



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

“Estudio del mecanismo de activación de la traducción del mRNA de *COX1* en mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA: ANGELICA RAQUEL ZAMUDIO OCHOA

TUTORA: DRA. XOCHITL PÉREZ MARTÍNEZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

CO-TUTOR: DR. ROBERTO CORIA ORTEGA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

CO-TUTOR: DR. FEDERICO MARTÍNEZ MONTES,
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, D.F. OCTUBRE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Reconocimientos

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

Se extiende un agradecimiento especial a la Dra. Yolanda Camacho Villasana del Instituto de Fisiología Celular, UNAM por la asesoría y participación en este trabajo.

Se agradece al Comité tutorial conformado por:

- Dra. Xochitl Pérez Martínez del Instituto de Fisiología Celular
- Dr. Roberto Coria Ortega del Instituto de Fisiología Celular
- Dr. Federico Martínez Montes de la Facultad de Medicina

por la asesoría, apoyo y valiosos comentarios a este trabajo.

Se agradece al Jurado integrado por:

- Dr. Félix Recillas Targa
- Dr. Roberto Coria Ortega
- Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova
- Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez
- Dra. Patricia León Mejía

Se agradece la asesoría técnica de la Dra. Soledad Funes y a la QBP Miriam Vazquez Acevedo del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Se reconoce el apoyo de la Dra. Teresa Lara Ortiz del Departamento de Bioquímica y Biología estructural del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Se agradece a la Dra. Faviola Tavares Carreón por cepas y experimentos preliminares.

Este trabajo fue apoyado por CONACyT (47514), PAPIIT (IN208711, IN204414) y la Fundación Miguel Alemán A.C.

Durante la realización de este trabajo conté con una beca de doctorado por parte de CONACyT (298954).

Agradecimientos

A mis padres, por su gran ejemplo de dedicación y trabajo, por apoyar todos mis sueños incondicionalmente y no permitir que me rindiera a pesar de todas las dificultades.

Nelson, gracias por acompañarme en este camino. Me siento muy feliz de tenerte como compañero de vida.

A Xochitl, porque tu inteligencia, paciencia y dedicación son mi modelo a seguir. Gracias por ser una tutora tan entregada y tan presente en nuestra formación.

Yola, no pude haber encontrado una mejor compañera de trabajo que tú. Trabajar contigo me animaba a seguir adelante a pesar de los obstáculos. ¡Lo logramos!

A Aldo, por tu apoyo y amistad incondicional. Espero algún día poder retribuirte todo lo bueno que has hecho por mí.

A Alexis, porque además de ser un gran ejemplo de dedicación y trabajo duro, también me has demostrado que nuestra amistad es para siempre.

Itzhel, gracias por estar en mi vida y aceptarme tal como soy. Pasar el tiempo contigo es la proporción ideal de risas y reflexiones sobre el mundo.

Emmy, gracias por hacerme reír y por escuchar mis problemas, aunque sea la versión resumida.

Gracias a mis compañeros del labo Aldo, Emmy, Juan Pablo, Rodolfo y Yola por hacer que el trabajo fuera aún más divertido.

Contenido

Abreviaturas	7
Resumen	9
Abstract	11
Introducción	13
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudio	13
La mitocondria	13
La cadena respiratoria de <i>S. cerevisiae</i>	14
La citocromo <i>c</i> oxidasa	16
El genoma mitocondrial	17
La transcripción y traducción en mitocondria de <i>S. cerevisiae</i>	18
Los activadores traduccionales de <i>S. cerevisiae</i>	20
Pet309	22
Mss51	24
Justificación	26
Hipótesis	27
Objetivos	27
Material y métodos	29
Obtención de mutantes de <i>PET309</i>	29
Transformación de las levaduras	30
Obtención de la fracción mitocondrial cruda	30
Cuantificación de proteínas por Lowry modificado	32
Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE)	33
Western blot	33
Traducción <i>in vivo</i> (ivTL) de proteínas mitocondriales a partir de células completas	35
Northern blot	36
Separación de complejos proteicos con gradientes de sacarosa	39
Inmunoprecipitación de complejos de proteína-RNA	39
Southern blot	44
Inmunoprecipitación con traducción <i>in organello</i> en presencia de puromicina	44

Resultados	46
<u>Primera sección: estudio de la interacción de Pet309 y Mss51 con el mRNA de <i>COXI</i></u>	47
Pet309 interactúa con el mRNA de <i>COXI</i>	47
La interacción entre Pet309 y el mRNA de <i>COXI</i> no depende de ribosomas tradicionalmente activos	50
Los 8 motivos PPR centrales de Pet309 no son indispensables para la interacción entre Pet309 y el mRNA de <i>COXI</i>	52
La ausencia de los 12 motivos PPR centrales reduce la afinidad de Pet309 por el mRNA de <i>COXI</i>	52
No se detectó interacción entre Mss51 y el mRNA de <i>COXI</i>	59
Resumen de resultados de la primera sección	60
<u>Segunda sección: estudio de la interacción de Pet309 y Mss51 con el ribosoma mitocondrial</u>	62
Pet309 interactúa con el ribosoma mitocondrial	62
El mRNA de <i>COXI</i> no es necesario para la interacción entre Pet309 y el ribosoma	64
La interacción entre Pet309 y el ribosoma depende de la región amino terminal de Pet309	66
Mss51 interactúa con el ribosoma mitocondrial	71
El mRNA de <i>COXI</i> no es necesario para la interacción entre Mss51 y el ribosoma	73
Resumen de los resultados de la segunda sección	74
<u>Tercera sección: estudio sobre la interacción física y funcional entre Pet309 y Mss51</u>	75
Pet309 y Mss51 interactúan físicamente	75
La ausencia de Mss51 modifica la interacción entre Pet309 y el mRNA de <i>COXI</i>	76
Mss51 no es necesaria para la interacción entre Pet309 y el ribosoma	80
Pet309 no es necesaria para la interacción entre Mss51 y el ribosoma	80
Resumen de los resultados de la tercera sección	82

Discusión	83
Conclusiones	97
Perspectivas	98
Apéndice 1. Artículo derivado de este trabajo	100
Apéndice 2. Otros artículos derivados de mi trabajo en el laboratorio	115
Apéndice 3. Cepas de levadura, amortiguadores y secuencias de oligonucleótidos	117
Bibliografía	126

Abreviaturas

- 5'UTR Región no traducida en el extremo 5' del RNA mensajero (del inglés "untranslated region")
- ATP Adenosín trifosfato
- *ATP6* Gen de la subunidad 6 de la ATPasa
- *ATP8* Gen de la subunidad 8 de la ATPasa
- *ATP9* Gen de la subunidad 9 de la ATPasa
- *COB* Gen del citocromo *b*
- *CcO* Citocromo *c* oxidasa
- *COX1* Gen de la subunidad 1 de la *CcO*
- *Cox1* Subunidad 1 de la *CcO*
- *COX2* Gen de la subunidad 2 de la *CcO*
- *Cox2* Subunidad 2 de la *CcO*
- *COX3* Gen de la subunidad 3 de la *CcO*
- *Cox3* Subunidad 3 de la *CcO*
- CS Citrato sintasa
- DDM n-dodecil- β -D-maltósido
- DEPC Dietil pirocarbonato
- DTT Ditiotreitol
- EIM Espacio intermembranal
- G6PDH Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
- HA Hemaglutinina
- MEM Membrana externa mitocondrial
- MIM Membrana interna mitocondrial
- MOPS Ácido 3-(N-morfolino) propanesulfónico
- PEG-3350 Polietilenglicol 3350
- PMSF Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- PPR Siglas en inglés de Pentatricopeptide repeat
- PVDF Fluoruro de polivinilideno

- TCA Ácido tricloroacético
- TEMED N,N',N',N'-tetrametil-etileno-diamina
- TLCK Hidrocloruro de N α -tosil-L-lisina clorometilcetona

Resumen

En el genoma mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae* se codifican 8 proteínas. Tres de ellas; Cox1, Cox2 y Cox3, forman parte del complejo IV de la cadena respiratoria o citocromo *c* oxidasa (CcO). Cox1 es la proteína más grande e hidrofóbica de la CcO, y su traducción se encuentra acoplada al estado de ensamblaje de dicho complejo. La traducción mitocondrial es un proceso poco comprendido tanto en *S. cerevisiae* como en otros organismos, incluyendo al humano. Los activadores traduccionales son proteínas que actúan en el extremo 5' no traducido (5'UTR) de su mRNA mitocondrial blanco para dar inicio a su traducción. Se cree que estas proteínas posicionan al ribosoma mitocondrial en el codón de inicio del mRNA, aunque esta hipótesis no se ha comprobado. Los activadores traduccionales del mRNA de *COXI* de *S. cerevisiae* son Pet309 y Mss51. Pet309 contiene motivos de unión a RNA llamados motivos PPR (del inglés Pentatricopeptide repeats), que podrían participar en su interacción con el extremo 5'UTR del mRNA de *COXI*. Pet309 también participa en la estabilización del mRNA de *COXI*, el cual se acumula cuando Pet309 se sobreexpresa. Por otro lado, además de activar la traducción de *COXI*, Mss51 también interactúa con la proteína Cox1 recién sintetizada, acoplando el estado de ensamblaje de Cox1 con su síntesis.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el mecanismo por el que Pet309 y Mss51 activan la traducción del mRNA de *COXI*. Para ello estudiamos la interacción de ambos activadores con el mRNA de *COXI* por medio de coimmunoprecipitación de complejos de proteína-RNA y RT-PCR. Encontramos que Pet309 interactúa con el mRNA de *COXI* independientemente de una traducción mitocondrial activa. Los motivos PPR de Pet309 mostraron un comportamiento cooperativo en la unión del mRNA. Sin embargo, no detectamos la asociación de Mss51 con el mRNA de *COXI*, lo que podría indicar que dicha interacción es transitoria, débil o que se da a través de otras proteínas. Para entender más sobre el mecanismo de acción de Pet309 y Mss51, se estudió la asociación de ambas proteínas con el ribosoma mitocondrial por medio de gradientes de sacarosa. Encontramos que Pet309 y Mss51 interactúan con la maquinaria traduccional independientemente de la presencia del mRNA de *COXI*, lo que significa que dicha interacción no depende de una traducción activa de *COXI*. A pesar de que en este trabajo

se detectó una interacción física entre Pet309 y Mss51, la presencia de Mss51 no fue necesaria para la interacción de Pet309 con el ribosoma, y viceversa. No obstante, la ausencia de Mss51 causó que la interacción de Pet309 con el mRNA de *COXI* fuera indetectable. Sin embargo, la sobreexpresión de Pet309 en un fondo *mss51Δ* acumuló al mRNA de *COXI* a los mismos niveles que una cepa silvestre. Esto indica que la ausencia de Mss51 provoca un cambio en la interacción entre Pet309 y el mRNA de *COXI*.

Considerando estos datos, proponemos un modelo de acción en el que Mss51 capacita a Pet309 para que pueda interactuar con una región específica en el extremo 5'UTR del mRNA de *COXI* y así posicionar al ribosoma en el codón AUG de inicio.

Abstract

The mitochondrial genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* codes for eight proteins, three of them; Cox1, Cox2 and Cox3, are part of the Complex IV of the respiratory chain or cytochrome *c* oxidase (CcO). Cox1 is the largest and most hydrophobic subunit of CcO and its translation is coupled to the assembly of this complex.

In human, *S. cerevisiae* and other organisms, mitochondrial translation is a poorly understood mechanism. Translational activators are proteins that act on the 5' untranslated region (5'UTR) of its target mRNA to initiate translation. It has been proposed that the function of these proteins is to locate the mitochondrial ribosome on the initiation codon of the target mRNA, although this hypothesis has not been proven.

The translational activators of *COX1* mRNA are Pet309 and Mss51. Pet309 has Pentatricopeptide repeats (PPR) that could participate on the interaction with the 5'UTR *COX1* mRNA. In addition, Pet309 participates in the stabilization of the *COX1* mRNA, which accumulates when Pet309 is overexpressed. The function of Mss51 also maps to the *COX1* mRNA 5'UTR, but in addition, Mss51 interacts with the newly synthesized Cox1 protein, coupling assembly of Cox1 with its synthesis.

The aim of this work was to study the mechanism of translation activation of *COX1* mRNA driven by Pet309 and Mss51. To achieve this, we studied the interaction of both factors with the *COX1* mRNA by immunoprecipitating protein-RNA complexes and by analyzing the immunoprecipitates through RT-PCR. We discovered that Pet309 interacts with *COX1* mRNA and that translation does not need to be active for this interaction to take place. PPR motifs in Pet309 showed a cooperative behavior in the binding of this mRNA. In contrast, we were not able to detect an interaction between Mss51 and the *COX1* mRNA, which may indicate that this interaction is weak or transient. To understand more about the mechanism of action of Pet309 and Mss51, we analyzed the association of both proteins with the mitochondrial ribosome through centrifugation on sucrose gradients. We found that Pet309 and Mss51 interact with the translational machinery independently on the presence of the *COX1* mRNA, which means that translation of *COX1* does not need to be active for these interactions to take place.

We demonstrated a physical interaction between Pet309 and Mss51. However, Mss51 was not necessary for the interaction of Pet309 with the mitoribosome and vice versa. Absence of Mss51 caused an undetectable interaction between Pet309 and the *COXI* mRNA. However, overexpression of Pet309 in a $\Delta mss51$ background accumulated *COXI* mRNA at the same levels as a wild type strain. This indicates that the absence of Mss51 causes a change in the interaction between Pet309 and the *COXI* mRNA.

We propose a model in which Mss51 makes Pet309 able to interact with a specific region on the *COXI* mRNA 5'UTR. After this interaction, Pet309 could position the ribosome on the initiation codon on the mRNA.

Introducción

Saccharomyces cerevisiae como modelo de estudio

Saccharomyces cerevisiae es un hongo unicelular facultativo que puede reproducirse cada 90 minutos en condiciones óptimas de laboratorio (Simon & Bedalov, 2004). Su genoma nuclear puede manipularse fácil y rápidamente por recombinación homóloga y en su forma haploide es posible obtener mutantes nulas con un solo evento de recombinación. Su genoma mitocondrial también puede modificarse por medio de biobalística (Larosa & Remacle, 2013). Su carácter facultativo es ideal para estudiar el metabolismo respiratorio, ya que las mutaciones en genes respiratorios que en otros organismos serían letales, en *S. cerevisiae* únicamente afectan su crecimiento en medios respiratorios (como etanol o glicerol) y no en medios fermentables (como glucosa) (Duina et al, 2014). Todas estas características hacen de *S. cerevisiae* un muy buen modelo para estudios genéticos y bioquímicos de la función mitocondrial.

La mitocondria

La mitocondria es el organelo especializado en la producción de energía en forma de ATP. Está compuesta de dos membranas: la membrana externa y la membrana interna, y de dos compartimentos: el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial.

La presencia de porinas en la membrana externa la hace altamente permeable, ya que permite el paso de moléculas pequeñas (menores a 5 kDa) y de iones (D. Nelson, 2005). En esta membrana también se encuentra el complejo TOM (de "Transport of the Outer Membrane") que participa en la importación de proteínas al organelo (Endo & Yamano, 2010; Lill & Neupert, 1996).

Por el contrario, la membrana interna es impermeable a casi todas las moléculas y iones incluyendo protones (H^+), por lo que las moléculas que cruzan esta membrana lo hacen por medio de transportadores específicos (D. Nelson, 2005). El complejo TIM (de "Transport of the Inner Membrane") se encuentra embebido en la membrana interna y permite el paso de proteínas hacia la matriz mitocondrial (Berthold et al, 1995; Mokranjac & Neupert, 2010). En esta membrana también se encuentran los complejos respiratorios y la ATP sintasa. La membrana interna mitocondrial forma invaginaciones conocidas como crestas mitocondriales, las cuales podrían jugar un papel en la formación

de microambientes que favorecen una fosforilación oxidativa mas eficiente (Chaban et al, 2014; Davies et al, 2012a) .

Entre la membrana externa y la membrana interna se encuentra el espacio intermembranal. En él se localizan diversos factores que participan en la importación de proteínas y en la biogénesis de los complejos respiratorios. Los complejos respiratorios bombean protones hacia este compartimento, lo que hace al espacio intermembranal ligeramente más ácido que la matriz mitocondrial (Porcelli *et al*, 2005).

En la matriz mitocondrial se encuentran muchas enzimas que participan en el metabolismo energético, como la piruvato deshidrogenasa y las enzimas del ciclo de Krebs, así como un gran número de intermediarios metabólicos (Alberts, 2002). En la matriz también se encuentra el DNA mitocondrial junto con toda su maquinaria de mantenimiento y expresión.

La presencia del DNA mitocondrial es una de las muchas evidencias que apoyan el origen endosimbionte de la mitocondria. Existen dos modelos principales sobre el origen de la endosimbiosis. En el modelo arquezoanico se propone que el huésped del endosimbionte fue un eucarionte amitochondriado (Koonin, 2010; Margulis, 1970). Por el contrario, en el modelo simbiogénico se propone que el huésped fue una arquea, lo que implicaría que la compartimentalización y formación del núcleo tuvo lugar luego del fenómeno de endosimbiosis (Koonin, 2010; Martin & Muller, 1998). Este último escenario es el más aceptado por la comunidad científica (Gray, 2012). Por medio de árboles filogenéticos se ha mostrado que la bacteria que dio origen a la mitocondria fue una α proteobacteria (Yang et al, 1985), específicamente del orden de las Rickettsiales (Williams et al, 2007).

La cadena respiratoria de *S. cerevisiae*

La cadena clásica de transporte de electrones se compone de 4 complejos multiméricos embebidos en la membrana interna mitocondrial. Estos complejos son llamados NADH:ubiquinona oxidoreductasa (Complejo I), succinato deshidrogenasa (Complejo II), ubiquinol citocromo *c* oxidoreductasa (Complejo III o complejo bc_1) y citocromo *c* oxidasa (Complejo IV o CcO). Los electrones provenientes del NADH y del FADH₂ son transferidos a través de los complejos I al IV hasta el último aceptor de electrones; el

oxígeno. Esta transferencia se encuentra acoplada al bombeo de protones (H^+) desde la matriz hacia el espacio intermembranal a través de la membrana interna mitocondrial por parte de los complejos I, III y IV (Stuart, 2008). El gradiente de protones formado en el espacio intermembranal es utilizado por la ATP sintasa para sintetizar ATP a partir de ADP y Pi (Mitchell, 1961).

