente protocolo:

Comparar 2 ml de dH₂O contra 2 ml de sorbitol 1.2 M adicionando a cada uno 50 µL de células, agitar en vórtex. Cuando se hayan formado los esferoplastos el tubo con agua se verá claro comparado con el tubo con sorbitol el cual se observará turbio, esto es debido a que la diferencia de osmolaridad romperá a los esferoplastos.

A partir de este punto todo se realiza a 4°C

- Centrifugar a 1100 x *g* por 5 min a 4°C.
- Resuspender en ¼ del volumen requerido de amortiguador Dounce (13.4 ml/g de peso húmedo).
- Homogenizar 10 veces en 70 ml de amortiguador usando un homogenizador y pistilo de vidrio (Estrecho).
- Centrifugar 5 min a 1900 x *g* a 4°C. Recuperar sobrenadante.
- Centrifugar 5 min a 1900 x *g* a 4°C. Recuperar sobrenadante.
- Centrifugar 12 min a 17400 x *g* a 4°C. Desechar sobrenadante (en el botón se encuentran las mitocondrias crudas).
- Resuspender suavemente el botón en 2 ml de amortiguador SEH (punta de la micropipeta cortada), después de resuspender el botón completamente agregar 8 ml de buffer SEH.
- Cuantificar por espectrofotometría la proteína (método de Lowry) de la siguiente manera: llevar 10 µl de mitocondrias crudas a 1000 µl con SDS al 0.6%, agitar en vórtex.

PURIFICACIÓN DE MITOCONDRIAS CRUDAS EN GRADIENTE DE Nicodenz.

- Preparar 10 ml de cada una de las siguientes soluciones de Nicodenz en amortiguador SEH 2X.
25% = 5 ml de Nicodenz 50% (w/v) + 5 ml de SEH 2X.
20% = 4 ml de Nicodenz al 50% (w/v) + 5 ml de SEH 2X + 1 ml de dH₂O.
15% = 3 ml de Nicodenz al 50% (w/v) + 5 ml de SEH 2X + 2 ml de dH₂O.
10% = 2 ml de Nicodenz al 50% (w/v) + 5 ml de SEH 2X + 3 ml de dH₂O.
5% = 1 ml de Nicodenz al 50% (w/v) + 5 ml de SEH 2X + 4 ml de dH₂O.
- Preparar dos gradientes por cultivo (1 l de medio de cultivo), depositando 2ml de cada una de las soluciones de Nicodenz en el siguiente orden; 25, 20, 15, 10 y 5% (Usar punta cortada en el extremo para micropipeta).

- Depositar 0.5 ml del extracto crudo de mitocondrias en cada gradiente. (Usar punta cortada).
- Centrifugar a 192000 x *g* por 39 min.
- Remover las bandas de mitocondrias (entre 20 y 15%) y mitoplastos (entre 15 y 10%) con una aguja y jeringa. Colocarlas en tubos diferentes.
- Diluir las mitocondrias y los mitoplastos en 25 ml de amortiguador SEH.
- Centrifugar 10 min a 17400 x *g* a 4°C.
- Para eliminar completamente el Nicodenz resuspender el botón en 20 ml de SEH.
- Centrifugar 10 min a 17400 x *g* a 4°C.
- Resuspender el botón en 250 µl de amortiguador SEH, con la punta cortada en el extremo para micropipeta.
- Cuantificar por espectrofotometría la proteína (método de Lowry) de la siguiente manera: llevar 10 µL de mitocondrias puras a 1000 µL con SDS al 0.6%, agitar en vórtex.
- Congelar en nitrógeno líquido y guardar a -70°C en alícuotas de 20 µl.

Amortiguadores para la purificación de mitocondrias

TD (Tris-DTT)

Tris-SO ₄ pH 9.4	0.1 M
DTT	10 mM

MP2

Sorbitol	1.2 M
Amortiguador de fosfatos pH 7.4	20 mM
Zimoliasa 20T (Accurate Chemical and Scientific Corporation)	3 mg/g peso húmedo

Homogenización (Dounce)

Tris pH7.4	10 mM
EDTA	1 mM

BSA	0.2% p/v
TLCK	50 µg/ml
Sorbitol	0.6 M ó 1.2 M (para purificación de mitocondrias)
PMSF (preparar al momento en etanol)	1 mM

Sorbitol/EDTA/HEPES (SEH)

HEPES	20 mM
Sorbitol	0.6 M ó 1.2 M (para purificación de mitocondrias)
EDTA	1 mM

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY (Markwell *et al*, 1978)

Curva de calibración

Usar una solución de albumina de 1 mg/ml

Preparar soluciones de albúmina con 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100 µl de la solución de albúmina. Llevar a 1 ml con agua como se indica en el paso 1.

Para cuantificar la cantidad de proteína de las muestras se agregan 10 y 20 µl. Llevar a 1 ml con agua como se indica en el paso 1.

1. Ajustar la muestra con agua a 1 ml.
2. Adicionar 3 ml de Solución C y mezclar en vortex. Incubar 10 min a temperatura ambiente.
3. Adicionar 300 µl de la Solución D y mezclar en vortex e incubar 30 min a temperatura ambiente.
4. Medir absorbancia a 740 nm.

Solución A

Na ₃ CO ₃	2% (p/v)
NaOH	0.4% (p/v)
Na ₂ tartrato	0.16% (p/v)
SDS	1% (p/v)

Solución B

$\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4% (p/v)

Solución C

Mezlar 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).

FRACCIONAMIENTO MITOCONDRIAL (Glick & Pon, 1995)

- Descongelar 100 μg de proteína de mitocondrias. Las mitocondrias se descongelan en un vaso de precipitado de 250 ml con 200 ml de dH_2O calentada durante 2 min en microondas.
- Centrifugar a 13200 x g una por 5 min a 4°C.
- Resuspender el botón en 400 μl de amortiguador CH pH7.4. Incubar en hielo durante 10 min.
- Sonicar en un baño con hielo/agua/etanol usando un sonicador Branson Sonifier 450 con seis pulsos, “output” 5, “duty cycle” al 40%. Repetir tres veces.
- Centrifugar 30 min a 179300 x g a 4°C.
- Separar sobrenadante y resuspender el botón con 400 μl de buffer CH.
- Precipitar las proteínas del sobrenadante y el botón adicionando 45 μl de ácido tricloroacético (TCA) 100%.
- Incubar en hielo por 30 min.
- Centrifugar 10 min a 13200 x g a 4°C.
- Lavar una vez con 1 ml de acetona 100% (-20°C).
- Centrifugar 10 min a 13200 x g a 4°C.
- Resuspender el botón en 100 ml de SB y calentar a 65°C a 10 min.

- Separar en gel desnaturizante SDS-PAGE y analizar por western blot.

Solución CH

NaCl: 100 mM
 Hepes pH 7.4: 20 mM
 SB: Ver protocolo geles de poliacrilamida

ENSAYO DE PROTECCIÓN A PROTEINASA K EN MITOCONDRIAS Y MITOPLASTOS (Fujiki *et al*, 1982)

- Descongelar 100 µg de proteína de mitocondrias. Las mitocondrias se descongelan en un vaso de precipitados de 250 ml con 200 ml de dH₂O calentada durante 2 min en microondas.
- Adicionar la cantidad de buffer SH, de manera que la cantidad de proteína (mitocondrias) se puedan repartir en 200 µl por tubo de reacción. (Ej. 400 µg/100 µl, agregar 700 µl de SH).
- Repartir la suspensión anterior en 4 tubos de la siguiente manera:

Tubo1 mt	Tubo2 mt/PK	Tubo 3 mp	Tubo 4 mp/PK	SN1 tubo1	SN2 tubo2	SN3 tubo3	SN4 tubo4
1. Adicionar 200 µl a cada tubo. 2. Centrifugar a 12100 x g por 4 min a 4°C. 3. Desechar sobrenadante. 4. Resuspender la pastilla con 20 µl de buffer SH a cada tubo (con una punta cortada, resuspender suavemente). 5. **Adicionar:				1. Adicionar TCA al 100% a una concentración final del 11% (25 µl). 2. Incubar en hielo por 30 min. 3. Centrifugar a 13200 x g en una centrífuga Eppendorf 5415D por 5 min a 4°C. 4. Lavar con 1 ml de acetona 100% a menos 20°C. 5. Centrifugar a 13200 x g por 5 min a 4°C.			
180µlSH 180µl SH/PK 180µl Hepes 180µlHepes/PK							

<ol style="list-style-type: none"> 6. Incubar en hielo por 30 min. 7. Agregar 2 μl de PMSF, invertir el tubo. 8. Centrifugar a 12100 x <i>g</i> por 4 min a 4°C. 9. Guardar los sobrenadantes (seguir pasos de la siguiente columna). 10. Resuspender la pastilla con 500 μl de SH con 5 μl de PMSF (suavemente, punta cortada). 11. Centrifugar a 12100 x <i>g</i> por 4 min a 4°C. 12. Resuspender la pastilla con 20 μl de SB con PMSF. 13. Calentar a 65°C por 5 min. 14. Cargar en gel SDS-PAGE al 12%. 	<ol style="list-style-type: none"> 6. Resuspender la pastilla con 20 μl de SB con PMSF. 7. Calentar a 65°C por 5 min. 8. Cargar en gel SDS-PAGE al 12%.
---	---

*Para este protocolo es necesario que todos los pasos se realicen a 4°C.

