



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

Nuevas señales de biogénesis mitocondrial: *OXA1* y su mRNA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

P R E S E N T A
MANUEL ALEJANDRO SEMÁN SENDEROS

TUTORA:
Dra. María Soledad Funes Argüello



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

A mis padres, por su incondicional amor y apoyo

The woods are lovely, dark, and deep,
But I have promises to keep,
And miles to go before I sleep,
And miles to go before I sleep.

Robert Frost

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. María Soledad Funes Argüello en el laboratorio 204 Sur del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Este trabajo constituye parte del proyecto de investigación apoyado por el donativo 105631 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), así como por el donativo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA, UNAM) con número IN215810.

Agradezco a la Dra. Fabiola Jaimes Miranda por la ayuda técnica brindada y por su valiosa participación en este trabajo.

A los laboratorios de los Dres. Diego González Halphen, Bertha González Pedrajo y Xóchitl Pérez Martínez, en particular a sus técnicos académicos, Q.B.P. Miriam Vázquez Acevedo, Dra. Norma Espinosa Sánchez y Dra. Yolanda Camacho Villasana por su apoyo y ayuda técnica brindada durante la realización de este proyecto.

A la Dra. Laura Ongay Larios, a la Biól. Guadalupe Códiz Huerta y a la M. en C. Minerva Mora Cabrera miembros de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, por el apoyo técnico brindado.

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

A la Lic. Cynthia Lima Cruz la ayuda administrativa brindada durante la licenciatura.

A los miembros del jurado, Dra. Xóchitl Pérez Martínez, Dr. Luis Servín González, Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez y Dr. Roberto José Rafael Hernández Fernández por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis y por sus valiosos comentarios y sugerencias al trabajo.

Agradecimientos

A mi Padre por siempre predicar con el ejemplo y enseñarme que solo con trabajo se alcanza el éxito.

A mi Madre por guiarme a través de mi vida siempre con una sonrisa.

A mi hermana Sofía por recordarme que la vida no debe de ser complicada.

A mi abuela Doris por su contagiosa alegría.

A mi teita Sonia por enseñarme que la familia es primero.

A mis dos abuelas por consentirme a lo largo de mi vida y por las lecciones de cocina.

A mi tío Jorge Amín y mi tía Sonia por su cariño y continuo interés en mi desarrollo.

A mi tía Doris y mi tío Fernando por sus constantes atenciones.

A mi tía Pily por su amor maternal.

A mi tía Grissel por todos sus detalles a pesar de la distancia.

A mis primos, por las incontables experiencias que hemos compartido.

A la flota por enseñarme, entre muchas otras cosas, que los hermanos no solo son consanguíneos.

A Silvana, Diana y Mariana por su amistad y consejos.

A todos los profesores que han formado parte integral de mi formación. Por el tiempo y esfuerzo dedicado al desarrollo de sus alumnos.

A mis profesores de la preparatoria por estimular mi curiosidad y saber encaminarme. Siempre les estaré en deuda.

En especial al Biol. Baldo Altube Moreno, Q.F.B. Guillermo González Villamar, Q. David Antonio Vázquez Lynn, Biol. Enrique David Tovar Osorio, Dr. Raúl Barrera Rodríguez y el I.Q. José Vicente Ortiz.

A mis profesores de la carrera por su interés en formar pensadores críticos y enseñarme que ser un científico implica mucho más que pipetear.

En particular al Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco, Dr. Antonio Peña Díaz, Dr. Jesús Adolfo García-Sainz, Dr. Alejandro Zentella Dehesa, Dr. Raúl Aguilar Roblero,

Dra. Patricia Ramos Morales, Dr. Arturo Carlos II Becerra Bracho y al Dr. Félix Recillas Targa.

A la Lic. Cynthia Lima Cruz por su amistad y el servicio invaluable que presta a la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica.

A la Dra. Soledad Funes por creer en mí. Gracias por ser accesible pero estricta cuando la ocasión lo requería, por poner la integridad personal y científica por encima de todo lo demás.

A la Dra. Fabiola Jaimes por su infinita paciencia y amabilidad conmigo.

A mis compañeros en el 204 Sur, José Luis, Carlos, Itzel, Roberto y Dominique por hacer que los buenos momentos fueran mejores y los malos pasaderos.

Índice

1. Resumen	9
2. Introducción	10
2.1 <i>Distribución de proteínas en la célula eucarionte</i>	10
2.2 <i>La mitocondria y su sistema de importación</i>	11
2.2.1 <i>Importación y distribución de proteínas en la mitocondria</i>	12
2.2.2 <i>Complejos de translocación e inserción mitocondrial</i>	13
2.2.3 <i>Visión cotraduccional de la importación mitocondrial</i>	15
2.3 <i>La levadura Saccharomyces cerevisiae como modelo de estudio de la función mitocondrial</i>	18
3. Planteamiento del problema	20
4. Hipótesis	21
5. Objetivo	22
5.1 <i>Objetivos Particulares</i>	22
6. Materiales y Métodos	23
7. Resultados	35
7.1 <i>Construcción de mutantes del gen OXA1</i>	36
7.2 <i>El 3'UTR y MTS regulan la biogénesis de Oxa1</i>	40
7.3 <i>La sobreexpresión alivia los efectos de la alteración del 3'UTR y MTS</i>	43
7.4 <i>El rol del 3'UTR y MTS es independiente de la transcripción</i>	45
7.5 <i>Puf3 no cumple con los requerimientos de un regulador de la importación cotraduccional</i>	46
7.6 <i>Obtención y verificación de mutantes</i>	49
8. Discusión	51
9. Conclusiones	58
10. Perspectivas	59
11. Apéndices	60
11.1 <i>Lista de los mRNAs descritos en la figura 11C</i>	61
11.2 <i>Oligonucleótidos</i>	71
11.3 <i>Medios de Cultivo</i>	74
11.4 <i>Soluciones</i>	76
12. <i>Referencias</i>	88

Abreviaturas

3'UTR	Región no traducida en el 3' de un mRNA, de las siglas en inglés "3' Untranslated Region"
5'UTR	Región no traducida en el 5' de un mRNA, de las siglas en inglés "5' Untranslated Region"
DNA	Ácido desoxiribonucleico, de las siglas en inglés "Deoxyribonucleic Acid"
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético, de las siglas en inglés "Ethylenediaminetetraacetic Acid"
GFP	Proteína verde fluorescente, de las siglas en inglés "Green Fluorescent Protein"
MTS	Señal de localización mitocondrial o presecuencia, de las siglas en inglés "Mitochondrial Targeting Sequence"
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero, de las siglas en inglés "messenger Ribonucleic Acid"
ORF	Marco de lectura abierto, de las siglas en inglés "Open Reading Frame"
OXPHOS	Conjunto de complejos involucrados con la fosforilación oxidativa (I a V mitocondriales).
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo, de las siglas en inglés "Phenylmethylsulfonyl fluoride"
RNA	Ácido ribonucleico, de las siglas en inglés "Ribonucleic Acid"
SDS	Dodecil sulfato de sodio, de las siglas en inglés "Sodium Dodecyl Sulfate"
TIM	Translocasa de la membrana interna, de las siglas en inglés "Translocase of the Inner Membrane"
TOM	Translocasa de la membrana externa, de las siglas en inglés "Translocase of the Outer Membrane"
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
WT	Cepa silvestre, de las siglas en inglés "Wild Type"

Resumen

La principal característica de una célula eucarionte es la presencia de organelos, compartimentos intracelulares delimitados por una membrana lipídica, lo cual genera distintos microambientes bioquímicos dentro de una sola célula y de esta manera el metabolismo y otras funciones celulares también se encuentran segregadas dentro de la misma. La identidad de cada organelo depende principalmente de su composición proteica por lo que la distribución y translocación correcta de estas proteínas es una función esencial. Señales que se encuentran en la estructura primaria de la proteína usualmente dirigen su localización mediante interacciones con complejos del organelo blanco; por lo que se ha observado previamente que la proteína tiene que estar parcial o completamente sintetizada para poder ser reconocida. Sin embargo, estudios de microscopía de fluorescencia han revelado que no solo las proteínas muestran localizaciones diferenciales sino también en muchos casos los transcritos que las codifican; esto sugiere que la traducción del mRNA y la consecuente importación al organelo pudieran estar acopladas.

En el caso particular de la mitocondria se ha propuesto un modelo postraduccional de localización, a partir de experimentos desarrollados en un sistema *in vitro* en el que las mitocondrias son capaces de importar proteínas completamente sintetizadas en ausencia de ribosomas. A pesar de que este modelo es ampliamente aceptado, el hecho de que haya proteínas que no se importan de manera eficiente en el sistema *in vitro* indica que puede haber vías alternativas. En particular la asociación de polisomas con la membrana externa mitocondrial, el enriquecimiento de mRNAs que codifican para proteína mitocondriales en estos y la incapacidad de detectar proteínas mitocondriales en el citosol, apoyan la idea de importación cotraduccional. Los eventos de esta vía permanecen en su mayoría inexplorados, pero se han propuesto a chaperonas, complejos mitocondriales y a la región 3' no traducida de los RNA mensajeros, como responsables de localizar a la maquinaria traduccional.

Aunque la vía cotraduccional cuenta con evidencia citológica y bioquímica, su relevancia fisiológica permanece sin evaluarse. El objetivo del presente trabajo fue analizar el fenotipo de levaduras en las que se eliminó el 3'UTR u otras porciones del mRNA, para simular una eliminación de la vía cotraduccional.

Nuestros resultados sugieren que efectivamente no sólo existen señales en las proteínas mitocondriales sino en sus mRNAs que de manera indirecta apoya un modelo de importación y traducción simultáneos en la mitocondria.

Introducción

1. Distribución de proteínas en la célula eucarionte

La principal innovación evolutiva de las células eucariontes es la presencia de organelos, sistemas membranales que permiten la creación de microambientes bioquímicamente distintos. Estos ambientes a su vez favorecen reacciones específicas haciendo que las funciones celulares se segreguen a estos espacios. El funcionamiento de una célula eucarionte, por lo tanto, depende de su capacidad para distribuir correctamente las proteínas características a cada organelo. Esta distribución incluye el reconocimiento y posterior reclutamiento de cada grupo de proteínas por parte de los complejos de importación de los distintos compartimentos celulares.

Las señales que permiten este reconocimiento se encuentran en la proteína, pueden ser dependientes de secuencia o estructura y han sido caracterizadas para varios de los organelos celulares. Algunos ejemplos de esto son el péptido señal para proteínas de la vía de secreción, la presecuencia de proteínas mitocondriales y la señal de localización nuclear (Alberts, 2008). A pesar de que estas señales comparten algunas características, los mecanismos por lo cuales dirigen proteínas a su respectivo organelo son distintas:

1. Vía cotraduccional: la traducción del RNA mensajero (mRNA) y la importación de la proteína están acopladas.

El ejemplo mejor caracterizado es la vía de translocación de proteínas al retículo endoplásmico. Estudios en levaduras y células de mamífero han revelado que la traducción de estas proteínas inicia en el citosol pero en cuanto se expone el péptido señal, éste es reconocido por SRP (por las siglas en inglés de *Signal Recognition Particle*) que detiene la traducción y se dirige a la membrana del retículo endoplásmico en donde es reconocido por su receptor (SRP-R). Esta interacción facilita que el complejo traduccionalmente activo libre de SRP se

deposite sobre la translocasa Sec61 restableciendo la traducción e iniciando la importación (Blobel, 1999; Cross et al., 2009).

2. Vía postraduccional: Las proteínas se sintetizan por completo en el citosol donde se asocian con chaperonas que las mantienen parcialmente desplegadas hasta ser reconocidas por la maquinaria de importación del organelo. Este caso ha sido descrito para peroxisomas, cloroplastos y mitocondrias (ver sección 2 para más detalles).

Por otra parte, aunque las señales en las proteínas son las mejor caracterizadas, también existen señales en los mRNAs que los localizan ya sea a la superficie de un organelo o a porciones específicas del citoplasma. Este mecanismo está altamente conservado tanto en procariontes como en eucariontes y se ha propuesto favorece una regulación mas precisa de la síntesis proteica, por ejemplo, que ocurra solo en una región celular determinada creando gradientes o en respuesta a un estímulo (St Johnston, 2005; Müller et al., 2006; Nevo-Dinur et al., 2011).

Las señales de los RNA mensajeros han sido delimitadas a la secuencia como en el caso de la región 3' no traducida (3'UTR) y el elemento rico en AU (ARE) o a la formación de estructuras secundarias como los "G-quadruplex" y se han relacionado con procesos como la direccionalidad a las proyecciones neuronales y el desarrollo en animales, además de la biogénesis de organelos como el retículo endoplásmico, los peroxisomas y la mitocondria (Marc et al., 2002; St Johnston, 2005; Loya et al., 2008; Holt y Bullock, 2009; Zipor et al., 2009; Subramanian et al., 2011; Beisang y Bohjanen, 2012).

2. La mitocondria y su sistema de importación

La mitocondria es un organelo celular presente en la gran mayoría de los eucariontes, donde lleva a cabo una gran variedad de procesos entre los que se destacan el metabolismo de aminoácidos, lípidos y centros hierro-azufre y la fosforilación oxidativa (Alberts, 2008).

Se caracterizan por la presencia de dos membranas, interna y externa, que separan dos compartimentos acuosos, la matriz al interior y el espacio intermembranal. La membrana externa es permeable a moléculas de menos de 5 kDa mientras que la interna es permeable casi exclusivamente a iones. Además de estas diferencias las funciones del organelo también están segregadas. En la matriz se lleva a cabo la β -oxidación de lípidos, el ciclo de la urea y el ciclo de Krebs mientras que en la membrana interna se encuentran los complejos responsables de la respiración celular (OXPHOS). Ya que esto requiere de proteínas únicas para cada espacio la vía de importación de proteínas a la mitocondria es una de las más complejas.

2.1 Importación y distribución de proteínas en la mitocondria

Una gran cantidad de estudios en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, han permitido identificar secuencias que dirigen a la mitocondria de manera postraduccional proteínas sintetizadas en el citosol. De éstas, conocemos dos grupos generales (Revisado en Herrmann y Hell, 2005; Chacinska et al., 2009; Schmidt et al., 2010):

1. Presecuencia o MTS: forman una α -hélice anfipática en el extremo amino terminal (N-terminal) de la proteína y después de ser importadas se editan por una proteasa mitocondrial.
2. Señales internas: secuencias lineales dentro de la proteína que no son editadas en el organelo.

La mayor fortaleza de este modelo de importación es la capacidad de reproducirlo *in vitro* utilizando mitocondrias aisladas y proteínas purificadas. De esta manera se han identificado una gran cantidad de complejos y condiciones necesarias para que este proceso se lleve a cabo, pues el sistema es fácilmente manipulable y al utilizar un modelo experimental como *S. cerevisiae* es posible purificar mitocondrias de un gran número de mutantes (Hay et al., 1984).

2.2 Complejos de translocación e inserción mitocondrial

La translocasa de la membrana externa TOM, es un complejo multimérico cuya función es reconocer e importar casi todas las proteínas que van a formar parte de la mitocondria. El reconocimiento de los precursores desplegados está mediado por las subunidades Tom20 y Tom70, mientras que el poro por el que atraviesan la membrana externa está conformado por la subunidad Tom40 (van Wilpe et al., 1999; Saitoh et al., 2007; Model et al., 2008).

Una vez que han entrado a la mitocondria, las proteínas se asocian con distintos complejos que translocan, retienen o insertan las proteínas dependiendo de su destino final. Estos procesos son dependientes de un segundo grupo de señales dentro de cada proteína.

Algunos ejemplos de estas señales se han caracterizado para proteínas de la membrana externa, como la señal β para proteínas con múltiples cruces transmembranales; y del espacio intermembranal, donde presentan presecuencias bipartitas que requieren de su inserción en la membrana interna y de un posterior procesamiento para ser liberadas como proteínas solubles; o de la oxidación de cisteínas para permanecer en este espacio (Hartl et al., 1987; Milenkovic et al., 2007; Kutik et al., 2008).

Los complejos involucrados en la distribución de proteínas mitocondriales identificados hasta la fecha son (Figura 1):

Subcompartimento	Complejo	Ejemplo de sustratos
Membrana Externa	SAM	Porina
Espacio Intermembranal	MIA40	Factor de ensamblaje de la oxidasa Cox17
Membrana Interna	TIM22	Transportador ATP/ADP
	TIM23	Subunidad 4 de la citocromo <i>c</i> oxidasa
Matriz	TIM23	Fumarasa

Sin embargo, no todas las proteínas mitocondriales están codificadas en el núcleo, un pequeño porcentaje es producto del genoma mitocondrial. En el genoma mitocondrial de *S. cerevisiae* se codifican ocho proteínas, siete de las cuales son proteínas membranales subunidades de los complejos OXPHOS. Estas proteínas membranales se sintetizan en la matriz y se insertan de manera cotraduccional utilizando a una proteína que se conoce como Oxa1, quien gracias a su extremo C-terminal une al ribosoma mitocondrial facilitando la inserción de las proteínas nacientes (Bauer et al., 1994; He y Fox, 1997; Hell et al., 1997).

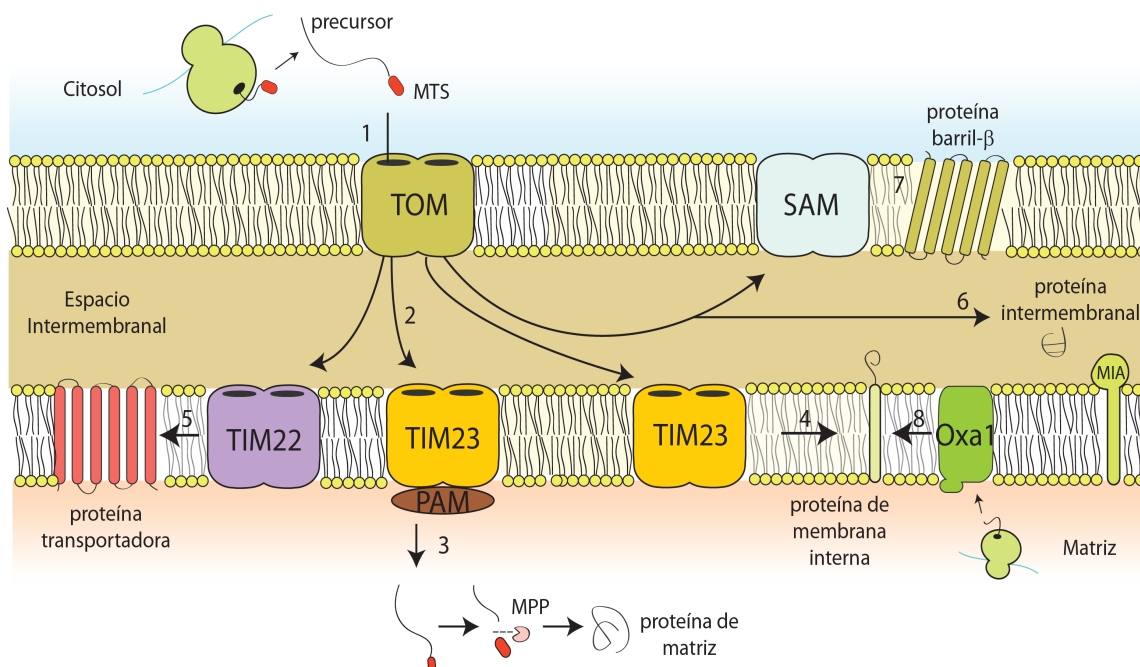


Figura 1. Vías de importación y distribución de proteínas mitocondriales. Las proteínas que se sintetizan por ribosomas citosólicos entran a la mitocondria a través del complejo de la translocasa de la membrana externa (TOM, paso 1), y dependiendo del compartimento en el cual residen y su topología final, son translocados e insertados a la membrana por distintos complejos. Uno de los complejos de translocasas de la membrana interna, TIM23, se encarga de transportar proteínas a la matriz con ayuda del motor de importación PAM (paso 2 y 3) y de insertar proteínas de un solo cruce transmembranal a la membrana interna (paso 4). El complejo TIM22 inserta proteínas de múltiples cruces transmembranales a la membrana interna (paso 5). Las proteínas residentes del espacio intermembranal interaccionan con Mia, el cambio conformacional que resulta permite que la proteína permanezca en este espacio (paso 6). El complejo SAM participa en el ensamblaje de las proteínas barril β de la membrana externa (paso 7). Las proteínas codificadas en el genoma mitocondrial residentes de la membrana interna son insertadas por la acción de Oxa1 (paso 8). Ver detalles en el texto.