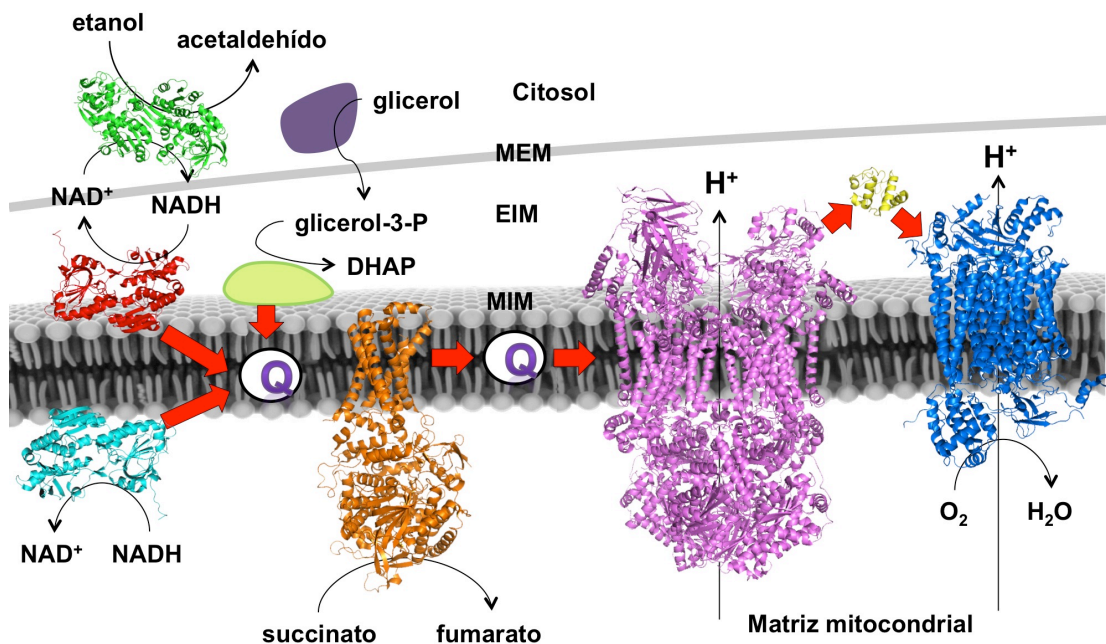


Figura 1. Modelo de la cadena respiratoria de *S. cerevisiae* y otras enzimas relevantes para este estudio. En el citosol, el etanol es transformado a acetaldehído por la etanol deshidrogenasa (*ADH2*, verde, PDB: 2HCY) quien dona los electrones al NAD^+ para formar NADH. El glicerol es fosforilado por la glicerol cinasa (*GUT1*, morado) para formar glicerol-3-P, el cual es convertido a dihidroxiacetona-P (DHAP) por la glicerol-3-P deshidrogenasa (*GUT2*, verde limón) quien dona los electrones a la ubiquinona (Q). El NADH citosólico es oxidado por la NADH deshidrogenasa externa (*NDE1*, *NDE2*, rojo PDB: 4G6G) y el NADH producido en la matriz mitocondrial es oxidado por la NADH deshidrogenasa interna (*NDII*, cyan, PDB: 4G6G). La ubiquinona es el receptor de electrones en ambos casos. En la vía del ciclo de Krebs, el succinato es oxidado a fumarato por la succinato deshidrogenasa o complejo II de la cadena respiratoria (naranja, PDB: 3SFD) y los electrones son donados a la ubiquinona. El complejo bc1 o Complejo III (magenta, PDB: 3CX5) oxida la ubiquinona y dona los electrones al citocromo *c* (amarillo, PDB: 3W67) y también bombea protones (H^+) hacia el espacio intermembranal (EIM). La citocromo *c* oxidasa o Complejo IV (azul PDB: 3CY7) recibe los electrones del citocromo *c* y reduce al oxígeno (O_2) formando H_2O , y también bombea protones al espacio intermembranal. Membrana interna mitocondrial (MIM), membrana externa mitocondrial (MEM).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* no tiene complejo I. En su lugar contiene NADH deshidrogenasas adosadas a la membrana interna mitocondrial que, aunque son incapaces de translocar protones al espacio intermembranal, donan los electrones provenientes del NADH a la ubiquinona (figura 1) (Luttik et al, 1998; Marres et al, 1991; Melo et al, 2004).

El NADH que alimenta la cadena respiratoria es obtenido de la glucólisis y el ciclo de Krebs. Sin embargo, debido a enzimas presentes en la célula, la levadura puede obtener ATP si se alimenta con etanol y/o glicerol (figura 1), produciéndolo únicamente si cuenta con una cadena respiratoria funcional (Luttik et al, 1998). De esta forma es posible evaluar la capacidad respiratoria de *S. cerevisiae* de forma independiente a su capacidad para fermentar.

La citocromo *c* oxidasa

Nuestro grupo de trabajo está interesado en estudiar la biogénesis de la citocromo *c* oxidasa o Complejo IV (CcO) de *S. cerevisiae*, el cual es el último aceptor de electrones de la cadena respiratoria. La CcO de levadura consiste de 12 subunidades. Tres de ellas; Cox1, Cox2 y Cox3, se encuentran codificadas en el genoma mitocondrial. Cox1 es la proteína más hidrofóbica del complejo, ya que cruza 12 veces la membrana interna mitocondrial. Contiene dos grupos hemo y un ión de cobre que participan en la transferencia de electrones hacia el O₂, reduciéndolo a H₂O (D. Nelson, 2005). Además de ser la subunidad más grande y más hidrofóbica de la CcO, Cox1 es también la primera subunidad que se inserta en la membrana y el eje de ensamblaje de la CcO (Srinivasan & Avadhani, 2012) Su síntesis, la cual ocurre en la matriz mitocondrial, se encuentra finamente regulada por el estado de ensamblaje de la CcO (Barrientos et al, 2004; Perez-Martinez et al, 2003; Shingu-Vazquez et al, 2010).

El genoma mitocondrial

El número de proteínas codificadas en el DNA mitocondrial varía ampliamente entre especies. Mientras que el genoma mitocondrial del protista *Reclinomonas americana* codifica para 67 proteínas (Lang et al, 1997), el del parásito de la malaria *Plasmodium falciparum* sólo codifica para 3 (Feagin, 2000). Los genes de los RNAs ribosomales se encuentran universalmente codificados en el genoma mitocondrial (Gray, 2012).

El genoma mitocondrial de *S. cerevisiae* (figura 2) codifica para 8 proteínas, 7 de las cuales forman parte de los complejos respiratorios: Cob, componente del Complejo III; Cox1, Cox2 y Cox3, subunidades del Complejo IV; y Atp6, Atp8 y Atp9, subunidades de la ATP sintasa. También codifica para una proteína del ribosoma mitocondrial llamada Var1, un juego completo de tRNAs y los rRNAs (Foury et al, 1998). El resto de los componentes de los complejos respiratorios, así como las proteínas necesarias para la expresión de los genes mitocondriales, se sintetizan en el citosol y luego son importados por la mitocondria.

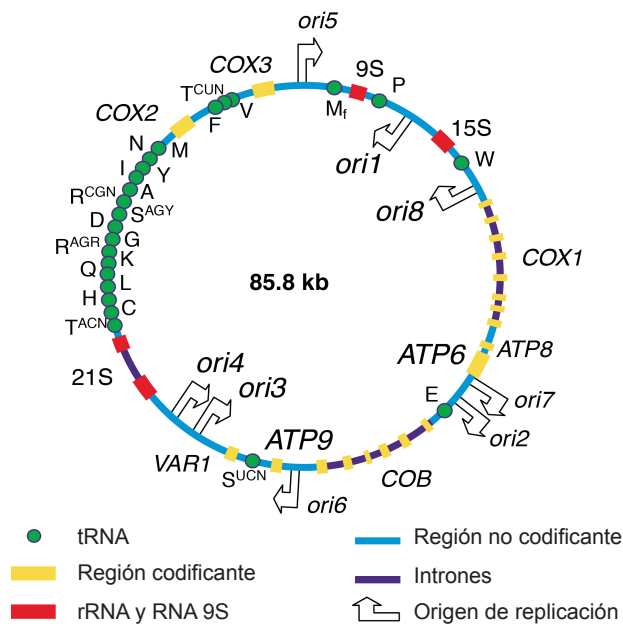


Figura 2. Representación circular del DNA mitocondrial de *S. cerevisiae*. Modificado de (Jacobs, 2001)

La mayor parte del DNA mitocondrial de la levadura se encuentra en forma concatamérica; esto significa que varias repeticiones del genoma se encuentran ordenadas en forma lineal (Maleszka et al, 1991). Debido al patrón de corte que mostraban las repeticiones lineales de este genoma, durante mucho tiempo se creyó que el genoma mitocondrial de *S. cerevisiae* era circular (Williamson, 2002).

El mantenimiento y expresión del DNA mitocondrial está controlado por varios factores codificados en el núcleo. Un grupo de ellos forman parte del nucleoide: una estructura nucleoproteica donde el DNA mitocondrial se encuentra empacado junto con chaperonas y otras proteínas (Kucej et al, 2008). El genoma mitocondrial es replicado por la DNA polimerasa γ , codificada por el gen nuclear *MIP1*. Las cepas que carecen de este gen pierden al DNA mitocondrial de inmediato, convirtiéndose en lo que es llamado cepa ρ^0 (ρ^0) (Foury, 1989; Merz & Westermann, 2009). Ni la DNA polimerasa ni la RNA polimerasa mitocondriales derivan del endosimbionte, sino de un bacteriófago tipo T7 que aparentemente infectó a la bacteria previamente a la endosimbiosis (Shutt & Gray, 2006).

La transcripción y traducción en mitocondria de *S. cerevisiae*

La RNA polimerasa mitocondrial consta de dos componentes: la subunidad catalítica Rpo41 y el factor transcripcional Mtf1 (Lisowsky & Michaelis, 1989). Dicha holoenzima sintetiza 12 transcritos, en su mayoría policistrónicos (Dieckmann & Staples, 1994), de los cuales muchos tRNAs se obtienen cuando RNAsas específicas procesan sus extremos 3' y 5' (Fekete et al, 2008; Osinga et al, 1984; Wiesenberger & Fox, 1997). Tres de los genes del genoma mitocondrial de *S. cerevisiae* pueden tener intrones: *COX1*, *COB* y el rRNA *21S* (Foury et al, 1998). Algunos de estos intrones codifican para madurasas que, junto con otras proteínas de origen nuclear, participan en el proceso de splicing (Costanzo & Fox, 1990). Los extremos 3' de los transcritos codificantes para proteínas se forman por un corte en una secuencia dodecamérica conservada (Zhu et al, 1987). En algunos policistrones, este corte separa RNAs mensajeros y permite una traducción independiente, aunque este no siempre es el caso. Por ejemplo: *COX1*, *ATP8* y *ATP6* se encuentran en dicho orden en el mismo policistrón (Simon & Faye, 1984). El extremo

3' del mRNA de *COXI* se procesa previamente a su traducción. Por el contrario, *ATP8* y *ATP6* pueden traducirse sin ser procesados (Pelissier et al, 1992).

Contrario a lo observado en el citosol y en mitocondrias de otros organismos, los mRNAs mitocondriales de *S. cerevisiae* no se poliadenilan en el extremo 3' UTR (Gagliardi et al, 2004).

Los extremos 5' pueden formarse por varios procesos, como la remoción de un tRNA río arriba, un corte en el dodecámero río arriba o inicio de la transcripción sin ningún procesamiento posterior. En la levadura, los extremos 5' no traducidos (5'UTR) suelen ser más largos que los de otros organismos y tienen un papel importante en la regulación de su traducción (Fox, 1996; Herrmann et al, 2013).

La traducción mitocondrial de todos los organismos difiere mucho de la traducción citosólica y comparte un mayor número de características con la traducción bacteriana. Prueba de ello es la presencia mitocondrial de homólogos de casi todos los factores de inicio, elongación y terminación bacteriana (Hallberg & Larsson, 2014), así como la gran cantidad de proteínas del ribosoma mitocondrial no universalmente conservadas que tienen un homólogo procarionte (Graack & Wittmann-Liebold, 1998).

Los ribosomas mitocondriales muestran una amplia variación en sus características y en el número y propiedades de sus constituyentes. Su coeficiente de sedimentación varía desde 80S en ciliados, 70-74S en hongos, 77-78S en plantas superiores y 55S en animales (Kitakawa & Isono, 1991). Este valor de sedimentación variable es el resultado de la diferencia en la proporción proteína:RNA. Esta proporción varía desde 1:1 en levadura hasta 2:1 en mamífero. Los mitoribosomas de animales y hongos contienen 2 moléculas de rRNA, que en el caso de *S. cerevisiae* son el 15S y el 21S rRNA. Se han descubierto cerca de 80 proteínas en los mitoribosomas de *S. cerevisiae*. (Woellhaf et al, 2014).

Existen proteínas que anclan a los mitoribosomas a la membrana interna mitocondrial (Bauerschmitt et al, 2010), lo que provoca que todas las proteínas codificadas en el genoma mitocondrial se sinteticen cerca de la membrana. Esto facilita la inserción co-traduccional de las subunidades más hidrofóbicas de los complejos respiratorios (Ott & Herrmann, 2010; Ott et al, 2006). Cabe destacar que una de las proteínas de anclaje de los ribosomas es Oxa1, el principal translocador de proteínas de la membrana interna mitocondrial (Szyrach et al, 2003).

Los activadores traduccionales de *S. cerevisiae*

Una diferencia importante entre la traducción mitocondrial y la bacteriana es la ausencia de una secuencia tipo Shine-Dalgarno en los mRNAs mitocondriales (Fox, 1996). La secuencia Shine-Dalgarno consiste de 4 a 9 residuos de purina que se localizan entre 8 a 13 pares de bases río arriba del codón de inicio. Esta secuencia se aparea con el rRNA *16S* colocando al AUG de inicio en el sitio P del ribosoma. De esta forma el ribosoma bacteriano identifica el codón correcto para dar inicio a la traducción (Lewin, 2008). Por otro lado, el ribosoma citosólico eucarionte escanea al RNA mensajero hasta encontrar el primer codón AUG, sitio donde inicia la traducción. Este tampoco es el mecanismo por el cual el ribosoma mitocondrial encuentra el codón de inicio, ya que existen otros codones AUG río arriba del sitio de inicio de la traducción en los mRNAs mitocondriales, e incluso si el codón de inicio se muta a un codón GUG, la traducción comienza en el sitio correcto (Bonney & Fox, 2000). La ausencia de una secuencia tipo Shine-Dalgarno en los mRNAs mitocondriales, así como la falta de escaneo ribosomal, plantea la pregunta de cómo es que el mitorribosoma encuentra el codón de inicio de la traducción. En levadura se ha propuesto que un conjunto de factores llamados activadores traduccionales cumplen con esta función (Fox, 1996; Herrmann et al, 2013). Cada RNA mensajero mitocondrial tiene su propio activador traduccional específico que actúa en el extremo 5' no traducido (5'UTR) de dicho mRNA (Herrmann et al, 2013). Esto significa que la activación de la traducción de cada gen mitocondrial depende de su extremo 5'UTR y no de su región codificante. Por ejemplo, Pet111 es el activador traduccional del mRNA de *COX2*, por lo que en su ausencia *Cox2* no se sintetiza (Poutre & Fox, 1987). Sin embargo, si el extremo 5'UTR del mRNA de *COX2* es intercambiado por el del mRNA de *COX3*, la traducción de *COX2* dependerá de los activadores de *COX3* y la ausencia de Pet111 no tiene efecto alguno (Mulero & Fox, 1993).

En la tabla 1 se presentan los activadores traduccionales de cada mRNA mitocondrial.

Todos los activadores traduccionales estudiados hasta la fecha han mostrado ser proteínas localizadas en la membrana interna mitocondrial y orientadas hacia la matriz. Esta ubicación apoya el modelo en el cual la inserción membranal de las proteínas codificadas en el genoma mitocondrial sucede de forma co-traduccional (Ott & Herrmann, 2010).

Tabla 1. Activadores traduccionales en <i>S. cerevisiae</i>		
Gen	Activador(es) traduccional(es)	Referencia(s)
mitocondrial		
<i>VARI</i>	Sov1	(Herrmann et al, 2013)
<i>COB</i>	Cbs1, Cbs2, Cbp1, Cbp3, Cbp6	(Gruschke et al, 2011; Islas-Osuna et al, 2002; Rodel, 1986)
<i>COX1</i>	Pet309, Mss51	(Manthey & McEwen, 1995; Perez-Martinez et al, 2003)
<i>COX2</i>	Pet111	(Poutre & Fox, 1987)
<i>COX3</i>	Pet54, Pet122, Pet494	(Brown et al, 1994; Haffter et al, 1990)
<i>ATP6/8</i>	Atp22	(Helfenbein et al, 2003)
<i>ATP9</i>	Aep1, Aep2	(Ackerman et al, 1991; Payne et al, 1991)

Se propone que los activadores traduccionales posicionan al ribosoma en el codón AUG de inicio del mRNA para activar su traducción (Herrmann et al, 2013). De acuerdo con esto, se ha comprobado la interacción física de Cbs2 con el ribosoma mitocondrial a partir de sus últimos 4 residuos (Krause-Buchholz et al, 2004). Por otro lado, existen mutaciones en proteínas de la subunidad pequeña ribosomal que suprimen el fenotipo no respiratorio causado por la eliminación de los últimos 60 aminoácidos de Pet122 (Haffter & Fox, 1992; McMullin et al, 1990). Esto sugiere una interacción física entre la región carboxilo terminal de Pet122 y proteínas de la subunidad pequeña del ribosoma mitocondrial.