**Para agregar la PK es necesario que se agregue con los 180 μ l del buffer según sea el caso.

Amortiguador SH

Sorbitol	0.6 M
HEPES pH 7.4	20 mM

GELES DE POLIACRILAMIDA AL 12% EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

	Gel separador 12%	Gel apilador 4%
Acrilamida 30% Bisacrilamida 0.8%	2 ml	260 µl
Tris 2 M pH 8.8	937 µl	-
Tris 2 M pH 6.8	-	125 µl
SDS 20%	25 µl	10 µl
H₂O	2 ml	1.58 ml
APS 10%	25 µl	20 µl
TEMED	2.5 µl	2 µl

Amortiguador de corrida 5X:

Tris-HCl pH 8.3 0.125 mM
 Glicina 0.96 M
 SDS 0.5%

Amortiguador de carga 2X (SB):

Tris-HCl pH 6.8: 62.5 mM
 Glicerol: 10%
 SDS: 2%
 β-mercaptoetanol: 5%
 Azul de bromofenol: 0.02% (agregar al momento con SB 1X)

* PMSF: 2 mM (*Solo si es necesario, agregar al momento con SB 1X)

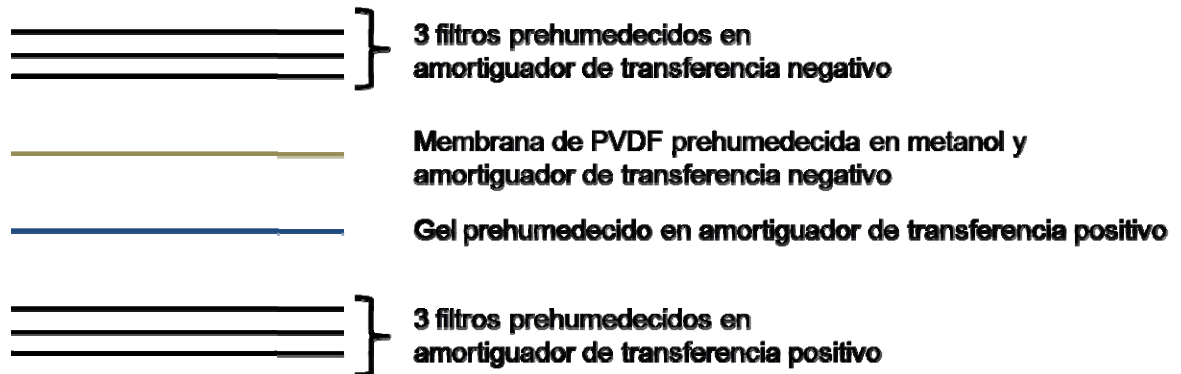
- Correr a 80V hasta la fase separadora y a 200V hasta que el azul de bromofenol salga del gel.

PREPARACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL DE LEVADURA

- La levadura se cultiva en medio apropiado: Medio rico 3 ml, medio mínimo 5 ml por 48 horas.
- Centrifugar por 2 min a 13200 x *g*. Eliminar sobrenadante.
- Resuspender botón celular con 1ml de dH₂O.
- Centrifugar 2 min a 13200 x *g*. Eliminar sobrenadante.
- Adicionar 1.85 M NaOH y 7.4% de β-mercaptoetanol (926 μl NaOH 2 N + 74 μl de β-mercaptoetanol).
- Incubar en hielo durante 15 min.
- Adicionar 150 μl de TCA 50%. Mezclar invirtiendo, incubar en hielo durante 15 min (Mayor tiempo está bien).
- Centrifugar 10min a 13200 x *g* a 4°C. Remover sobrenadante por aspiración.
- Lavar pellet con 1.5ml de acetona 100% previamente enfriada a -20°C (Cortar punta y resuspender). Agitar con vortex.
- Centrifugar 5 min a 13200 x *g* a 4°C. Remover sobrenadante por aspiración. Dejar secar al aire.
- Disolver el botón con 50 μl de SB (ver protocolo de geles de poliacrilamida) + NH₄OH 1:100. ***(Usar guantes, puntas con filtro y en campana)**. Agregar β-mercaptoetanol al 5%.
- Incubar a 65°C por 5 min. Agitar con vortex.
- Poner en tubo nuevo.
- Cuantificar proteína (Método de Lowry) y guardar a -70°C.

RÉPLICA EN WESTERN BLOT

- Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfieren a membranas de PVDF (Millipore) mediante método semi-seco usando la cámara de electrotransferencia de FisherBiotech, de la siguiente manera:



- Electrotransferir durante 2 horas a 1.5 mA/cm^2 , cuidando que no exceda los 10V.
- La membrana se deja secar durante 30 min a temperatura ambiente.
- La membrana se bloquea con solución de bloque toda la noche a 4°C .
- Incubar la membrana con la solución de réplica, la cual contiene al anticuerpo primario (acoplado o no acoplado a peroxidasa). Incubar 1 hora a temperatura ambiente.
- Lavar la membrana en solución de lavado por 10 min, repetir el lavado 2 veces más.
- Incubar si es necesario durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa.
- Revelar la presencia del anticuerpo unido a la proteína deseado siguiendo las indicaciones del paquete ECL (Pierce).
- Tomar autoradiografía con la película BioMax Film (Kodak) exponiendo el tiempo necesario según sea el caso para cada anticuerpo.
- Eliminar el anticuerpo unido a las proteínas de la membrana incubando con la solución de eliminación de anticuerpo por 30 min a 50°C .

- Bloquear nuevamente durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C.
- Repetir los pasos de incubación con anticuerpo si se desea revelar la presencia de una proteína distinta.

Amortiguador de transferencia negativo

Ácido ϵ -amino- <i>n</i> -caproico (Sigma)	39.4 g/l pH 8.5-8.7 (ajustar con Tris)
SDS 0.05%	0.5 g/l

Amortiguador de transferencia positivo

Tris	18.2 g/l
Tricina	9 g/l
Metanol	20%

Solución de bloqueo

Leche en polvo descremada (Svelty)	5 g
Tris 1 M pH 7.6	2.5 ml
NaCl 5 M	1.5 ml
H ₂ O	a 50 mL

Solución de réplica

Leche en polvo descremada (Svelty)	0.1 g
Tris 1 M pH 7.6	100 μ l
NaCl 5 M	200 μ l
EDTA 500 mM	20 μ l
Tween-20 al 50%	200 μ l
H ₂ O	a 10 ml
Anticuerpo	Adicionar según el título de anticuerpo apropiado

Solución de lavado

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

Solución de eliminación

β-mercaptoetanol	700 μl
Tris 1 M pH 6.8	6.25 ml
SDS 10%	20 ml
H ₂ O	a 100 mL

Diluciones utilizadas para los anticuerpos

Anti-citrato sintasa	1:1000 (Donado por el Dr. Thomas Fox)
Anti-G6PDH	1:10000 (Sigma)
Anti-Cox2p	1:500 (Donado por el Dr. Thomas Mason)
Anti-citocromo b ₂	1:2000 (Donado por el Dr. Thomas Fox)
Anti-HA/peroxidasa (Clona 3F10)	1:500 (Roche)
Anti-conejo/peroxidasa	1:500 (Zymax)
Anti-ratón/peroxidasa	1:500 (Zymax)

DILUCIONES SERIADAS 1:10

- Un día antes cultivar en 2 ml de YPD a 30°C por una noche a cada cepa.
- Al día siguiente pesar los tubos Eppendorf (1.5 ml) a utilizar en balanza analítica.
- Centrifugar 1 mL de cada cultivo a 13200 x g por 1min. Eliminar todo el sobrenadante.
- Pesar nuevamente los tubos. Estimar el peso del botón celular.
- Diluir con dH₂O estéril para que queden las células a una concentración de 0.01 g/ml.

Caja de pozos:

- Colocar en los pozos (A2, A3, A4... B1, B2, B3...) 135 μ l de dH₂O estéril con pipeta multicanal hasta la columna número 6.
- En el primer pozo de cada fila (A1, B1, C1...) agregar 150 μ l de la solución celular.
- Con pipeta multicanal, tomar 15 μ l de cada primer pozo de la primera fila y transferir al siguiente pozo (A2, B2, C2...) (subir y bajar para homogenizar). Repetir éste paso hasta la columna 6 (A3, B3, C3...) (A4, B4, C4...) etc.
- Esterilizar el replicador sumergiéndolo en etanol en caja de petri de vidrio. Poner a la flama. Dejarlo enfriar por unos segundos.
- Sumergir cuidadosamente en los pozos al replicador.
- Imprimir en el medio a analizar.
- Tomar fotografía los días necesarios.

CONSUMO MITOCONDRIAL DE OXÍGENO (Estabrook, 1967; Uribe *et al*, 1985)

Actividad de la cadena respiratoria

- Descongelar la cantidad de mitocondrias necesarias para una concentración de 0.5 mgprot/ml por ensayo.
- Agregar a la cámara del oxímetro (YSI 5300 equipado con un electrodo de Clark, acoplado a un sistema computarizado para recabar datos del consumo de oxígeno) las siguientes soluciones en el orden:

Soluciones	Concentración
Buffer SH	Hasta completar 1.5 ml (cámara)
KCl	20 mM
MgCl ₂	10 mM
KH ₂ PO ₄	4 mM
Etanol	7.5 μ l
Mitocondrias	0.5 mg/ml
*ADP	3.5 μ l

*Agregar después de medir el estado 2 respiratorio por corto tiempo

Buffer SH

Sorbitol 0.6 M
Hepes 20 mM

KCl 2 M

KH₂PO₄ 1 M

MgCl₂ 100 mM

ADP 100 mM

Actividad de la CcO

- Descongelar la cantidad de mitocondrias necesarias para una concentración de 0.5 mg/ml por ensayo.
- Agregar a la cámara del oxímetro (YSI 5300 equipado con un electrodo de Clark, acoplado a un sistema computarizado para recabar datos del consumo de oxígeno) las siguientes soluciones en el orden:

Soluciones	Concentración
Buffer SH	Hasta completar 1.5 ml (cámara)
KCl	20 mM
MgCl₂	10 mM
KH₂PO₄	4 mM
Antimicina	18.2 mM
Ascorbato	30 μ l
TMPD	50 mM
Mitocondrias	0.5 mg/ml
*ADP	3.5 μ l
**KCN	15 μ l

*Agregar después de medir por un corto tiempo

** Agregar después de medir por tiempo prolongado

Buffer SH:

Sorbitol 0.6 M

Hepes 20 mM

KCl: 2 M

KH₂PO₄: 1 M

MgCl₂: 100 mM

ADP: 100 mM

Antimicina: 150 mM

Tetrametil-*p*-fenilendiamida (TMPD): 15 mM (preparado con di-metil-sulfóxido DMSO)

Ascorbato de sodio: 250 mM

KCN: 50 mM

RESULTADOS

LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE Hah1

Detección de Hah1

Para poder detectar la proteína por Western blot, fue necesario fusionar un epítipo de hemaglutinina (HA) a su extremo carboxilo terminal. (Ver Materiales y Métodos). La construcción se clonó bajo su propio promotor en dos diferentes plásmidos, uno de alto número de copias (YEp352) y en otro de bajo número de copias (pRS416) (Ver materiales y métodos). Los plásmidos se transformaron en una cepa $\Delta hah1$ (AGG1). Posteriormente se obtuvo un extracto total de proteínas.