2.3 Visión cotraduccional de la importación mitocondrial

A pesar de la robustez del modelo postraduccional, existe evidencia que indica que al menos para un grupo de proteínas mitocondriales la traducción e importación son procesos acoplados (Revisado en Ahmed y Fisher, 2009).

Esto se basa en las siguientes observaciones:

1. La asociación de polisomas traduccionalmente activos, y cargados con mRNAs que codifican para proteínas mitocondriales, con la membrana externa mitocondrial (Figura 2, Kellems y Butow, 1974; Kellems et al., 1975).
2. El enriquecimiento selectivo de algunos RNA mensajeros en los polisomas asociados a la mitocondria y no en polisomas libres (Suissa y Schatz, 1982).
3. La localización perimitocondrial de alrededor del 20% de los transcritos que codifican para proteínas mitocondriales (Marc et al., 2002; Garcia et al., 2007; Gadir et al., 2011).
4. El incremento en la eficiencia de importación de una proteína *in vitro* si se lleva a cabo la traducción del RNA mensajero correspondiente (Fujiki y Verner, 1991).
5. El hecho de que proteínas como Fum1 o Tim50 no se puedan importar eficientemente en un sistema de importación *in vitro* (Knox et al., 1998; Funes S, datos no publicados).

A pesar de que todos estos resultados apuntan hacia la existencia de la vía cotraduccional, no se ha propuesto hasta ahora, el sistema que relacione la localización de los RNA mensajeros, los polisomas y el sistema de importación.

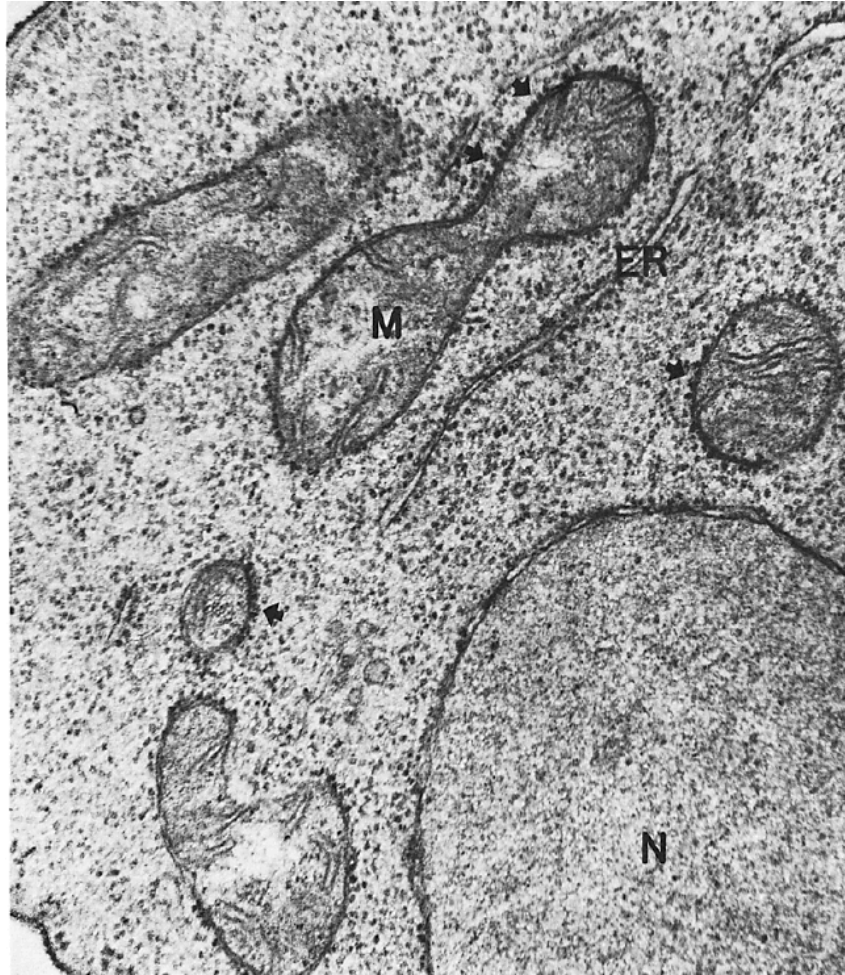


Figura 2. Asociación de polisomas con la membrana externa mitocondrial *in vivo*. Fotografía de microscopía de transmisión electrónica de un corte de levadura. Las partículas electrodensas, ribosomas, asociadas a la membrana externa mitocondrial se indican con las flechas negras . N, núcleo; ER, retículo endoplásmico; M, mitocondria. Modificada de Kellems et al. (1975).

Sobre los RNA mensajeros sabemos que su localización es dependiente de la región 3' no traducida (3'UTR, Marc et al., 2002; Gadir et al., 2011) sin embargo quién interacciona con ellos en la superficie mitocondrial sigue sin conocerse. En el caso particular del mRNA de *ATP2* se han identificado dos secuencias que parecen ser relevantes para la localización de éste mensajero en particular, sin embargo no hay una correlación entre la presencia de las secuencias y la localización de otros mensajeros en la superficie mitocondrial (Margeot et al., 2002, Liu y Liu, 2007).

Uno de los candidatos más interesantes para ser el receptor de los mRNAs en la membrana externa mitocondrial es Puf3, una proteína de unión a RNA de la familia PUF

y cuyos blancos preferencialmente codifican para proteínas mitocondriales (Figura 3, Gerber et al., 2004; Garcia-Rodriguez et al., 2007). El rol canónico de esta proteína es la represión traduccional de mRNAs mediante la unión a la secuencia consenso (UGUA) contenida en el 3'UTR y el reclutamiento de complejos de desadenilación como CCR4-Not (Wickens et al., 2002).

A pesar de esto, a Puf3 se le ha propuesto como un posible receptor porque su eliminación provoca que mRNAs previamente localizados difundan en el citosol (Saint-Georges et al., 2008; Eliyahu et al., 2009). Eliminar al receptor Tom20 (Eliyahu et al., 2009) o la chaperona Ssa1 (Eliyahu et al., 2012) resulta en el mismo comportamiento por lo que también se han propuesto como candidatos, aunque en estos casos no es evidente cómo participan en la localización de los mRNAs.

Por otra parte, tampoco se sabe si existen factores citosólicos que recluten al ribosoma, aunque se ha relacionado a la chaperona de proteínas nacientes NAC con este proceso (Yogev et al., 2007).

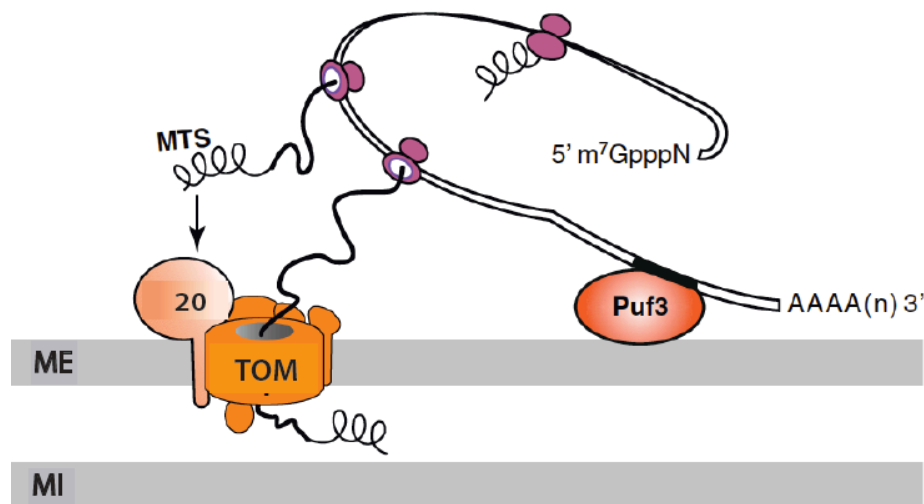


Figura 3. Modelo de acción de Puf3 en la vía cotraduccional de importación de proteínas a la mitocondria. Puf3 se asocia con la membrana externa mitocondrial donde funciona como el receptor de los mRNAs localizados a la mitocondria, estos mensajeros son traducidos por ribosomas (violeta). La síntesis del MTS favorece el reconocimiento por el receptor del complejo TOM (20), y la posterior translocación de la proteína. Modificado de Quenault et al. (2011).

3. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudio de la función mitocondrial

La levadura *S. cerevisiae* es un organismo unicelular que presenta varias ventajas para estudiar procesos básicos de las células eucariontes (Figura 4), entre ellos se encuentra que es de fácil mantenimiento, crecimiento rápido y su manipulación genética es de alta eficiencia (Revisado en Diekert et al 2002).

Además, es un organismo aerobio facultativo lo cual permite mutar genes involucrados en la utilización de fuentes no fermentables de carbono, sin comprometer la viabilidad del organismo, por lo que es una herramienta única para entender la biología mitocondrial.

Su tradición como organismo modelo ha llevado a la generación de un gran número de recursos:

- a. Su genoma nuclear y mitocondrial se encuentran completamente secuenciados (Mewes et al., 1997; Foury et al., 1998).
- b. Se conoce la composición proteica mitocondrial (Sickmann et al., 2003).
- c. Se cuenta con colecciones de mutantes que cubren ~80% de los marcos de lectura abiertos (ORFs) en el genoma (Giaever et al., 2002).

Por las características mencionadas se decidió utilizar a la levadura para nuestro estudio.

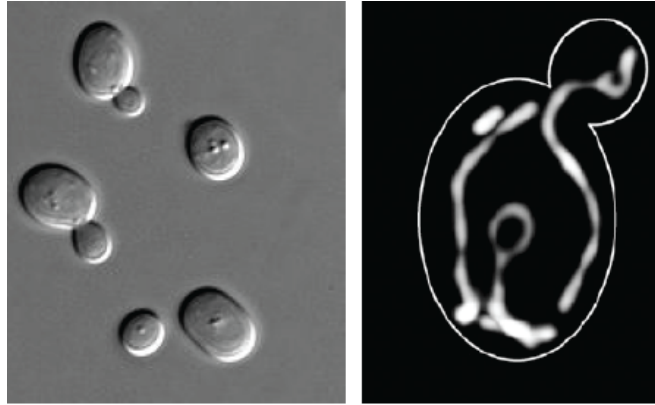


Figura 4. La levadura *S. cerevisiae*. Panel izquierdo, fotografía de microscopía de interferencia diferencial de un grupo de levaduras. Panel derecho, fotografía por microscopía de fluorescencia de una levadura. La red mitocondrial es revelada por la expresión de una versión de GFP dirigida a la mitocondria. La forma del organismo esta delineada por la línea blanca. Tomado de Garcia-Rodriguez et al. (2007).

Planteamiento del Problema

Actualmente no se ha definido el papel fisiológico de la vía cotraduccional de importación de proteínas a la mitocondria, posiblemente debido a la falta de información (ambigüedad) sobre qué factores constituyen a dicho sistema. En particular, no está claro si la localización de los mRNAs a la cercanía de la mitocondria es un paso necesario para esta vía y aunque conocemos la dependencia de la localización del 3'UTR no hay estudios que reflejen si esta secuencia es importante para la importación de proteínas mitocondriales. Creemos que las señales contenidas en el mRNA (específicamente el 3'UTR) dirigen su localización mitocondrial, favoreciendo el reclutamiento de ribosomas activos y por lo tanto la importación cotraduccional.

En este trabajo hemos desarrollado un sistema *in vivo* que nos permite abordar el problema desde una perspectiva integrativa a partir de la cual podremos confirmar el efecto del 3'UTR sobre la fisiología celular y determinar en qué paso de la biogénesis de proteínas mitocondriales el 3'UTR ejerce su efecto. Esperamos también que este trabajo nos permita sentar las bases para identificar los componentes proteicos que modulan la acción del 3'UTR durante la importación de proteínas a la mitocondria.

Hipótesis

Alterar la secuencia del mRNA de *OXA1*, resultará en una alteración en la biogénesis de la proteína, lo que a su vez perturbará la adecuación de la levadura *S. cerevisiae*. Esta alteración será la misma al eliminar los elementos en el mRNA o las proteínas responsables de interpretar la información contenida en el transcrito.

Objetivo general

Desarrollar un sistema *in vivo* que nos permita entender el rol del 3'UTR sobre la fisiología celular, con el fin de tratar de esclarecer los mecanismos de la vía cotraduccional.

Objetivos particulares

1. Generar construcciones con diferentes alteraciones del mRNA de *OXA1* y evaluar su efecto sobre la biogénesis de Oxa1.
2. Determinar si las alteraciones en el mRNA producen inestabilidad de la molécula, disminución en su traducción o en la capacidad de importación de la proteína codificada por éste.
3. Analizar si Puf3 es el receptor de los mRNAs que codifican para proteínas mitocondriales.

Materiales y Métodos

a. *Escherichia coli*

a.i Cepas y condiciones de crecimiento

La cepa DH5 α (Invitrogen) de *E. coli* se utilizó para todos los experimentos de clonación.

Los cultivos se realizaron en medio Luria-Bertani (LB) o LB-Ampicilina (apéndice III) a 37°C y en agitación a 250 rpm para cultivos líquidos.

a.ii Transformación

Células competentes de la cepa DH5 α fueron preparadas de manera estándar (Hanahan, 1983) utilizando los siguientes amortiguadores de transformación:

Amortiguador de transformación I

Acetato de potasio	30 mM
Cloruro de manganeso (MgCl ₂)	50 mM
Cloruro de rubidio (RbCl)	100 mM
Cloruro de calcio (CaCl ₂)	10 mM
Glicerol	12% (v/v)

Amortiguador de transformación II

MOPS pH 7.0	10 mM
Cloruro de calcio (CaCl ₂)	75 mM
Cloruro de rubidio (RbCl)	10 mM
Glicerol	12% (v/v)

Estas células se utilizaron para transformar por choque térmico, 90 segundos a 42°C.

a.iii Extracción de DNA extracromosomal

Células de un cultivo crecido por 16 horas en LB-ampicilina (1 mL) se colectaron por centrifugación (8609 x g, 5 minutos) y se les lavó con agua desionizada.

La extracción se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente protocolo:

1. Resuspender el botón celular con 50 μ L de agua, 300 μ L de amortiguador TENS (apéndice IV.i)

2. Agitar vigorosamente
3. Agregar 150 μ L de acetato de sodio 3 M pH 4.9
4. Centrifugar a 20879 x g por 20 minutos a 4°C
5. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo
6. Agregar 900 μ L de etanol 96%
7. Centrifugar a 20879 x g por 15 minutos a 4°C
8. Eliminar el sobrenadante
9. Lavar el botón con 250 μ L de etanol 70%
10. Centrifugar a 20879 x g por 15 minutos a 4°C
11. Eliminar el sobrenadante
12. Centrifugar a 8609 x g por 30 segundos a temperatura ambiente
13. Quitar el excedente de etanol y dejar secar los botones
14. Resuspender en 100 μ L de agua desionizada

Para realizar extracciones de mayor volumen se utilizó el kit *PureYield Plasmid Midiprep System* de Promega siguiendo las instrucciones del proveedor.

b. *Saccharomyces cerevisiae*

b.i Cepas y condiciones de crecimiento

Las cepas utilizadas en este trabajo y su genotipo se describen en la siguiente tabla:

Nombre	Genotipo	Cepa de origen	Referencia
BY4741	Mat a <i>his3</i> Δ 1 <i>leu2</i> Δ 0 <i>met15</i> Δ 0 <i>ura3</i> Δ 0	S288C	ATCC#: 201388 (Brachmann et al., 1998)
W303-1A	Mat a <i>leu2-2,112</i> <i>trp1-1 can1-100</i> <i>ura3-1 ade2-1 his3-11,15</i>	-	ATCC#: 208352 (Thomas y Rothstein, 1989)
XPM11 ρ^0	Mat α <i>lys2 leu2-3,</i> <i>arg8::hisG ura3-52</i> [ρ^0]	XPM11	Pérez-Martínez X.
Δ <i>oxa1</i>	Mat a <i>his3</i> Δ 1 <i>leu2</i> Δ 0 <i>met15</i> Δ 0 <i>ura3</i> Δ 0 <i>Δoxa1::hph</i>	BY4741	Este estudio
Δ <i>puf3</i>	Mat a <i>his3</i> Δ 1 <i>leu2</i> Δ 0 <i>met15</i> Δ 0 <i>ura3</i> Δ 0 <i>Δpuf3::KanMX</i>	BY4741	(Giaever et al., 2002)

<i>Δoxa1</i> <i>Δpuf3</i>	Mat a <i>his3Δ1 leu2Δ0</i> <i>met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>Δoxa1::hph</i> <i>Δpuf3::KanMX</i>	BY4741	Este estudio
NB40-3C ρ^0	Mat a <i>lys2 leu2-3,112</i> <i>ura3-52 his3ΔHindIII</i> <i>arg8::hisG [ρ^0]</i>	D273- 10B	(Bonnefoy y Fox, 2000)

Todos los cultivos se realizaron en los medios descritos en el apéndice III (YPD, YPGE y SD) a 30°C, excepto donde fue indicado, y en agitación a 250 rpm para cultivos líquidos.

b.ii Ensayos de crecimiento

Las cepas se crecieron en medio líquido hasta obtener una densidad óptica por mililitro (O.D._{600nm}/mL) cercana a 1.0, se tomó 1 mL y las células fueron colectadas por centrifugación (8609 x g, 2 minutos) y lavadas con agua desionizada. El volumen se ajustó de acuerdo con la O.D._{600nm}/mL de cada cultivo de manera que siempre se tomara el mismo número de células.

Posteriormente se realizaron diluciones seriadas en agua desionizada, la primera 1:2 (para obtener una O.D._{600nm} de 0.5) a partir de la cual se realizaron cuatro 1:10 consecutivas. Se tomaron 3 μ L de cada dilución y se depositaron en placas de medio sólido.

Las placas se incubaron por dos días para medio fermentativo y tres días para medio respiratorio, después de los cuales las cajas se escanearon para su posterior análisis.

b.iii Transformación

Las cepas se crecieron en medio líquido hasta obtener una O.D._{600nm}/mL cercana a 1.0, se tomaron 1.5 mL y las células fueron colectadas por centrifugación (8609 x g, 2 minutos) y lavadas con agua desionizada.