No se ha comprobado *in vivo* la interacción de ningún activador traduccional y su mRNA blanco. Sin embargo, esta interacción se ha logrado comprobar *in vitro* para Pet54, definiendo la región de interacción en un fragmento de 137 nucleótidos dentro del extremo 5'UTR del mRNA de *COX3* (Kaspar et al, 2008).

En este trabajo nos enfocamos en estudiar el mecanismo de acción de los activadores traduccionales del mRNA de *COX1*: Pet309 y Mss51.

Pet309

Pet309 es una proteína de 965 aminoácidos y de 112 kDa que se encuentra en la matriz mitocondrial, adosada a la membrana interna de forma periférica (Tavares-Carreón et al, 2008). Al igual que todos los activadores traduccionales mitocondriales, actúa en el extremo 5'UTR del mRNA de *COXI* (Manthey & McEwen, 1995), su mRNA blanco. La ausencia de Pet309 provoca un fenotipo no respiratorio debido a que Cox1 no se sintetiza.

Dentro de la secuencia de Pet309 se predicen 22 motivos PPR ordenados en serie desde el aminoácido 53 hasta el aminoácido 958 (figura 3A) (Lipinski et al, 2011). Los motivos PPR participan en la interacción con moléculas de RNA (Small & Peeters, 2000), por lo que están presentes en proteínas que intervienen en procesos del metabolismo de RNA como transcripción, estabilidad, splicing, edición y traducción (Schmitz-Linneweber & Small, 2008). La familia de proteínas PPR es un grupo altamente representado en mitocondrias y cloroplastos de plantas (Barkan & Small, 2014), aunque se han identificado proteínas PPR en todos los eucariontes (Aphasizheva et al, 2011; Solotoff et al, 2014).

Una de las pocas estructuras obtenidas por cristalografía de una proteína PPR es la de PPR10 (Yin et al, 2013), que se une a una secuencia casi idéntica en dos mRNAs en el cloroplasto de maíz, estabilizándolos (Pfalz et al, 2009). Cada motivo PPR consta de 35 aminoácidos que forman dos α hélices antiparalelas. El conjunto de motivos PPR, que en el caso de PPR10 es de 19, se ensambla en una espiral superhelicoidal. En la estructura se observa a PPR10 como un homodímero en el que un monómero se intercala con el otro de forma antiparalela, por lo que el extremo amino terminal de un monómero interactúa con el extremo carboxilo terminal del otro monómero (figura 3B). La proteína también se cristalizó en presencia de uno de sus mRNAs blanco, con lo que se confirmó que cada motivo PPR une a un solo nucleótido de RNA y los aminoácidos 2, 5 y 35 de cada motivo confieren la especificidad a esta interacción (Yin et al, 2013). Se piensa que ésta es la estructura general de las proteínas PPR, aunque no se sabe si la dimerización es una característica general de las proteínas PPR o específica de PPR10.

Un modelo de Pet309 generado con el Software Robetta (<http://robetta.bakerlab.org>) se presenta en la figura 3C.

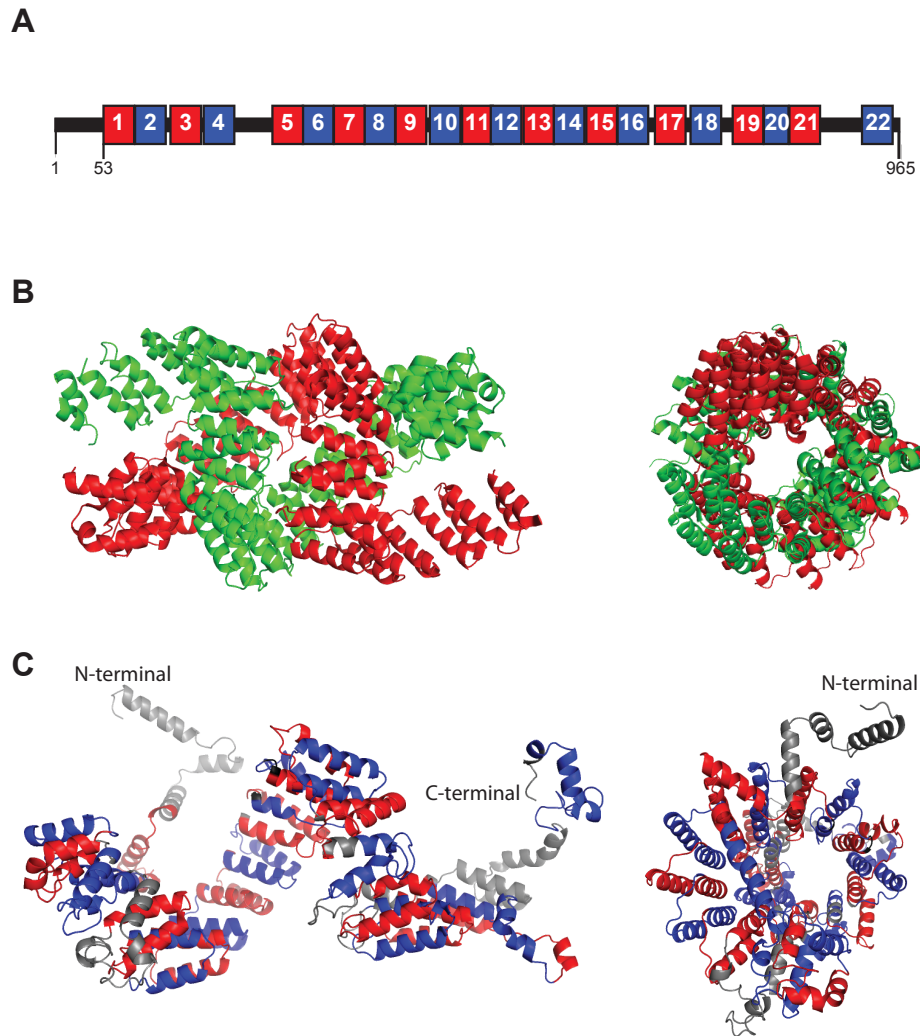


Figura 3. Estructura de las proteínas PPR. **A)** Diagrama lineal de Pet309 y sus repeticiones PPR predichas (Lipinski et al, 2011). En color blanco se indica el número de motivo PPR. En números negros se indican los residuos donde comienzan las repeticiones PPR (53) y el primer (1) y último (965) residuo de la proteína. **B)** Estructura obtenida por cristalografía del dímero de la proteína PPR10 (PDB: 4M59) (Yin et al, 2013). A la izquierda se muestra una vista lateral y a la derecha una vista superior. Los monómeros se muestran en rojo y verde. **C)** Estructura terciaria de los 22 motivos PPR de Pet309 predicha por el programa Robetta (<http://robetta.bakerlab.org>). Cada motivo PPR se encuentra coloreado como en A). Los residuos que no forman parte de un PPR predicho se muestran en gris. A la izquierda se muestra una vista lateral y a la derecha una vista superior. Se indica la localización de los extremos amino (N-terminal) y carboxilo (C-terminal) terminales.

En *S. cerevisiae* se han identificado 15 proteínas PPR, todas con ubicación mitocondrial (Lipinski et al, 2011). Pet309, Pet111, Cbp1, Aep2 y Atp22 son los activadores traduccionales de *S. cerevisiae* que contienen motivos PPR.

Además de participar en la activación de la traducción del mRNA de *COXI*, Pet309 también participa en la estabilización de dicho mRNA. En cepas en las que *COXI* tiene intrones, la ausencia de Pet309 provoca que el mRNA de *COXI* disminuya a niveles indetectables por ensayos de northern blot. Cuando el mRNA de *COXI* no tiene intrones, la ausencia de Pet309 no afecta su estabilidad (Manthey & McEwen, 1995). Sin embargo, si la proteína Pet309 se sobreexpresa, el mRNA de *COXI* se acumula hasta un 400% más que los niveles basales de la cepa silvestre (Tavares-Carreón et al, 2008). Esta acumulación y la presencia de motivos PPR, sugiere que Pet309 interactúa con el mRNA de *COXI* protegiéndolo de RNAsas. A pesar de esto, no se ha comprobado la interacción física entre Pet309 y el mRNA de *COXI*.

Mss51

Mss51 es una proteína de 436 aminoácidos y 51kDa. Al igual que Pet309, Mss51 es una proteína periférica de la membrana interna, orientada hacia la matriz mitocondrial (Barrientos et al, 2004). Además de activar la síntesis del mRNA de *COXI* actuando en su extremo 5'UTR (Perez-Martínez et al, 2009), Mss51 también interactúa con la proteína Cox1 recién sintetizada (Perez-Martínez et al, 2003). Dicha interacción forma parte de un circuito regulatorio que acopla la síntesis de Cox1 con el correcto ensamblaje de la CcO (figura 4) (Mick et al, 2010; Perez-Martínez et al, 2009).

Cox1 es la primera subunidad de la CcO que se inserta en la membrana y es el núcleo de ensamblaje del resto del complejo (Perez-Martínez et al, 2009; Srinivasan & Avadhani, 2012). Cuando alguna subunidad de la CcO no está presente, la síntesis de Cox1 se detiene (Barrientos et al, 2004). Se cree que ésta es una forma de proteger a la célula de subcomplejos ensamblados en la membrana mitocondrial que son generadores potenciales de especies reactivas de oxígeno (Khalimonchuk et al, 2007).

La interacción entre Mss51 y la proteína Cox1 se da en etapas tempranas del ensamblaje de la CcO, por lo que cuando dicho ensamblaje se encuentra completo, Mss51 se libera para continuar con su función en la activación traduccional del mRNA de *COXI*

(Barrientos et al, 2004; Perez-Martinez et al, 2003). La región carboxilo terminal de Cox1 participa en esta regulación, ya que la eliminación de dicha región abate el acoplamiento entre el ensamblaje de la CcO y la traducción de Cox1 (Shingu-Vazquez et al, 2010).

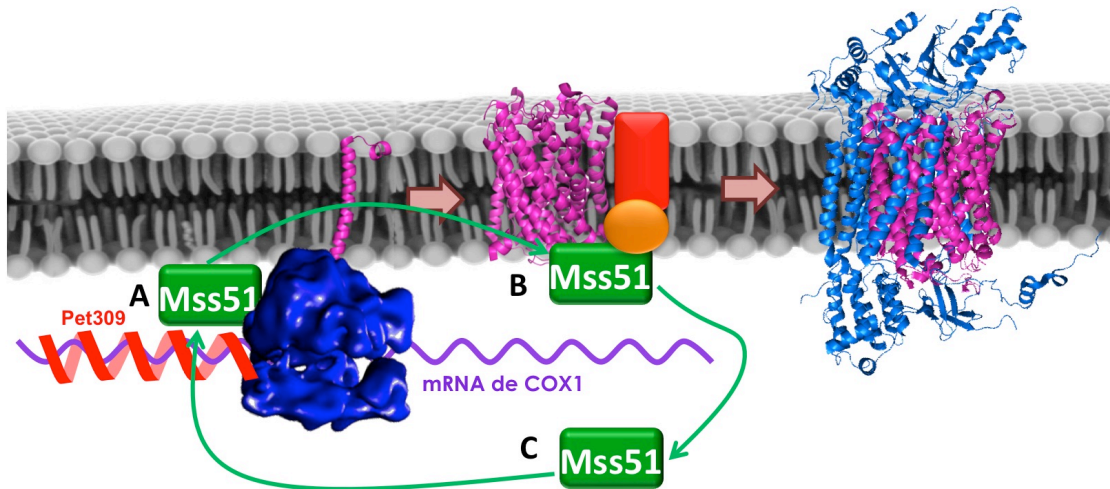


Figura 4. Circuito regulatorio de Mss51. **A)** Mss51 se requiere para activar la síntesis de Cox1, actuando en el extremo 5'UTR del mRNA de *COX1*. **B)** Cuando la proteína Cox1 (magenta) se sintetiza e inserta en la membrana, Mss51 interactúa con ella y con otras proteínas (rojo y naranja) que asisten en el ensamblaje del complejo. **C)** Al ensamblarse las demás subunidades de la CcO (azul), Mss51 se libera de su asociación con Cox1 y se encuentra disponible para otra ronda de traducción del mRNA de *COX1*.

Contrario a lo observado para Pet309, Mss51 no presenta motivos conocidos de interacción con RNA. Sin embargo, por un ensayo de triple híbrido se observó una posible interacción entre un fragmento de Mss51 y el extremo 5'UTR del mRNA de *COX1*, específicamente con una región que va del nucleótido -97 al +23 del 5'UTR de dicho mRNA (siendo la posición +1 la A del AUG de inicio) (Zambrano et al, 2007). Este ensayo se realizó en el entorno nuclear, por lo que sería necesario comprobar la interacción por un método más confiable.

Justificación

Tanto en bacterias como en eucariontes, el inicio de la traducción es un proceso sumamente regulado. En mitocondria no existe una secuencia tipo Shine-Dalgarno en los mRNAs y se sabe que el mitoribosoma no escanea para encontrar el codón de inicio. Al momento no se conoce cómo el ribosoma encuentra el sitio de inicio de la traducción en el mRNA. Se propone que los activadores traduccionales podrían interactuar con un sitio específico del extremo 5'UTR de su mRNA blanco y con el ribosoma mitocondrial para posicionarlo en el codón de inicio de dicho mRNA. Pet309 y Mss51 son los activadores traduccionales del mRNA de *COXI*. La ausencia de cualquiera de estas dos proteínas provoca que Cox1 no se sintetice. El mecanismo por el cual Pet309 y Mss51 activan la traducción del mRNA de *COXI* no se conoce, pero sabemos que Mss51 es el sensor del estado de ensamblaje de la CcO. Por otro lado, Pet309 contiene motivos PPR que podrían participar en la interacción directa con el mRNA de *COXI*, aunque dicha interacción no se ha comprobado.

Estudiar la interacción de ambos activadores traduccionales con el mRNA de *COXI* y con el ribosoma mitocondrial contribuirá a entender mejor el mecanismo de acción de dichas proteínas. Asimismo, estudiar la relación entre Pet309 y Mss51 ayudará a contestar la interrogante de cómo cooperan ambos activadores para dar inicio a la síntesis de Cox1.

Hipótesis

Pet309 y Mss51 interactúan con el mRNA de *COXI*, con el ribosoma mitocondrial y entre sí.

Objetivo

Investigar si Pet309 y Mss51 interactúan con el mRNA de *COXI*, con el ribosoma mitocondrial y entre ellas; y estudiar de qué dependen dichas interacciones.

Objetivos particulares

Primera sección: estudio de la interacción de Pet309 y Mss51 con el mRNA de *COXI*

- Investigar si existe interacción entre Pet309 y el mRNA de *COXI*.
- Investigar si la interacción entre Pet309 y el mRNA de *COXI* depende de una traducción mitocondrial activa.
- Entender el papel de los motivos PPR de Pet309 en su interacción con el mRNA de *COXI*.
- Demostrar la interacción entre Mss51 y el mRNA de *COXI*.

Segunda sección: estudio de la interacción de Pet309 y Mss51 con el ribosoma mitocondrial.

- Comprobar la interacción entre Pet309 y el ribosoma mitocondrial
- Conocer si la interacción entre Pet309 y el ribosoma mitocondrial depende de la presencia del mRNA de *COXI*.
- Identificar la región de Pet309 responsable de la interacción con el ribosoma mitocondrial.
- Demostrar la interacción entre Mss51 y el ribosoma mitocondrial
- Estudiar si la interacción entre Mss51 y el ribosoma mitocondrial depende de la presencia del mRNA de *COXI*.

Tercera sección: estudio de la relación entre Pet309 y Mss51.

- Investigar si existe una interacción física entre Pet309 y Mss51.
- Estudiar si Mss51 es necesaria para que Pet309 interactúe tanto con el mRNA de *COXI* como con el ribosoma.
- Investigar si Pet309 es necesaria para que Mss51 interactúe con el ribosoma mitocondrial.

Material y métodos

Las cepas utilizadas en este estudio son congénicas a D273-10B y se listan en la tabla A3.1 del apéndice 3.

La composición de los medios de cultivo se basa en (Burke D, 2000) y se detalla en el apéndice A3.1. Como fuentes de carbono fermentables se utilizaron YPD o YPRaf con 2% de glucosa o rafinosa respectivamente. Los medios mínimos se elaboraron con 0.67% de base nitrogenada, 2% de glucosa o rafinosa (en caso de medio fermentable), 3% de etanol y 3% de glicerol (en caso de medio no fermentable), y mezcla Dropout sin uracilo o sin metionina marca Bio 101 Systems.

Los métodos genéticos están basados en (Burke D, 2000; Guthrie C, 2002). Las mutantes nulas se obtuvieron con casetes de *LEU2*, *URA3* o *KanMx4* por medio de PCR.

Obtención de mutantes de PET309

El procedimiento por el que se obtuvo a la mutante *pet309Δ8ppr-HA* se describe en (Tavares-Carreón et al, 2008). La mutante *Pet309Δ12ppr-HA* carece de los residuos N312 a N759 (Zamudio-Ochoa et al, 2014). La mutante *Pet309Δ4ppr-HA* carece de los residuos N312 a I346 e I638 a N759 (Zamudio-Ochoa et al, 2014). La mutante *Pet309Δcarboxilo-HA* carece de los residuos L760 a V962. La mutante *Pet309Δamino-HA* carece de los residuos A53 a Q311. Estas construcciones se obtuvieron por PCR de fusión utilizando al plásmido pXP96 como molde. pXP96 contiene al gen *PET309-3xHA* en el plásmido de expresión en *Escherichia coli* pBluescript. Los productos de PCR se digirieron con las enzimas PstI-EcoRI y se ligaron en el plásmido pXP96 digerido de la

misma forma. Para generar el plásmido de expresión en levadura de bajo número de copia, los fragmentos digeridos con XbaI-XhoI se ligaron en el plásmido pXP97 digerido de la misma forma. pXP97 contiene al gen *PET309-3xHA* ligado en el plásmido pRS416. Para generar el plásmido de expresión en levadura de alto número de copia, los fragmentos digeridos con XbaI-ClaI se ligaron en el plásmido pXP104 digerido de la misma forma. pXP104 contiene al gen *PET309-3xHA* ligado en el plásmido YEp352.