Para detectar a Hah1-HA en alto y bajo de número de copias, realizamos un Western blot utilizando al anticuerpo contra HA (Figura 11). Observamos que la detección de Hah1-HA en ambas cepas correspondía a un peso molecular de alrededor de 34 kDa, así como al número de copias (Figura 11). Como control, negativo se constató que en las cepas con el plásmido vacío, no se detecta señal con el anticuerpo anti-HA.

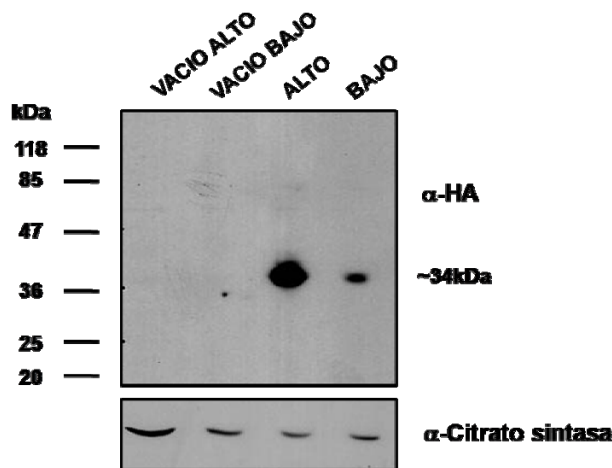


Figura 11. Detección de Hah1-HA por Western blot. Se fusionó un epítipo de hemaglutinina (HA) en el extremo carboxilo terminal de Hah1. Se clonó en dos diferentes vectores, en ALTO y BAJO número de copias. Las dos versiones se expresaron en una cepa nula de *HAH1*. Se extrajo la proteína total de las dos cepas con las diferentes versiones de Hah1-HA, incluyendo las cepas con los dos tipos de plásmidos vacíos (VACIO ALTO y VACIO BAJO). Se cargaron 50 μ g de proteína en gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) y se analizaron por Western blot con anticuerpos contra HA y contra la enzima citrato sintasa (CS) como control de carga.

Localización subcelular de Hah1-HA

En el laboratorio estudiamos si Hah1, al igual que su homólogo en humano, Taco1, también se localiza en la mitocondria (Weraarpachai *et al*, 2009). Para ello utilizamos a las dos versiones de Hah1-HA, en alto y bajo número de copias, purificamos mitocondrias y durante el proceso de purificación tomamos muestras de las fracciones citosólicas. Se analizaron ambas fracciones mediante Western blot. Al utilizar un anticuerpo contra HA observamos que Hah1-HA se asocia con las fracciones mitocondriales tanto en alto como en bajo número de copias. Como control citosólico se utilizó al anticuerpo contra la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) este anticuerpo policlonal detecta proteínas

inespecíficas en las fracciones mitocondriales. Como control mitocondrial se utilizó al anticuerpo contra la citrato sintasa (CS) (Figura 12)

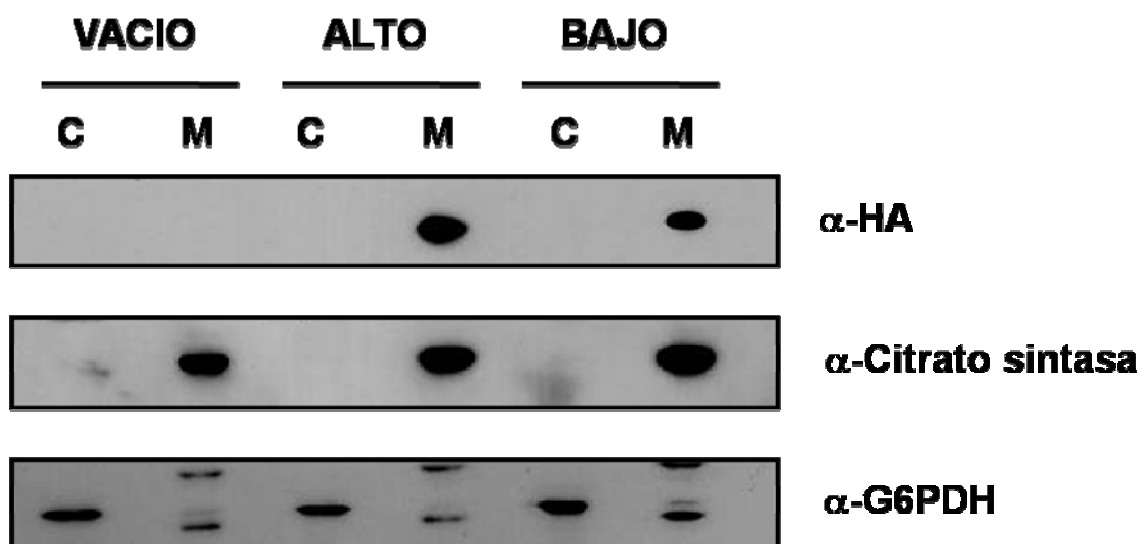


Figura 12. Localización celular de Hah1-HA. Las versiones de Hah1-HA en alto y bajo número de copias co-purifican con la fracción mitocondrial (M) y no así en las fracciones citoplasmáticas (C). Como control citosólico se utilizó el anticuerpo contra la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y como control mitocondrial el anticuerpo contra la enzima citrato sintasa (CS). Se cargaron 20 μ g de proteína en gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE).

Localización de Hah1 en las fracciones mitocondriales

Hasta el momento aún no se sabía si Hah1 es una proteína soluble o membranal, aunque los programas de predicción de hidrofobicidad no sugieren la presencia de ningún cruce transmembranal. Para saberlo se realizó un fraccionamiento mitocondrial. En este experimento se utilizaron las dos versiones de Hah1-HA, en

alto y en bajo número de copias. Se purificaron mitocondrias de ambas cepas. La mitocondrias puras se sonicaron y se separó la fracción membranal de la fracción soluble por ultracentrifugación. Las proteínas de ambas fracciones se resolvieron por SDS-PAGE al 12% y se analizaron por Western blot. En éste experimento pudimos observar que ambas versiones de Hah1-HA son proteínas solubles al igual que su homólogo en humano Taco1 (*Weraarpachai et al, 2009*) (Figura 13).

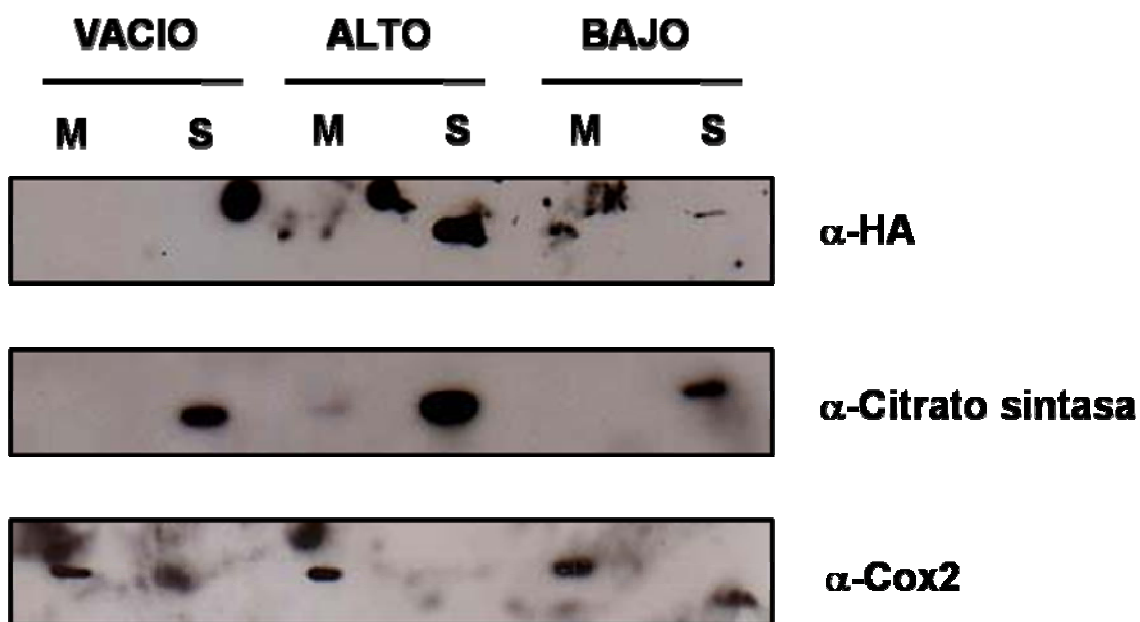


Figura 13. Localización de Hah1-HA en las fracciones mitocondriales. Las versiones de Hah1-HA en BAJO y en ALTO número de copias colocalizan con la fracción soluble (S) y no así con las fracciones membranales (M). Como control soluble se utilizó a la enzima citrato sintasa y como control membranal a la subunidad 2 de la CcO (Cox2). Se cargaron 20 μ g de proteína en gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE).

Ensayo de protección a la digestión por la proteinasa K

Para determinar la ubicación de Hah1 en la mitocondria se realizó un ensayo de protección a proteinasa K. Para ello las mitocondrias puras de la versión en bajo número de copias, se sometieron a choque osmótico para generar mitoplastos. Las proteínas localizadas en la matriz mitocondrial se protegen de la acción de digestión de la proteinasa K, mientras que las que se localizan en el espacio intermembranal se degradan.

Para este experimento, las mitocondrias se centrifugaron y se resuspendieron en el amortiguador sorbitol/HEPES, dejando las mitocondrias intactas. Para la generación de mitoplastos se resuspendieron únicamente en HEPES. Ambas muestras se incubaron con o sin proteinasa K (10 μ g/ml) durante 30 min en hielo. Las muestras se resolvieron en SDS-PAGE al 12% y se analizaron por Western blot. En éste experimento pudimos observar que Hah1-HA se protege a la acción de digestión de la proteinasa K (Figura 14, carriles 2 y 4) al igual que la enzima citrato sintasa que se localiza en la matriz mitocondrial. Por lo que podemos concluir que Hah1-HA es una proteína soluble que se localiza en la matriz mitocondrial.