Posteriormente se les incubó en la solución de transformación por 45 minutos a 42°C, fueron colectadas nuevamente por centrifugación y resuspendidas en 100 μ L de agua desionizada estéril.

Se les sembró en medio de selección ya fuera inmediatamente después de haber transformado con plásmidos o después de haber crecido en medio no selectivo durante 12 horas cuando se realizó una deleción (Gietz y Woods, 2002).

Los antibióticos utilizados para seleccionar mutantes se detallan en la siguiente tabla:

Antibiótico	Concentración por placa
Higromicina B (Invitrogen)	200 µg/mL
G418 (Sigma)	400 µg/mL

Solución de transformación

Polietilenglicol 3500 (PEG)	33.3% (p/v)
Acetato de litio	0.1 M
DNA de esperma de salmón fragmentado por sonicación	100 mg
DNA de interés (plásmido o producto de PCR)	1-1.5 mg

Volumen final: 360 µL

b.iv Extracción de DNA genómico

Las cepas se crecieron en medio líquido por 16 horas, se tomaron 1.5 mL, fueron colectadas por centrifugación (8609 x g, 2 minutos) y lavadas con agua desionizada.

La extracción se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente protocolo (Amberg et al., 2005) :

1. Resuspender el botón celular en 200 µL de amortiguador de lisis (apéndice IV.i)
2. Agregar 200 µL de una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1)
3. Agitar vigorosamente por 3 minutos
4. Centrifugar a 13200 x g por 5 minutos a temperatura ambiente
5. Transferir la fase acuosa a otro tubo
6. Agregar un décimo del volumen de acetato de sodio 3 M pH 4.9 y 3 volúmenes de etanol 96%
7. Incubar por 2 horas a -20°C
8. Centrifugar a 13200 x g por 10 minutos a 4°C
9. Eliminar el sobrenadante
10. Resuspender el botón con 1 mL de etanol 70%
11. Centrifugar a 13200 x g por 1 minuto a 4°C
12. Quitar el excedente de etanol y dejar secar los botones
13. Resuspender en 50 µL de agua desionizada

b.v Extracción de RNA total

Las cepas se crecieron en medio líquido hasta obtener una O.D._{600nm}/mL cercana a 2.0, y se tomó el volumen necesario para que al colectar las células por centrifugación (16873 x g, 5 minutos) se obtuvieran 20 mg de peso húmedo.

El botón celular se congeló en nitrógeno líquido y se molió utilizando un mortero, el homogenado resultante se utilizó para extraer RNA con el reactivo *Trizol* (Ambion) de acuerdo con las especificaciones del proveedor.

La concentración de las muestras se obtuvo utilizando un espectrofotómetro *Nanodrop* (Thermo Scientific).

b.vi Extracción de proteínas

Las cepas se crecieron en medio líquido hasta obtener una O.D._{600nm}/mL cercana a 2.0, se tomaron 2 mL y las células fueron colectadas por centrifugación (8609 x g, 2 minutos) y lavadas con agua desionizada.

La extracción se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente protocolo:

1. Resuspender el botón celular en 250 μ L de Tris 50 mM pH 8.0
2. Agregar 50 μ L de solución de *Rödel* (apéndice IV.iii)
3. Incubar por 10 minutos en hielo
4. Agregar 100 μ L de ácido tricloroacético 72%
5. Incubar por 2 horas a -20°C
6. Centrifugar a 18188 x g por 30 minutos a 4°C
7. Eliminar el sobrenadante
8. Lavar el botón con 1 mL de acetona fría (-20 °C)
9. Centrifugar a 18188 x g por 30 minutos a 4°C
10. Eliminar el sobrenadante
11. Centrifugar a 8609 x g por 30 segundos a temperatura ambiente
12. Quitar el excedente de acetona y dejar secar los botones
13. Resuspender en 100 μ L de amortiguador de carga LAE (apéndice IV.iii)

c. DNA

c.i Electroforesis de DNA

La separación por tamaño de DNA se llevó a cabo en geles de agarosa al 1.5% (p/v) corridos en un cámara de electroforesis horizontal con amortiguador de carga TAE (apéndice IV.i) a 100 V.

Para revelar la presencia de DNA en el gel junto con la muestra y el amortiguador de carga se agregó el intercalante *Gel Red* (Biotium).

c.ii Purificación de DNA a partir de un gel de agarosa

El DNA contenido en un gel de agarosa se purificó de acuerdo con las especificaciones del sistema *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega).

c.iii PCR (Polimerasa: *Taq*)

Las reacciones de PCR para verificar mutantes y amplificar módulos de resistencia se realizaron bajo el siguiente esquema:

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Número de ciclos
Desnaturalización inicial*	94	5	1
Desnaturalización	94	1	35
Alineamiento	Tm-5**	1:30	
Extensión	72	1 por kilobase de producto esperado	
Extensión final	72	8	1

*En el caso de que la fuente de DNA templado fueran células enteras, se agregó un paso inicial en el que se lisaron las células al incubar por 10 min a 94°C.

** La temperatura de alineamiento se calculó tomando la Tm teórica superior del par de oligonucleótidos y restándole 5 grados.

La mezcla de reacción fue la siguiente:

<i>Taq</i> polimerasa (Fermentas)	1.5 unidades
<i>Buffer Taq</i> (Fermentas)	1X
MgCl ₂ (Fermentas)	2 mM
Desoxiribonucleótidos trifosfatados (Fermentas)	0.4 mM
Oligonucleótidos	1mM cada uno
DNA templado	10-250 ng

c.iv PCR (Polimerasa: *Phusion*)

Las reacciones de PCR para amplificar genes de interés se realizaron bajo el siguiente esquema:

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (segundos)	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	98	10	1
Desnaturalización	98	1	30
Alineamiento	T _m -3*	10	
Extensión	72	30 por kilobase de producto esperado	
Extensión final	72	60	1

* La temperatura de alineamiento se calculó tomando la T_m teórica superior del par de oligonucleótidos y restándole 5 grados.

La mezcla de reacción fue la siguiente:

<i>Phusion Master Mix</i> (Finnzymes)	1X
Oligonucleótidos	1mM cada uno
DNA templado	10-250 ng

c.v Digestión de DNA

Para digerir DNA se incubó con las enzimas de restricción correspondientes por 16 horas a 37°C.

Siendo la mezcla de reacción:

Enzima(s) de restricción (New England Biolabs, NEB)	20 unidades c/u
Albúmina sérica bovina (NEB)	0.1 mg
Amortiguador de digestión (apéndice IV.i)	1X
DNA	10-50 ng ¹ o 1 mg ²

1. Productos de PCR 2. Plásmidos

c.vi Desfosforilación de los fragmentos con fosfatasa alcalina

Para evitar la religación de fragmentos digeridos por una sola enzima se trataron con fosfatasa alcalina por 1 hora a 37°C.

La mezcla de reacción fue la siguiente:

Fosfatasa alcalina de intestino de bovino (NEB)	25 unidades
Amortiguador de la fosfatasa alcalina (apéndice IV.i)	1X
DNA	10-250 ng

c.vii Ligación de fragmentos de DNA

Para todas las reacciones de ligación se utilizó una relación 1:7 del vector con respecto al inserto y se incubaron por 16 horas a 15°C.

La mezcla de reacción fue la siguiente:

Ligasa de DNA de Fago T4 (NEB)	800 unidades
Amortiguador de ligación (NEB, apéndice IV.i)	1X
DNA	10-250 ng

d. RNA (Experimentos tipo *Northern blot*)

d. i Electroforesis de RNA

La separación por tamaño de RNA se realizó en condiciones desnaturizantes de acuerdo con el siguiente protocolo (Sambrook y Russell, 2001):

1. Preparación del gel

Para un gel de 70 mL (8 x 10 cm):

Agarosa	0.7 g
Agua	50 mL
MOPS 10X (apéndice IV.ii)	7 mL
Formaldehído 36.5% (Sigma)	13 mL

Mezclar agarosa y agua y calentar hasta disolver, dejar enfriar y agregar el MOPS y el formaldehído; verter el gel.

Una vez que se haya solidificado el agar llenar la cámara de electroforesis con MOPS 1X.

2. Preparación de las muestras

Las muestras se homogenizaron entre sí de acuerdo a su concentración y la intensidad de los RNAs ribosomales observada en geles de calibración.

Agregar a 10 µg de RNA:

MOPS 10X	2 µL
Formamida desionizada	20 µL
Formaldehído 36.5 % (v/v)	6 µL

Incubar por 15 minutos a 65°C y después pasar a hielo por 5 minutos.

Agregar 5 µL amortiguador de carga y 1 µL de bromuro de etidio.

3. Precorrer el gel por 5 minutos a 50 V

4. Cargar las muestras y correr a 50 V hasta que el frente de carga haya recorrido tres cuartas partes de la longitud del gel.

d.ii Transferencia

El RNA se transfirió del gel a una membrana *Amersham Hybond* (GE Healthcare) por capilaridad utilizando SSC 20X (apéndice IV.ii, Sambrook y Russell, 2001).

Después de la transferencia se fijó el RNA a la membrana por entrecruzamiento con luz UV (254-312 nm) en un entrecruzador *Stratalinker* (Stratagene, Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM).

d.iii Marcaje de la sonda

La sonda se generó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos descritos en el apéndice II.iii (O1Pf y O1Br) y la construcción *OXA1* en el plásmido pRS316 como templado.

El fragmento purificado se marcó utilizando el kit *DecaLabel DNA labeling* (Promega) con 33.3 μ Ci de [α - 32 P]-dCTP y se limpió del exceso de marca radiactiva con las columnas *Micro Bio-Spin Chromatography Columns* (Bio-Rad) de acuerdo con las especificaciones de los proveedores.

Antes de utilizarse, la sonda se incubó con 1/10 de volumen de solución de desnaturalización (apéndice IV.ii) por 5 minutos a temperatura ambiente.

d.iv Hibridación y lavados

Las membranas se incubaron en amortiguador de hibridación (apéndice IV.ii) por una hora a 65°C en rotación constante, posteriormente se agregó la sonda marcada y se dejaron incubando bajo las mismas condiciones por 16 horas.

Posteriormente se realizaron los siguientes lavados en rotación constante:

1. Solución de lavado I (apéndice IV.ii) por 5 minutos a 25°C
2. Solución de lavado I por 15 minutos a 65°C
3. Solución de lavado II (apéndice IV.ii) por 30 minutos a 65°C

d.v Revelado.

Las membranas se envolvieron en plástico autoadherente y se pusieron en contacto con una pantalla de fósforo por 16 horas a temperatura ambiente.

La pantalla se analizó utilizando el escáner *Typhoon 9400* (GE Healthcare) de la unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

e. Proteínas

e.i Electroforesis de proteínas

La separación por tamaño de proteínas se basó en el sistema de electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Para los geles se utilizó una concentración 17.5% acrilamida y 0.2% bisacrilamida y fueron corridos en una cámara de electroforesis vertical con amortiguador de carga (apéndice IV.iii), a 120 V y 25 mA por gel (Funes y Herrmann, 2007).

Para cada muestra se cargaron 7.5 μ l de extracto total (ver sección b.vi).

e.ii Transferencia

Para transferir las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa (Whatman Protran) se pusieron en contacto en una cámara de transferencia húmeda con amortiguador de transferencia (apéndice IV.iii) a 120 V y 380 mA por 1 hora a 4°C. Las membranas se tiñeron con rojo de *Ponceau* (apéndice IV.iii) para evaluar la eficiencia del proceso y la homogeneidad entre muestras, además de poder identificar el marcador de peso molecular.

e.iii Inmunoensayos tipo *Western blot*

a) Bloqueo

Las membranas se incubaron en solución de bloqueo (apéndice IV.iii) por 2 horas a 4°C y en agitación constante.

b) Incubación con anticuerpos y lavados

El anticuerpo primario se disolvió en solución de bloqueo y se incubó con las membranas bloqueadas por 2 horas a 4°C y en agitación constante.

Los anticuerpos y sus condiciones de uso se detallan en la siguiente Tabla:

Anticuerpo	Dilución utilizada	Tiempo de incubación (h)
Anti Oxa1 N-terminal (Suero policlonal de conejo)	1:1000	2
Anti Atp2 (Suero policlonal de conejo)	1:1000	2
Anti IgG de conejo conjugado a peroxidasa (Millipore)	1:4000	2

Las membranas se lavaron primero con TBS-T 1% y después con TBS por duplicado (apéndice IV.iii), los lavados tuvieron una duración de 10 minutos

y se realizaron bajo las mismas condiciones que la incubación con el anticuerpo.

El proceso fue el mismo para el anticuerpo secundario a excepción de que el primer lavado se realizó con TBS-T 0.1%.

c) Revelado

Las membranas se revelaron por quimioluminiscencia utilizando el sistema *Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate* (Millipore) con un tiempo de incubación de 8 minutos.

Posteriormente se expusieron a una película de autoradiografía *Biomax XAR* (Kodak).

Resultados

Para evaluar la presencia de motivos que regularan la biogénesis de una proteína mitocondrial se utilizó como modelo a Oxa1. Esta proteína de la membrana interna está codificada en el núcleo y presenta un MTS canónico en el extremo N-terminal (Figura 5). Sin embargo, se ha observado que su mRNA está localizado a la mitocondria (García et al., 2007; Gadir et al., 2011), que este proceso es dependiente de su 3'UTR (Sylvestre et al., 2003) y que cuenta con un sitio de reconocimiento de Puf3 (Gerber et al., 2004). Estas características hacen que la proteína Oxa1 sea un buen candidato para entender las señales de localización tanto a nivel de proteína (en el MTS) como en el mRNA.

Otra ventaja considerable de utilizar Oxa1 en este estudio, es que debido a su papel en el ensamblaje de los complejos OXPHOS su delección causa un fenotipo letal en medio respiratorio. Por lo tanto es posible evaluar la eficiencia con la que se rescata este fenotipo al modificar diferentes partes del gen y/o del genoma.

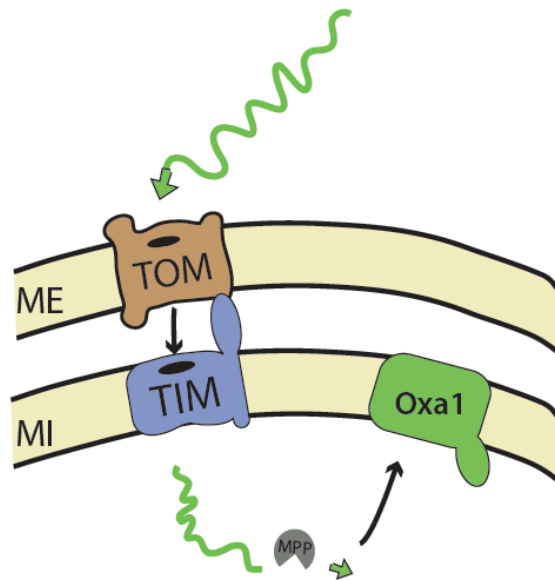


Figura 5. Biogénesis de Oxa1. Oxa1 es sintetizada en el citoplasma y dirigida a la mitocondria por su MTS (flecha verde) una vez que es reconocida e importada a través de la membrana externa e interna por los complejos TOM y TIM respectivamente, su MTS es editada por la proteasa de la matriz mitocondrial e insertada a la membrana interna. ME, Membrana externa mitocondrial; MI, Membrana interna mitocondrial; TOM, Translocasa de la membrana externa; TIM, Translocasa de la membrana interna; MPP, Proteasa de la matriz mitocondrial.

I. Construcción de mutantes del gen *OXA1*

Se realizaron distintas construcciones a partir del gen silvestre (Figura 6A) que permitieran analizar la relevancia de cada uno de los dominios del mRNA en el proceso de importación mitocondrial. Estas construcciones se clonaron en el plásmido pRS316 (Tabla I) utilizando los oligonucleótidos descritos en el apéndice II.iii, de la siguiente manera:

- a) Oxa1: el gen *OXA1* y sus regiones flanqueantes (300pb río arriba y 300pb río abajo) se amplificaron por PCR utilizando los oligonucleótidos O1Pf y O1Tr. El producto amplificado se digirió con las enzimas *SacI* y *XhoI* y se clonó en los mismos sitios del plásmido.

Para poder observar la localización celular de las diferentes construcciones se clonaron dos sitios de unión de la proteína MS2 de manera contigua a la región 3'UTR. Al coexpresar nuestras construcciones y la proteína MS2 fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP) será posible observar *in vivo* la localización del mRNA (Beach et al., 1999).

- b) El sitio de unión de MS2 se obtuvo a partir de la digestión del plásmido pIII/MS2-2 (Beach et al., 1999) con *XmaI* y *EcoRI* y se clonó en el plásmido linearizado con las mismas enzimas. Los sitios de unión de MS2 se clonaron primero debido a la presencia de un sitio de *EcoRI* en el ORF de *OXA1*.

- b.1) A continuación se amplificó por PCR la región 3'UTR (300pb río abajo del codón de término de *OXA1*) utilizando los oligonucleótidos O1Uf y O1Tr. El producto amplificado se digirió con las enzimas *EcoRI* y *XhoI* y se clonó en el plásmido que ya contenía el sitio de unión MS2 proveniente del paso b.

- b.2) Para clonar la región 3'UTR en dirección 3' → 5' se amplificaron por PCR los mismos 300pb ahora utilizando los oligonucleótidos O1UIf y O1UIr. El

producto amplificado se digirió con las enzimas EcoRI y XhoI y se clonó en el plásmido que ya contenía el sitio de unión MS2 proveniente del paso b.

- c.1) Oxa1 + MS2: se amplificó por PCR la región 5'UTR y el ORF completo de *OXA1* utilizando los oligonucleótidos O1Pf y O10Br. El producto amplificado se digirió con las enzimas SacI y BamHI y se clonó en el plásmido que ya contenía el sitio de unión MS2 y la región 3'UTR proveniente del paso b.1.

- c.2) 3'UTR invertido: se amplificó por PCR la región 5'UTR y el ORF completo de *OXA1* utilizando los oligonucleótidos O1Pf y O10Br. El producto amplificado se digirió con las enzimas SacI y BamHI y se clonó en el plásmido que ya contenía el sitio de unión MS2 y la región 3'UTR en dirección 3' → 5' proveniente del paso b.2.

- d) Sin 3'UTR: se amplificó por PCR la región 5'UTR y el ORF completo de *OXA1* utilizando los oligonucleótidos O1Pf y O10Br. El producto amplificado se digirió con las enzimas SacI y BamHI y se clonó en el plásmido que ya contenía el sitio de unión MS2 proveniente del paso b.

- e) Sin ORF: el promotor (300pb río arriba del codón de inicio de *OXA1*) se amplificó utilizando los oligonucleótidos O1Pf y O1Pr. El producto amplificado se digirió con las enzimas SacI y BamHI y se clonó en el plásmido que ya contenía el sitio de unión MS2 y la región 3'UTR proveniente del paso b.1.