Transformación de las levaduras

Las cepas se transformaron con los vectores que contienen las construcciones de las mutantes mediante el método de Ito (Ito et al, 1983) que se describe a continuación:

1. Inocular en 2 ml de YPD la cepa deseada a 30°C por 16 h.
2. Tomar 500 µl de las células del cultivo y centrifugar 1 min a 14000 rpm a 4°C en una centrífuga de mesa modelo Eppendorf 5415C. Eliminar el sobrenadante.
3. Resuspender las células en 52.5µl de mezcla de transformación:
40µl de PEG-3350 al 50%.
5µl de DTT 1M.
5µl de acetato de litio 2M.
2.5µl de DNA de esperma de salmón a 10mg/ml (previamente hervido por 10 min y colocado en hielo inmediatamente).
4. Agregar el DNA a emplear para la transformación celular (100 ng).
5. Incubar a 42°C por 30 min agitando en vórtex cada 10 min.
6. Plaquear la mezcla en una caja de Petri con el medio selectivo.

Obtención de la fracción mitocondrial cruda

Modificado de (Diekert et al, 2001) La composición de los amortiguadores se encuentra en el apéndice A3.2.

1. Cultivar una colonia de levadura en 2 ml de YPRaf o medio mínimo con rafinosa y sin uracilo (-Ura Raf) por 24 horas a 30°C con una agitación de 250 rpm.

2. Resembrar los 2 ml de cultivo saturado en 50 ml del mismo medio e incubar a 30°C por 24 horas con una agitación de 250 rpm.
3. Del cultivo anterior resembrar en 1 litro del mismo medio dejando el cultivo con una absorbancia a 600nm (A_{600}) de 0.1. Incubar a 30°C con una agitación de 250 rpm hasta alcanzar una A_{600} entre 1 y 1.2 (fase exponencial de crecimiento).
4. Centrifugar a 4000 rpm por 10 min a 4°C en el rotor JA-10 (Beckman).
5. Lavar el botón una vez con agua fría desionizada y centrifugar a 4000 rpm en rotor JA-10.
6. Reunir todos los botones en un tubo de centrifuga previamente pesado.
7. Centrifugar a 4000 rpm por 10 min a 4°C en rotor JA-10. Eliminar el sobrenadante y pesar.
8. Resuspender el botón en el amortiguador TD (en una relación de 2 ml/g de peso húmedo).
9. Agitar 10 min a 30°C con agitación de 250 rpm.
10. Centrifugar a 3300 rpm durante 5 min a 4°C en rotor JA-10.
11. Lavar el botón con el amortiguador MPZ sin zimoliasa (en una relación de 7 ml/g de peso húmedo)
12. Centrifugar 5 min a 3300 rpm en rotor JA-10.
13. Resuspender el botón en amortiguador MPZ (en una relación de 7ml/g de peso húmedo), adicionar zimoliasa-20T (en una relación de 3mg/g de peso húmedo).
14. Agitar 1 hora a 30°C.

A partir de este paso todo se hace a 4°C

15. Centrifugar a 2500 rpm por 5 min a 4°C en rotor JA-10.
16. Resuspender en 50 ml de amortiguador Dounce.
17. Homogeneizar 10 veces usando un homogeneizador y pistilo de vidrio.
18. Centrifugar 5 min a 3300 rpm en el rotor JA-10 a 4°C. Recuperar el sobrenadante.
19. Centrifugar 5 min a 3300 rpm en el rotor JA-10 a 4°C. Recuperar el sobrenadante.
20. Centrifugar 12 min a 12000 rpm en el rotor JA-25.5 a 4°C (en el botón se encuentran las mitocondrias crudas).

21. Resuspender el botón en 10 ml de amortiguador SEH (si las mitocondrias se utilizarán para experimentos de interacción proteína-RNA) o SH (si las mitocondrias se utilizarán para experimentos de interacción con ribosoma).
22. Centrifugar 12 min a 12000 rpm en el rotor JA-25.5 a 4°C.
23. Resuspender el botón en 300 µl de amortiguador de SEH o SH (con la punta de la micropipeta cortada).
24. Alicuotar y guardar a -70°C.

Cuantificación de proteínas por Lowry modificado (Markwell et al, 1978)

Solución A

Na₂CO₃ 2%, NaOH 0.4%, tartrato de Na₂ 0.16%, SDS 1%.

Solución B

Cu₂SO₄.5H₂O 4%.

Solución C

Mezclar 100 volúmenes de solución A con 1 volumen de solución B.

Solución D

Mezclar 1 volumen de reactivo de Folin con 1 volumen de agua.

Curva de calibración

1. Usar una solución de albúmina a una concentración de 1 mg/ml.
2. Preparar diluciones con 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 µl de la solución de albúmina en 1 ml de H₂O.
3. Diluir 1:10 con H₂O la muestra de mitocondrias a cuantificar.
4. Ajustar la muestra con agua a 1 ml.
5. Adicionar 3 ml de solución C y mezclar en vórtex. Incubar 10 min a TA.
6. Adicionar 300 µl de solución D y mezclar en vórtex e incubar 30 min a TA.
7. Determinar la absorbancia a 740 nm.

Electroforesis de geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

	Gel separador 12 %	Gel concentrador 4 %
Acrilamida 30%	3.0 ml	0.488 ml
Bisacrilamida 0.8%		
Tris 2M, pH 8.8	1.395 ml	-
Tris 2M, pH 6.8	-	234 µl
SDS 20%	75 µl	19 µl
H ₂ O	3 ml	2.96 ml
Persulfato de amonio 10%	38 µl	38 µl
TEMED	3.8 µl	3.8 µl

Amortiguador de corrida 5X	0.125M	Tris-HCl pH 8.3
	1.25M	Glicina
	0.5%	SDS
Amortiguador de carga 1X	50 mM	Tris-HCl, pH 8.3
	10%	Glicerol
	2%	SDS
	2%	β-Mercaptoetanol
	0.1%	Azul de bromo fenol

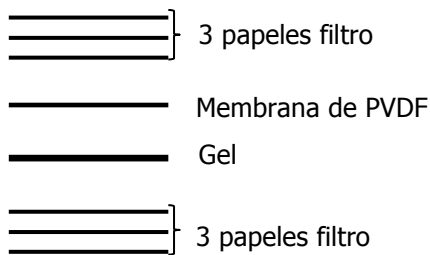
Iniciar la electroforesis a 80 V durante 30 min. Posteriormente, aumentar el voltaje a 100 V durante 90 min.

Western blot

La composición de los amortiguadores se describen en el apéndice A3.3 y las diluciones de anticuerpos se describen en la tabla A3.2.

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfieren a una membrana de PVDF (Millipore) mediante un método semi-seco usando la cámara de transferencia de FisherBiotech.

1. Prehumedecer la membrana en metanol al 100%.
2. Humedecer la membrana, gel y 6 papeles filtro en amortiguador de electroforesis 1x con 20% de metanol.
3. Acomodar los papeles filtro, el gel y la membrana en la cámara de transferencia de la siguiente manera:



4. Transferir por 2 horas a 1.5 mA/cm^2 .
5. Luego de la transferencia, incubar la membrana por 10 seg en metanol. Dejar secar al menos 20 minutos.
6. Incubar la membrana con solución de blot con anticuerpo anti-HA (Roche) acoplado a peroxidasa de rábano, durante 1h a temperatura ambiente.
7. Lavar la membrana con solución de lavado por 10 min. Repetir el lavado 2 veces más.
8. Revelar la presencia del anticuerpo unido a la proteína Pet309-3xHA o Mss51-3xHA siguiendo las indicaciones del kit MILLIPORE Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate.
9. Tomar autorradiografía con la película Medical X-ray Blue (Carestream) exponiendo durante 1 min. De ser necesario, exponer más películas con menor o mayor tiempo.
10. Eliminar el anticuerpo unido a las proteínas de la membrana incubando con la solución de eliminación de anticuerpo por 30 min a 50°C . Lavar 30 min con solución de lavado.

11. Incubar la membrana con solución de blot con el anticuerpo contra Cox1, Myc, G6PDH, Mrp51, Mrp20 o CS durante 1 h a temperatura ambiente.
12. Lavar la membrana con solución de lavado por 10 minutos, repetir el lavado 2 veces.
13. Incubar la membrana con una solución de blot que contenga al anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo (Santa Cruz) acoplados a peroxidasa de rábano, durante 1 h a temperatura ambiente.
14. Lavar la membrana con solución de lavado por 10 minutos, repetir el lavado 2 veces más.
15. Revelar la presencia del anticuerpo siguiendo las indicaciones del kit ECL (Amersham).
16. Tomar autorradiografía con la película Medical X-ray Blue (Carestream), exponiendo durante 5 a 30 seg dependiendo del anticuerpo.
Repetir con los anticuerpos necesarios.

Traducción *in vivo* (ivTL) de proteínas mitocondriales a partir de células completas (Colby et al, 1998)

La composición del amortiguador SHP se encuentra en el apéndice A3.4.

1. Cultivar una colonia en 2 ml de YP Rafinosa o -Ura Rafinosa a 30°C por 16 horas en agitación.
2. Inocular 0.1 ml de este cultivo en 10 ml del mismo medio, incubar a 30°C por 16 horas en agitación.
3. Adicionar 10 ml de YP Rafinosa o -Ura Rafinosa e incubar 3 horas a 30°C en agitación.
4. Centrifugar alícuotas de 5 ml de cultivo (o 7.5 ml si la cepa no respira) en tubos con tapa de rosca previamente pesados a 3000 g por 10 min a TA.
5. Lavar dos veces con 1 ml de agua estéril.
6. Resuspender en 500 µl de medio mínimo con rafinosa y sin metionina (-Met Raf). Incubar 30 min a 30°C con agitación.
7. Adicionar 5 µl de cicloheximida a 10mg/ml (disuelta en etanol). Incubar 5 min a 30°C con agitación.

8. Adicionar 5 μ Ci de 35 S-Metionina (Perkin Elmer). Incubar 10 min a 30°C con agitación.
9. Enfriar inmediatamente en hielo/agua 5 min.
10. Centrifugar a velocidad máxima a 4°C por 1 min en una centrífuga de mesa modelo Eppendorf 5415C. Eliminar sobrenadante.
11. Lavar el botón con 200 μ l de SHP frío.
12. Resuspender el botón en 200 μ l de SHP frío.
13. Adicionar un volumen de perlas de vidrio, previamente enfriadas a -20°C.
14. Agitar en vórtex 30 seg a velocidad máxima e incubar 30 seg en hielo.
15. Repetir el paso anterior 2 veces más.
16. Centrifugar a 2500 rpm por 5 min a 4°C en una centrífuga de mesa modelo Eppendorf 5415C.
17. Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 ml.
18. Adicionar a las perlas 200 μ l de SHP frío. Repetir el ciclo vórtex/hielo.
19. Combinar los sobrenadantes y centrifugar a velocidad máxima durante 10 min a 4°C en una centrífuga de mesa modelo Eppendorf 5415C.
20. Eliminar el sobrenadante y adicionar 40 μ l de amortiguador de Laemmli 1X. Calentar a 65°C por 5 min.
21. Cargar 10 μ l en un gel de acrilamida/SDS al 12%. Correr a 27mA una distancia de 7 cm a partir de la interfase de los geles de carga y separador.
22. Transferir a membrana de PVDF 1.5 horas a 1.5mA/cm². Dejar secar y exponer en una placa de película BioMax MR Film (Kodak).

Northern blot (Sambrook J, 2001)

La composición de los amortiguadores se describe en el apéndice A3.5.

Gel desnaturizante de RNA

1. Inocular 3 ml de -URA Raf y dejar crecer a 30°C hasta una A₆₀₀ de entre 1 y 1.2.
2. Purificar el RNA según las instrucciones del kit RNeasy de Qiagen.
3. Cuantificar el RNA en Nanodrop ND 2000 (Thermo Scientific).
4. Composición del gel desnaturizante:

- 1.7 g de agarosa
- 126 ml de H₂O
- 17.5 ml de amortiguador MOPS10X
- 31.5 ml de formaldehído (Sigma)
- 5. Preparación de muestras
 - 7.5 µg de RNA
 - 2 µl de MOPS10X
 - 6 µl de formaldehído (Sigma)
 - 20 µl de formamida (Invitrogen)
- 6. Calentar las muestras por 15 min a 65°C.
- 7. Incubar en hielo por 5 min.
- 8. Agregar 5µl de amortiguador de carga y 1µl de bromuro de etidio a 10 mg/ml.
- 9. Cargar las muestras en el gel y correrlo a 50V por 90 min, posteriormente correr a 100V por 2 horas.

Transferencia de RNA a membrana de Nylon-Hybond

1. Colocar el soporte del gel de agarosa en un refractario que contenga amortiguador SSC 10X.
2. Colocar sobre el soporte un papel filtro que toque el amortiguador.
3. Sobre el papel filtro colocar el gel previamente lavado con H₂O tratada con DEPC.
4. Cubrir el gel con una membrana de Nylon-Hybond (Amersham).
5. Colocar sobre la membrana 3 papeles filtro prehumedecidos con SSC 10X.
6. Colocar sobre los papeles filtro una torre de papel absorbente de aproximadamente 7 cm de altura.
7. Sobre la torre, colocar una superficie plana de acrílico y un peso de aproximadamente 1kg.
8. Dejar transfiriendo durante 16 horas.
9. Hecha la transferencia, dejar secar la membrana.
10. Entrecruzar la membrana con irradiación UV a 254/312 nm en un Stratalinker de Stratagene.

Marcaje y desnaturalización de la sonda radiactiva

1. Marcar la sonda con ^{32}P (Perkin Elmer) siguiendo las instrucciones del Kit HexaLabel DNA Labeling (Fermentas).
2. Una vez detenida la reacción limpiar la sonda de exceso de nucleótidos radioactivos por centrifugación suave en columnas Micro-Bio Spin Chromatography Columns (BioRad).
3. Desnaturalizar a la sonda marcada y purificada incubando con 1/10 de volumen de una solución 1N NaOH, 1mM de EDTA por 5 min a temperatura ambiente.
4. Agregar la sonda a la solución de prehibridación donde se encuentra la membrana.

Hibridación

1. Prehibridar una hora a 65°C en horno rotatorio con 50 ml de la siguiente solución precalentada:
 - 5x SSC
 - 5x Denhardt's
 - 0.5% SDS
 - 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón (previamente hervido 10 min y colocado en hielo inmediatamente por otros 10 min).
2. Agregar la sonda marcada y desnaturalizada.
3. Hibridar a 65°C toda la noche.

Lavados

1. Desechar la solución de hibridación.
2. Hacer los siguientes lavados con 50 ml de las siguientes soluciones:
 - 1 lavado con 2x SSC, 0.2% SDS por 5 min, temperatura ambiente.
 - 2 lavados con 2x SSC, 0.2% SDS por 15min, 65°C.
 - 1 lavado con 0.2x SSC, 0.2% SDS por 30 min, 65°C.
3. Envolver la membrana en egapack y exponer en pantalla de fosforecencia (Storage Phosphor Screen, KODAK).

4. Leer la emisión radioactiva con un TYPHOON 8600 phoshoimager.
5. Cuantificar la señal en el programa ImageQuant versión 5.2.

Separación de complejos proteicos con gradiente de sacarosa

La composición de los amortiguadores se describe en el apéndice A3.6.

1. Centrifugar 0.5 mg de mitocondrias por 5 min a 14000 rpm en centrífuga de mesa modelo Eppendorf 5415C a 4°C. Retirar el sobrenadante.
2. Resuspender en 300 µl de amortiguador de lisis.
3. Incubar 30 min en hielo.
4. Cargar en un gradiente discontinuo de 20, 30 y 40% de sacarosa.
5. Centrifugar 2 horas a 39000 rpm en rotor Sw55Ti.
6. Retirar fracciones de 600 µl y agregar 60 µl de TCA al 100%.
7. Incubar 30 min en hielo.
8. Centrifugar 10 min a 14000 rpm en centrífuga de mesa modelo Eppendorf 5415C a 4°C. Retirar sobrenadante.
9. Lavar con 1 ml de acetona fría.
10. Centrifugar 10 min a 14000 rpm en centrífuga de mesa modelo Eppendorf 5415C a 4°C. Retirar SN.
11. Incubar 5 min a 65°C para evaporar la acetona.
12. Resuspender en 10 µl de una solución de SDS 5%, NH₄OH 1%.
13. Incubar 5 min a 65°C.
14. Agregar amortiguador de Laemmli 1x.
15. Incubar 5 min a 65°C.
16. Cargar en un gel de acrilamida desnaturalizante, transferir y analizar por western blot con los anticuerpos deseados.

Inmunoprecipitación de complejos de proteína-RNA

Para este ensayo es necesario usar guantes y todo el material debe estar estéril. Utilizar H₂O mili Q estéril para preparar los amortiguadores. La descripción del amortiguador de lisis se encuentra en el apéndice A3.7.

1. Centrifugar 1 mg de mitocondrias 5 min a 14000 rpm a 4°C en centrífuga de mesa modelo Eppendorf 5415C. Retirar el sobrenadante.
2. Resuspender las mitocondrias en 500 µl de amortiguador de lisis, pipetear varias veces para solubilizar todo el botón.
3. Incubar en aparato giratorio 20 min a 4°C.
4. Centrifugar 10 min a 14000 rpm a 4°C en centrífuga de mesa modelo Eppendorf 5415C.
5. Mientras tanto, añadir 200 µl de amortiguador SH a 50 µl de perlas anti HA-agarosa (Pierce) o 50 µl de perlas de proteína A sefarosa no acopladas a anticuerpo (Amersham). Centrifugar 1 min a 14000 rpm en centrífuga de mesa modelo Eppendorf 5415C y retirar 200 µl de sobrenadante.
6. En caso de utilizar perlas no acopladas, agregar 10 µl de anticuerpo anti HA de rata (Roche).
7. Retirar 20 µl del lisado mitocondrial para ser utilizado como fracción total para analizar proteína (T).
8. Añadir el lisado mitocondrial al tubo con las perlas anti HA-agarosa o de proteína A sefarosa con anticuerpo anti HA.
9. Incubar 2 h en aparato giratorio a 4°C.
10. Centrifugar 1 min a 14000 rpm a 4°C en centrífuga de mesa modelo Eppendorf 5415C.
11. Retirar el sobrenadante y colocarlo en un tubo nuevo.
12. Tomar 40 µl del sobrenadante del paso anterior y transferir a un tubo nuevo. Esta muestra será para extraer proteína (fracción de sobrenadante o S). La muestra restante se utilizará para extraer RNA.
13. Lavar el botón con 500 µl del amortiguador de lisis. Invertir 5 veces y centrifugar 1 min. a 14000 rpm en centrífuga de mesa modelo Eppendorf 5415C. Repetir este paso.
14. Lavar el botón con 1 ml de Hepes 20mM pH 7.4. Invertir 5 veces y centrifugar 1 min. a 14000 rpm en centrífuga de mesa modelo Eppendorf 5415C. Repetir este paso.
15. Resuspender el botón en 150 µl de Hepes 20 mM pH 7.4.