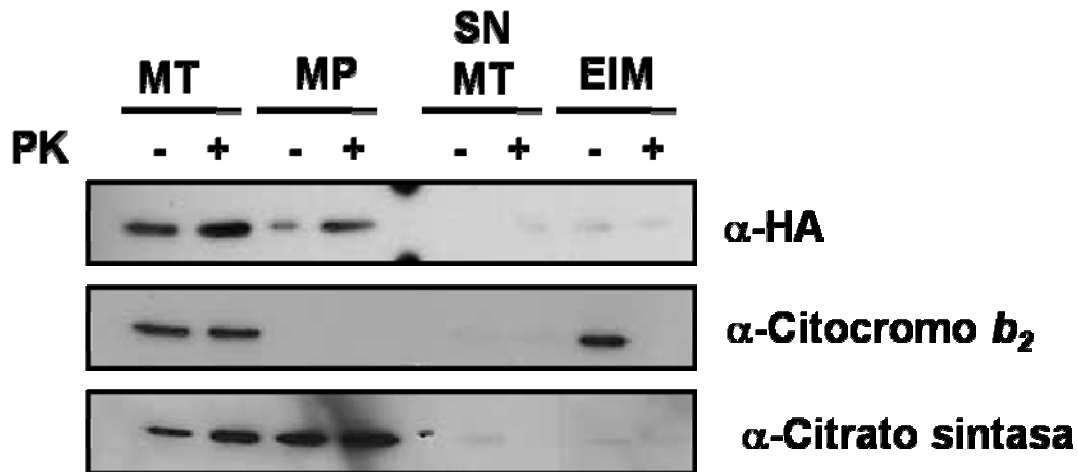


Figura 14. Ensayo de protección a la digestión por proteinasa K. El ensayo se realizó con 100 μ g de proteína mitocondrial por muestra. Se resolvieron por gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) y se analizaron por Western blot. Como controles se utilizaron a la proteína citocromo b_2 (espacio intermembranal) y a la enzima citrato sintasa (matriz mitocondrial). MT (mitocondrias); MP (mitoplastos); SN MT (sobrenadante solución con mitocondrias); EIM (espacio intermembranal).

ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE Hah1

Hah1 en *S. cerevisiae* es el homólogo de Taco1 en humano. En humano se encontró que Taco1 es una proteína cuya función es la de un posible activador traduccional de *COX1*. En este mismo estudio también se observó que Hah1 no tiene ningún efecto sobre la síntesis en el fondo nuclear BY4741 y BY4742 de *S. cerevisiae*, (Weraarpachai *et al*, 2009).

Como ya habíamos comprobado que Hah1 es una proteína que se localiza en la matriz mitocondrial, decidimos estudiar a fondo su función sobre la respiración celular. Para esto decidimos analizar el fenotipo de Hah1 sobre el crecimiento en medios respiratorios, así como en la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial y de la CcO. Para estos estudios utilizamos tres distintos fondos

nucleares: BY4742, D273-10b y W303. Para la cepa D273-10b utilizamos dos distintos fondos mitocondriales, una con el gen *COX1* con intrones (*COX1 I⁺*) y otra con el gen *COX1* sin intrones (*COX1 I[°]*). Los distintos fondos nucleares fueron utilizados para observar si no existían diferencias de fenotipo de Hah1 entre ellos.

Fenotipo de crecimiento de Hah1 en medio respiratorio

Para analizar si Hah1 tiene un efecto sobre el crecimiento dependiente del medio respiratorio, estudiamos los diferentes fondos nucleares con una mutación nula $\Delta hah1$: BY4742 ($\Delta hah1$), D273-10b *COX1⁺* (AGG2), *COX1[°]* (AGG1) y W303 (AGG4). Se realizaron diluciones seriadas en medios con tres diferentes sustratos respiratorios: Etanol-Glicerol (YPEG), Glicerol (YPG) y Lactato (YPlac). Las diluciones seriadas se analizaron después de dos días de incubación a 30°C. En éste experimento no encontramos ninguna diferencia de crecimiento en los diferentes medios respiratorios (Figura 15).

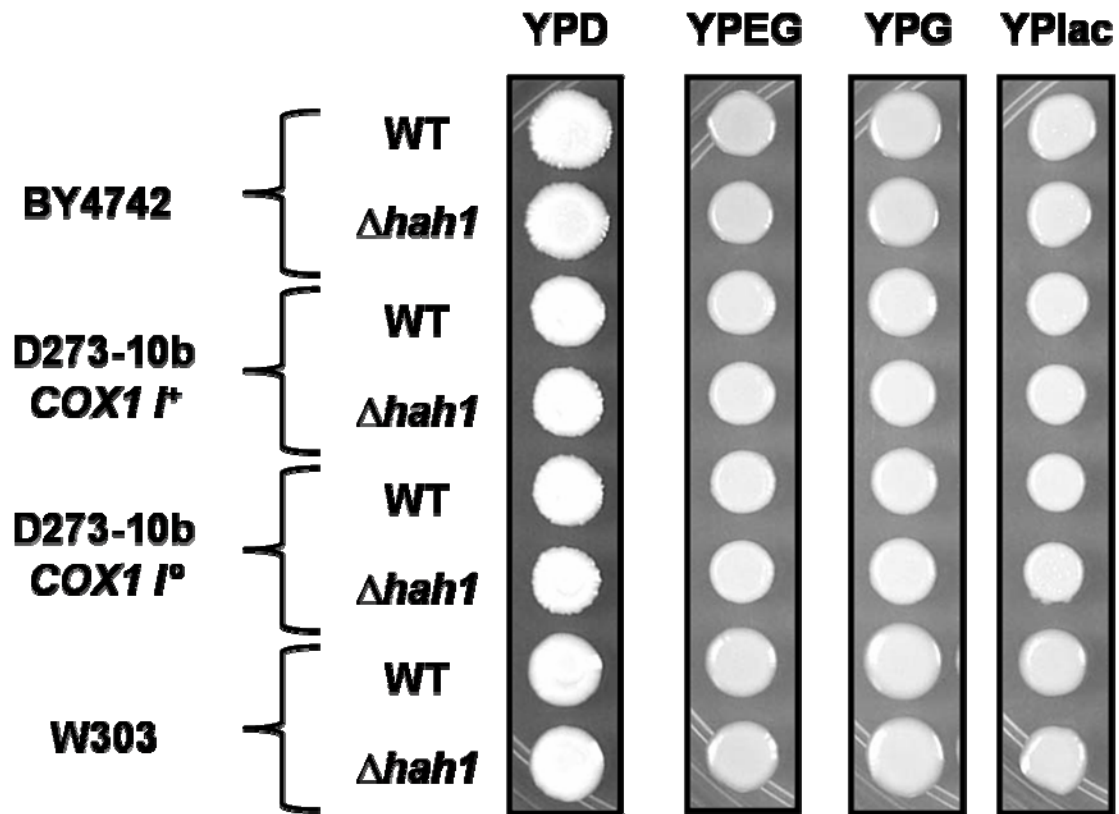


Figura 15. Análisis del fenotipo de crecimiento en medio respiratorio. Se utilizaron tres fondos nucleares diferentes: BY4742, D273-10b *COX1 I⁺*, D273-10b *COX1 I[°]* y W303; cada una con su cepa silvestre (WT) y su mutante ($\Delta hah1$). Se analizaron después de dos días de incubación a 30°C. Como control se utilizó medio con glucosa (YPD) y como medios respiratorios con los sustratos: Etanol-Glicerol (YPEG), Glicerol (YPG), y Lactato (YPlac).

Efecto de Hah1 sobre la actividad de la cadena respiratoria y la actividad de la CcO

Debido a que no observamos ningún fenotipo sobre el crecimiento en medio respiratorio de Hah1, decidimos estudiar su efecto sobre la cadena respiratoria o sobre la actividad de la CcO, la cual no se puede observar en el crecimiento en medio respiratorio. Obtuvimos las fracciones mitocondriales crudas de las cepas

silvestres y mutantes de los fondos nucleares: BY4742, D273-10b *COX1⁺*, D273-10b *COX1^o* y W303; y determinamos la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial mediante el consumo de oxígeno. Se midieron el estado 2 respiratorio (consumo de oxígeno no acoplado a la síntesis de ATP) y el estado 3 respiratorio (consumo de oxígeno acoplado a la síntesis de ATP) adicionando ADP a la cámara. El consumo de oxígeno de cada una de las cepas se graficó considerando la cantidad de proteína mitocondrial y la difusión del oxígeno en el agua (200 $\mu\text{mol/l}$) (Figura 16, A y B). No observamos ninguna disminución en el consumo de oxígeno en los diferentes fondos nucleares. También medimos la actividad de la CcO y para ello inhibimos la actividad del Complejo III con antimicina y agregamos Ascorbato/TMPD como donadores de electrones al citocromo c. Calculamos el consumo de oxígeno y tampoco observamos ninguna disminución en la actividad de la CcO en ninguno de los distintos fondos nucleares (Figura 16, C).