- f) Sin MTS: *OXA1* sin la región que codifica para el MTS se amplificó utilizando los oligonucleótidos O10Mf y O10Xr. El producto amplificado se digirió con las enzimas BamHI y XmaI y se clonó en el plásmido que ya contenía el promotor, el sitio de unión MS2 y la región 3'UTR proveniente del paso e.

g) MTS sin ATG: el MTS se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos O1Oaf y O1Mr1. El producto amplificado se utilizó como templado para otra reacción de PCR con los oligonucleótidos O1Af y O1Mr2. En este caso la primera reacción sirvió para eliminar los codones ATG que se encuentran dentro del MTS y la segunda para amplificar en su totalidad esta región. Posteriormente el producto se digirió con la enzima BamHI y se clonó en el plásmido que ya contenía el promotor, el ORF, el sitio de unión a MS2 y la región 3'UTR proveniente del paso f.

Para todas las reacciones de PCR mencionadas se utilizó como templado DNA total de la cepa W303-1A (ver materiales y métodos).

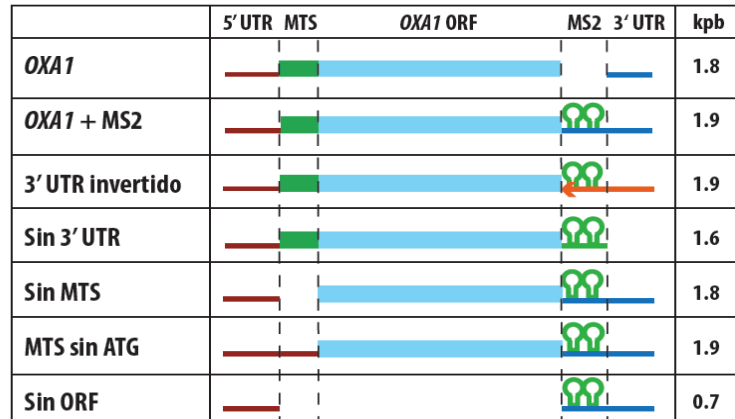
Una vez que las construcciones fueron verificadas se subclonaron en el plásmido pRS426, del cual se mantienen alrededor de 20 copias por célula, utilizando las enzimas de restricción SacI y XhoI. Todas las construcciones fueron verificadas por secuenciación, utilizando los oligonucleótidos T3 y T7 de los plásmidos. Esto se realizó en el secuenciador automático *ABI Prism 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) de la unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Tabla I: Plásmidos utilizados en este trabajo

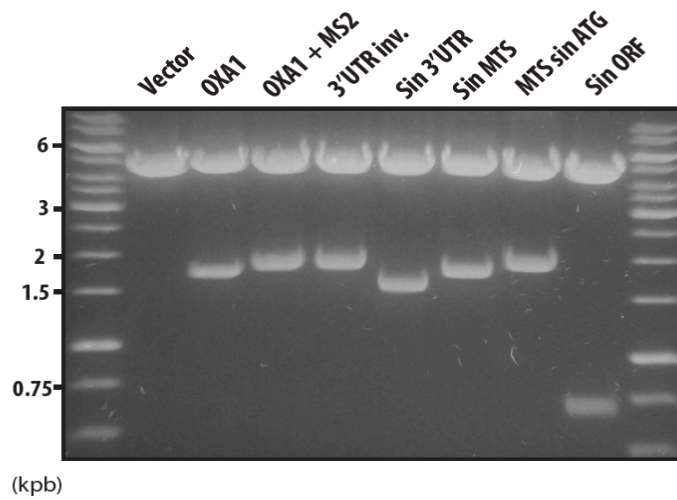
Nombre	Marcador <i>E. coli</i>	Marcador <i>S. cerevisiae</i>	Origen de replicación	Referencia
pRS316	AmpR	<i>URA3</i>	CEN/ARS	(Sikorski y Hieter, 1989)
pRS426	AmpR	<i>URA3</i>	2 μ	(Christianson et al., 1992)

Las figuras 6B y C muestran las construcciones digeridas con SacI y XhoI revelando el tamaño de los insertos.

A.



B.



C.

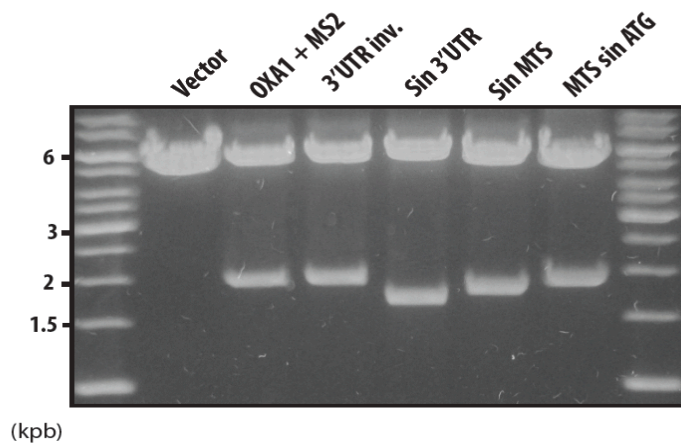


Figura 6. **A.** Representación esquemática de las construcciones de *OXA1* utilizadas en este estudio. **B.** y **C.** Ensayos de digestión de los plásmidos que contienen las diferentes construcciones de *OXA1* clonados en pRS316 (**B.**) y pRS426 (**C.**). Los insertos observados coinciden con el tamaño esperado (*OXA1* 1.8 kbp, *OXA1*+MS2 1.9 kbp, 3'UTR Inv. 1.9 kbp, Sin 3'UTR 1.6 kbp, Sin MTS 1.8 kbp, MTS sin ATG 1.9 kbp, Sin ORF 0.7 kpb).

II. El 3'UTR y MTS regulan la biogénesis de Oxa1

Para evaluar el papel del 3'UTR se construyeron dos versiones distintas, una en la que se eliminó por completo esta secuencia y otra en la que se clonó en el sentido inverso, de esta manera sería posible discernir si el rol de esta región es dependiente de la simple presencia del elemento o de su secuencia. Para investigar la relevancia de la presecuencia de Oxa1, se diseñaron dos variaciones: en la primera de ellas se eliminó la secuencia que la codifica y en la segunda únicamente se quitó el codón de inicio original y se añadió uno nuevo después de la secuencia que codifica el MTS de manera que la información se mantiene en el RNA mensajero pero no en la proteína. Finalmente, se realizó una construcción en la que el ORF se eliminó para ser utilizada como control negativo en nuestros ensayos.

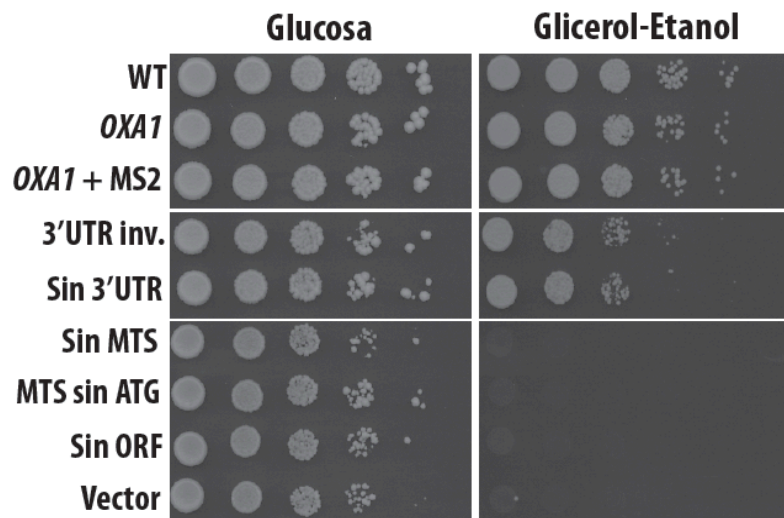
Los plásmidos se utilizaron para transformar a la cepa $\Delta oxa1$ (ver más adelante). Esta cepa tiene un fenotipo letal en fuentes no fermentables de carbono, por lo que la capacidad de rescate de cada construcción revelaría si la región alterada tiene una función en la biogénesis de Oxa1 (Figura 7A).

Las construcciones con el ORF silvestre (*OXA1* y *OXA1+MS2*) rescataron por completo el fenotipo de la mutante, aquellas en las que se alteró el 3'UTR (Sin 3'UTR y 3'UTR invertido) lo hicieron parcialmente y las cepas en las que Oxa1 carece de MTS (Sin MTS y MTS sin ATG) muestran el mismo fenotipo no respiratorio que la mutante sin transformar.

Para evaluar si el efecto observado se debía a alteraciones en la cantidad basal de Oxa1, se realizó un experimento tipo *Western blot* a partir de extractos totales de proteína de cada cepa. La señal de Oxa1 correlaciona con el crecimiento en medio respiratorio, por lo que las regiones analizadas sí parecen tener un efecto sobre la cantidad y por lo tanto eventual función de Oxa1 (Figura 7B).

Con el propósito de investigar si diferencias en la temperatura de crecimiento influían sobre el fenotipo observado, se realizaron ensayos de crecimiento también a 25 y 37°C (Figura 8). El efecto observado al alterar el 3'UTR se incrementó a 25°C, mientras que a 37°C la diferencia entre cepas disminuyó. Por otra parte, la ausencia de MTS provocó la letalidad esperada en medio respiratorio a ambas temperaturas aunque a 25°C estas cepas también mostraron un pobre crecimiento en medio fermentativo.

A.



B.

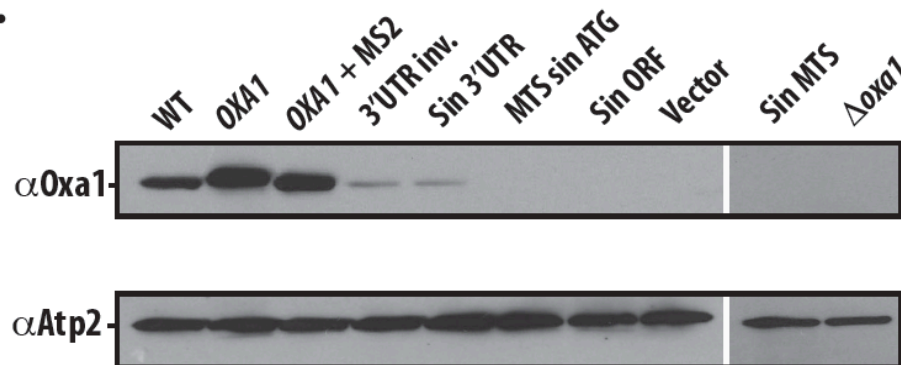


Figura 7. El 3'UTR y MTS regulan la biogénesis de Oxa1 **A.** Ensayos de crecimiento utilizando las construcciones clonadas en pRS316. La cepa Δ *oxa1* se transformó con el plásmido vacío o con una de las construcciones descritas en la figura 6A. Diluciones seriadas de cada cepa fueron depositadas en medio fermentativo (Glucosa) o respiratorio (Glicerol-Etanol) y se comparó su crecimiento con la cepa silvestre (WT). **B.** Inmunoensayo tipo *Western blot*. Extractos totales de proteínas de cada cepa se sometieron a electroforesis desnaturizante y posteriormente se utilizó un anticuerpo policlonal para detectar a Oxa1 o Atp2 como control de carga.

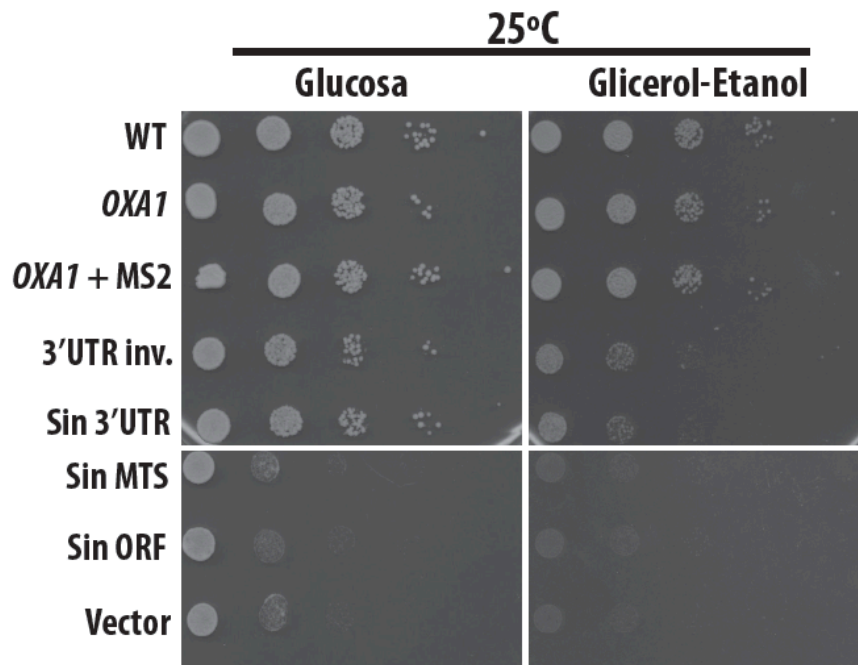
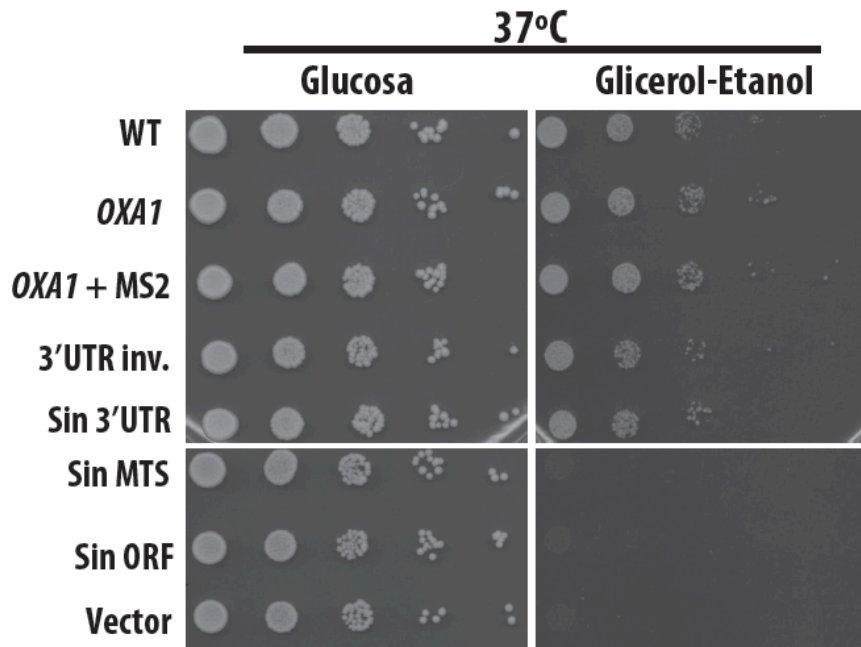
A.**B.**

Figura 8. La complementación de la cepa $\Delta oxa1$ es afectada por la temperatura. Diluciones seriadas de cada cepa (ver Figura 5A y descripción en el texto) fueron depositadas en medio fermentativo (Glucosa) o respiratorio (Glicerol-Etanol), se incubaron a 25 y 37°C de 3 a 4 o 2 a 3 días respectivamente y se comparó su crecimiento con la cepa silvestre (WT).

III. La sobreexpresión alivia los efectos de la alteración del 3'UTR y MTS

La complementación parcial, la disminución en los niveles de proteína y el crecimiento a 37°C que muestran las cepas con el 3'UTR alterado, nos llevó a pensar que esta región del mRNA actúa como un regulador de la biogénesis de Oxa1 probablemente al afectar su eficiencia.

De ser cierta esta hipótesis, la eficiencia del proceso debería de volver a niveles silvestres al aumentar la cantidad del RNA mensajero. Tomando esto en cuenta, se decidió subclonar en un vector multicopia (pRS426) a las dos construcciones en las que se alteró el 3'UTR y comparar su crecimiento en medio respiratorio además de la cantidad de Oxa1 con las cepas de expresión silvestre.

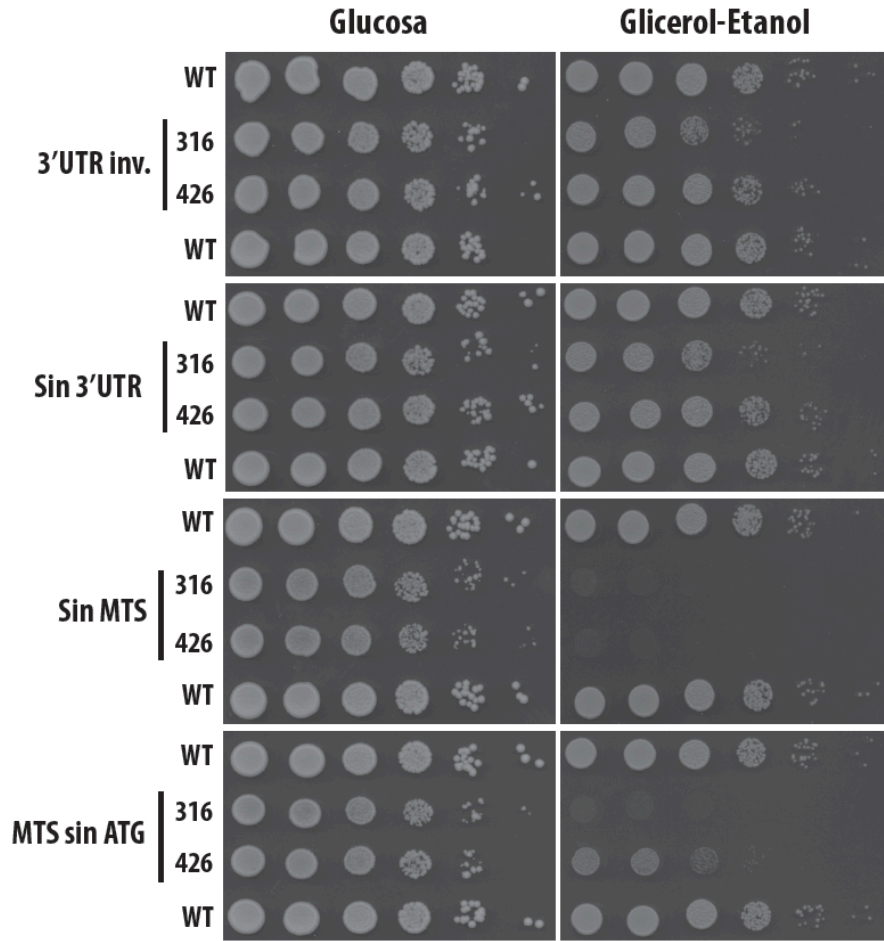
Como control negativo de los efectos de sobreexpresión se utilizaron las dos construcciones que no cuentan con MTS.

La sobreexpresión de las construcciones Sin 3'UTR y 3'UTR invertido llevó la viabilidad en medio respiratorio a niveles silvestres mientras que la cantidad de proteína incrementó considerablemente (Figuras 9A y B).

Por otra parte, una de las construcciones con el MTS alterado (MTS sin ATG) mostró un crecimiento modesto y una recuperación en los niveles basales de Oxa1. Estos efectos no se observaron en la cepa Sin MTS bajo las mismas condiciones (Figuras 9A y B). Esto indica que el fragmento de mRNA correspondiente al MTS tiene un rol, aunque débil, en la biogénesis de Oxa1.

Todos estos datos apoyan la existencia de regiones en el mRNA de Oxa1 que regulan los niveles basales de la proteína.

A.



B.