16. Tomar 40 μ l de esta fracción (fracción de inmunoprecipitación o IP) y transferir a un tubo nuevo que será para extraer proteína. La muestra restante se utilizará para extraer RNA.
17. A las muestras para proteína de la inmunoprecipitación (IP) y del sobrenadante (S) agregar 4 μ l de TCA al 100%. A la muestra del total (T) agregar 2 μ l de TCA al 100%. Conservar en hielo hasta terminar la extracción de RNA.
18. El RNA de la fracción total (T) se obtiene de 50 μ g de mitocondrias sin solubilizar.

Extracción de RNA

1. A las 3 muestras destinadas para la extracción de RNA agregar 1 ml de Trizol (Invitrogen). Pipetear varias veces. Incubar 5 min a temperatura ambiente.
2. Añadir 200 μ l de cloroformo. Agitar 15 seg. Incubar 3 min a temperatura ambiente.
3. Centrifugar a 12000 rpm 15 min a 4°C en centrífuga de mesa modelo Eppendorf 5415C
4. A la fase acuosa añadir 500 μ l de isopropanol. Incubar a temperatura ambiente por 10 min.
5. Centrifugar 10 min a 12000 rpm a 4°C en centrífuga de mesa modelo Eppendorf 5415C.
6. Lavar con 1 ml de etanol al 75%.
7. Centrifugar 5 min a 9000 rpm en centrífuga de mesa modelo Eppendorf 5415C. Retirar sobrenadante.
8. Dejar secar el botón, se puede incubar a 65°C por 2 min.
9. Resuspender la fracción total y la fracción del sobrenadante en 35 μ l de H₂O Mili Q.
10. Resuspender la fracción de inmunoprecipitación en 25 μ l de H₂O Mili Q.
11. Cuantificar el RNA en un Nano-drop 2000 (Thermo Scientific).

Precipitación de proteína

1. Centrifugar las muestras de proteína a 14000 rpm 10 min a 4°C en centrífuga de mesa modelo Eppendorf 5415C. Retirar sobrenadante.
2. Lavar con 1 ml de acetona a -20°C.
3. Centrifugar a 14000 rpm 10 min a 4°C en centrífuga de mesa modelo Eppendorf 5415C. Retirar sobrenadante.
4. Incubar de 1 a 3 min a 65°C para eliminar la acetona.
5. Resuspender en 10 µl de una solución de SDS 5%, NH₄OH 1%.
6. Incubar 5 min a 65°C.
7. Agregar 10 µl de amortiguador de Laemmli 2X con β-mercaptoetanol.
8. Incubar 5 min a 65°C.
9. Cargar en el gel de acrilamida SDS-PAGE.

RT-PCR

Las secuencias de los oligonucleótidos se muestran en la tabla A3.3.

1. Usar tubos de PCR de 0.2 ml estériles. Marcar los tubos como T+, T-, IP+, IP-, S+, S-. A los – no se les va a agregar transcriptasa reversa. Es el control para saber si hay contaminación por DNA.
2. Preparar la siguiente mezcla:
 - X µl de RNA (30 ng)
 - 1 µl de amortiguador DNAsa I 10x (Invitrogen).
 - 1 µl de DNAsa I (Invitrogen).
 - X µl de H₂O-MilliQ
 - 10 µl de volumen final.
3. Incubar 15 min a 25°C en termociclador.
4. Agregar 1 µl de EDTA 25mM. Calentar 10 min a 65°C.
5. Agregar a cada tubo:
 - 1µl de oligo 10µM CO1E4-R2
 - 1 µl de oligo 10µM COX3R- CODIF
 - 1µl de oligo 10µM ATP8R- CODIF

- 1 µl de oligo 10 µM ATP6R2-CODIF
 1 µl de oligo 10 µM VAR1R3
 1 µl de dNTPs 10mM
6. Calentar a 65°C 5 min y 1 min a 4°C.
 7. Centrifugar y agregar :
 - 4 µl de amortiguador FS 5x (Invitrogen)
 - 1 µl de DTT 0.1 M
 - 1 µl de RNase OUT (Invitrogen)
 - 1 µl de Superscript III (Invitrogen). Solo a los tubos +.
 8. Generar el cDNA en el termociclador:
 - 5 min 25°C
 - 60 min 50°C
 - 15 min 70°C

9. Para el PCR se utiliza 1 µl de cDNA

Amortiguador 10x	2.5 µl
MgCl ₂	0.75 µl
dNTPs 10mM	0.5 µl
Oligonucleótido Fw 10 µM	1.5 µl
Oligonucleótido Rv 10 µM	1.5 µl
cDNA	1 µl
Taq pol (Invitrogen)	0.5 µl
dH ₂ O	8.25 µl

Amplificar usando el siguiente programa:

94°C 5min

94°C 45 seg	}	5X
48°C 1 min		
72°C 1 min		
94°C 45 seg	}	30X
50°C 1 min		
72°C 1 min		

72°C 5 min

4°C ∞

Oligonucleótidos para PCR (ver las secuencias en la tabla A3.3.)

Gen	Oligonucleótido Forward	Oligonucleótido Reverse
<i>COX1</i>	CO15'-400F	CO15'R5-5'
<i>COX3</i>	COX3F-5'UTR	COX3R-5'UTR
<i>ATP8</i>	ATP8F-5'UTR	ATP8R-5'UTR
<i>ATP6</i>	ATP6F5'UTR	ATP6R5'UTR
<i>VARI</i>	VAR1F1	VAR1R1

Southern blot (Sambrook J, 2001)

1. Incubar el gel de agarosa que se va a transferir en la solución desnaturizante (0.4 N de NaOH y 1M de NaCl) durante 15 min.
2. Cambiar la solución por una nueva e incubar 20 min.
3. Humedecer la membrana de Nylon-Hybond (Amersham) en H₂O.
4. Sumergir la membrana en la solución desnaturizante por 5 min.
5. Transferir el gel, marcar la sonda, hibridar y exponer la membrana de la misma forma que se describe para el northern blot.

Inmunoprecipitación con traducción *in organello* en presencia de puromicina

La composición del amortiguador ioTL 1.5X se describe en el apéndice A3.8.

1. Utilizar 1 mg de mitocondrias.
2. Agregar la cantidad necesaria de amortiguador SH para tener un volumen total de 500µl. Dividir en 2 tubos de 250 µl cada uno.
3. Agregar a cada tubo 550µl de amortiguador ioTL 1.5X.
4. Agregar 50µl de puromicina a 400 mg/ml.
5. Incubar 5 min a 30°C. Mezclar cada minuto.

6. Retirar 80µl de cada cepa. A esta muestra agregar 7mCi de ³⁵S-metionina (Perkin Elmer). Luego de incubar 20 min a 30°C, lavar con 1 ml de SH, agregar Laemmli 1X y cargar en gel SDS-PAGE. Secar el gel y exponer en película para autorradiografía (BioMaxMR Film Kodak).
7. A la muestra restante agregar 0.7µl de metionina 100 mM.
8. Incubar 20 min a 30°C. Mezclar cada 5 min.
9. Centrifugar 5min a 13000rpm en centrífuga de mesa modelo Eppendorf 5415C.
10. Resuspender en 500µl de amortiguador SH.
11. Centrifugar 5min a 13000rpm en centrífuga de mesa modelo Eppendorf 5415C.
12. Resuspender en 250µl de amortiguador de lisis para inmunoprecipitación a los 2 tubos de cada cepa.
13. Incubar 20 min a 4°C con agitación constante.
14. Agregar al tubo 50µl de perlas anti-HA acopladas a sefarosa.
15. Seguir protocolo de inmunoprecipitación de Pet309-HA y purificación de RNA para RT-PCR.

Resultados

Los resultados de esta tesis se dividen en 3 secciones. En la primera sección se describe la interacción de Pet309 y Mss51 con el mRNA de *COXI*. En la segunda sección se explora la interacción de Pet309 y Mss51 con el ribosoma mitocondrial. En la tercera sección se estudia la interacción entre Pet309 y Mss51, así como si sus interacciones con el ribosoma y con el mRNA de *COXI* dependen una de la otra.

Primera sección: estudio de la interacción de Pet309 y Mss51 con el mRNA de *COXI*

Pet309 interactúa con el mRNA de *COXI*

Los motivos PPR son dominios de interacción con RNA (Small & Peeters, 2000). Pet309 es una proteína PPR que activa la traducción del mRNA de *COXI* y cuyo sitio de acción mapea al extremo 5'UTR de dicho mRNA (Manthey & McEwen, 1995). Por lo tanto, creíamos que existía una interacción física entre Pet309 y el mRNA de *COXI*. Para detectar esta interacción en condiciones *in vivo*, solubilizamos las mitocondrias e inmunoprecipitamos a Pet309, para luego analizar al RNA asociado a la proteína por medio de transcripción reversa y PCR. Debido a que no contábamos con anticuerpos contra Pet309, agregamos un triple epítotope de hemaglutinina en la región carboxilo terminal de Pet309 (Pet309-HA). Este epítotope no afecta el crecimiento respiratorio de la cepa (Tavares-Carreón et al, 2008). Para minimizar la degradación del RNA en nuestros experimentos, se eliminó al gen *NUC1*, el cual codifica para una nucleasa mitocondrial que se activa luego de la solubilización (Iqbal & Hudson, 1996). No se detectaron diferencias en el crecimiento respiratorio de la cepa *nuc1Δ* respecto a la cepa *NUC1⁺* (datos no mostrados).

Como control negativo de la inmunoprecipitación se incluyó una cepa carente del epítotope HA en Pet309. Las mitocondrias de las cepas *PET309-HA* y *PET309* se solubilizaron con 0.7% de Dodecil β maltósido (DDM) y a dicho lisado se le agregó anticuerpo αHA acoplado a perlas de sefarosa/agarosa. Se purificó el RNA de la fracción inmunoprecipitada (IP), no inmunoprecipitada (sobrenadante, S) y del total (T). A la par se purificó proteína de alícuotas de las 3 fracciones para analizar por western blot la eficiencia de la inmunoprecipitación (Figura 5A). La proteína Pet309-HA se detectó en las 3 fracciones, mientras que la proteína control citrato sintasa (CS), que no está relacionada con la traducción de *COXI*, únicamente se detectó en la fracción total y en el sobrenadante, sugiriendo una inmunoprecipitación específica de Pet309-HA. La proteína Cox1 no se detectó en el inmunoprecipitado de la cepa *PET309-HA*, lo que confirma que no existe interacción física entre ambas proteínas. Como se esperaba, no se observó señal con el anticuerpo contra HA en las fracciones de la cepa *PET309* (cepa sin epítotope). Se

purificó RNA de las 3 fracciones antes descritas, y mediante transcripción reversa se obtuvo cDNA, el cual se utilizó como templado para reacciones de PCR en las que se amplificó al gen *COX1* y a los genes *ATP8*, *ATP6*, *COX3*, y *VAR1* como controles negativos de la interacción (Figura 5B).

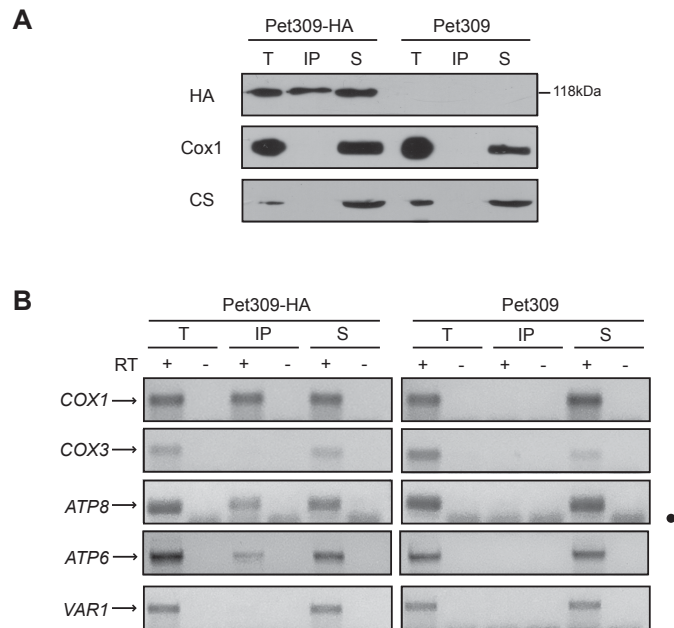


Figura 5. Pet309-HA interactúa con el mRNA de *COX1*. **A)** 1 mg de mitocondrias de las cepas *PET309-HA* y *PET309* se lisaron con 0.7% de DDM y se precipitaron con anticuerpo α HA acoplado a perlas de sefarosa. 4% del lisado total (T) y 25% de la fracción inmunoprecipitada (IP) y del sobrenadante (S) se precipitaron con TCA. La proteína obtenida se cargó en un gel de SDS-PAGE y se analizó por western blot con los anticuerpos indicados. HA: Anticuerpo antihemaglutinina; Cox1: Anticuerpo anti Cox1; CS: Anticuerpo anti citrato sintasa. **B)** Se purificó el RNA de la fracción total, fracción inmunoprecipitada y fracción del sobrenadante y se obtuvo cDNA utilizando a transcriptasa reversa (RT) y oligos específicos para cada gen mitocondrial. El cDNA se utilizó como molde para amplificar los genes mitocondriales indicados. Los signos + y - indican la adición y ausencia de transcriptasa reversa durante la reacción de síntesis de cDNA, respectivamente, y es un control para descartar contaminación con DNA. El punto negro indica el dímero de oligonucleótidos. El color del gel de agarosa se invirtió para mayor claridad.

El gen *COX1* se detectó en la fracción del inmunoprecipitado, al igual que en el total y el sobrenadante. Esto indica que existe una interacción física entre Pet309 y el mRNA de *COX1*. Esta interacción parece ser específica, ya que ni el gen *COX3* ni el gen *VARI* pudieron detectarse en dicha fracción. Este no fue el caso para los genes *ATP6* y *ATP8*, quienes sí se amplificaron en el inmunoprecipitado de la cepa con epítipo en Pet309. Este resultado puede deberse a que *COX1*, *ATP6* y *ATP8* son transcritos en un mismo policistrón que luego es procesado (Simon & Faye, 1984), por lo que la amplificación de estos genes sugiere que la interacción entre Pet309 y el mRNA de *COX1* tiene lugar antes de que el policistrón se procese y los RNAs mensajeros de *ATP8* y *ATP6* se separen del RNA mensajero de *COX1*. En el control negativo (Pet309 sin epítipo de HA) no se observó amplificación de genes mitocondriales, indicando que la inmunoprecipitación y reacción de RT-PCR fueron específicas.

Para asegurarnos de que la banda observada en el experimento de RT-PCR fuera la de *COX1* y no la de algún contaminante, se realizó un experimento de Southern blot. Para hacer este ensayo, el mismo gel mostrado en la figura 5B (únicamente la región correspondiente a la amplificación de *COX1* y de *COX3*) se transfirió a una membrana de Nylon. La membrana se hibridó contra una sonda radiactiva que hibridaba con el extremo 5'UTR del gen *COX1* (Figura 6).

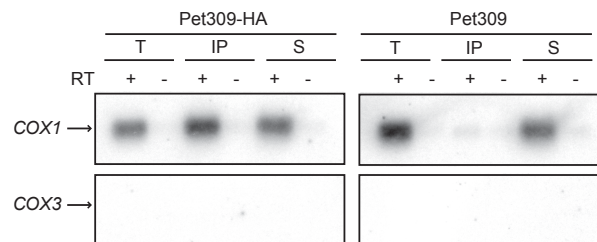


Figura 6. Comprobación de la identidad del producto de PCR de *COX1* obtenido en la figura 5. Los geles de agarosa de la figura 5 donde se amplificó por PCR a *COX1* y a *COX3* se transfirieron a una membrana de Nylon que se hibridó contra una sonda que hibrida con el extremo 5'UTR de *COX1*.

El resultado demostró que la banda observada en la figura 5B sí corresponde a *COX1*, ya que se observa una fuerte señal en la misma región en la que se encuentra la banda de

COXI mostrada en la figura 5B. Por el contrario, en el gel transferido de *COX3* no se observó señal.

Estos resultados comprueban que Pet309 interactúa físicamente con el mRNA de *COXI*. Esta interacción es previa al procesamiento del policistrón que contiene a *COXI*, *ATP8* y *ATP6*.

La interacción entre Pet309 y el mRNA de *COXI* no depende de ribosomas traduccionalmente activos

El experimento en el que comprobamos que Pet309 interactúa con el mRNA de *COXI* se hizo con mitocondrias obtenidas en fase de crecimiento exponencial, en el cual la traducción mitocondrial se encuentra activa. Sin embargo, nos interesaba saber si dicha interacción únicamente tenía lugar durante la traducción del mRNA de *COXI* o si se trataba de una interacción constante. Para ello, previo al experimento de coimmunoprecipitación descrito para la figura 5, se realizó un experimento de traducción en mitocondrias aisladas (traducción *in organello*) en presencia o ausencia de puromicina, un antibiótico que inhibe la traducción durante la elongación, liberando al péptido naciente (Sohmen et al, 2009). Las mitocondrias de la cepa que contiene a *PET309-HA* se incubaron con un amortiguador que provee todo lo necesario para la traducción mitocondrial y con ³⁵S-metionina, la cual se incorpora a las proteínas mitocondriales recién sintetizadas. Una alícuota de cada muestra se analizó por western blot y autorradiografía (Figura 7A).