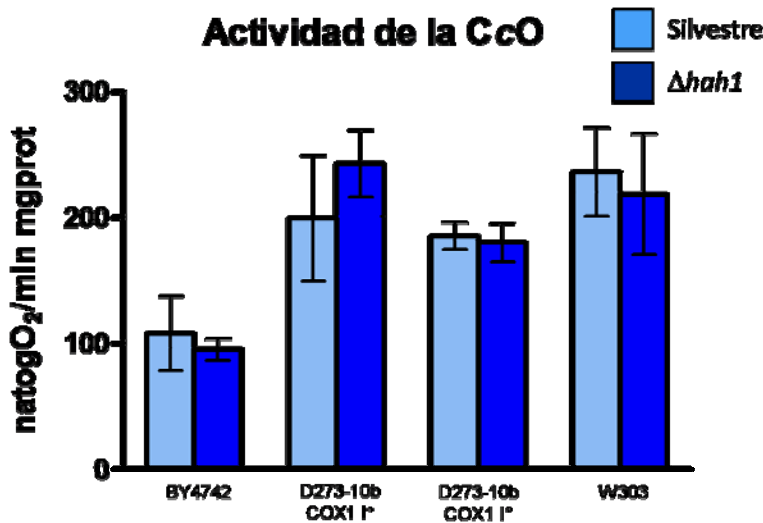
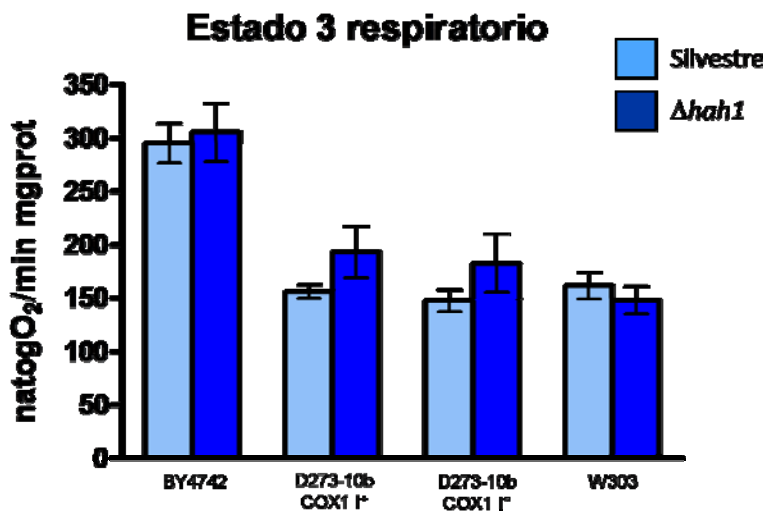
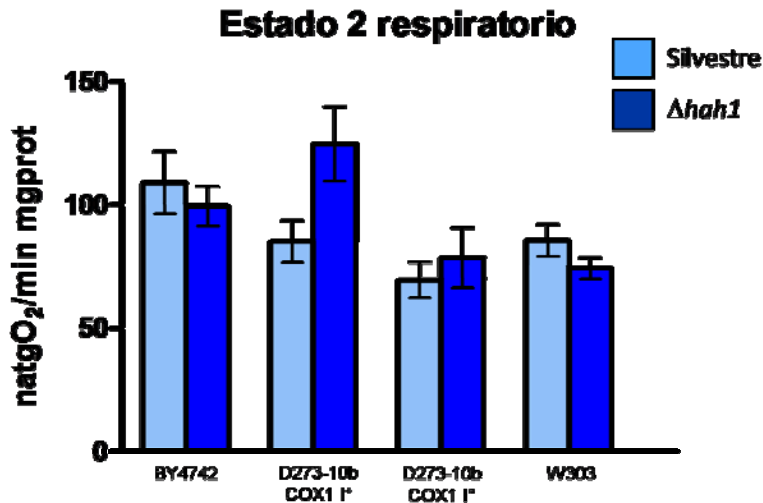


Figura 16. Cuantificación del consumo de oxígeno de la cadena respiratoria y de la CcO. Para cuantificar el consumo de oxígeno se utilizaron las fracciones mitocondriales crudas de los fondos nucleares: BY4742, D273-10b COX1^{I+}, D273-10b COX1^{I°} y W303; cada una con su cepa silvestre (WT, AZUL CLARO) y mutante ($\Delta hah1$, AZUL OSCURO). Para cuantificar el estado 2 respiratorio (consumo de oxígeno no acoplado a la síntesis de ATP) se cuantificó el consumo de oxígeno en ausencia de ADP. Para medir el estado 3 respiratorio (consumo de oxígeno acoplado a la síntesis de ATP) se cuantificó el consumo de oxígeno en presencia de ADP. Temperatura=25°C; n=4.

Estudio de la interacción de Hah1 con Oms1 y Fmp46

Debido a que no encontramos que la ausencia de Hah1 disminuyera la respiración, consideramos que podrían existir otras proteínas que cumplieran la misma función que Hah1. Decidimos estudiar a dos genes mitocondriales que se sabe que podrían tener una interacción genética con el gen *HAH1* (Costanzo *et al*, 2010): *OMS1* y *FMP46*. Para poder estudiar si *HAH1* junto con *OMS1* y *FMP46* tiene una función sobre la respiración, realizamos las mutantes dobles $\Delta hah1 \Delta oms1$ y $\Delta hah1 \Delta fmp46$. Observamos su fenotipo de crecimiento en medio respiratorio mediante diluciones seriadas (Figura 17). A los tres días de crecimiento a 30°C observamos una disminución en el crecimiento en medio respiratorio de la mutante $\Delta oms1$, la cual había sido reportada con anterioridad (Lemaire *et al*, 2004) y una disminución más evidente de la doble mutante $\Delta hah1 \Delta oms1$.

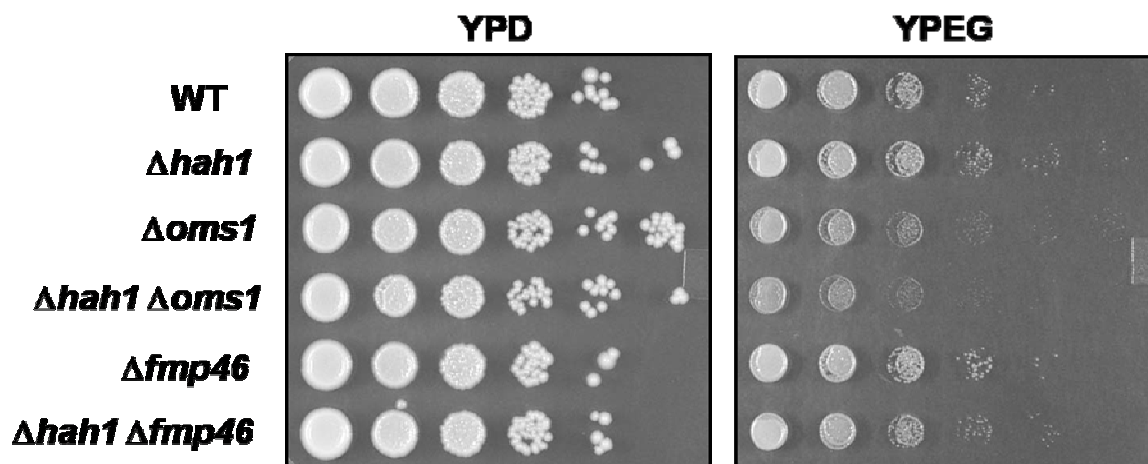


Figura 17. Análisis del crecimiento en medio respiratorio de las dobles mutantes $\Delta hah1 \Delta oms1$ y $\Delta hah1 \Delta fmp46$. Para el análisis se utilizó al medio respiratorio con el sustrato respiratorio etanol-glicerol (YPEG) y como control el medio fermentativo Glucosa (YPD). Se analizaron las mutantes sencillas: $\Delta hah1$, $\Delta oms1$ y $\Delta fmp46$, y las mutantes dobles: $\Delta hah1 \Delta oms1$ y $\Delta hah1 \Delta fmp46$. Dos días de crecimiento en YPD. Tres días de crecimiento a 30°C en YPEG.

DISCUSIÓN

Hah1 es una proteína mitocondrial

Hah1 en *S. cerevisiae* es el homólogo de Taco1 en humano. Se ha propuesto que Taco1 podría ser un activador traduccional de *COX1* (Weraarpachai *et al*, 2009) aunque su mecanismo de acción aún se desconoce. Cabe hacer notar que Taco1 sería el primer activador traduccional de *COX1* identificado en humano. Aunque aún es necesario determinar si esta proteína pueda actuar en el mRNA de *COX1* al igual que los activadores traduccionales en *S. cerevisiae* Pet309 y Mss51 (Manthey & McEwen, 1995; Perez-Martinez *et al*, 2003).

Nos interesó estudiar a Hah1 para entender su función. Nuestra hipótesis inicial era que participaría en la expresión de *COX1*, al igual que su homólogo en humano Taco1. Sin embargo nuestros datos hasta el momento no han comprobado que Hah1 conserve dicha función. Taco1 y Hah1 pertenecen a la superfamilia de proteínas con dominio Duf28, los cuales se encuentran conservados en diferentes organismos, incluyendo mamíferos, hongos y bacterias. La estructura cristalográfica del dominio Duf28 se ha determinado para las proteínas YebC (*E. coli*), Aq1575 (*Aquifex aeolicus*) y HP0162 (*Helicobacter pylori*) (Protein Data Bank 1lfp, 1kon, y 1mw7 respectivamente). Por su análisis estructural, las tres proteínas tienen una cavidad con predominancia de residuos negativos en la superficie de las misma. Sin embargo aún no se conoce la función de ninguna de estas proteínas. Además se propone que contiene un posible dominio de unión a DNA (Shin *et al*, 2002), aunque de los miembros de la familia Duf28 solo se ha identificado una (pmpR/PA0964) que se une a DNA en *Pseudomonas aeruginosa*, la cual se une a la región promotora del operón *phzA1* (Liang *et al*, 2008).

Llama la atención que Hah1 es la única proteína identificada en *S. cerevisiae* que se ha identificado que contiene el dominio Duf28. En el presente trabajo nos interesó estudiar a fondo la función mitocondrial de Hah1 en *S. cerevisiae*.

Para determinar la función de Hah1, en el presente trabajo estudiamos la localización de esta proteína. Determinamos que Hah1-HA es una proteína soluble que colocaliza con las fracciones mitocondriales puras y no así con las fracciones citoplasmáticas, además de que se localiza en la matriz mitocondrial cuando Hah1-HA es expresada desde plásmidos de alto como de bajo número de copias indicando que en ambas versiones la localización de Hah1-HA no se vio afectada. Taco1, también es una proteína soluble que se localiza en la mitocondria. Sin embargo, para determinar la localización de Taco1 se utilizaron métodos de microscopía por fluorescencia, los cuales no determinan el compartimento mitocondrial en el que se localizan las proteínas (Weraarpachai *et al*, 2009). Dado que su efecto aparentemente es sobre la síntesis de Cox1 podemos suponer que su actividad se encuentra en la matriz mitocondrial, ya que ahí es donde se encuentra la maquinaria traduccional.

A diferencia de Taco1 y Hah1, se ha determinado que los activadores traduccionales en la mitocondria de *S. cerevisiae* se asocian a la membrana interna mitocondrial ya sea de manera integral o periférica. Tal es el caso de los activadores traduccionales de COX3 (Pet54, Pet122 y Pet494) (McMullin & Fox, 1993), de COX2 (Pet111) (Green-Willms *et al*, 2001), de COX1 (Pet309 y Mss51) (Siep *et al*, 2000; Tavares-Carreón *et al*, 2008) y de COB (Cbs1 y Cbs2) (Rodel, 1986). La localización de los activadores traduccionales en la membrana interna mitocondrial apoya el argumento de que estos permiten que el ensamblaje de las subunidades de los complejos respiratorios que se codifican en el DNA mitocondrial sea de manera cotraduccional y no postraduccional. La inserción cotraduccional da estabilidad a las proteínas que se codifican en la matriz mitocondrial ya que todas, excepto Var1, son altamente hidrofóbicas. Estos argumentos son apoyados por experimentos en los que se expresaron los genes COX2 o COX3 bajo el control de las regiones reguladoras no traducidas de VAR1. Var1 es una proteína soluble la cual se sintetiza en la matriz mitocondrial, por lo que se propone que no posee activadores traduccionales asociados a la membrana interna. En este experimento se observó que aunque Cox2 y Cox3 se

sintetizan, estas proteínas se degradan rápidamente porque no son capaces de integrarse a la membrana. En contraste, Taco y Hah1 son proteínas solubles sugiriendo que no necesariamente participan en la inserción cotraduccional de Cox1, como los activadores anteriormente descritos. Será necesario estudiar más a fondo las posibles funciones sobre la síntesis de Cox1, en particular de Taco1, donde si se ha podido demostrar que participa en la expresión específica de Cox1.