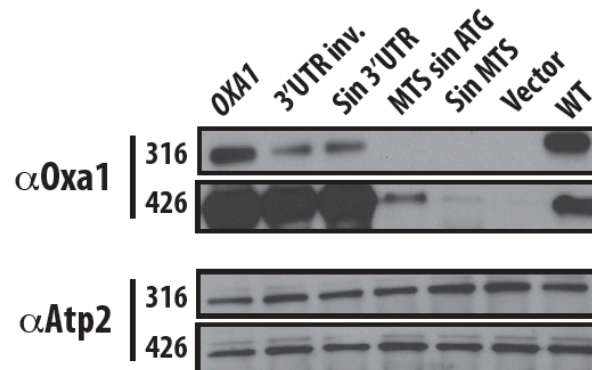


Figura 9. La sobreexpresión alivia los efectos de la alteración del 3'UTR y MTS. **A.** Ensayos de crecimiento. La cepa $\Delta oxa1$ se transformó con un plásmido de copia única (316) o múltiple (426) que contiene la construcción indicada. Diluciones seriadas de cada cepa fueron depositadas en medio fermentativo (Glucosa) o respiratorio (Glicerol-Etanol) y se comparó su crecimiento con el de cepa silvestre (WT). **B.** Inmunoensayo tipo *Western blot*. Extractos totales de proteína de cada cepa se sometieron a electroforesis desnaturalizante y posteriormente se utilizó un anticuerpo policlonal para detectar a Oxa1 o Atp2 como control de carga.

IV. El rol del 3'UTR y MTS es independiente de la transcripción

Ya que los efectos observados hasta este punto pudieran explicarse por diferencias a nivel transcripcional, traduccional o de importación, decidimos averiguar si existían diferencias en la cantidad de mRNA de *OXA1* entre cepas.

Para ello realizamos ensayos tipo *Northern blot* utilizando RNA total y una sonda específica para *OXA1*. A pesar de que la señal del transcrito es imperceptible en la cepa silvestre, fue posible observar que en las cepas con plásmidos monocopia, hay niveles de mensajero equivalentes entre la construcción *OXA1 + MS2* y las construcciones en las que el 3'UTR está alterado (Sin 3'UTR y 3'UTR invertido, Figura 10A).

La cantidad de RNA mensajero detectada en las cepas sin MTS (Sin MTS y MTS sin ATG) es visiblemente menor, sin embargo, son niveles comparables con la cepa que expresa el mRNA silvestre (*OXA1*, Figura 10A). Estos resultados descartan que la cantidad de mRNA presente en cada una de las cepas sea responsable de los fenotipos.

Ya que el mensajero de *OXA1* se expresa de manera constitutiva sin sufrir represión catabólica (*Saccharomyces* Genome Database, www.yeastgenome.org), esperábamos poder detectar este mRNA en condiciones silvestres. Al no observar ésto, suponemos que tenemos un problema de sensibilidad por lo que en las cepas que expresan *OXA1* desde un plásmido podría haber una cantidad mayor de mRNA que en la cepa silvestre, permitiendo la detección del transcrito en las condiciones experimentales actuales (Figura 10A).

Por otra parte, en las cepas de sobreexpresión los niveles de mRNA son similares entre sí (Figura 10B). Cabe destacar que quien presenta una mayor señal (Sin MTS) es la única cepa que no crece en medio respiratorio (Figura 9A).

Los ensayos de tipo *Northern blot* indican que las diferencias en la capacidad de complementación entre construcciones no se deben a patrones de expresión radicalmente distintos.

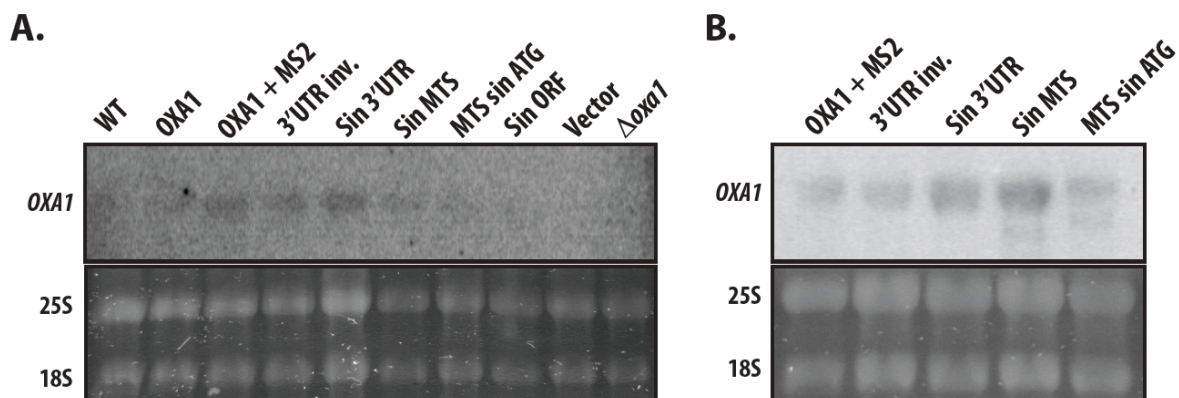


Figura 10. El rol de el 3'UTR y MTS es independiente de la transcripción. RNA total de cada cepa, plásmido de copia única en **A.** y multiple en **B.**, se sometió a electroforesis desnaturizante y posteriormente se utilizó una sonda para detectar a *OXA1*. Los RNAs ribosomales 25S y 18S observados en la tinción con bromuro de etidio se utilizaron como control de carga. WT, silvestre.

V. **Puf3 no cumple con los requerimientos de un regulador de la importación cotraduccional.**

Siendo que Puf3 se ha propuesto como el posible receptor de los mRNAs que se localizan en la cercanía de la mitocondria, decidimos analizar el comportamiento de una mutante nula del gen (Giaever et al., 2002, ver sección VI) en condiciones donde se requiere una biogénesis mitocondrial robusta.

La ausencia de Puf3 no genera ningún fenotipo observable al analizar el crecimiento en fuentes fermentables o respiratorias de carbono (Figura 11A). A pesar de esto y debido que el mRNA *OXA1* tiene un sitio de reconocimiento de Puf3, decidimos realizar una cepa doble mutante Δ oxa1 Δ puf3 (ver sección VI) en la que realizaríamos ensayos de complementación con las construcciones de *OXA1*. Pensamos que si Puf3 era la proteína responsable de la acción del 3'UTR, la complementación en esta cepa sería deficiente aún en las construcciones silvestres (Figura 11B).

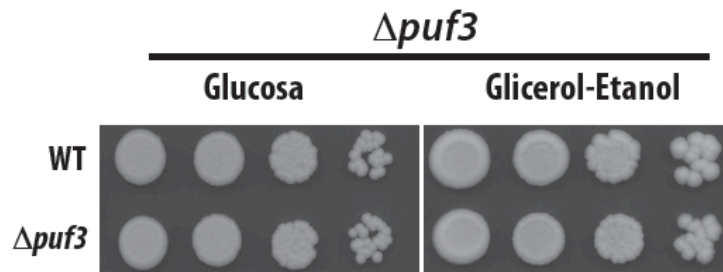
El crecimiento y la cantidad de Oxa1 en la doble mutante no fueron diferentes a los ya vistos con la mutante sencilla, indicando que Puf3 no es la proteína que relaciona al 3'UTR con la biogénesis de Oxa1.

Pensamos que de ser Puf3 el punto de anclaje mitocondrial para mRNAs, un buen porcentaje de sus blancos también debería de localizarse en la superficie mitocondrial. Por lo que decidimos analizar los transcritos que se ha reportado se unen a Puf3 (Gerber et al., 2004) y compararlos con los mensajeros que se localizan a la mitocondria (Marc et al., 2002, Garcia et al., 2007, Nadir et al., 2011), el traslape entre ambos grupos fue considerablemente bajo (Figura 11C). Como grupo control en este análisis se utilizaron a las proteínas reportadas con una extensión N-terminal, que reflejan una buena parte del universo de proteínas mitocondriales con rutas de biogénesis descritas (Vögtle et al., 2009).

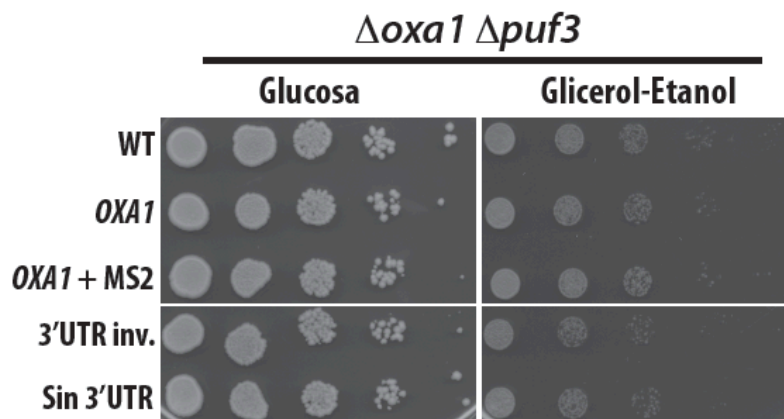
La lista completa de los mRNAs en los que se basa la figura 11C se encuentra en el apéndice I.

En resumen, estos datos sugieren que Puf3 no parece estar involucrado en biogénesis mitocondrial, al menos no cumpliendo un papel único durante la localización de mRNAs a la superficie de este organelo.

A.



B.



C.

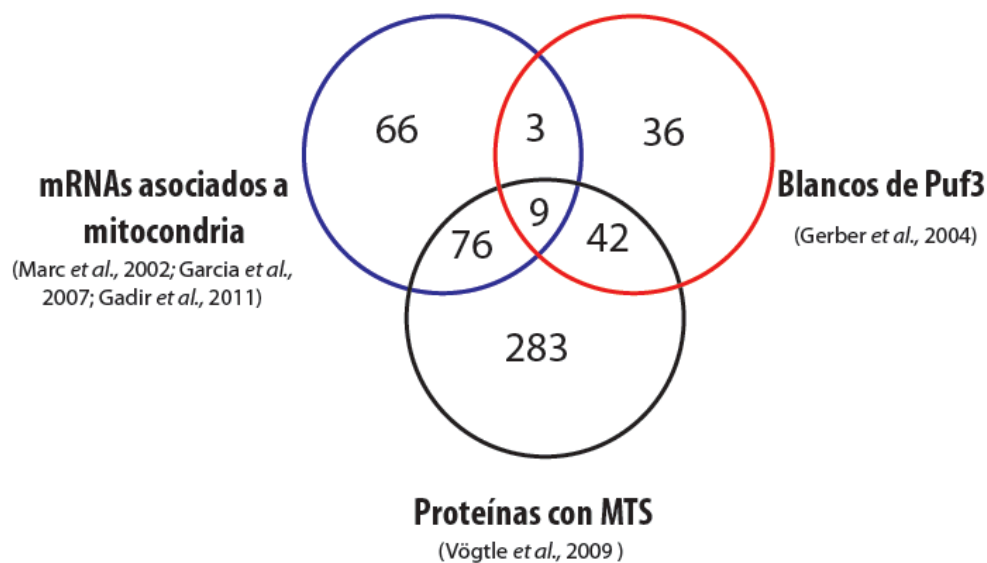


Figura 11. Puf3 no cumple con los requerimientos de un regulador de la importación cotraduccional A. y B. Ensayos de crecimiento. Diluciones seriadas de la cepa $\Delta puf3$ (A.) o $\Delta oxa1 \Delta puf3$ (B.) fueron depositadas en medio fermentativo (Glucosa) o respiratorio (Glicerol-Etanol) y se comparó su crecimiento con la cepa silvestre (WT). C. Comparación de los mRNAs localizados a la cercanía de la mitocondria, los blancos de Puf3 y las proteínas mitocondriales con una extensión N-terminal (MTS). Los datos se obtuvieron de los trabajos citados y se compararon manualmente.

VI. Obtención y verificación de mutantes

Para generar las cepas $\Delta oxa1$ y $\Delta oxa1\Delta puf3$ se amplificó el módulo de resistencia a higromicina B del plásmido pAG32 (Goldstein y McCusker, 1999) utilizando los oligonucleótidos descritos en el apéndice II.i. El casete está flanqueado por sitios homólogos al gen que facilitan su recombinación, una vez purificado el producto se utilizó para transformar a la cepa silvestre o a la $\Delta puf3$.

La cepa $\Delta puf3$ fue obtenida de la colección de mutantes de *S. cerevisiae* (Giaever et al., 2002). La colección se generó al intercambiar cada uno de los genes no esenciales de la levadura por un casete de resistencia al antibiótico G418.

Las transformantes se seleccionaron por su crecimiento en presencia del antibiótico(s) correspondiente(s) (ver materiales y métodos).

La verificación de las mutantes se llevó a cabo mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos descritos en el apéndice II.ii, para evidenciar la presencia del módulo de resistencia y la ausencia del gen silvestre (Figura 12A).

De contar con anticuerpos contra la proteína de interés (ver materiales y métodos) se realizaron también inmunoensayos tipo *Western blot* (Figura 12B).

Por otra parte, para asegurar que el fenotipo respiratorio asociado a estas cepas sólo se debiera a la eliminación del gen y no a la pérdida del genoma mitocondrial, cruzamos nuestras mutantes con la cepa XPM11 ρ^0 (ver materiales y métodos) y evaluamos el crecimiento en medio respiratorio de la cepa diploide (Figura 12C). Ya que la cepa XPM11 ρ^0 no cuenta con DNA mitocondrial, la cepa diploide que resulta de esta cruce solo podrá respirar si la mutante aporta este componente.

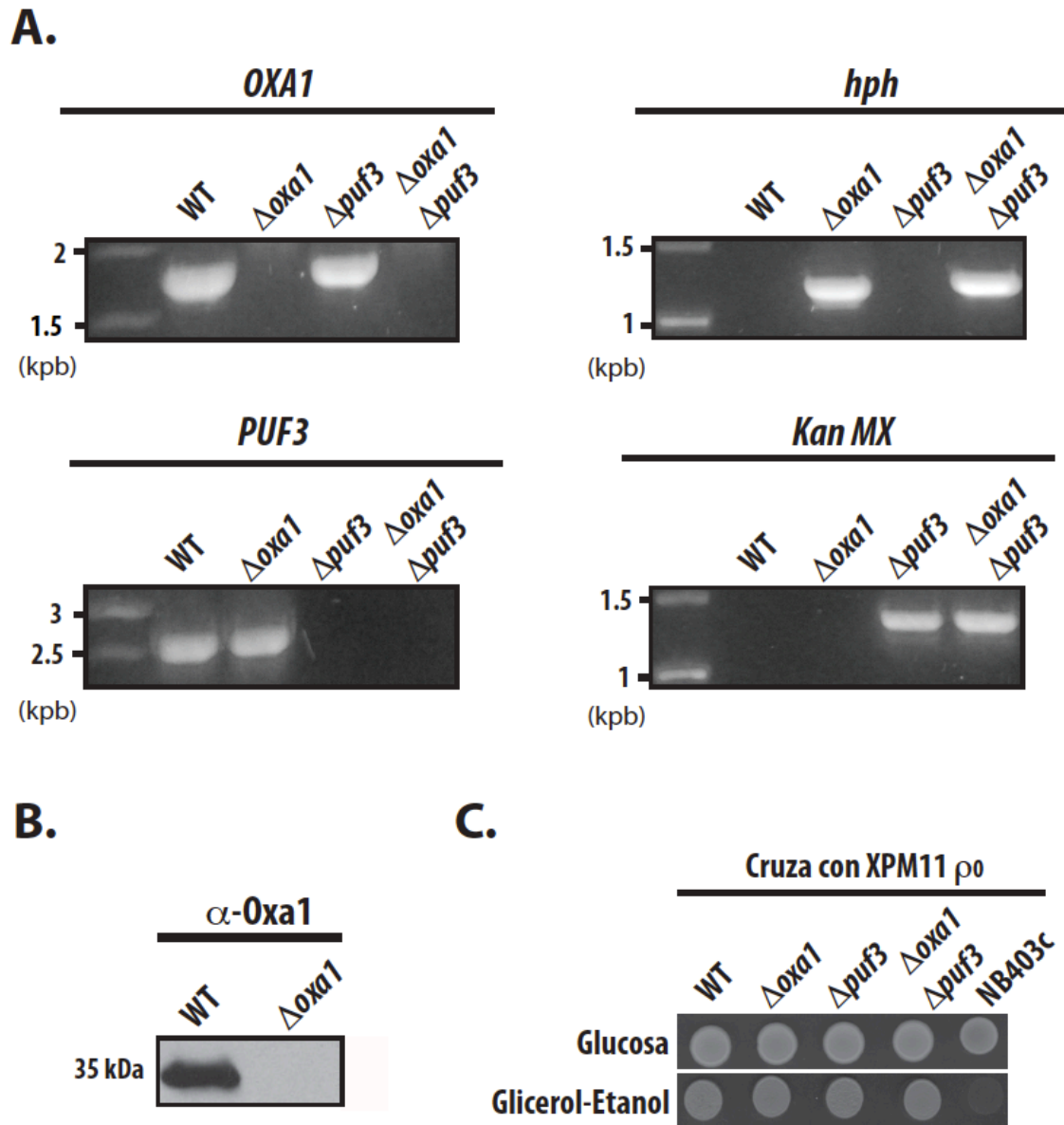


Figura 12. Verificación de las mutantes. **A.** Reacción de PCR. DNA genómico de la cepa silvestre y las mutantes se utilizó para amplificar el gen silvestre (*OXA1*, *PUF3*) o el casete de resistencia a higromicina (*hph*) o G418 (*KanMX*). **B.** Ensayo de *Western blot*. Extractos totales de las cepas fueron sujetos a electroforesis desnaturalizante y posteriormente se detectó Oxa1 con un anticuerpo policlonal. **C.** Presencia de DNA mitocondrial. Las mutantes se cruzaron con la cepa XPM11 ρ^0 y el crecimiento del diploide resultante fue analizado en medio fermentativo (Glucosa) y respiratorio (Glicerol-Etanol). WT, silvestre.

Discusión

El modelo postraducciona l de importación de proteínas a la mitocondria es ampliamente aceptado para proteínas de diversas características estructurales, fisicoquímicas y de localización dentro del organelo. Este modelo se sustenta en una gran cantidad de estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro*. Ya que su principal postulado es que la traducción e importación no están acopladas, supone que toda la información necesaria para el proceso se encuentra en la secuencia de aminoácidos y/o en la estructura secundaria de la proteína. Estas señales, permanecen accesibles para los complejos de reconocimiento y translocación gracias a la acción de chaperonas citoplásmicas (Chacinska et al., 2009; Schmidt et al., 2010).

Sin embargo, se ha propuesto que hay información relevante para la biogénesis de proteínas mitocondriales dentro de sus mensajeros (mRNAs). En particular, la observación de que estos transcritos y los ribosomas que los traducen se localizan en la cercanía de la mitocondria (Kellems et al., 1975; Suissa y Schatz, 1982; Marc et al., 2002; Garcia et al., 2007), sugiere que los procesos de traducción e importación se llevan a cabo en el mismo lugar.

En el caso de los mRNAs, el 3'UTR ha sido mapeado como el responsable de su localización. Este papel ha sido demostrado en varios de los genes que codifican para proteínas mitocondriales como *OXA1* (Sylvestre et al., 2003; Gadir et al., 2011), *ATP2* (Margeot et al., 2002; Garcia et al., 2007; 2010) o *ATM1* (Corral-Debrinsky et al., 2000). Este proceso no es exclusivo de genes mitocondriales ya que también se ha reportado para los mensajeros de proteínas de la membrana plasmática (Loya et al., 2008), peroxisomales (Zipor et al., 2009) o involucradas en la gemación (Bertrand et al., 1998).