Como se esperaba, la traducción mitocondrial fue normal en las muestras sin puromicina (control positivo). Por el contrario, ninguna proteína se marcó radiactivamente en la muestra con puromicina, lo que indica que la traducción se inhibió exitosamente. Luego de activar la síntesis de las proteínas codificadas en el DNA mitocondrial, las mitocondrias se utilizaron para un experimento de coimmunoprecipitación de Pet309-HA (figura 7B).

Al hacer el RT-PCR utilizando al RNA de las 3 fracciones, *COXI* se detectó tanto en el inmunoprecipitado de las mitocondrias control como en el de las mitocondrias incubadas con puromicina (Figura 7C). Como se esperaba, el gen *COX3* no se detectó en ningún inmunoprecipitado.

Este resultado indica que la síntesis de Cox1 no necesita estar activa para que Pet309 interactúe con el RNA mensajero de *COX1*.

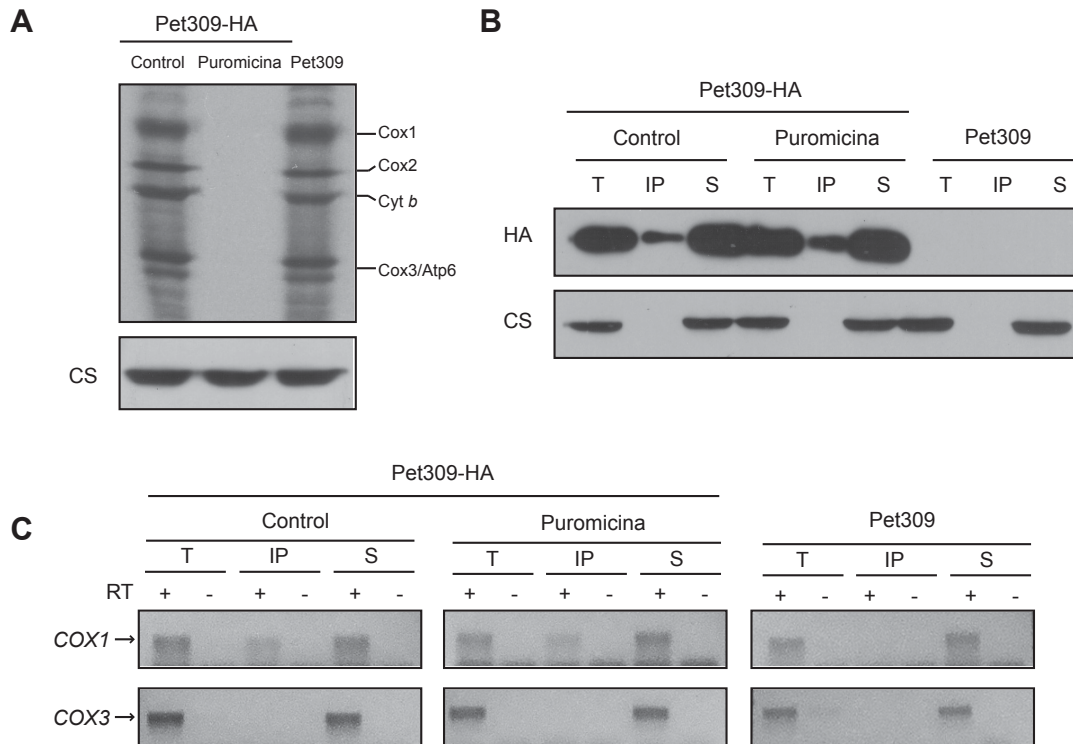


Figura 7. La interacción de Pet309-HA con el mRNA de *COX1* no depende de ribosomas traduccionalmente activos. 1 mg de mitocondrias de la cepa *PET309-HA* se incubó con amortiguador de traducción en ausencia o presencia de 25 $\mu\text{g/ml}$ de puromicina. También se incubaron mitocondrias de la cepa *PET309* sin puromicina como control negativo. **A)** 50 μg de esta muestra se incubaron con ^{35}S -metionina y luego del marcaje se cargaron en un gel SDS-PAGE. El marcaje de las proteínas codificadas en el genoma mitocondrial se analizó por autorradiografía. En el panel inferior se muestra el control de carga con anti citrato sintasa (CS) analizada por western blot. **B)** Luego de incubación con metionina fría, las muestras se inmunoprecipitaron con perlas acopladas a anti HA como se describe en la figura 5. Las muestras se analizaron por western blot con anticuerpos anti HA y anti CS. **C)** Gel de agarosa donde se muestra la amplificación de los genes *COX1* y *COX3* por RT-PCR en las 3 fracciones del experimento de inmunoprecipitación. + y - indican la adición y ausencia de transcriptasa reversa, respectivamente. El color de los geles se invirtió para mayor claridad.

Los 8 motivos PPR centrales de Pet309 no son indispensables para la interacción entre Pet309 y el mRNA de *COXI*

Inicialmente, los motivos PPR de Pet309 se predijeron con un programa llamado TPR Pred (<http://www.tprpred.com.mx>) (Karpenahalli et al, 2007). En 2007, este programa únicamente identificaba 8 motivos PPR en Pet309: desde el motivo 8 al motivo 15 según la numeración reportada por el grupo de Golik 4 años después (Lipinski et al, 2011). En un trabajo de nuestro grupo reportado en 2008, se caracterizó a una mutante de Pet309 que carece de dichos motivos, eliminando desde la Q347 hasta la S632 (*pet309Δ8ppr-HA*) (Figura 8A). A pesar de tener una estabilidad similar y la misma ubicación submitocondrial que la proteína silvestre, esta mutante no es capaz de activar la síntesis de *COXI* (Tavares-Carreón et al, 2008). Debido a que en esta proteína se elimina una gran parte de los motivos PPR, podría ser incapaz de interactuar con el mRNA de *COXI* y por lo tanto de activar su traducción. Para evaluar si este era el caso, el gen *pet309Δ8ppr-HA* junto con su promotor endógeno se clonó en un plásmido centromérico (pRS416) y se transformó en una cepa *pet309Δ*. Las mitocondrias de la cepa resultante se purificaron y con ellas se hizo un ensayo de coimmunoprecipitación de RNA (figura 8B). La inmunoprecipitación de Pet309Δ8ppr-HA no fue tan eficiente como en el caso de la proteína Pet309-HA. Sin embargo, el gen *COXI* se detectó en el inmunoprecipitado de forma específica (figura 8C). Este resultado indica que los 8 motivos PPR centrales de Pet309 no son indispensables para su interacción con el mRNA de *COXI*. Debido a que el RT-PCR no es cuantitativo, no sabemos si la interacción es menos eficiente. Sin embargo ésta es suficiente para detectarla con nuestra técnica.

La ausencia de los 12 motivos PPR centrales reduce la afinidad de Pet309 por el mRNA de *COXI*

En 2008, el programa TPR Pred indicaba la presencia de 12 motivos PPR en la región central de Pet309, 4 motivos más que los predichos en 2007. Este cambio en la predicción se debía al enriquecimiento de las bases de datos de proteínas PPR a lo largo del tiempo.

Para estudiar la función de estos motivos en la interacción con el mRNA de *COXI*, eliminamos los 12 motivos PPR predichos por TPR pred. Estos motivos van del motivo 7

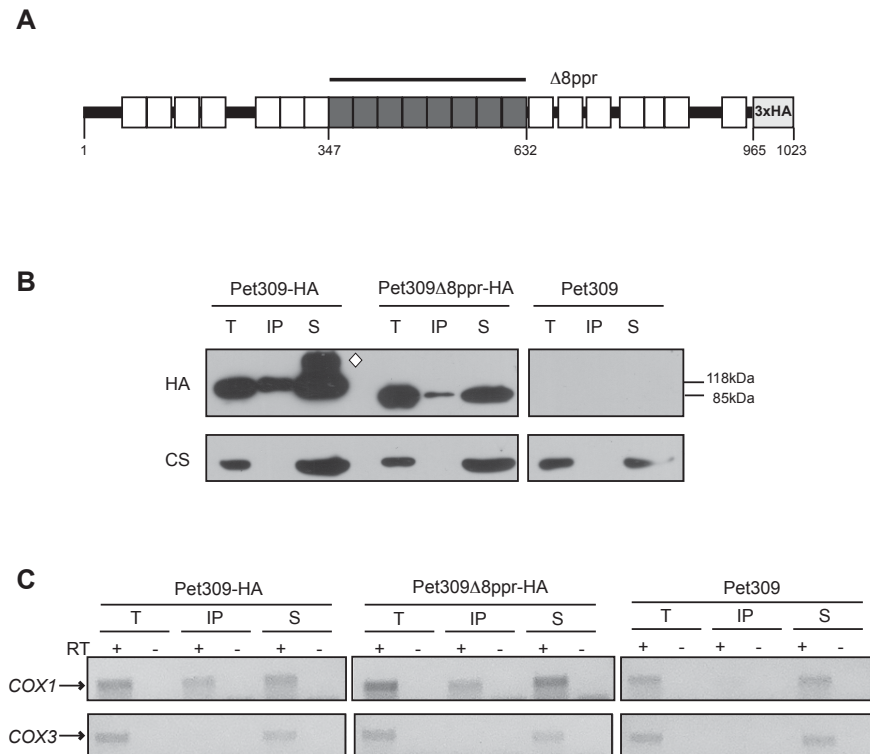


Figura 8. Los 8 motivos PPR centrales de Pet309 no son indispensables para su interacción con el mRNA de *COX1*. **A)** Esquema de Pet309Δ8ppr-HA. Los números indican el residuo y los cuadros grises indican la región eliminada. **B)** Los lisados mitocondriales de las cepas *PET309-HA*, *pet309Δ8ppr-HA* y *PET309* se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti HA acoplado a perlas de sefarosa como se indica en la figura 5, y las 3 fracciones se analizaron por western blot. El rombo blanco indica la presencia de posibles agregados de Pet309-3xHA. **C)** Geles de agarosa que muestran la amplificación de los genes *COX1* y *COX3* en los RNAs purificados de las 3 fracciones de la inmunoprecipitación. + y – indican la adición y ausencia de transcriptasa reversa durante la síntesis de cDNA, respectivamente. El color de los geles de agarosa se invirtió para una mayor claridad.

al motivo 18 según la nomenclatura de Lipinski (Lipinski et al, 2011), e incluyen desde la N312 hasta la N759 (figura 9A). La construcción *pet309Δ12ppr-HA* se ligó en un plásmido con un promotor centromérico (pRS416) y se transformó en una cepa *pet309Δ*. A pesar de que la proteína Pet309Δ12ppr-HA fue detectada a los mismos niveles que la proteína silvestre, la cepa resultante mostró un fenotipo no respiratorio debido a que Cox1 no se sintetiza (datos no mostrados). Este fenotipo no se debió a que la proteína no

pudiera ser importada o localizada en su sitio de acción, ya que Pet309 Δ 12ppr-HA resultó ser una proteína periférica de membrana, igual que la proteína silvestre (Zamudio-Ochoa et al, 2014). Esto indica que los 12 motivos PPR centrales de Pet309 no son necesarios para su asociación con la membrana interna mitocondrial. Para saber si la proteína Pet309 Δ 12ppr-HA es capaz de interactuar con el mRNA de *COX1*, realizamos el experimento de coimmunoprecipitación con mitocondrias de la cepa *pet309 Δ 12ppr-HA*.

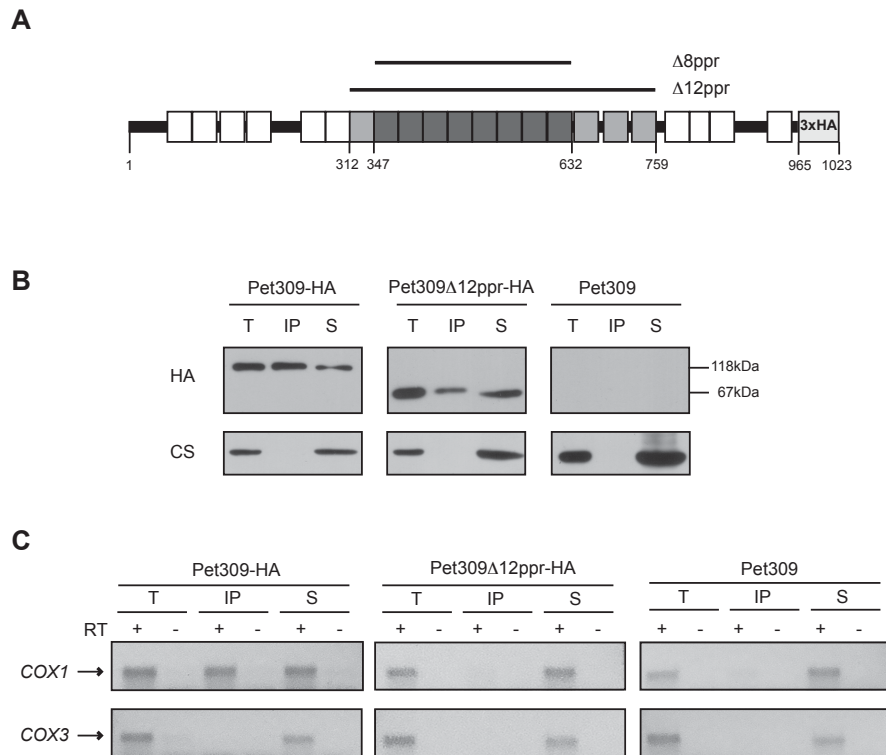


Figura 9. La ausencia de los 12 motivos PPR centrales de Pet309 afectan su interacción con el mRNA de *COX1*. **A)** Esquema de Pet309 Δ 12ppr-HA. Los números indican el residuo y los cuadros grises indican la región eliminada. Los cuadros gris oscuro indican la región eliminada en Pet309 Δ 8ppr-HA **B)** Los lisados mitocondriales de las cepas *PET309-HA*, *pet309 Δ 12ppr-HA* y *PET309* se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti HA acoplado a perlas de sefarosa como se indica en la figura 5, y las 3 fracciones se analizaron por western blot. **C)** Geles de agarosa que muestran la amplificación de los genes *COX1* y *COX3* en los RNAs de las 3 fracciones de la inmunoprecipitación. + y - indican la adición y ausencia de transcriptasa reversa durante la síntesis de cDNA, respectivamente. El color de los geles de agarosa se invirtió para una mayor claridad.

A pesar de que la inmunoprecipitación de Pet309 Δ 12ppr-HA fue eficiente (figura 9B), *COXI* no se amplificó en la fracción del inmunoprecipitado (figura 9C). Este resultado podría indicar que no existe interacción entre Pet309 Δ 12ppr-HA y el mRNA de *COXI* o bien que dicha interacción es tan débil que no es detectable por medio de nuestra técnica.

Los motivos PPR 7, 16, 17 y 18 son los 4 motivos ausentes en Pet309 Δ 12ppr-HA pero presentes en Pet309 Δ 8ppr-HA. La ausencia de estos 4 motivos PPR marcó la diferencia entre detectar o no la interacción entre Pet309 y el mRNA de *COXI*. Por lo tanto, estos 4 motivos PPR podrían tener un papel más importante dentro de la interacción. Alternativamente, al eliminar estos 4 motivos PPR se habría superado el número de motivos PPR necesarios para una interacción detectable entre Pet309 y el mRNA de *COXI*. Para estudiar este aspecto, se diseñó una nueva mutante de Pet309 que carece únicamente de los motivos PPR 7, 16, 17 y 18: *pet309 Δ 4ppr-HA* (figura 10A). Si estos motivos eran los responsables de la interacción, no se observaría al mRNA de *COXI* en el inmunoprecipitado de dicha mutante. La cepa que contiene a *pet309 Δ 4ppr-HA* tuvo un fenotipo no respiratorio (figura 10B) y no fue capaz de sintetizar a Cox1 (figura 10C), lo que significa que los PPRs 7, 16, 17 y 18 de Pet309 son necesarios para que Pet309 active la traducción del mRNA de *COXI*.

Las mitocondrias de la cepa *pet309 Δ 4ppr-HA* se utilizaron para hacer un ensayo de coimmunoprecipitación de RNA (figura 10 D, E). El resultado mostró que la proteína Pet309 Δ 4ppr-HA es capaz de interactuar con el mRNA de *COXI*. Esto indica que los motivos PPR 7, 16, 17 y 18 no son indispensables para la interacción entre Pet309 y el mRNA de *COXI*.