Estudio de la función de Hah1

Debido a que se ha propuesto que Hah1 es el homólogo de Taco1, y se observó que esta última afecta la respiración, decidimos estudiar si Hah1 tenía el mismo efecto. Para ello estudiamos tres diferentes fondos nucleares de *S. cerevisiae*: (BY4742, D273-10b (con y sin intrones en el gen de *COX1*) y W303. El estudio en los diferentes fondos nucleares nos ayudó a observar si existían diferencias fenotípicas entre los mismos. Existen ejemplos en los que se han observado diferencias fenotípicas entre diferentes fondos nucleares. Un ejemplo en nuestro laboratorio es el de la mutación Δcox24 , que en el fondo W303 solo tiene un efecto sobre la síntesis de Cox1 (Barros *et al*, 2006), mientras que en la cepa D273-10b las células pierden el DNA mitocondrial rápidamente (Rodolfo García Villegas, Tesis de licenciatura). En la cepa D273-10b utilizamos dos diferentes fondos mitocondriales en donde el gen *COX1* se encontraba con intrones (*COX1 I⁺*) y sin intrones (*COX1 I^o*) para estudiar si el efecto de Hah1 estaba asociado a la presencia de los mismos y poder así atribuir a Hah1 una función en el procesamiento del mRNA de *COX1*.

Analizamos el efecto de la ausencia de *HAH1* en los diferentes fondos nucleares mediante ensayos de crecimiento en medio respiratorio, así como el efecto sobre la actividad de la cadena respiratoria y la CcO. En éste estudio no detectamos ningún efecto sobre la mutante nula de *hah1*.

A diferencia de Hah1, Taco1 tuvo un efecto sobre la síntesis de Cox1 y por lo tanto un defecto en la CcO. Cabe destacar que el efecto de la mutación de Taco1 sobre el paciente con Síndrome de Leigh fue tardío (Weraarpachai *et al*, 2009).

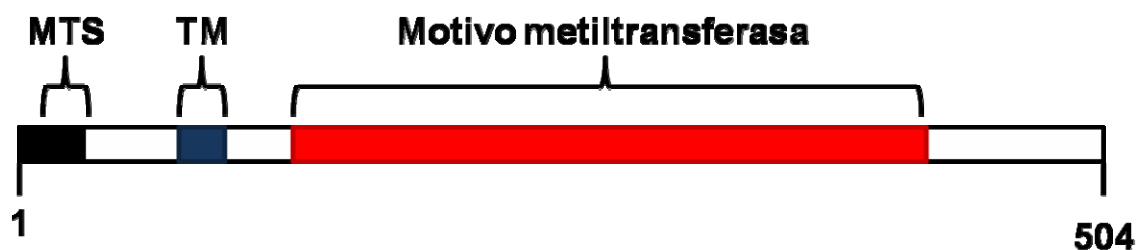
Proteínas anteriormente descritas en pacientes con la misma enfermedad (Surf1, Cox10, Cox15 y LRPPRC) (Antonicka *et al*, 2003a; Mootha *et al*, 2003; Oquendo *et al*, 2004; Pequignot *et al*, 2001) asociadas a defectos en el ensamblaje de la CcO se desarrollaron de manera temprana en pacientes con una vida no mayor a los 3 años.

Debido a lo anterior el interés en nuestro laboratorio fue estudiar a fondo la función de Hah1, ya que es una proteína muy conservada entre diferentes especies como bacterias, hongos y mamíferos, más aún que todas las proteínas con homología a Hah1 contienen el dominio Duf28. Como no detectamos ningún efecto de Hah1 sobre la respiración pensamos que podría existir otra u otras proteínas que pudieran estar cumpliendo una función similar a Hah1. Revisamos el estudio de interacciones genéticas de *S. cerevisie* (Costanzo *et al*, 2010) y observamos que existen varios genes con posibles interacciones genéticas con *HAH1*, algunas con funciones citoplasmáticas y otras con localización mitocondrial. Escogimos a dos genes (*OMS1* y *FMP46*) dado que ambos productos tienen localización mitocondrial.

Para analizar la interacción genética de *HAH1* con *OMS1* y *FMP46*, realizamos las dobles mutantes: $\Delta hah1 \Delta oms1$ y $\Delta hah1 \Delta fmp46$. Observamos que en las dos existe una moderada disminución en el crecimiento en medio respiratorio en comparación con la mutante sencilla Δoms y $\Delta fmp46$. Aunque distinguimos que la doble mutante $\Delta hah1 \Delta oms1$ tiene un mayor efecto sobre el crecimiento respiratorio que la doble mutante $\Delta hah1 \Delta fmp46$.

Oms1 es una proteína muy conservada en hongos, se localiza en la membrana interna mitocondrial con un cruce transmembranal, contiene un motivo de metiltransferasa con probable actividad y con localización en el espacio intermembranal (Lemaire *et al*, 2004) (Figura 15). Se determinó que Oms1 suprime el fenotipo en alto número de copias mutaciones puntuales en el translocador de Oxa1, además de que en ese mismo estudio se creó un modelo en el que se propone que Oms1 suprime debido a que estabiliza al translocador

de Oxa1 evitando que sea susceptible a proteasas como Oma1p (Lemaire *et al*, 2004).



ESPECIE	IDENTIDAD
<i>Kluyveromyces lactis</i>	65%
<i>Debaryomyces hansenii</i>	77%
<i>Candida albicans</i>	76%
<i>Aspergillus nidulans</i>	46%
<i>Neurospora crassa</i>	35%
<i>Toxoplasma gondii</i>	45%
<i>Trypanosoma gondii</i>	26%
<i>Leishmania braziliensis</i>	23%

Figura 15. BLASTP y representación esquemática de Oms1. Oms1 contiene una secuencia señal (~75 a.a.) (MTS NEGRO); un cruce transmembranal (TM AZUL) (105-125 a.a.); y un motivo metiltransferasa (ROJO). Oms1 es una proteína conservada en la mayoría de los hongos así como en algunos parásitos.

Fmp46 se identificó en el proteoma mitocondrial (Sickmann *et al*, 2003). A diferencia de Oms1, a Fmp46 no se le predicen cruces transmembranales. La función de Fmp46 es aún desconocida, aunque por espectroscopia NMR se propuso que podría ser una proteína redox con una posible función de tioredoxina

involucrada en la reducción de moléculas tóxicas pequeñas (Jung *et al*, 2005). Programas de alineamiento (BLAST) predicen pocos homólogos a Fmp46, aunque los ejemplos están distribuidos en bacterias, cianobacterias y hongos (Figura 16).

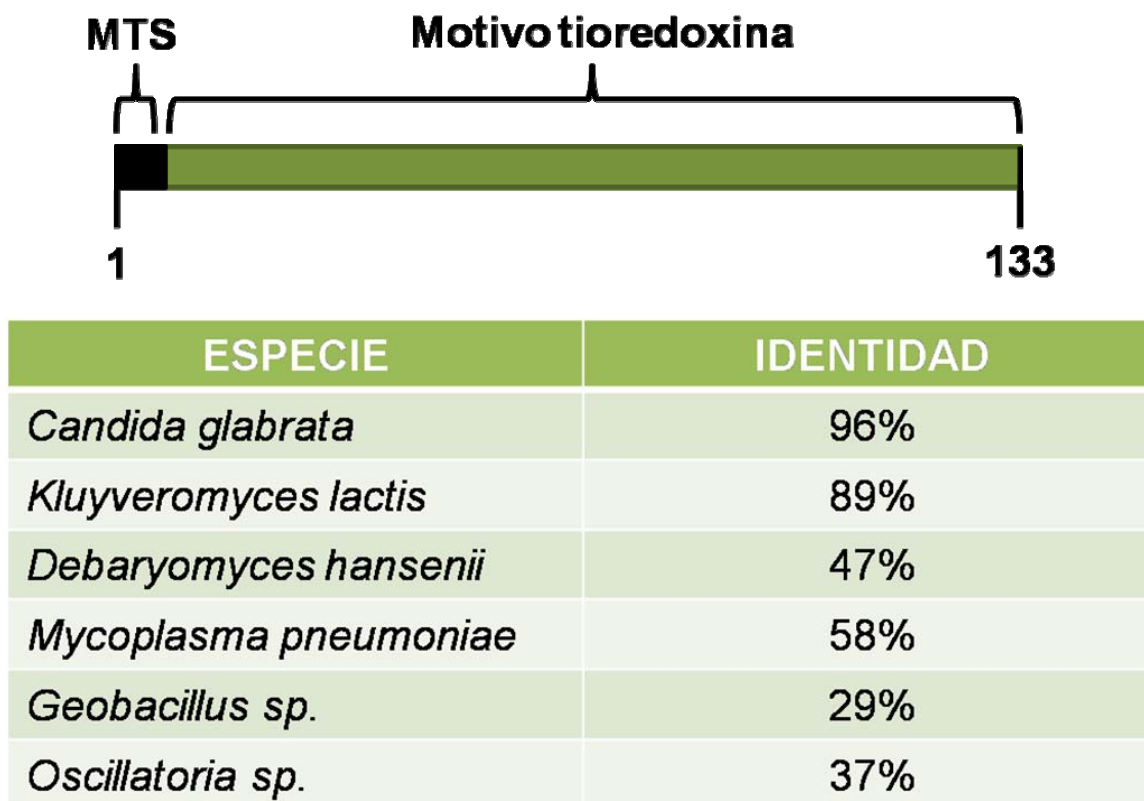


Figura 16. BLASTP y representación esquemática de Fmp46. Fmp46 contiene una secuencia señal de 72 a.a. (MTS NEGRO); y un motivo tioredoxina a lo largo de la secuencia (VERDE). Fmp46 tiene pocos homólogos (BLAST) aunque estos están distribuidos en hongos (*K. lactis*, *C. glabrata*, *D. hansenii*) en bacterias (*Geobacillus sp.*, *M. pneumoniae*) y una cianobacteria (*Oscillatoria sp.*)

Aunque *OMS1* y *FMP46* parecen no tener funciones similares en procesos mitocondriales, sabemos que interaccionan genéticamente con *HAH1* y que están involucrados en la respiración mitocondrial. Existen ejemplos de proteínas

mitocondriales a las cuales se les había determinado una función y posteriormente se observó que cumplían una diferente, tal es el caso de Mdm38. Originalmente se había determinado que tenía una función en la translocasa K^+/H^+ mitocondrial (Nowikovsky *et al*, 2007). Sin embargo en estudios recientes se determinó que ésta se asocia a los mitoribosomas y a Mba1, y que en conjunto tienen un efecto sobre la traducción de *COX1* y *COB* (Bauerschmitt *et al*, 2010).