De manera complementaria, también se han identificado proteínas de unión a RNA que pudieran favorecer el proceso de localización e importación: Puf3, que une preferencialmente mRNAs que codifican para proteínas mitocondriales (Gerber et al.,

2004) y Npl3, que en condiciones en las que es retenida en el citoplasma, en lugar del núcleo, permite la importación de una versión mutante de Atp2 sin presecuencia (Ellis y Reid, 1993; Gratzner et al., 2000).

Estos datos en su conjunto sugieren fuertemente que el mRNA contiene información, en particular en el 3'UTR, que puede acoplar la traducción y la importación de las proteínas mitocondriales.

Las dos vías de importación, cotraduccional y postraduccional, se han propuesto como mutuamente excluyentes (Suissa y Schatz, 1982; Hay et al., 1984; Sylvestre et al., 2003), sin embargo evidencia reciente apoya que en realidad sean mecanismos complementarios:

1. No todas las proteínas mitocondriales cuentan con una extensión N-terminal editable por lo que una cantidad importante de ellas no sigue la vía canónica de importación (40% las presentan, Vögtle et al., 2009).
2. Únicamente alrededor del 20% de los transcritos que codifican para proteínas mitocondriales están localizados (Marc et al., 2002; Garcia et al., 2007; Gadir et al., 2011).
3. Hay un traslape considerable entre los mRNAs localizados y las proteínas con MTS (Figura 11C y apéndice I).

A pesar de que a lo largo de la última década se han realizado numerosos experimentos alrededor de este tema, poco se sabe realmente de la vía cotraduccional de importación de proteínas a la mitocondria. En particular, aunque existe una gran cantidad de información sobre la localización de los RNA mensajeros y los elementos intrínsecos que los dirigen, no se ha estudiado si este proceso tiene relevancia en la importación mitocondrial y por lo tanto en la fisiología del organismo.

El objetivo de este trabajo fue, utilizando a *OXA1* como modelo, determinar si el 3'UTR es relevante para la biogénesis de la proteína codificada por este gen y en particular sobre su importación a la mitocondria.

En un primer acercamiento revelamos que alterar el 3'UTR disminuye significativamente el nivel basal de la proteína y también la capacidad respiratoria de las células (Figuras 7A y B). De la misma manera observamos que el MTS es necesario para llevar a cabo la biogénesis en condiciones silvestres, ya que las construcciones que contienen el 3'UTR y no el MTS no complementaron a la cepa $\Delta oxa1$ (Figura 7A). Estos resultados coinciden con la idea de dos vías complementarias que regulan la biogénesis de *Oxa1*. La primera mediada por el MTS y la vía postraducciona y la segunda por el 3'UTR y la vía cotraducciona. La relevancia del 3'UTR observada en este trabajo concuerda con lo publicado para los genes *ATP2* (Margeot et al., 2002), *ATM1* (Corral-Debrinsky et al., 2000) y para *OXA1* en humano (Sylvestre et al., 2003).

Posteriormente realizamos ensayos de crecimiento a diferentes temperaturas y observamos que el efecto de la eliminación del 3'UTR se aminoró a 37°C (Figura 8B). Pensamos que esto se debe a que la difusión de los ribosomas traducciona y activos incrementa por la temperatura, posicionándolos sobre los complejos de importación de la membrana externa y por lo tanto, aunque ocurra de manera estocástica, el proceso es un poco más eficiente.

Los experimentos de sobreexpresión nos permitieron observar que al incrementar el nivel de mensajero alrededor de veinte veces, las construcciones con el 3'UTR alterado presentan un crecimiento equivalente al de su contraparte silvestre (Figura 9A y B). Una posible explicación de éste efecto es que al incrementar la cantidad del mensajero, la disminución en el crecimiento producida por la ausencia del 3'UTR es contrarrestada por un incremento en la cantidad de proteína disponible. Esto nos llevó a plantear que el 3'UTR funciona regulando la eficiencia de la biogénesis de *OXA1*, pues el proceso se puede llevar a cabo en su ausencia aunque en menor medida.

Por otra parte, estos experimentos también identificaron otra región del mRNA relevante para la biogénesis de Oxa1: la secuencia que codifica para el MTS. Esto no es un artefacto de la sobreexpresión pues la construcción en la que no se encuentra esta secuencia pero que produce exactamente la misma proteína no creció bajo las mismas condiciones (Figuras 9A y B). El efecto de esta región sólo es observable al ser sobreexpresada, por lo que es probable que funcione como el ligando de un receptor en la membrana externa mitocondrial o bien sea el sitio de unión de factores citosólicos que recluten al mensajero o al ribosoma traduccionalmente activo. Estas interacciones en condiciones silvestres podrían ser de baja afinidad y por lo tanto únicamente influyen de manera superficial a la biogénesis (Figura 7A y B), sin embargo, al aumentar la concentración de ligando se favorece y se evidencia su importancia (Figura 9A y B). Este sería un nuevo ejemplo de una región del mRNA, que no es el 3'UTR, regulando la biogénesis de una proteína mitocondrial. Previamente se ha reportado que porciones del ORF correspondientes a la proteína madura (sin MTS) de *ATP2* son importantes para su localización perimitocondrial (Garcia et al., 2010).

Estos resultados llevaron a la idea de que existen sitios de unión a la mitocondria para el mensajero. La unión del mensajero complementaría a la de la presecuencia constituyendo así el sistema necesario para mantener la biogénesis de Oxa1.

Para descartar que los resultados obtenidos no se debieran a una alteración en la tasa de expresión o traducción entre las cepas, se analizó la expresión del mensajero *OXA1* proveniente de cada una de las construcciones (Figura 10). Ninguna de las cepas mostró diferencias apreciables, por lo que es posible concluir que el 3'UTR no actúa a este nivel.

Hasta el momento no se han realizado los experimentos necesarios para demostrar que la tasa de traducción también es homogénea, sin embargo, el que la transcripción y estabilidad del mRNA sea similar y que la cola de poli-A (principal regulador traduccional en el extremo 3' (Preiss et al., 1998), no se encuentra alterada en las construcciones, permiten suponer que no será el caso.

A partir de los resultados obtenidos, se propone el siguiente modelo (Figura 13):

Existen regiones en los mRNAs que dirigen su localización mitocondrial (en particular el 3'UTR y la región que codifica para el MTS). Esto se logra mediante la unión a receptores de naturaleza aún desconocida, en la membrana externa mitocondrial.

La unión del mensajero podría suceder en dos escenarios alternativos:

1. El mRNA se une a la membrana externa mitocondrial, posteriormente se ensambla el ribosoma e inicia la traducción, la consecuente síntesis del MTS fortalece la interacción con el organelo.
2. El complejo traduccionalmente activo (mRNA, ribosoma y proteína naciente) es ensamblado en el citoplasma antes de ser reclutado a la mitocondria, donde mRNA y MTS se unen a sus respectivos receptores.

En ambos casos podrían existir también factores citoplásmicos que reconozcan de manera específica a los mRNAs y a su vez sean unidos por un receptor sobre la superficie mitocondrial. Una vez que se encuentran unidos estos componentes inicia la importación (Figura 13A).

En el caso de las construcciones en las que se alteró el 3'UTR la importación continúa por medio del MTS, que se ha reportado como una señal fuerte de importación (Herrmann et al., 1997). Nuestros resultados indican que de alguna manera la secuencia del mRNA que codifica para el MTS podría también mediar el contacto con la mitocondria (Figura 13B).

Por último, de no haber MTS en la proteína, los sitios de contacto del mRNA con la mitocondria anclan al ribosoma y ponen en contacto a la proteína naciente (que ya se encuentra en su forma madura) con el complejo TOM (Figura 9 y 13C).

Este ultimo caso y las otras proteínas mitocondriales sin MTS (Vögtle et al., 2009), sustentan la hipótesis de que el reclutamiento del RNA mensajero a la mitocondria es independiente del ribosoma y por lo tanto de la traducción.

Uno de los candidatos mas atractivos para ser el receptor de estos mRNAs en la membrana externa mitocondrial es Puf3, una proteína de unión a RNA cuyos blancos son predominantemente mitocondriales (Gerber et al., 2004) y que se asocia con el organelo (Garcia-Rodriguez et al., 2007).

Sin embargo el hecho de que su expresión está restringida a medios fermentables de carbono (Garcia-Rodriguez et al., 2007) y por lo tanto su eliminación no provoque un fenotipo en medio respiratorio (Figura 11A, Gerber et al., 2004) indican que no tiene un rol predominante en condiciones en las que se necesita una alta biogénesis mitocondrial. Ya que *OXA1* es uno de los pocos mensajeros que están localizados y además son blanco de Puf3, realizamos un experimento complementario en la doble mutante $\Delta oxa1\Delta puf3$ utilizando nuestras construcciones. De ser Puf3 el receptor o regulador de la función del 3'UTR de *OXA1*, las construcciones silvestres también deberían de haber mostrado una complementación parcial de la mutante. El fenotipo observado no mostró diferencias con el ya descrito para la mutante sencilla (Figura 11B).

Por otra parte, la poca correlación que existe entre los blancos de Puf3 y los mRNAs localizados a la cercanía de la mitocondria sugieren que no es necesario para el proceso y por lo tanto poco probable como receptor (Figura 11C).

Aunque no podemos descartar la asociación de Puf3 con otras funciones mitocondriales, estos experimentos sugieren que lleva a cabo su función canónica de reclutar complejos de desadenilación y degradación de mRNAs como lo ya descrito para *COX17* (Olivas y Parker, 2000) y no el de un receptor mitocondrial responsable de la localización de estos mensajeros. Probar si alguno de los otros candidatos propuestos

por la literatura (por ejemplo Tom20, Ssd1 o Tom70) es el punto de anclaje mitocondrial es el propósito de trabajo en el futuro.

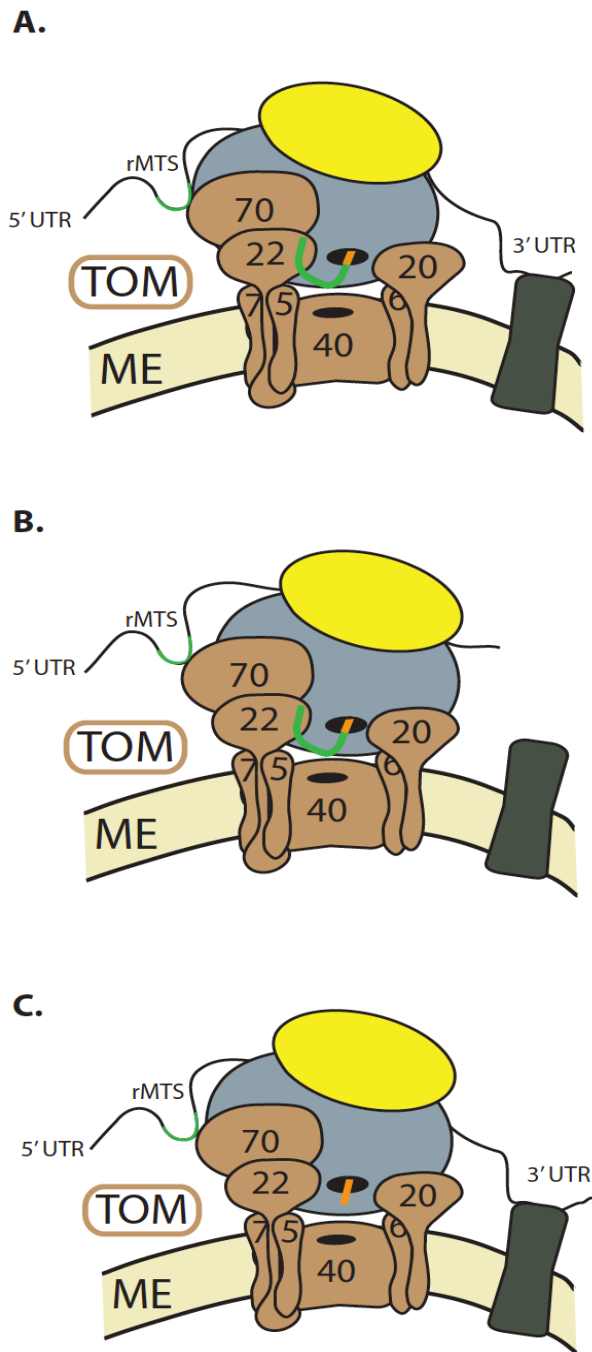


Figura 13. Modelo de los elementos en *cis* que regulan la importación cotraduccional. **A.** Condiciones silvestres. **B.** Sin 3'UTR **C.** Sin presecuencia. rMTS, porción del mRNA que codifica para el MTS; ME, Membrana externa mitocondrial; TOM, Translocasa de la membrana externa. La presecuencia se presenta en color verde al igual que el rMTS, mientras que el resto de la proteína naciente es de color naranja. Ver detalles en el texto.

Conclusiones

1. El MTS, tanto la proteína como el mensajero que lo codifica y el 3'UTR son necesarios y en su conjunto suficientes para mantener la biogénesis de Oxa1.
2. El efecto observado al alterar diferentes regiones del mRNA no es consecuencia de una menor expresión.
3. Puf3 no es el receptor de los mRNAs en la membrana externa mitocondrial.

Perspectivas

1. Ya que no se logró observar la expresión de Oxa1 en la cepa silvestre se deberán mejorar los métodos de detección. Para esto se planea realizar protocolos más sensibles como RT-PCR semicuantitativo.
2. Para descartar que los efectos observados se deban a distintas tasas de traducción entre las cepas, se planea realizar ensayos de pulso-caza en donde Oxa1 se marque con radiactividad y posteriormente se inmunoprecipite para observar los niveles de proteína sintetizada en un curso temporal en cada una de las cepas.
3. Para verificar el modelo propuesto, debemos generar una construcción en la que el 3'UTR y la presecuencia sean eliminados. Si el modelo es correcto esta cepa no debería de poder respirar incluso bajo condiciones de sobreexpresión.
4. Analizar la localización de las construcciones *in vivo* utilizando el sistema de las secuencias MS2.
5. Además de Puf3 hay otras proteínas candidato (Tom20, Ssd1 o Tom70) para ser el receptor de los mRNAs en la membrana externa mitocondrial. Por lo que se propone generar dobles mutantes y repetir el enfoque realizado con Puf3 para tratar de identificarlo.
6. Demostrar el rol funcional de estas regiones en otros genes (*COX17* y *FUM1*) para demostrar que éste no es un fenómeno exclusivo de *OXA1*.

Apéndices

Apéndice I. Lista de los mRNAs descritos en la figura 11C

Li mRNAs localizados, con sitio de reconocimiento de Puf3 y que codifican para una proteína con una extensión N-terminal (n=9)

ORF	Gen
YDR116C	<i>MRPL1</i>
YDR194C	<i>MSS116</i>
YER141W	<i>COX15</i>
YER154W	<i>OXA1</i>
YGR112W	<i>SHY1</i>
YIL022W	<i>TIM44</i>
YIL093C	<i>RSM25</i>
YMR193W	<i>MRPL24</i>
YOR187W	<i>TUF1</i>

I.ii mRNAs localizados, con sitio de reconocimiento de Puf3 y que no codifican para una proteína con una extensión N-terminal (n=3)

ORF	Gen
YCR046C	<i>IMG1</i>
YDR041W	<i>RSM10</i>
YEL050C	<i>RML2</i>

I.iii mRNAs no localizados, con sitio de reconocimiento de Puf3 y que codifican para una proteína con una extensión N-terminal (n=42)

ORF	Gen
YDR511W	<i>ACN9</i>
YNL315C	<i>ATP11</i>
YAL039C	<i>CYC3</i>
YPL059W	<i>GRX5</i>
YOR020C	<i>HSP10</i>
YCR071C	<i>IMG2</i>
YIL070C	<i>MAM33</i>
YHR024C	<i>MAS2</i>
YDR347W	<i>MRP1</i>
YGR084C	<i>MRP13</i>
YDR405W	<i>MRP20</i>
YBL090W	<i>MRP21</i>
YKL167C	<i>MRP49</i>
YNL005C	<i>MRP7</i>
YKL003C	<i>MRP17</i>
YNL284C	<i>MRPL10</i>
YDL202W	<i>MRPL11</i>
YNL185C	<i>MRPL19</i>
YNL177C	<i>MRPL22</i>
YOR150W	<i>MRPL23</i>
YBR282W	<i>MRPL27</i>
YBR122C	<i>MRPL36</i>
YPL173W	<i>MRPL40</i>
YNR022C	<i>MRPL50</i>
YHR147C	<i>MRPL6</i>
YJL063C	<i>MRPL8</i>
YPL013C	<i>MRPS16</i>
YMR188C	<i>MRPS17</i>
YDR337W	<i>MRPS28</i>
YBR251W	<i>MRPS5</i>
YBR146W	<i>MRPS9</i>
YNL137C	<i>NAM9</i>
YER058W	<i>PET117</i>
YOR158W	<i>PET123</i>

ORF	Gen
YNR037C	<i>RSM19</i>
YKL155C	<i>RSM22</i>
YGL129C	<i>RSM23</i>
YDR175C	<i>RSM24</i>
YEL020W-A	<i>TIM9</i>
YNL131W	<i>TOM22</i>
YOR045W	<i>TOM6</i>
YML025C	<i>YML6</i>

Liv mRNAs localizados, sin sitio de reconocimiento de Puf3 y que codifican para una proteína con una extensión N-terminal (n=80)

ORF	Gen
YBL015W	<i>ACH1</i>
YLR304C	<i>ACO1</i>
YEL052W	<i>AFG1</i>
YJR080C	<i>AIM24</i>
YHR199C	<i>AIM46</i>
YER080W	<i>AIM9</i>
YLR089C	<i>ALT1</i>
YBL099W	<i>ATP1</i>
YBR039W	<i>ATP3</i>
YBL098W	<i>BNA4</i>
YGR150C	<i>CCM1</i>
YKR066C	<i>CCP1</i>
YCL064C	<i>CHA1</i>
YOR356W	<i>CIR2</i>
YNR001C	<i>CIT1</i>
YPR001W	<i>CIT3</i>
YML110C	<i>COQ5</i>
YBL045C	<i>COR1</i>
YPL132W	<i>COX11</i>
YOR065W	<i>CYT1</i>
YDL178W	<i>DLD2</i>
YOR317W	<i>FAA1</i>
YER182W	<i>FMP10</i>
YPL262W	<i>FUM1</i>
YHR100C	<i>GEP4</i>
YDR508C	<i>GNP1</i>
YIL155C	<i>GUT2</i>
YER014W	<i>HEM14</i>
YLR259C	<i>HSP60</i>
YDR342C	<i>HXT7</i>
YNL037C	<i>IDH1</i>
YOR136W	<i>IDH2</i>
YDL066W	<i>IDP1</i>
YLR355C	<i>ILV5</i>