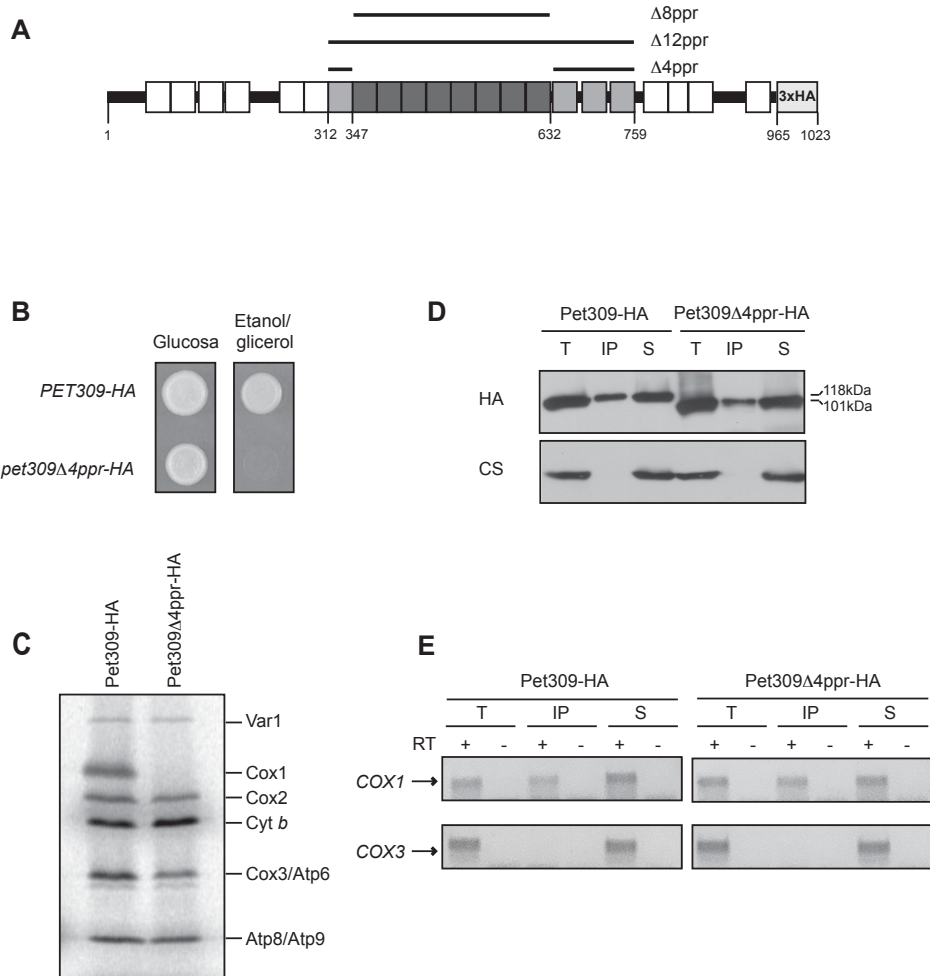


Figura 10. Los motivos PPR 7, 16, 17 y 18 de Pet309 son necesarios para la síntesis de Cox1 pero no para su interacción con el mRNA de *COX1*. **A)** Esquema de Pet309Δ4ppr-HA. Los números indican el residuo y los cuadros gris claro indican la región eliminada. **B)** Crecimiento de la cepa *pet309Δ4ppr-HA* en medio fermentable (glucosa) y medio respiratorio (etanol/glicerol). Las células se incubaron a 30°C durante 3 días. **C)** Marcaje radiactivo de proteínas codificadas en el DNA mitocondrial en la cepa silvestre (Pet309-HA) y en la cepa que contiene a Pet309Δ4ppr-HA. **D)** Los lisados mitocondriales de las cepas *PET309-HA* y *pet309Δ4ppr-HA* se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti HA acoplado a perlas de sefarosa como se indica en la figura 5, y las 3 fracciones se analizaron por western blot. **E)** Geles de agarosa que muestran la amplificación de los genes *COX1* y *COX3* en los RNAs de las 3 fracciones de la inmunoprecipitación. + y - indican la adición y ausencia de transcriptasa reversa, respectivamente. El color de los geles se invirtió para una mayor claridad

La proteína Pet309 Δ 12ppr-HA contiene al menos 10 motivos PPR restantes, los cuales podrían estar interactuando con el mRNA de *COX1* con una afinidad reducida. Dicha afinidad podría no ser suficiente para poder detectar la interacción mediante nuestra técnica de coimmunoprecipitación de RNA. Para evaluar si este era el caso, la mutante *pet309 Δ 12ppr-HA* se clonó en un plásmido que contiene el promotor 2 μ (YE μ 352), el cual tiene una replicación independiente de la replicación cromosomal, lo que provoca que existan entre 40 y 60 copias por célula (Ghosh et al, 2007). Utilizando este plásmido, obtuvimos una sobreexpresión de Pet309 Δ 12ppr-HA. Las mitocondrias de dicha cepa se utilizaron para un ensayo de inmunoprecipitación y RT-PCR (figura 11 A, B).

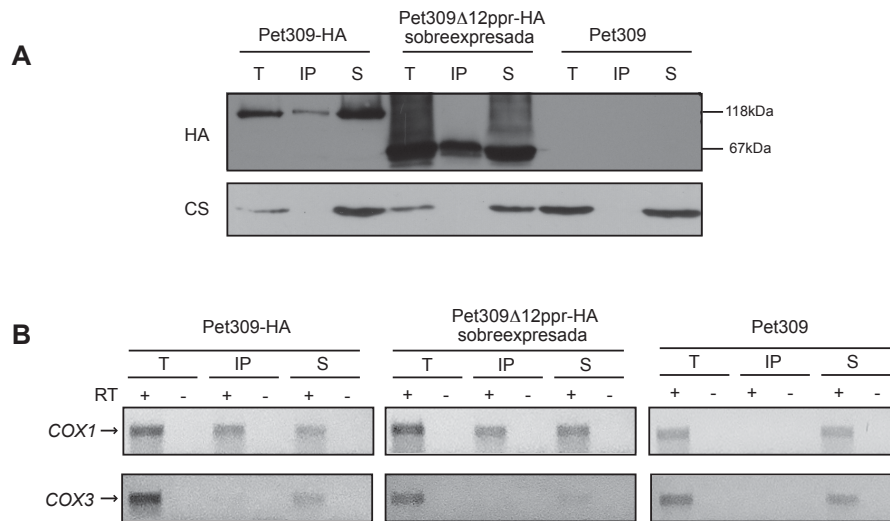


Figura 11. La interacción de Pet309 Δ 12ppr-HA con el mRNA de *COX1* es detectable cuando la proteína mutada se sobreexpresa **A)** Los lisados mitocondriales de las cepas que contienen a Pet309-HA y Pet309 en niveles basales y a Pet309 Δ 12ppr-HA en sobreexpresión se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti HA acoplado a perlas de sefarosa como se indica en la figura 5, y las 3 fracciones se analizaron por western blot. **B)** Geles de agarosa que muestran la amplificación de los genes *COX1* y *COX3* en los RNAs de las 3 fracciones de la inmunoprecipitación. + y - indican la adición y ausencia de transcriptasa reversa durante la síntesis del cDNA, respectivamente. El color de los geles de agarosa se invirtió para una mayor claridad.

Este experimento mostró que cuando la proteína Pet309 Δ 12ppr-HA se sobreexpresa e inmunoprecipita, la interacción con *COXI* es detectable. Esto indica que la proteína Pet309 Δ 12ppr-HA es capaz de interactuar con el mRNA de *COXI* pero con una afinidad tan baja que no es posible detectar dicha interacción con niveles basales de proteína.

Para confirmar que Pet309 Δ 12ppr-HA sí es capaz de interactuar con el mRNA de *COXI* pero con una baja afinidad, se analizaron los niveles del mRNA de *COXI* en baja y alta expresión de dicha mutante. Nuestro grupo de trabajo ha observado que la sobreexpresión de Pet309-HA incrementa los niveles del mRNA de *COXI* hasta un 400% comparado con la cepa con una expresión basal de la proteína (Tavares-Carreón et al, 2008). Se cree que esta acumulación se debe a que la unión de Pet309 al mRNA de *COXI* lo protege contra nucleasas, por lo que un exceso de Pet309 (como sería en condiciones de sobreexpresión) alargaría la vida media del RNA, acumulándolo. Esta acumulación de mRNA de *COXI* también se ha observado en la sobreexpresión de Pet309 Δ 8ppr-HA (Tavares-Carreón et al, 2008), la cual interactúa físicamente con el mRNA de *COXI* (figura 8). Si Pet309 Δ 12ppr-HA interactúa con el mRNA de *COXI*, esperamos una acumulación de dicho mRNA cuando la mutante se sobreexpresa. Se purificó RNA total de la cepa *pet309 Δ 12ppr-HA* en baja y alta expresión, así como de los controles que consisten en el gen silvestre (PET309-HA) en baja y alta expresión y en la cepa *pet309 Δ* con los plásmidos vacíos. Estos RNAs se separaron en un gel de agarosa desnaturizante, se transfirieron a una membrana de Nylon y se analizaron por northern blot y autorradiografía (figura 12 A,B).

Como se esperaba, la sobreexpresión de Pet309-HA acumuló al mRNA de *COXI* más de 400% al compararla con la cepa *PET309-HA* en bajo número de copia. La sobreexpresión de la mutante Pet309 Δ 12ppr-HA también acumuló al RNA mensajero, aunque sólo un 250% aproximadamente. Este experimento comprueba que Pet309 Δ 12ppr-HA interactúa con el mRNA de *COXI*, y al haber acumulado a dicho mRNA a niveles más bajos, sugiere que esta interacción es de menor afinidad que la que se da entre Pet309 silvestre y el mRNA de *COXI*.

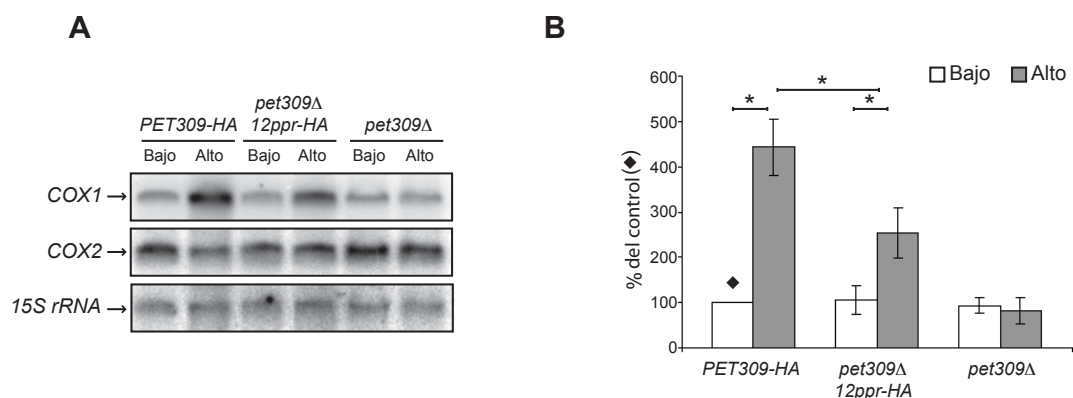


Figura 12. El mRNA de *COX1* se acumula cuando *Pet309-HA* y *Pet309Δ12ppr-HA* se sobreexpresan. **A)** El RNA total de las cepas *pet309Δ* transformadas con plásmidos que contienen a *PET309-HA*, *pet309Δ12ppr-HA* y con plásmido vacío, en bajo y alto número de copia se cargó en un gel desnaturalizante. Los niveles de mRNA de *COX1*, *COX2* y el rRNA *15S* se analizaron por northern blot. La señal de *COX2* se utilizó como control de un gen no relacionado con *Pet309*. **B)** Los niveles del mRNA de *COX1* normalizados con la señal del rRNA *15S* de tres experimentos independientes se cuantificaron tomando los niveles de la cepa *PET309-HA* en bajo número de copia (rombo negro) como el 100%. Las diferencias estadísticamente significativas se obtuvieron con un análisis de varianza ANOVA y un análisis de Bon-Ferroni. Las diferencias significativas relevantes se indican con un asterisco *.

No se detectó interacción entre *Mss51* y el mRNA de *COX1*

A diferencia de *Pet309*, la secuencia de *Mss51* no predice dominios de interacción con RNA. Sin embargo, *Mss51* también es un activador traduccional del mRNA de *COX1* cuyo sitio de acción mapea al extremo 5'UTR de este mRNA (Perez-Martinez et al 2009).

Para investigar si *Mss51* interactúa físicamente con el mRNA de *COX1*, se realizó el mismo experimento de co-inmunoprecipitación de RNA que se hizo con *Pet309-HA*, pero en este caso se utilizaron mitocondrias de una cepa que tiene al gen *MSS51* marcado con un triple epítoto de hemaglutinina en el extremo carboxilo terminal (*MSS51-HA*). Este epítoto no afecta el crecimiento respiratorio de la cepa (Perez-Martinez et al, 2003). Como control positivo, en el experimento se incluyeron mitocondrias de la cepa *PET309-HA*, y como control negativo se utilizaron mitocondrias sin epítoto en *Mss51*.

La inmunoprecipitación de la proteína Mss51-HA fue muy eficiente (Figura 13A). A pesar de ello, el mRNA de *COX1* no se detectó en el inmunoprecipitado (Figura 13B).

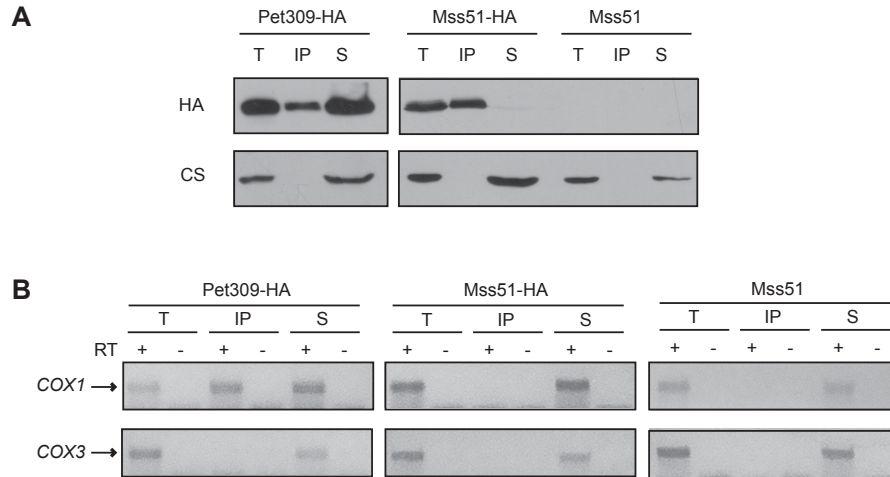


Figura 13. La interacción entre Mss51-HA y el mRNA de *COX1* fue indetectable. **A)** Los lisados mitocondriales de las cepas *PET309-HA*, *MSS51-HA* y *MSS51* se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti HA acoplado a perlas de sefarosa como se indica en la figura 5, y las 3 fracciones se analizaron por western blot. **B)** Geles de agarosa que muestran la amplificación de los genes *COX1* y *COX3* por RT-PCR en los RNAs de las 3 fracciones de la inmunoprecipitación. + y – indican la adición y ausencia de transcriptasa reversa durante la síntesis de cDNA, respectivamente. Para una mejor claridad, se invirtió el color de los geles.

Este resultado sugiere que no existe interacción directa entre Mss51 y el mRNA de *COX1*, o que ésta podría ser muy débil o transitoria, de forma que no es detectable mediante nuestra técnica.

Resumen de resultados de la primera sección

En esta sección se demostró que Pet309 interactúa físicamente con el mRNA de *COX1* y que dicha interacción no depende de una traducción mitocondrial activa. La interacción se detectó cuando una mutante sin los 8 motivos PPR centrales se expresó a niveles basales, pero fue necesario sobreexpresar a una mutante sin los 12 motivos PPR centrales para detectar dicha interacción. Los 4 motivos PPR cuya ausencia provocó esta diferencia

de detección no parecen tener un papel más importante en la interacción, ya que una mutante sin dichos motivos muestra una interacción con el mRNA de *COXI* detectable a niveles basales. Estos resultados sugieren que cada motivo PPR de Pet309 tiene un papel cooperativo en la afinidad por el RNA. Por otro lado, no se detectó interacción física entre Mss51 y el mRNA de *COXI* mediante nuestra técnica de coimmunoprecipitación de RNA.

Segunda sección: estudio de la interacción de Pet309 y Mss51 con el ribosoma mitocondrial

Pet309 interactúa con el ribosoma mitocondrial

Se propone que la función de los activadores traduccionales mitocondriales es la de posicionar al ribosoma en el codón de inicio de su RNA mensajero blanco (Fox, 1996; Herrmann et al, 2013). La interacción entre Pet309 y el mRNA de *COXI* se comprobó por coimmunoprecipitación (figura 5), por lo que a continuación nos interesó estudiar si Pet309 también interactúa con el ribosoma mitocondrial. La interacción física de Pet309 con ambos componentes apoyaría la hipótesis de la función de todos los activadores traduccionales, la cual nunca se ha comprobado.

Para estudiar la interacción entre Pet309 y el ribosoma mitocondrial, las mitocondrias de la cepa que contienen a Pet309-HA integrado en el genoma se lisaron con 1% de digitonina en un amortiguador que contiene 10 mM de acetato de magnesio. En esta concentración de Mg^{2+} , las dos subunidades ribosomales están acopladas (Sperrazza & Spremulli, 1983). El lisado se cargó en un gradiente discontinuo del 20 al 40% de sacarosa. El gradiente se centrifugó a 180000 g por 2 horas y se dividió en 7 fracciones que se retiraron con micropipeta. Se precipitó la proteína de cada fracción y ésta se cargó en un gel de SDS-PAGE. La migración de Pet309-HA y de algunas proteínas ribosomales se analizó por western blot con anticuerpos específicos contra proteínas de la subunidad grande (Mrp20) y chica (Mrp51) ribosomales, así como contra la citrato sintasa (CS) como control negativo de una proteína que no interacciona con el ribosoma (Figura 14A). El western blot mostró que Pet309-HA comigra con la proteína Mrp51, quien forma parte de la subunidad chica ribosomal (Green-Willms et al, 1998), y con Mrp20, componente de la subunidad grande ribosomal (Fearon & Mason, 1988). Como se esperaba, la enzima del ciclo de Krebs citrato sintasa, que no está relacionada con la traducción mitocondrial, migró en la superficie del gradiente.