En conclusión, este estudio nos permitió entender que Hah1 podría tener una función conjunta con Oms1 y Fmp46, aunque las dobles mutantes $\Delta hah1 \Delta oms1$ y $\Delta hah1 \Delta fmp46$ aún pueden crecer en medio respiratorio. Será necesario determinar si los genes *OMS1* y *FMP46* son los únicos con los que interacciona *HAH1* o si existen otros que interaccionen de igual manera con *HAH1*. Para ello será necesario realizar un tamizaje genómico mediante la creación de mutantes sintéticas no respiratorias. Para este análisis, a partir de una cepa nula de *hah1*, se apareará con una colección de mutantes sencillas de *S. cerevisiae* y se analizará el fenotipo respiratorio de las diploides resultantes. Este estudio nos dará mayor información de los posibles genes que interaccionen con *HAH1*.

PERSPECTIVAS

En el presente trabajo observamos que la proteína Hah1 es una proteína soluble que se localiza en la matriz mitocondrial. Para continuar con el estudio de la función de la proteína Hah1, en nuestro laboratorio planteamos las siguientes perspectivas.

- Estudiar si la interacción entre Hah1, Oms1 y Fmp46 es física.
- Analizar cuál es el efecto en los complejos respiratorios de las dobles mutantes $\Delta hah1 \Delta oms$ y $\Delta hah1 \Delta fmp46$.
- En nuestro laboratorio analizamos los posibles genes que pudieran tener una interacción genética con Oms1, y observamos que interacciona genéticamente con genes del ribosoma mitocondrial. Para ello realizaremos un gradiente continuo de sacarosa para analizar si Hah1 y Oms1 co-migran con los ribosomas mitocondriales.
- Mediante un tamizaje genómico automatizado y la creación de mutantes sintéticas no respiratorias analizaremos si existen otros genes que tengan interacción con *HAH1*.
- Para poder entender más sobre la función de Hah1 estudiaremos si se asocia a complejos de alto peso molecular.
- Como el homólogo de Hah1 en humano estaba asociado al desarrollo del síndrome de Leigh tardío, estamos interesados en estudiar si los efectos de Hah1 son tardíos, para ello analizaremos el tiempo de envejecimiento de la mutante nula de *hah1*.
- Como determinamos que la función de Hah1 sea similar a la de Taco1, adicionalmente estudiaremos la función de la Hah1 en el modelo de *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), el cual contiene un homólogo de Hah1. *C. elegans* recientemente ha sido utilizado como modelo de estudio

de los procesos mitocondriales. Además éste estudio nos permitirá entender más el mecanismo de acción de Taco1 y Hah1 en la mitocondria.

APÉNDICE

Tabla de oligonucleótidos utilizados en éste estudio

NOMBRE	SECUENCIA	COMENTARIOS
TACO1Fw	5'TTTAGTTACTATGCGTCAGTGAG3'	Oligo para amplificar al gen <i>HAH1</i> 300 nucleótidos río arriba del codón de inicio.
TACO1Rv	5' CCTAGCCATGATCTAATATTACCG3'	Oligo para amplificar al gen <i>HAH1</i> 300 nucleótidos río abajo del codón de inicio.
TACO1Fw3	5'ATTtctagaAGAAGGATGGCAATATCG3'	Oligo para amplificar y agregar el sitio de restricción XbaI al gen <i>HAH1</i> 500nucleótidos río arriba del codón de inicio. Letras minúsculas: secuencia de corte de XbaI.
TACO1Rv3	5'TTCtctagaGATTTGATGACTGTCAAG3'	Oligo para amplificar y agregar el sitio de restricción XbaI al gen <i>HAH1</i> 500nucleótidos río abajo del codón de inicio. Letras minúsculas: secuencia de corte de XbaI.
TACO1-HAFw	5'ggttaccatcacgatgttcgtgactatgcgTCCAACCGTAAATAAATA3'	Oligo para agregar el epítipo de HA al gen <i>HAH1</i> eliminando el codón de paro. Letras minpusculas: secuencia de HA.
TACO1-HARv	5'cgcatagtcaggaacatcgatgggtaaccAGCGTTGCTAGCGTTAGTG3'	Oligo para agregar el epítipo de HA al gen <i>HAH1</i> eliminando el codón de paro. Letras minpusculas: secuencia de HA.
TACOLEU2 Fw	5'AATAACTAAGAAAAACAGCAAACCTTGGTATGAACGCATCAAAAATTGGAAAcctcaacataacgagaac3'	Oligo para amplicar al casete de <i>LEU2</i> . Letras minúsculas: Inicio del casete de <i>LEU2</i> . Letras mayúsculas: Secuencia 5' no traducida de <i>HAH1</i> .
TACOLEU2 Rv	5'ATACAGGTATTTGTGGTATTGATTATTTATTTTACGGTTTGGTGGAggtgtttttattgttga3'	Oligo para amplicar al casete de <i>LEU2</i> .

BIBLIOGRAFÍA

Alberts B (2008) *Molecular Biology of the Cell*, Fifth edn.: Garland Science.

Amberg D, Burke D, Strathern J (2005) *Methods in yeast genetics*: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Antonicka H, Leary SC, Guercin GH, Agar JN, Horvath R, Kennaway NG, Harding CO, Jaksch M, Shoubridge EA (2003a) Mutations in COX10 result in a defect in mitochondrial heme A biosynthesis and account for multiple, early-onset clinical phenotypes associated with isolated COX deficiency. *Hum Mol Genet* **12**(20): 2693-2702

Antonicka H, Mattman A, Carlson CG, Glerum DM, Hoffbuhr KC, Leary SC, Kennaway NG, Shoubridge EA (2003b) Mutations in COX15 produce a defect in the mitochondrial heme biosynthetic pathway, causing early-onset fatal hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* **72**(1): 101-114

Barrientos A, Korr D, Tzagoloff A (2002) Shy1p is necessary for full expression of mitochondrial COX1 in the yeast model of Leigh's syndrome. *EMBO J* **21**(1-2): 43-52

Barros MH, Myers AM, Van Driesche S, Tzagoloff A (2006) COX24 codes for a mitochondrial protein required for processing of the COX1 transcript. *J Biol Chem* **281**(6): 3743-3751

Bauerschmitt H, Mick DU, Deckers M, Vollmer C, Funes S, Kehrein K, Ott M, Rehling P, Herrmann JM (2010) Ribosome-binding proteins Mdm38 and Mba1 display overlapping functions for regulation of mitochondrial translation. *Mol Biol Cell* **21**(12): 1937-1944

Bonnefoy N, Fox TD (2002) Genetic transformation of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Methods Enzymol* **350**: 97-111

Burke Dan DD, Stearns Tim. (2000) *Methods in Yeast Genetics*

Carr HS, Winge DR (2003) Assembly of cytochrome c oxidase within the mitochondrion. *Acc Chem Res* **36**(5): 309-316

Cohen SN, Chang AC, Hsu L (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**(8): 2110-2114

Costanzo M, Baryshnikova A, Bellay J, Kim Y, Spear ED, Sevier CS, Ding H, Koh JL, Toufighi K, Mostafavi S, Prinz J, St Onge RP, VanderSluis B, Makhnevych T, Vizeacoumar FJ, Alizadeh S, Bahr S, Brost RL, Chen Y, Cokol M, Deshpande R, Li Z, Lin ZY, Liang W, Marback M, Paw J, San Luis BJ, Shuteriqi E, Tong AH, van Dyk N, Wallace IM, Whitney JA, Weirauch MT, Zhong G, Zhu H, Houry WA, Brudno M, Ragibizadeh S, Papp B, Pal C, Roth FP, Giaever G, Nislow C, Troyanskaya OG, Bussey H, Bader GD, Gingras AC, Morris QD, Kim PM, Kaiser CA, Myers CL, Andrews BJ, Boone C (2010) The genetic landscape of a cell. *Science* **327**(5964): 425-431

- Dieckmann CL, Staples RR (1994) Regulation of mitochondrial gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int Rev Cytol* **152**: 145-181
- DiMauro S, De Vivo DC (1996) Genetic heterogeneity in Leigh syndrome. *Ann Neurol* **40**(1): 5-7
- Estabrook R (1967) Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement ADP:O ratios. *Methods Enzymol*
- Falkenberg M, Larsson NG, Gustafsson CM (2007) DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annu Rev Biochem* **76**: 679-699
- Foury F, Kucej M (2002) Yeast mitochondrial biogenesis: a model system for humans? *Curr Opin Chem Biol* **6**(1): 106-111
- Frey TG, Murray JM (1994) Electron microscopy of cytochrome c oxidase crystals. Monomer-dimer relationship and cytochrome c binding site. *J Mol Biol* **237**(3): 275-297
- Fujiki Y, Hubbard AL, Fowler S, Lazarow PB (1982) Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **93**(1): 97-102
- Gennis RB (1998) How does cytochrome oxidase pump protons? *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(22): 12747-12749
- Glick BS, Pon LA (1995) Isolation of highly purified mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* **260**: 213-223
- Green-Willms NS, Butler CA, Dunstan HM, Fox TD (2001) Pet111p, an inner membrane-bound translational activator that limits expression of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial gene COX2. *J Biol Chem* **276**(9): 6392-6397
- Guthrie C, and Fink, G.R. (1991) *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*, Vol. Part A: Methods in Enzymology, San Diego, CA.: Academic Press.
- Guthrie C, and Fink, G.R. (2002) *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*, Vol. Part B: Methods in Enzymology, San Diego, CA.: Academic Press.
- Jung JW, Yee A, Wu B, Arrowsmith CH, Lee W (2005) Solution structure of YKR049C, a putative redox protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem Mol Biol* **38**(5): 550-554
- Kerscher SJ (2000) Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases. *Biochim Biophys Acta* **1459**(2-3): 274-283
- Khalimonchuk O, Rodel G (2005) Biogenesis of cytochrome c oxidase. *Mitochondrion* **5**(6): 363-388
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-685