ORF	Gen
YCL009C	<i>ILV6</i>
YGR031W	<i>IMO32</i>
YKL217W	<i>JEN1</i>
YIL125W	<i>KGD1</i>
YDR148C	<i>KGD2</i>
YNL071W	<i>LAT1</i>
YNL104C	<i>LEU4</i>
YOR108W	<i>LEU9</i>
YOR196C	<i>LIP5</i>
YFL018C	<i>LPD1</i>
YOR142W	<i>LSC1</i>
YGR244C	<i>LSC2</i>
YIL094C	<i>LYS12</i>
YKL150W	<i>MCR1</i>
YKL085W	<i>MDH1</i>
YOR232W	<i>MGE1</i>
YKL195W	<i>MIA40</i>
YLR203C	<i>MSS51</i>
YMR145C	<i>NDE1</i>
YML120C	<i>NDI1</i>
YCL017C	<i>NFS1</i>
YPL134C	<i>ODC1</i>
YIL136W	<i>OM45</i>
YBR221C	<i>PDB1</i>
YGR231C	<i>PHB2</i>
YBL022C	<i>PIM1</i>
YIL042C	<i>PKP1</i>
YGL008C	<i>PMA1</i>
YBL064C	<i>PRX1</i>
YPR191W	<i>QCR2</i>
YEL024W	<i>RIP1</i>
YML091C	<i>RPM2</i>
YNL026W	<i>SAM50</i>
YBR037C	<i>SCO1</i>

ORF	Gen
YKL148C	<i>SDH1</i>
YLL041C	<i>SDH2</i>
YKL141W	<i>SDH3</i>
YBR263W	<i>SHM1</i>
YGR236C	<i>SPG1</i>
YBR044C	<i>TCM62</i>
YGR033C	<i>TIM21</i>
YJL054W	<i>TIM54</i>
YNL121C	<i>TOM70</i>
YHR117W	<i>TOM71</i>
YDL015C	<i>TSC13</i>
YMR302C	<i>YME2</i>

I.v mRNAs no localizados, sin sitio de reconocimiento de Puf3 y que codifican para una proteína con una extensión N-terminal (n=279)

ORF	Gen
YBR085W	<i>AAC3</i>
YKL106W	<i>AAT1</i>
YGL119W	<i>ABC1</i>
YMR072W	<i>ABF2</i>
YDL203C	<i>ACK1</i>
YKL192C	<i>ACP1</i>
YAL054C	<i>ACS1</i>
YDR226W	<i>ADK1</i>
YMR282C	<i>AEP2</i>
YER017C	<i>AFG3</i>
YPR021C	<i>AGC1</i>
YFL030W	<i>AGX1</i>
YER087W	<i>AIM10</i>
YIL087C	<i>AIM19</i>
YJL131C	<i>AIM23</i>
YJR100C	<i>AIM25</i>
YNL100W	<i>AIM37</i>
YOR215C	<i>AIM41</i>
YPR004C	<i>AIM45</i>
YOR374W	<i>ALD4</i>
YER073W	<i>ALD5</i>
YML086C	<i>ALO1</i>
YER069W	<i>ARG5,6</i>
YDR376W	<i>ARH1</i>
YNR002C	<i>ATO2</i>
YJL180C	<i>ATP12</i>
YLR295C	<i>ATP14</i>
YPL271W	<i>ATP15</i>
YDL004W	<i>ATP16</i>
YDR377W	<i>ATP17</i>
YML081C-A	<i>ATP18</i>
YMR098C	<i>ATP25</i>
YDR298C	<i>ATP5</i>
Q0085	<i>ATP6</i>

ORF	Gen
YKL016C	<i>ATP7</i>
YHR208W	<i>BAT1</i>
YJL060W	<i>BNA3</i>
YKR036C	<i>CAF4</i>
YML042W	<i>CAT2</i>
YGR174C	<i>CBP4</i>
YBR120C	<i>CBP6</i>
YDR197W	<i>CBS2</i>
YPR025C	<i>CCL1</i>
YEL061C	<i>CIN8</i>
YGR207C	<i>CIR1</i>
YJL062W-A	<i>COA3</i>
YOL008W	<i>COQ10</i>
YNR041C	<i>COQ2</i>
YBR203W	<i>COS111</i>
YLR038C	<i>COX12</i>
YJL003W	<i>COX16</i>
YLL009C	<i>COX17</i>
Q0275	<i>COX3</i>
YGL187C	<i>COX4</i>
YNL052W	<i>COX5A</i>
YHR051W	<i>COX6</i>
YMR256C	<i>COX7</i>
YLR395C	<i>COX8</i>
YDL067C	<i>COX9</i>
YDR155C	<i>CPR1</i>
YML078W	<i>CPR3</i>
YMR264W	<i>CUE1</i>
YJR048W	<i>CYC1</i>
YOR037W	<i>CYC2</i>
YEL039C	<i>CYC7</i>
YDR430C	<i>CYM1</i>
YNL112W	<i>DBP2</i>
YOL021C	<i>DIS3</i>

ORF	Gen
YDR069C	<i>DOA4</i>
YMR287C	<i>DSS1</i>
YBR176W	<i>ECM31</i>
YDR036C	<i>EHD3</i>
YMR031C	<i>EIS1</i>
YOL071W	<i>EMI5</i>
YML008C	<i>ERG6</i>
YAR002C-A	<i>ERP1</i>
YGR029W	<i>ERV1</i>
YBR026C	<i>ETR1</i>
YER015W	<i>FAA2</i>
YPL231W	<i>FAS2</i>
YER183C	<i>FAU1</i>
YHL021C	<i>FMP12</i>
YDR070C	<i>FMP16</i>
YBR047W	<i>FMP23</i>
YMR115W	<i>FMP24</i>
YPL103C	<i>FMP30</i>
YOR286W	<i>FMP31</i>
YFL046W	<i>FMP32</i>
YGL080W	<i>FMP37</i>
YMR157C	<i>FMP39</i>
YNL168C	<i>FMP41</i>
YGR243W	<i>FMP43</i>
YGR052W	<i>FMP48</i>
YBR262C	<i>FMP51</i>
YER004W	<i>FMP52</i>
YNL256W	<i>FOL1</i>
YNL135C	<i>FPR1</i>
YOR271C	<i>FSF1</i>
YAL008W	<i>FUN14</i>
YAL019W	<i>FUN30</i>
YMR232W	<i>FUS2</i>
YMR189W	<i>GCV2</i>

ORF	Gen
YAL044C	<i>GCV3</i>
YPR184W	<i>GDB1</i>
YAL048C	<i>GEM1</i>
YLR091W	<i>GEP5</i>
YDL198C	<i>GGC1</i>
YIR024C	<i>GIF1</i>
YPL137C	<i>GIP3</i>
YOR040W	<i>GLO4</i>
YHR183W	<i>GND1</i>
YER020W	<i>GPA2</i>
YKL152C	<i>GPM1</i>
YDR513W	<i>GRX2</i>
YIR038C	<i>GTT1</i>
YMR192W	<i>GYL1</i>
YDR232W	<i>HEM1</i>
YOR176W	<i>HEM15</i>
YOR227W	<i>HER1</i>
YMR110C	<i>HFD1</i>
YPR006C	<i>ICL2</i>
YER078C	<i>ICP55</i>
YMR108W	<i>ILV2</i>
YJL082W	<i>IML2</i>
YDL181W	<i>INH1</i>
YPR067W	<i>ISA2</i>
YER048W-A	<i>ISD11</i>
YPL040C	<i>ISM1</i>
YPL135W	<i>ISU1</i>
YPL155C	<i>KIP2</i>
YHR186C	<i>KOG1</i>
YNL239W	<i>LAP3</i>
YKR063C	<i>LAS1</i>
YLR239C	<i>LIP2</i>
YPL004C	<i>LSP1</i>
YDR234W	<i>LYS4</i>

ORF	Gen
YKL029C	<i>MAE1</i>
YLR163C	<i>MAS1</i>
YBR185C	<i>MBA1</i>
YOR298C-A	<i>MBF1</i>
YBR227C	<i>MCX1</i>
YPL270W	<i>MDL2</i>
YLR069C	<i>MEF1</i>
YGL125W	<i>MET13</i>
YJR144W	<i>MGM101</i>
YDR296W	<i>MHR1</i>
YJR077C	<i>MIR1</i>
YBR084W	<i>MIS1</i>
YIL149C	<i>MLP2</i>
YMR177W	<i>MMT1</i>
YPL224C	<i>MMT2</i>
YCL057C-A	<i>MOS1</i>
YGR235C	<i>MOS2</i>
YPR166C	<i>MRP2</i>
YPL118W	<i>MRP51</i>
YLR312W-A	<i>MRPL15</i>
YBL038W	<i>MRPL16</i>
YDR462W	<i>MRPL28</i>
YCR003W	<i>MRPL32</i>
YPR100W	<i>MRPL51</i>
YNR036C	<i>MRPS12</i>
YIR021W	<i>MRS1</i>
YOR334W	<i>MRS2</i>
YBR091C	<i>MRS5</i>
YOR354C	<i>MSC6</i>
YOL033W	<i>MSE1</i>
YPR047W	<i>MSF1</i>
YNL073W	<i>MSK1</i>
YPR134W	<i>MSS18</i>
YPL097W	<i>MSY1</i>

ORF	Gen
YDL044C	<i>MTF2</i>
YMR097C	<i>MTG1</i>
YPR155C	<i>NCA2</i>
YHR004C	<i>NEM1</i>
YPL226W	<i>NEW1</i>
YKL040C	<i>NFU1</i>
YGL221C	<i>NIF3</i>
YLR335W	<i>NUP2</i>
YJL104W	<i>PAM16</i>
YKR065C	<i>PAM17</i>
YPR002W	<i>PDH1</i>
YGR193C	<i>PDX1</i>
YBL030C	<i>PET9</i>
YPL206C	<i>PGC1</i>
YER053C	<i>PIC2</i>
YPR113W	<i>PIS1</i>
YGL059W	<i>PKP2</i>
YOR266W	<i>PNT1</i>
YMR129W	<i>POM152</i>
YNL055C	<i>POR1</i>
YIL114C	<i>POR2</i>
YMR267W	<i>PPA2</i>
YPL148C	<i>PPT2</i>
YNL169C	<i>PSD1</i>
YHR037W	<i>PUT2</i>
YHR001W-A	<i>QCR10</i>
YFR033C	<i>QCR6</i>
YDR529C	<i>QCR7</i>
YJL166W	<i>QCR8</i>
YGR183C	<i>QCR9</i>
YOR048C	<i>RAT1</i>
YML030W	<i>RCF1</i>
YNR018W	<i>RCF2</i>
YOR285W	<i>RDL1</i>

ORF	Gen
YLR059C	<i>REX2</i>
YPR165W	<i>RHO1</i>
YCR028C-A	<i>RIM1</i>
YKL132C	<i>RMA1</i>
YGL107C	<i>RMD9</i>
YIL066C	<i>RNR3</i>
YOR151C	<i>RPB2</i>
YKR094C	<i>RPL40B</i>
YDR450W	<i>RPS18A</i>
YER074W	<i>RPS24A</i>
YNL213C	<i>RRG9</i>
YJR101W	<i>RSM26</i>
YGR215W	<i>RSM27</i>
YDR494W	<i>RSM28</i>
YKL212W	<i>SAC1</i>
YHR083W	<i>SAM35</i>
YGL229C	<i>SAP4</i>
YBR024W	<i>SCO2</i>
YDR178W	<i>SDH4</i>
YLR105C	<i>SEN2</i>
YJR095W	<i>SFC1</i>
YLR383W	<i>SMC6</i>
YIL016W	<i>SNL1</i>
YDR011W	<i>SNQ2</i>
YJR104C	<i>SOD1</i>
YHR008C	<i>SOD2</i>
YEL031W	<i>SPF1</i>
YDL130W-A	<i>STF1</i>
YAL011W	<i>SWC3</i>
YPR095C	<i>SYT1</i>
YPR140W	<i>TAZ1</i>
YGR192C	<i>TDH3</i>
YBL088C	<i>TEL1</i>
YJR019C	<i>TES1</i>

ORF	Gen
YDR322C-A	<i>TIM11</i>
YGR181W	<i>TIM13</i>
YGR082W	<i>TOM20</i>
YMR203W	<i>TOM40</i>
YPR133W-A	<i>TOM5</i>
YNL070W	<i>TOM7</i>
YCR083W	<i>TRX3</i>
YDR470C	<i>UGO1</i>
YJL109C	<i>UTP10</i>
YHL035C	<i>VMR1</i>
YOL129W	<i>VPS68</i>
YLR090W	<i>XDJ1</i>
YBL095W	-
YHR135C	<i>YCK1</i>
YCR004C	<i>YCP4</i>
YDL119C	-
YDL157C	-
YDR061W	-
YEL067C	-
YER140W	-
YGR234W	<i>YHB1</i>
YMR241W	<i>YHM2</i>
YJL113W	-
YJL133C-A	-
YJR003C	-
YJR039W	-
YJR085C	-
YKL196C	<i>YKT6</i>
YHL014C	<i>YLF2</i>
YLR290C	-
YLR419W	-
YBR104W	<i>YMC2</i>
YPR024W	<i>YME1</i>
YFR049W	<i>YMR31</i>

ORF	Gen
YKL067W	<i>YNK1</i>
YNL208W	-
YOR022C	-
YOR186W	-
YPR011C	-
YBR111C	<i>YSA1</i>
YOL109W	<i>ZE01</i>

I.vi mRNAs no localizados, con sitio de reconocimiento de Puf3 y que no codifican para una proteína con una extensión N-terminal (n=36)

ORF	Gen
YJL071W	<i>ARG2</i>
YDR375C	<i>BCS1</i>
YGR062C	<i>COX18</i>
YKL087C	<i>CYT2</i>
YBR179C	<i>FZ01</i>
YJL112W	<i>MDV1</i>
YHL004W	<i>MRP4</i>
YKR006C	<i>MRPL13</i>
YNL252C	<i>MRPL17</i>
YKR085C	<i>MRPL20</i>
YGR076C	<i>MRPL25</i>
YKL138C	<i>MRPL31</i>
YBR268W	<i>MRPL37</i>
YKL170W	<i>MRPL38</i>
YML009C	<i>MRPL39</i>
YLR439W	<i>MRPL4</i>
YMR225C	<i>MRPL44</i>
YJL096W	<i>MRPL49</i>
YDR237W	<i>MRPL7</i>
YGR220C	<i>MRPL9</i>
YNL306W	<i>MRPS18</i>
YGR165W	<i>MRPS35</i>
YMR158W	<i>MRPS8</i>
YGR028W	<i>MSP1</i>
YDL107W	<i>MSS2</i>
YGR257C	<i>MTM1</i>
YMR257C	<i>PET111</i>
YJR034W	<i>PET191</i>
YLR067C	<i>PET309</i>
YNR045W	<i>PET494</i>
YNL083W	<i>SAL1</i>
YLR139C	<i>SLS1</i>
YJL143W	<i>TIM17</i>
YPL252C	<i>YAH1</i>
YDR115W	-
YIL006W	<i>YIA6</i>

I.vii mRNAs localizados, sin sitio de reconocimiento de Puf3 y que no codifican para una proteína con una extensión N-terminal (n=60)

ORF	Gen
YLR356W	<i>ATG33</i>
YMR301C	<i>ATM1</i>
YLR393W	<i>ATP10</i>
YJR121W	<i>ATP2</i>
YPL078C	<i>ATP4</i>
YDR046C	<i>BAP3</i>
YGR286C	<i>BIO2</i>
YOR125C	<i>CAT5</i>
YPL215W	<i>CBP3</i>
YCR005C	<i>CIT2</i>
YOL096C	<i>COQ3</i>
YDR204W	<i>COQ4</i>
YDL248W	<i>COS7</i>
YPL172C	<i>COX10</i>
YNL130C	<i>CPT1</i>
YDR256C	<i>CTA1</i>
YML054C	<i>CYB2</i>
YDL174C	<i>DLD1</i>
YER166W	<i>DNF1</i>
YLL001W	<i>DNM1</i>
YFR044C	<i>DUG1</i>
YDR039C	<i>ENA2</i>
YGL139W	<i>FLC3</i>
YPL222W	<i>FMP40</i>
YDL222C	<i>FMP45</i>
YDR019C	<i>GCV1</i>
YML048W	<i>GSF2</i>
YHL032C	<i>GUT1</i>
YFL011W	<i>HXT10</i>
YDR343C	<i>HXT6</i>
YNL009W	<i>IDP3</i>
YER086W	<i>ILV1</i>
YJR016C	<i>ILV3</i>
YOR221C	<i>MCT1</i>

ORF	Gen
YFL016C	<i>MDJ1</i>
YAL010C	<i>MDM10</i>
YGL219C	<i>MDM34</i>
YOL027C	<i>MDM38</i>
YOR211C	<i>MGM1</i>
YGL143C	<i>MRF1</i>
YML128C	<i>MSC1</i>
YGR147C	<i>NAT2</i>
YHR042W	<i>NCP1</i>
YJR051W	<i>OSM1</i>
YER178W	<i>PDA1</i>
YPL036W	<i>PMA2</i>
YHR076W	<i>PTC7</i>
YDL140C	<i>RPO21</i>
YJR045C	<i>SSC1</i>
YJR117W	<i>STE24</i>
YLR251W	<i>SYM1</i>
YGR046W	<i>TAM41</i>
YPL063W	<i>TIM50</i>
YKR042W	<i>UTH1</i>
YDL027C	-
YER077C	-
YJL045W	-
YPR125W	<i>YLH47</i>
YNL195C	-
YBR054W	<i>YRO2</i>

Apéndice II. Oligonucleótidos

II.i Oligonucleótidos utilizados para la obtención de mutantes

Nombre	Secuencia (5'-3') ¹	T _m (°C)
01Hphf	GTA TCT GTT CAC GTA CAA GCG GAG CCA CAG AAT AAC CTC CCC GAC GCC AGC TGA AGC TTC GTA CGC	60.8
01Hphr	GAG TTT TAT ATT TTT ATA TTT ACA GAG AGA TAT AGA GCC TTT ATT TCG ATG AAT TCG AGC TCG TT	55.2

* En negritas se indica la región homóloga a *OXA1*.