- Leigh D (1951) Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **14**(3): 216-221
- Lemaire C, Guibet-Grandmougin F, Angles D, Dujardin G, Bonnefoy N (2004) A yeast mitochondrial membrane methyltransferase-like protein can compensate for oxa1 mutations. *J Biol Chem* **279**(46): 47464-47472
- Lemaire C, Robineau S, Netter P (1998) Molecular and biochemical analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cox1 mutants. *Curr Genet* **34**(2): 138-145
- Liang H, Li L, Dong Z, Surette MG, Duan K (2008) The YebC family protein PA0964 negatively regulates the *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal system and pyocyanin production. *J Bacteriol* **190**(18): 6217-6227
- Liu L, McKeenan WL (2002) Sequence analysis of LRPPRC and its SEC1 domain interaction partners suggests roles in cytoskeletal organization, vesicular trafficking, nucleocytoplasmic shuttling, and chromosome activity. *Genomics* **79**(1): 124-136
- Manthey GM, McEwen JE (1995) The product of the nuclear gene PET309 is required for translation of mature mRNA and stability or production of intron-containing RNAs derived from the mitochondrial COX1 locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **14**(16): 4031-4043
- Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* **87**(1): 206-210
- Mashkevich G, Repetto B, Glerum DM, Jin C, Tzagoloff A (1997) SHY1, the yeast homolog of the mammalian SURF-1 gene, encodes a mitochondrial protein required for respiration. *J Biol Chem* **272**(22): 14356-14364
- McMullin TW, Fox TD (1993) COX3 mRNA-specific translational activator proteins are associated with the inner mitochondrial membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **268**(16): 11737-11741
- McMullin TW, Haffter P, Fox TD (1990) A novel small-subunit ribosomal protein of yeast mitochondria that interacts functionally with an mRNA-specific translational activator. *Mol Cell Biol* **10**(9): 4590-4595
- Mick DU, Vukotic M, Piechura H, Meyer HE, Warscheid B, Deckers M, Rehling P (2010) Coa3 and Cox14 are essential for negative feedback regulation of COX1 translation in mitochondria. *J Cell Biol* **191**(1): 141-154
- Mick DU, Wagner K, van der Laan M, Frazier AE, Perschil I, Pawlas M, Meyer HE, Warscheid B, Rehling P (2007) Shy1 couples Cox1 translational regulation to cytochrome c oxidase assembly. *EMBO J* **26**(20): 4347-4358

Michaelis U, Korte A, Rodel G (1991) Association of cytochrome b translational activator proteins with the mitochondrial membrane: implications for cytochrome b expression in yeast. *Mol Gen Genet* **230**(1-2): 177-185

Mootha VK, Lepage P, Miller K, Bunkenborg J, Reich M, Hjerrild M, Delmonte T, Villeneuve A, Sladek R, Xu F, Mitchell GA, Morin C, Mann M, Hudson TJ, Robinson B, Rioux JD, Lander ES (2003) Identification of a gene causing human cytochrome c oxidase deficiency by integrative genomics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(2): 605-610

Nelson D (2005) *Lehninger: Principles of Biochemistry*, Fourth edn.: W.H. Freeman and Company.

Nijtmans LG, Taanman JW, Muijsers AO, Speijer D, Van den Bogert C (1998) Assembly of cytochrome-c oxidase in cultured human cells. *Eur J Biochem* **254**(2): 389-394

Nowikovsky K, Reipert S, Devenish RJ, Schweyen RJ (2007) Mdm38 protein depletion causes loss of mitochondrial K⁺/H⁺ exchange activity, osmotic swelling and mitophagy. *Cell Death Differ* **14**(9): 1647-1656

Oquendo CE, Antonicka H, Shoubbridge EA, Reardon W, Brown GK (2004) Functional and genetic studies demonstrate that mutation in the COX15 gene can cause Leigh syndrome. *J Med Genet* **41**(7): 540-544

Papadopoulou LC, Sue CM, Davidson MM, Tanji K, Nishino I, Sadlock JE, Krishna S, Walker W, Selby J, Glerum DM, Coster RV, Lyon G, Scalais E, Lebel R, Kaplan P, Shanske S, De Vivo DC, Bonilla E, Hirano M, DiMauro S, Schon EA (1999) Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, a COX assembly gene. *Nat Genet* **23**(3): 333-337

Pequignot MO, Dey R, Zeviani M, Tiranti V, Godinot C, Poyau A, Sue C, Di Mauro S, Abitbol M, Marsac C (2001) Mutations in the SURF1 gene associated with Leigh syndrome and cytochrome C oxidase deficiency. *Hum Mutat* **17**(5): 374-381

Pereira MM, Santana M, Teixeira M (2001) A novel scenario for the evolution of haem-copper oxygen reductases. *Biochim Biophys Acta* **1505**(2-3): 185-208

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

Perez-Martinez X, Butler CA, Shingu-Vazquez M, Fox TD (2009) Dual functions of Mss51 couple synthesis of Cox1 to assembly of cytochrome c oxidase in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Mol Biol Cell* **20**(20): 4371-4380

Pierrel F, Bestwick ML, Cobine PA, Khalimonchuk O, Cricco JA, Winge DR (2007) Coa1 links the Mss51 post-translational function to Cox1 cofactor insertion in cytochrome c oxidase assembly. *EMBO J* **26**(20): 4335-4346

Poyton RO, McEwen JE (1996) Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. *Annu Rev Biochem* **65**: 563-607

Reinders J, Zahedi RP, Pfanner N, Meisinger C, Sickmann A (2006) Toward the complete yeast mitochondrial proteome: multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics. *J Proteome Res* **5**(7): 1543-1554

Rich PR, Junemann S, Meunier B (1998) Protonmotive mechanism of heme-copper oxidases. *J Bioenerg Biomembr* **30**(1): 131-138

Rodel G (1986) Two yeast nuclear genes, CBS1 and CBS2, are required for translation of mitochondrial transcripts bearing the 5'-untranslated COB leader. *Curr Genet* **11**(1): 41-45

Shin DH, Yokota H, Kim R, Kim SH (2002) Crystal structure of conserved hypothetical protein Aq1575 from Aquifex aeolicus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(12): 7980-7985

Shingu-Vazquez M, Camacho-Villasana Y, Sandoval-Romero L, Butler CA, Fox TD, Perez-Martinez X (2010) The carboxyl-terminal end of Cox1 is required for feedback-assembly regulation of Cox1 synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *J Biol Chem*

Sickmann A, Reinders J, Wagner Y, Joppich C, Zahedi R, Meyer HE, Schonfisch B, Perschil I, Chacinska A, Guiard B, Rehling P, Pfanner N, Meisinger C (2003) The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(23): 13207-13212

Siep M, van Oosterum K, Neufeglise H, van der Spek H, Grivell LA (2000) Mss51p, a putative translational activator of cytochrome c oxidase subunit-1 (COX1) mRNA, is required for synthesis of Cox1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **37**(4): 213-220

Tavares-Carreón F, Camacho-Villasana Y, Zamudio-Ochoa A, Shingu-Vazquez M, Torres-Larios A, Perez-Martinez X (2008) The pentatricopeptide repeats present in Pet309 are necessary for translation but not for stability of the mitochondrial COX1 mRNA in yeast. *J Biol Chem* **283**(3): 1472-1479

Tiranti V, Hoertnagel K, Carrozzo R, Galimberti C, Munaro M, Granatiero M, Zelante L, Gasparini P, Marzella R, Rocchi M, Bayona-Bafaluy MP, Enriquez JA, Uziel G, Bertini E, Dionisi-Vici C, Franco B, Meitinger T, Zeviani M (1998) Mutations of SURF-1 in Leigh disease associated with cytochrome c oxidase deficiency. *Am J Hum Genet* **63**(6): 1609-1621

Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R, Yoshikawa S (1995) Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* **269**(5227): 1069-1074

Uribe S, Ramirez J, Pena A (1985) Effects of beta-pinene on yeast membrane functions. *J Bacteriol* **161**(3): 1195-1200

Valnot I, Osmond S, Gigarel N, Mehaye B, Amiel J, Cormier-Daire V, Munnich A, Bonnefont JP, Rustin P, Rotig A (2000a) Mutations of the SCO1 gene in mitochondrial cytochrome c oxidase deficiency with neonatal-onset hepatic failure and encephalopathy. *Am J Hum Genet* **67**(5): 1104-1109

Valnot I, von Kleist-Retzow JC, Barrientos A, Gorbatyuk M, Taanman JW, Mehaye B, Rustin P, Tzagoloff A, Munnich A, Rotig A (2000b) A mutation in the human heme A:farnesyltransferase gene (COX10) causes cytochrome c oxidase deficiency. *Hum Mol Genet* **9**(8): 1245-1249

Weraarpachai W, Antonicka H, Sasarman F, Seeger J, Schrank B, Kolesar JE, Lochmuller H, Chevrette M, Kaufman BA, Horvath R, Shoubridge EA (2009) Mutation in TACO1, encoding a translational activator of COX I, results in cytochrome c oxidase deficiency and late-onset Leigh syndrome. *Nat Genet* **41**(7): 833-837

Wikstrom M, Morgan JE, Verkhovsky MI (1998) On the mechanism of proton translocation by respiratory enzyme. *J Bioenerg Biomembr* **30**(1): 139-145

Xu F, Morin C, Mitchell G, Ackerley C, Robinson BH (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 COX III mRNA. *Biochem J* **382**(Pt 1): 331-336

Zara V, Conte L, Trumppower BL (2009) Biogenesis of the yeast cytochrome bc1 complex. *Biochim Biophys Acta* **1793**(1): 89-96

Zhu Z, Yao J, Johns T, Fu K, De Bie I, Macmillan C, Cuthbert AP, Newbold RF, Wang J, Chevrette M, Brown GK, Brown RM, Shoubridge EA (1998) SURF1, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase, is mutated in Leigh syndrome. *Nat Genet* **20**(4): 337-343