II.ii Oligonucleótidos utilizados para verificar mutantes

Nombre	Región de alineamiento	Secuencia (5'-3')	Sitio de restricción	T _m (°C)
P3Pf	Promotor (<i>PUF3</i>)	AGC GAG CTC GGA AAA AGA AAA ATA AGT GGT GC	SacI	54.9
P3Tr	Terminador (<i>PUF3</i>)	GAG CTC GAG TGT TAA ATT CTC TAT CTG TTG CAG	XhoI	55.7
O1Pf	Promotor (<i>OXA1</i>)	GGC GAG CTC ACA TTT TCC CGT TTA AAC TGC	SacI	53.9
O1Tr	Terminador (<i>OXA1</i>)	GCG CTC GAG TTT GAA TAA AGT ACA TCA GCA TG	XhoI	54.9
KanR	ORF (<i>KanMX</i>)	GGC AGT TCC ATA GGA TGG CA	-	59.6
HphR	ORF (<i>Hph</i>)	GCA ATC GCG CAT ATG AAA TC	-	54

II.iii Oligonucleótidos utilizados para clonar *OXA1* y en la generación de sondas

Nombre	Región de alineamiento	Secuencia (5'-3')	Sitio de restricción	Tm (°C)
O1Pf	Promotor	GGC GAG CTC ACA TTT TCC CGT TTA AAC TGC	SacI	53.9
O1Tr	Terminador	GCG CTC GAG TTT GAA TAA AGT ACA TCA GCA TG	XhoI	54.9
O1Uf	3'UTR	GCT GAA TTC ATA AAG GCT CTA TAT CTC TCT G	EcoRI	55
O1UIf	3'UTR	GCT CTC GAG ATA AAG GCT CTA TAT CTC TCT G	XhoI	55
O1UIr	3'UTR	GCT GAA TTC TTT GAA TAA AGT ACA TCA GCA TG	EcoRI	57
O10Br	ORF	GCT GGA TCC TCA TTT TTT GTT ATT AAT GAA GTT TGA TTT GTG	BamHI	58
O1Pr	Promotor	GGC GGA TCC CGT CGG GGA GGT TAT TCT GTG	BamHI	61.7
O10Mf	ORF (MTS)	GCT GGA TCC ATG AAT TCG ACG GGC CCA AAT GC	BamHI	59
O1MAf	MTS	GAT GGA TCC TTG TTC AAA CTC ACC TCT TCG	BamHI	54
O1Mr1	MTS	AAA GAG ATC CAA GAC GGA TGG	-	57
O1Mr2	MTS	GAT GGA TCC AAA TCT TTT GGC CTG AAA AGA GAT C	BamHI	54
O10Xr	ORF	GCT CCC GGG TCA TTT TTT GTT ATT AAT GAA GTT TGA TTT GTG	XmaI	58

Apéndice III. Medios de Cultivo

LB

Cloruro de sodio (NaCl)	1% p/v
Bactotripton	1% p/v
Extracto de levadura	0.5% p/v

Ampicilina	100 µg/mL
Bactoagar	2% p/v

YPD

Glucosa	2% p/v
Bactopeptona	2% p/v
Extracto de levadura	1% p/v

Bactoagar	2% p/v
-----------	--------

YPEG

Etanol	2% v/v
Glicerol	2% v/v
Bactopeptona	2% p/v
Extracto de levadura	1% p/v

Bactoagar	2% p/v
-----------	--------

Medio sintético con glucosa (SD)

Glucosa	2% p/v
Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos	0.17% p/v
Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0.5% p/v
Sulfato de adenina	20 µg/mL
Uracilo	20 µg/mL
L-triptófano	20 µg/mL
L-histidina	20 µg/mL
L-metionina	20 µg/mL
L-lisina	30 µg/mL
L-leucina	120 µg/mL

Bactoagar	2% p/v
-----------	--------

Apendice IV. Soluciones

IV.i DNA

IV.i.a Purificación

IV.i.a.i Plásmidos

Amortiguador TENS

Tris-HCl pH 7.5	10 mM
EDTA	1 mM
NaOH	100 mM
SDS	0.5% p/v

Solución de neutralización

Acetato de sodio pH 4.9	3 M
-------------------------	-----

IV.i.a.ii DNA genómico

Amortiguador de lisis

Tritón X-100	2% v/v
SDS	1% v/v
NaCl	100 mM
Tris-HCl pH 8.0	1 mM
EDTA pH 8.0	1 mM

IV.i.b Electroforesis

Amortiguador de corrida (TAE)

Tris	40 mM
EDTA pH 8.0	1 mM
Ácido acético	0.114% (v/v)

Amortiguador de carga

Glicerol	5% (v/v)
Azul de bromofenol	0.041% (p/v)
Xilen cianol	0.041% (p/v)

IV.i.c Clonación

Amortiguador de Digestión

Tris-acetato pH 8.3	33 mM
Acetato de potasio	62.5 mM
Acetato de magnesio	10 mM
Espermidina	4 mM
Ditioeritritol	0.5 mM

Amortiguador de Desfosforilación (NEB)

Tris-HCl pH 7.9	50 mM
MgCl ₂	10 mM
NaCl	100 mM
Ditiotritol	1 mM

Amortiguador de Ligación (NEB)

Tris-HCl pH 7.5	50 mM
MgCl ₂	10 mM
Ditiotritol	10 mM
ATP	1 mM

IV.ii RNA

IV.ii.a Electroforesis

Amortiguador de corrida (MOPS)

MOPS (ácido 3-(<i>N</i> -morpholino) propanosulfónico)	200 mM
Acetato de sodio	500 mM
EDTA	10 mM

Amortiguador de carga

Glicerol	50% (v/v)
EDTA pH 8.0	10 mM
Azul de Bromofenol	0.25 (p/v)
Xilen cianol	0.25 (p/v)

IV.ii.b Transferencia

SSC 20X

NaCl	3 M
Citrato de sodio tribásico dihidratado	300 mM

Ajustar el pH a 7.0 con HCl.

IV.ii.c Bloqueo, hibridación y lavados

Solución de *Denhardt* 50X

Albúmina bovina sérica	1% (p/v)
Ficoll	1% (p/v)
Polivinilpirrolidona	1% (p/v)

Esterilizar por filtración (0.45mm)

Amortiguador de hibridación

Solución de <i>Denhardt</i>	5X
SSC	5X
SDS	0.5% (p/v)
DNA de esperma de salmón	100 µg/mL

Solución de desnaturalización

NaOH	1 M
EDTA pH 8.0	1 mM

Solución de lavado I

SSC	2X
SDS	0.2% (p/v)

Solución de lavado II

SSC	0.2X
SDS	0.2% (p/v)

IV.iii Proteínas

IV.iii.a Extracción

Solución de Rödel

NaOH	10 M
PMSF	20 mM
β-mercaptoetanol	7.4% (v/v)

IV.iii.b Electroforesis

Amortiguador de carga (LAE, (Laemmli, 1970))

Tris-HCl pH 6.8	60 mM
Glicerol	10% (v/v)
SDS	2% (p/v)
β-mercaptoetanol	5% (v/v)
Azul de bromofenol	0.02% (p/v)

Amortiguador de corrida

Glicina	385 mM
Tris-HCl pH 8.4	50 mM
SDS	0.1% (p/v)

IV.iii.c Transferencia

Amortiguador de transferencia

Glicina	192 mM
Tris	24.76 mM
SDS	0.1% (p/v)
Metanol	20% (v/v)

Tinción de Ponceau

Rojo de Ponceau	0.2% (p/v)
Ácido tricloroacético (TCA)	3% (p/v)

IV.iii.d Bloqueo y Lavados

Solución de bloqueo

NaCl	150 mM
Tris-HCl pH 7.5	10 mM
Leche en polvo (Nestlé)	5% (p/v)

TBS-T

NaCl	150 mM
Tris-HCl pH 7.5	10 mM
Triton X-100	0.1-1% (v/v)

TBS

NaCl	150 mM
Tris-HCl pH 7.5	10 mM

Referencias

Ahmed, A.U. y Fisher, P.R. (2009). Import Of Nuclear-Encoded Mitochondrial Proteins: A Cotranslational Perspective. *International Review of Cell and Molecular Biology* 273, 49–68.

Alberts, B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Walter P. (2008). *Molecular Biology of the Cell. 5ª ed.* (Garland Publishers).

Amberg, D., Burke, D. y Strathern, J.N. (2005). *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Bauer, M., Behrens, M., Esser, K. y Michaelis, G. (1994). PET1402, a nuclear gene required for proteolytic processing of cytochrome oxidase subunit 2 in yeast. *Mol. Gen. Genet.* 245, 272-278

Beach, D., Salmon, E. y Bloom, K. (1999). Localization and anchoring of mRNA in budding yeast. *Current Biology* 9, 569–578.

Beisang, D. y Bohjanen, P.R. (2012). Perspectives on the ARE as it turns 25 years old. *WIREs RNA*.

Bertrand, E., Chartrand, P., Schaefer, M., Shenoy, S., y Singer, R. (1998). Localization of *ASH1* mRNA Particles in Living Yeast. *Molecular Cell* 2, 437–445.

Blobel, G. (1999). Nobel Lecture.

Bonnefoy, N. y Fox, T.D. (2000). In vivo analysis of mutated initiation codons in the mitochondrial *COX2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* fused to the reporter gene *ARG8m* reveals lack of downstream reinitiation. *Mol. Gen. Genet.* 262, 1036–1046.

Brachmann, C., Davies, A., Cost, G., Caputo, E., Li, J., Hieter, P. y Boeke, J. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14, 115–132.

Chacinska, A., Koehler, C., Milenkovic, D., Lithgow, T. y Pfanner, N. (2009). Importing Mitochondrial Proteins: Machineries and Mechanisms. *Cell* 138, 628–644.

Christianson, T., Sikorski, R., Dante, M., Shero, J. y Hieter, P. (1992). Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* 110, 119–122.

Corral-Debrinsky, M., Blugeon, C. y Jacq, C. (2000). In yeast, the 3' untranslated region or the presequence of *ATM1* is required for the exclusive localization of its mRNA to the vicinity of mitochondria. *Molecular and Cellular Biology* 20, 7881–7892.

Cross, B.C.S., Sinning, I., Luirink, J. y High, S. (2009). Delivering proteins for export from the cytosol. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 255–264.

Daniel Gietz, R. y Woods, R.A. (2002). *Methods in Enzymology: Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology-Part B*. 350, 87-96

Eliyahu, E., Lesnik, C. y Arava, Y. (2012). The protein chaperone Ssa1 affects mRNA localization to the mitochondria. *FEBS Letters* 586, 64–69.

Eliyahu, E., Pnueli, L., Melamed, D., Scherrer, T., Gerber, A.P., Pines, O., Rapaport, D. y Arava, Y. (2009). Tom20 Mediates Localization of mRNAs to Mitochondria in a Translation-Dependent Manner. *Molecular and Cellular Biology* 30, 284–294.

Ellis, E. y Reid, G. (1993). The *Saccharomyces cerevisiae* *MTS1* gene encodes a putative RNA-binding protein involved in mitochondrial. *Gene* 132, 175–183.

Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N. y Purnelle, B. (1998). The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 440, 325–331.

Fujiki, M. y Verner, K. (1991). Coupling of protein synthesis and mitochondrial import in a homologous yeast in vitro system. *J. Biol. Chem.* 266, 6841–6847.

Funes, S. y Herrmann, J.M. (2007). Analysis of mitochondrial protein synthesis in yeast. *Methods Mol. Biol.* 372, 255–263.

Gadir, N., Haim-Vilmovsky, L., Kraut-Cohen, J. y Gerst, J.E. (2011). Localization of mRNAs coding for mitochondrial proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 17, 1551–1565.

Garcia, M., Darzacq, X., Delaveau, T., Jourden, L., Singer, R.H. y Jacq, C. (2007). Mitochondria-associated yeast mRNAs and the biogenesis of molecular complexes. *Molecular Biology of the Cell* 18, 362–368.

Garcia, M., Delaveau, T., Goussard, S. y Jacq, C. (2010). Mitochondrial presequence and open reading frame mediate asymmetric localization of messenger RNA. *EMBO Reports* 11, 285–291.

Garcia-Rodriguez, L.J., Gay, A.C. y Pon, L.A. (2007). Puf3p, a Pumilio family RNA binding protein, localizes to mitochondria and regulates mitochondrial biogenesis and motility in budding yeast. *The Journal of Cell Biology* 176, 197–207.

Gerber, A., Herschlag, D. y Brown, P. (2004). Extensive Association of Functionally and Cytotopically Related mRNAs with Puf Family RNA-Binding Proteins in Yeast. *Plos Biology* 2, e79.

Giaever, G., Chu, A.M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Véronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., André, B., et al. (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418, 387–391.

Goldstein, A.L. y McCusker, J.H. (1999). Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15, 1541–1553.

Gratzer, S., Bellharz, T., Beddoe, T., Henry, M. y Lithgow, T. (2000). The mitochondrial protein targeting suppressor (*mts1*) mutation maps to the mRNA binding domain of Npl3p and affects translation on cytoplasmic polysomes. *Molecular Microbiology* 35, 1277–1285.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166, 557–580.

Hartl, F.U., Ostermann, J., Guiard, B. y Neupert, W. (1987). Successive translocation into and out of the mitochondrial matrix: targeting of proteins to the intermembrane space by a bipartite signal peptide. *Cell* 51, 1027–1037.

Hay, R., Böhni, P. y Gasser, S. (1984). How mitochondria import proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta* 779, 65–87.

He, S. y Fox, T.D. (1997). Membrane translocation of mitochondrially coded Cox2p: distinct requirements for export of N and C termini and dependence on the conserved protein Oxa1p. *Molecular Biology of the Cell* 8, 1449–1460.

Hell, K., Herrmann, J., Pratje, E., Neupert, W. y Stuart, R.A. (1997). Oxa1p mediates the export of the N- and C-termini of pCoxII from the mitochondrial matrix to the intermembrane space. *FEBS Letters* 418, 367–370.

Herrmann, J.M. y Hell, K. (2005). Chopped, trapped or tacked – protein translocation into the IMS of mitochondria. *Trends in Biochemical Sciences* 30, 205–212.

Herrmann, J.M., Neupert, W., Stuart R.A. (1997) Insertion into the mitochondrial inner membrane of a polytopic protein, the nuclear-encoded Oxa1p. *EMBO J.* 16, 2217-2226.

Holt, C.E. y Bullock, S.L. (2009). Subcellular mRNA Localization in Animal Cells and Why It Matters. *Science* 326, 1212–1216.

Kellems, R., Allison, V.F. y Butow, R.A. (1975). Cytoplasmic type 80S ribosomes associated with yeast mitochondria. *The Journal of Cell Biology* 65, 1–14.

Kellems, R. y Butow, R. (1974). Cytoplasmic Type 80 S Ribosomes with Yeast Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 249, 3304–3310.

Knox, C., Sass, E., Neupert, W., Pines, O. (1998). Import into Mitochondria, Folding and Retrograde Movement of Fumarase in Yeast. *The Journal of Biological Chemistry.* 273, 25587-25593

Kutik, S., Stojanovski, D., Becker, L., Becker, T., Meinecke, M., Krüger, V., Prinz, C., Meisinger, C., Guiard, B., Wagner, R., et al. (2008). Dissecting membrane insertion of mitochondrial beta-barrel proteins. *Cell* 132, 1011–1024.

Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.

Liu, J.M. y Liu, D.R. (2007) Discovery of a mRNA mitochondrial localization element in *Saccharomyces cerevisiae* by nonhomologous random recombination and in vivo selection. *Nucleic Acid Research* 35, 6750-6761.

Loya, A., Pnueli, L., Yosefzon, Y., Wexler, Y., Ziv-Ukelson, M. y Arava, Y. (2008). The 3'-UTR mediates the cellular localization of an mRNA encoding a short plasma membrane protein. *RNA* 14, 1352–1365.

Marc, P., Margeot, A., Devaux, F., Blugeon, C., Corral-Debrinsky, M. y Jacq, C. (2002). Genome-wide analysis of mRNAs targeted to mitochondria. *EMBO Reports* 31, 159–164.

Margeot, A., Blugeon, C., Sylvestre, J., Vialette, S., Jacq, C. y Corral-Debrinski, M. (2002). In *Saccharomyces cerevisiae*, *ATP2* mRNA sorting to the vicinity of mitochondria is essential for respiratory function. *EMBO J.* 21, 6893–6904.

Mewes, H.W., Albermann, K., Bähr, M., Frishman, D., Gleissner, A., Hani, J., Heumann, K., Kleine, K., Maierl, A., Oliver, S.G., et al. (1997). Overview of the yeast genome. *Nature* 387, 7–65.

Milenkovic, D., Gabriel, K., Guiard, B., Schulze-Specking, A., Pfanner, N. y Chacinska, A. (2007). Biogenesis of the essential Tim9-Tim10 chaperone complex of mitochondria: site-specific recognition of cysteine residues by the intermembrane space receptor Mia40. *J. Biol. Chem.* 282, 22472–22480.

Model, K., Meisinger, C. y Kühlbrandt, W. (2008). Cryo-electron microscopy structure of a yeast mitochondrial preprotein translocase. *Journal of Molecular Biology* 383, 1049–1057.

Müller, M., Heuck, A. y Niessing, D. (2006). Directional mRNA transport in eukaryotes: lessons from yeast. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64, 171–180.

Nevo-Dinur, K., Nussbaum-Schohat, A., Ben-Yehuda, S., Amster-Choder, O. (2011) Translation-Independent Localization of mRNA in *E. coli*. *Science*. 331, 1081-1084.

Olivas, W. y Parker, R. (2000). The Puf3 protein is a transcript-specific regulator of mRNA degradation in yeast. *EMBO J.* 19, 6602–6611.

Preiss, T., Muckenthaler, M. y Hentze, M.W. (1998). Poly(A)-tail-promoted translation in yeast: implications for translational control. *RNA* 4, 1321–1331.

Quenault, T., Lithgow, T. y Traven, A. (2011). PUF proteins: repression, activation and mRNA localization. *Trends in Cell Biology* 21, 104–112.

Saitoh, T., Igura, M., Obita, T., Ose, T., Kojima, R., Maenaka, K., Endo, T. y Kohda, D. (2007). Tom20 recognizes mitochondrial presequences through dynamic equilibrium among multiple bound states. *EMBO J.* *26*, 4777–4787.

Sambrook, J. y Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3^a ed.* (Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Schmidt, O., Pfanner, N. y Meisinger, C. (2010). Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *11*, 655–667.

Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H.E., Schönfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A. y Guiard, B. (2003). The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* *100*, 13207.

Sikorski, R. y Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *122*, 19–27.

St Johnston, D. (2005). Moving Messages: The intracellular localization of mRNAs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *6*, 363–375.

Subramanian, M., Rage, F., Tabet, R., Flatter, E., Mandel, J.-L. y Moine, H. (2011). G-quadruplex RNA structure as a signal for neurite mRNA targeting. *EMBO Reports* *12*, 697–704.

Suissa, M. y Schatz, G. (1982). Import of proteins into mitochondria. *J. Biol. Chem.* *257*, 13048–13055.

Sylvestre, J., Margeot, A., Jacq, C., Dujardin, G. y Corral-Debrinsky, M. (2003). The role of the 3'untranslated region in mRNA sorting to the vicinity of mitochondria is conserved from yeast to human cells. *Molecular Biology of the Cell* *14*, 3848–3856.

Thomas, B.J. y Rothstein, R. (1989). Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* *56*, 619–630.

van Wilpe, S., Ryan, M.T., Hill, K., Maarse, A.C., Meisinger, C., Brix, J., Dekker, P.J., Moczko, M., Wagner, R., Meijer, M., et al. (1999). Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase. *Nature* *401*, 485–489.

Vögtle, F.N., Wortelkamp, S., Zahedi, R.P., Becker, D., Leidhold, C., Gevaert, K., Kellermann, J., Voos, W., Sickmann, A., Pfanner, N., et al. (2009). Global Analysis of the Mitochondrial N-Proteome Identifies a Processing Peptidase Critical for Protein Stability. *Cell* *139*, 428–439.

Wickens, M., Bernstein, D., Kimble, J. y Parker, R. (2002). A PUF family portrait: 3'UTR regulation as a way of life. *Trends in Genetics* *18*, 150–157.

Yogev, O., Karniely, S. y Pines, O. (2007). Translation-coupled Translocation of Yeast Fumarase into Mitochondria in vivo. *J. Biol. Chem.* *282*, 29222–29229.

Zipor, G., Haim-Vilmovsky, L., Gelin-Licht, R., Gadir, N., Brocard, C. y Gerst, J.E. (2009). Localization of mRNAs coding for peroxisomal proteins in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* *106*, 19848.