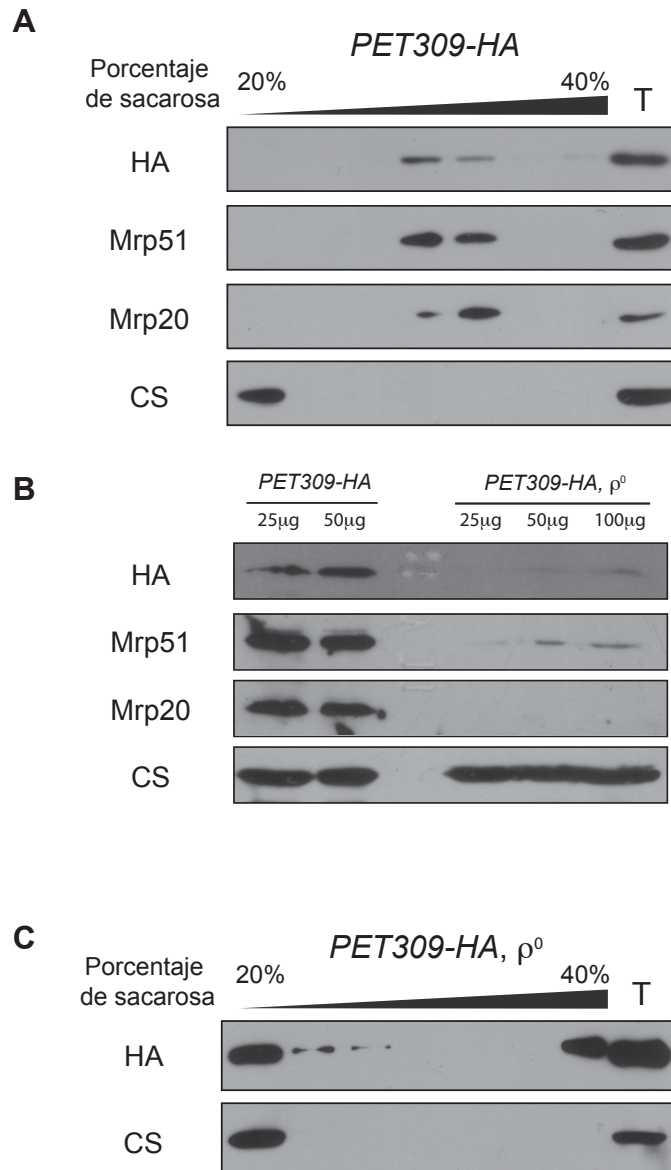


Figura 14. Pet309-HA interactúa con el ribosoma mitocondrial. **A)** 500 μg de mitocondrias de la cepa *PET309-HA* se lisaron con 1% de digitonina y se centrifugaron en un gradiente discontinuo de sacarosa del 20 al 40%. Las proteínas de cada una de las 7 fracciones obtenidas se analizaron mediante SDS-PAGE y western blot. Mrp51, proteína de la subunidad chica del ribosoma mitocondrial. Mrp20, proteína de la subunidad grande del ribosoma mitocondrial. CS, citrato sintasa. T, Total, equivalente al 7% del lisado total. **B)** Diferentes μg de proteína mitocondrial de la cepa *PET309-HA* y *PET309-HA ρ⁰* se analizaron por western blot con anticuerpos anti HA, anti Mrp51, anti Mrp20 y anti CS. **C)** El mismo experimento de A) se repitió con mitocondrias de una cepa sin DNA mitocondrial (ρ^0) que contiene a *PET309-HA* en un plásmido de alto número de copia. No se muestra el análisis por western blot de las dos proteínas ribosomales, ya que son indetectables cuando la cepa no tiene genoma mitocondrial.

Este resultado comprueba una comigración entre Pet309-HA y el ribosoma mitocondrial, lo que sugiere una interacción entre ellos. Sin embargo, la comigración también podría deberse a que Pet309-HA forma parte de un complejo del mismo peso molecular que el ribosoma, aunque independiente de él. Para probar que la migración de Pet309-HA en el gradiente de sacarosa se debe directamente a una interacción con el ribosoma, se hizo el mismo experimento de gradiente pero con una cepa que carece de DNA mitocondrial (cepa ρ^0). Los rRNAs mitocondriales se codifican en el genoma de este organelo, por lo que una cepa sin DNA mitocondrial no es capaz de ensamblar al ribosoma. Si la interacción existe, Pet309 cambiaría su patrón de migración en una cepa ρ^0 .

Antes de realizar el experimento de gradiente, las mitocondrias de la cepa *PET309-HA* ρ^0 se analizaron por western blot. En dicha muestra, la proteína Pet309-HA fue prácticamente indetectable (figura 14B). Este comportamiento es similar al observado para muchas proteínas ribosomales, quienes al no tener un complejo riboproteico en el cual ensamblarse, se degradan (Graack & Wittmann-Liebold, 1998; Warner, 1989). La inestabilidad de Pet309-HA en una cepa ρ^0 apoya que es una proteína que interactúa con el ribosoma mitocondrial.

Para compensar la inestabilidad de Pet309-HA en la cepa ρ^0 , se sobreexpresó a Pet309-HA utilizando un plásmido de alto número de copia (YEp352). El lisado mitocondrial de la cepa ρ^0 que sobreexpresa a *PET309-HA* se cargó en el gradiente de sacarosa y las fracciones se analizaron por western blot (figura 14C). Se encontró que Pet309-HA migra en la superficie del gradiente cuando el ribosoma no se ensambla, junto con la citrato sintasa. Este resultado confirma que la migración de Pet309-HA en fracciones profundas del gradiente depende de la presencia del ribosoma mitocondrial. Con estos resultados podemos concluir que Pet309 interactúa físicamente con el ribosoma mitocondrial.

El mRNA de *COXI* no es necesario para la interacción entre Pet309 y el ribosoma

Pet309 interactúa con el mRNA de *COXI*, por lo que la interacción de este activador con el ribosoma mitocondrial podría estar mediada por el mRNA en proceso de traducción y no por una interacción directa. Para estudiar este aspecto, se realizó el gradiente de sacarosa con el lisado mitocondrial de una cepa *PET309-HA, cox1 Δ* , en la que tanto la

región codificante de *COXI* como sus UTRs se eliminaron del genoma mitocondrial (Perez-Martinez et al, 2009). Por lo tanto, en esta cepa el mRNA de *COXI* no está presente (figura 15).

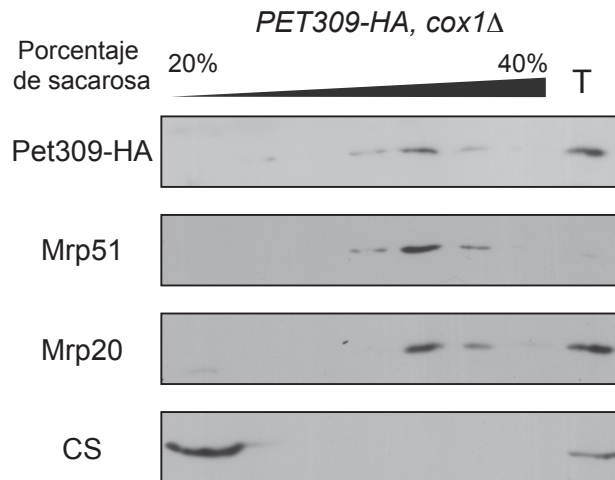


Figura 15. El mRNA de *COXI* no es necesario para la interacción de Pet309-HA con el ribosoma mitocondrial. El lisado mitocondrial de la cepa *PET309-HA, cox1Δ*, se separó en un gradiente de sacarosa como se indica para la figura 14A. Las siete fracciones se analizaron por western blot. Mrp51, proteína de la subunidad chica del ribosoma mitocondrial. Mrp20, proteína de la subunidad grande del ribosoma mitocondrial. CS, citrato sintasa. T, total equivalente al 7% del lisado total.

El análisis mostró que Pet309 comigra con el ribosoma mitocondrial a pesar de la ausencia del mRNA de *COXI*. Esto significa que la interacción entre Pet309 y el ribosoma mitocondrial es directa y no se da a través del mRNA de *COXI*. También indica que la traducción del mRNA de *COXI* no necesita estar activa para que Pet309 interactúe con el mitorribosoma.

La interacción entre Pet309 y el ribosoma depende de la región amino terminal de Pet309

Dentro de la secuencia de Pet309, se predicen 22 motivos PPR en serie a lo largo de toda la proteína (figura 3). Los motivos PPR 7 al 18 son predichos por el Software TPR pred (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/tprpred>). Los PPRs restantes: 6 motivos en la región amino terminal y 4 en la región carboxilo terminal se predicen exclusivamente por el algoritmo escondido de Markov desarrollado por el grupo de Pawel Golik (Lipinski et al, 2011). Para estudiar más acerca del mecanismo de acción de Pet309 y de la función de cada una de las regiones de la proteína, quisimos saber qué región de Pet309 interactúa con el ribosoma mitocondrial.

Nuestra primera predicción fue que la región carboxilo terminal de Pet309, es decir, los últimos 4 motivos PPR de la proteína, eran responsables de la interacción con el mitorribosoma. Sabemos que la eliminación de esta región (*pet309 Δ 760-962-HA* o *pet309 Δ carboxilo-HA*) provoca un fenotipo no respiratorio causado por la falta de traducción del mRNA de *COX1* (Zamudio-Ochoa, tesis de licenciatura). Aunado a esto, se comprobó que 2 activadores traduccionales: Cbs2 y Pet122, interactúan con el ribosoma a partir de su región carboxilo terminal (Haffter & Fox, 1992; Krause-Buchholz et al, 2004; McMullin et al, 1990). Para saber si los últimos 4 motivos PPR de Pet309 son los responsables de la interacción con el mitorribosoma, la mutante *pet309 Δ carboxilo-HA* (figura 16A) se introdujo en un plásmido de bajo número de copia (pRS416), el cual se transformó en una levadura *pet309 Δ* . La migración de la proteína *Pet309 Δ carboxilo-HA* se analizó por medio de un gradiente de sacarosa (figura 16B).

El resultado mostró que la proteína *Pet309 Δ carboxilo-HA* comigra con el ribosoma mitocondrial. Por lo tanto, los últimos 4 motivos PPR de Pet309 son dispensables para su interacción con el ribosoma.

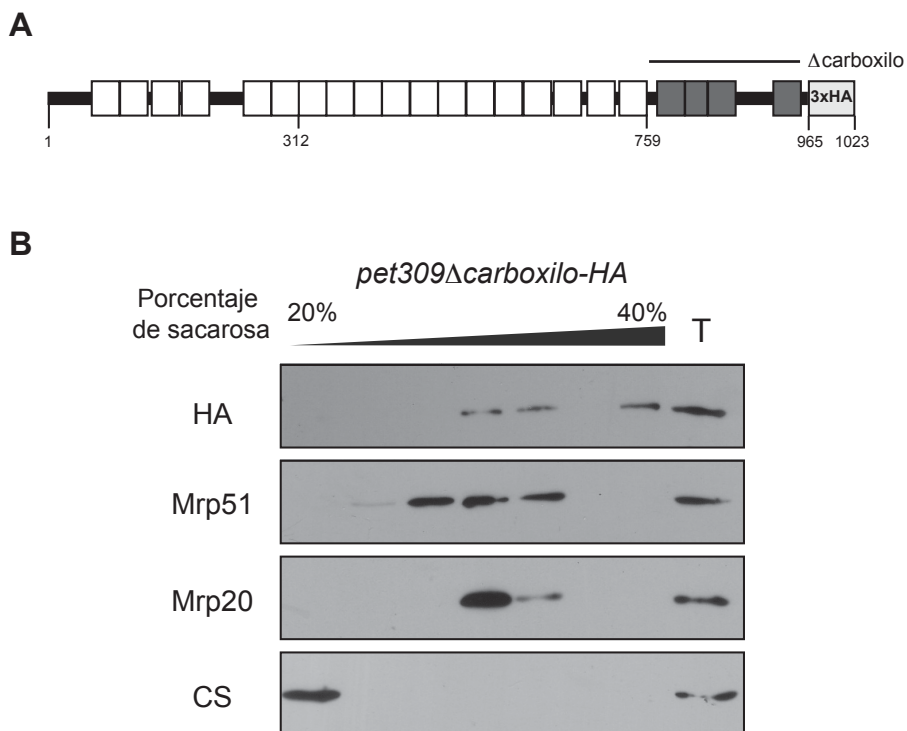


Figura 16. Los últimos 4 motivos PPR de Pet309 no son necesarios para su interacción con el ribosoma. **A)** Esquema de Pet309-HA que indica en color gris los motivos PPR eliminados en la mutante *pet309Δcarboxilo-HA*. **B)** El lisado mitocondrial de la cepa *pet309Δcarboxilo-HA* se cargó en un gradiente de sacarosa como se indica para la figura 14 y las fracciones se analizaron por western blot. Mrp51, proteína de la subunidad chica del ribosoma mitocondrial. Mrp20, proteína de la subunidad grande del ribosoma mitocondrial. CS, citrato sintasa. T, total equivalente al 7% del lisado total.

A continuación decidimos probar si los 12 motivos PPR centrales de Pet309 son los responsables de la interacción con el ribosoma. Como se observó en la sección 1 de este trabajo, una mutante sin los 12 motivos PPR centrales de Pet309 no es capaz de activar la traducción del mRNA de *COXI*, a pesar de que aún es capaz de interactuar con dicho mRNA, aunque con menor afinidad. Las mitocondrias de la cepa que contiene a *pet309Δ12ppr-HA* (figura 17A) en un plásmido de bajo número de copia se lisaron y centrifugaron en el gradiente de sacarosa, y su migración se analizó por western blot (figura 17B). El resultado mostró que la mutante *pet309Δ12ppr-HA* comigra con el

ribosoma mitocondrial, por lo que los doce motivos PPR centrales de Pet309 no son los responsables de la interacción de Pet309 con dicho complejo.

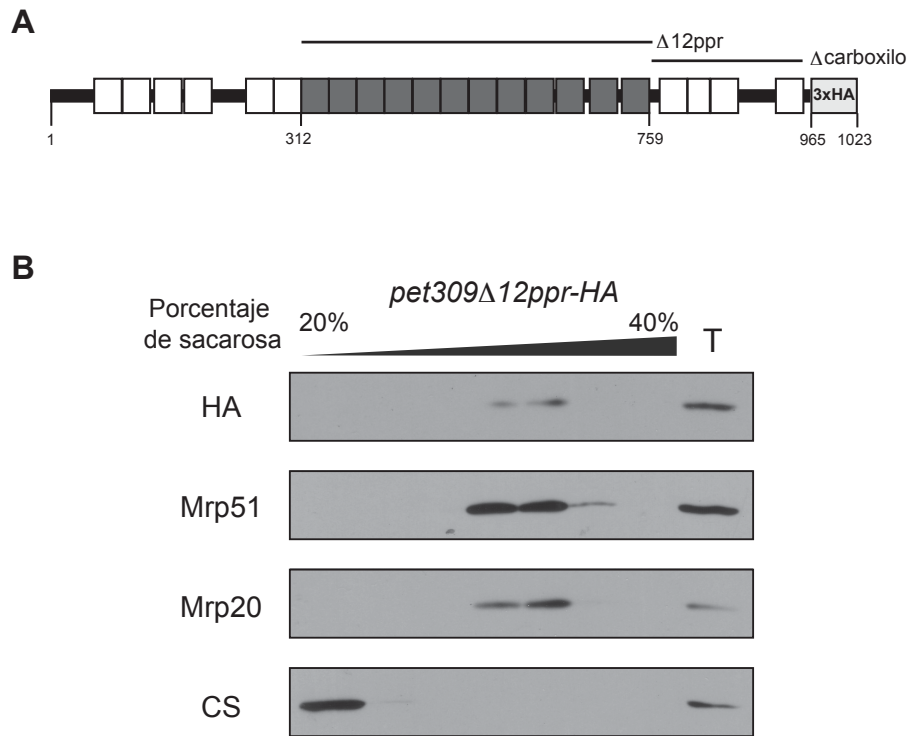


Figura 17. Los 12 motivos PPR centrales de Pet309 no son necesarios para su interacción con el ribosoma mitocondrial. **A)** Esquema de Pet309-HA que indica en color gris los motivos PPR eliminados en la mutante $pet309\Delta 12ppr-HA$. **B)** El lisado mitocondrial de la cepa $pet309\Delta 12ppr-HA$ se cargó en un gradiente de sacarosa como se indica para la figura 14 y las fracciones se analizaron por western blot. Mrp51, proteína de la subunidad chica del ribosoma mitocondrial. Mrp20, proteína de la subunidad grande del ribosoma mitocondrial. CS, citrato sintasa. T, total equivalente al 7% del lisado total.

A continuación se diseñó una mutante que carece de los primeros 6 motivos PPR de la proteína. En esta mutante se elimina desde el aminoácido 53 hasta el aminoácido 311 (Pet309 Δ amino-HA) (figura 18A). Los primeros 53 aminoácidos no se eliminaron para

no interferir con la posible presecuencia de Pet309 que dirigiría a Pet309 a la mitocondria, aunque no se ha demostrado su presencia. Para saber si la proteína Pet309 Δ amino-HA era importada eficientemente por la mitocondria, durante el proceso de purificación de mitocondrias se tomó una alícuota de la fracción citosólica celular. Esta alícuota se analizó por western blot junto con una muestra de mitocondrias de la misma cepa. La proteína Pet309 Δ amino-HA se detectó en la fracción mitocondrial y no en la fracción citosólica de la célula con un peso de 83 kDa. (figura 18B). La cepa *pet309 Δ amino-HA* mostró un fenotipo no respiratorio aún en sobreexpresión (Figura 18 C) debido a la ausencia de síntesis de Cox1 (figura 18D).

Cuando se analizó la migración de la proteína Pet309 Δ amino-HA en el gradiente de sacarosa, se observó que no migraba en las mismas fracciones que el ribosoma mitocondrial (figura 19), lo que indica que los primeros 6 motivos PPR de Pet309 son necesarios para que la proteína interactúe con el ribosoma.

Inesperadamente, la proteína Pet309 Δ amino-HA no migra en la primera fracción del gradiente como lo hace Pet309-HA en un fondo ρ^0 o como lo hace la citrato sintasa. Mientras que Pet309-HA en ausencia de ribosoma ensamblado migra en la primera fracción del gradiente (figura 14C), Pet309 Δ amino-HA migra en la segunda fracción. Esto significa que la versión mutante de la proteína forma parte de un complejo de alto peso molecular más ligero que el ribosoma. Aunado a esto, Pet309 Δ amino-HA no es una proteína inestable como lo es Pet309-HA en el fondo ρ^0 . Esto sugiere que Pet309 Δ amino-HA podría interactuar con otras proteínas que le den estabilidad y que evitan que se degrade a pesar de no interactuar con el ribosoma. Alternativamente, Pet309 Δ amino-HA podría formar homopolímeros resistentes a proteasas. Se requieren futuros estudios para saber qué componentes forman parte del complejo en el que se encuentra Pet309 Δ amino-HA.

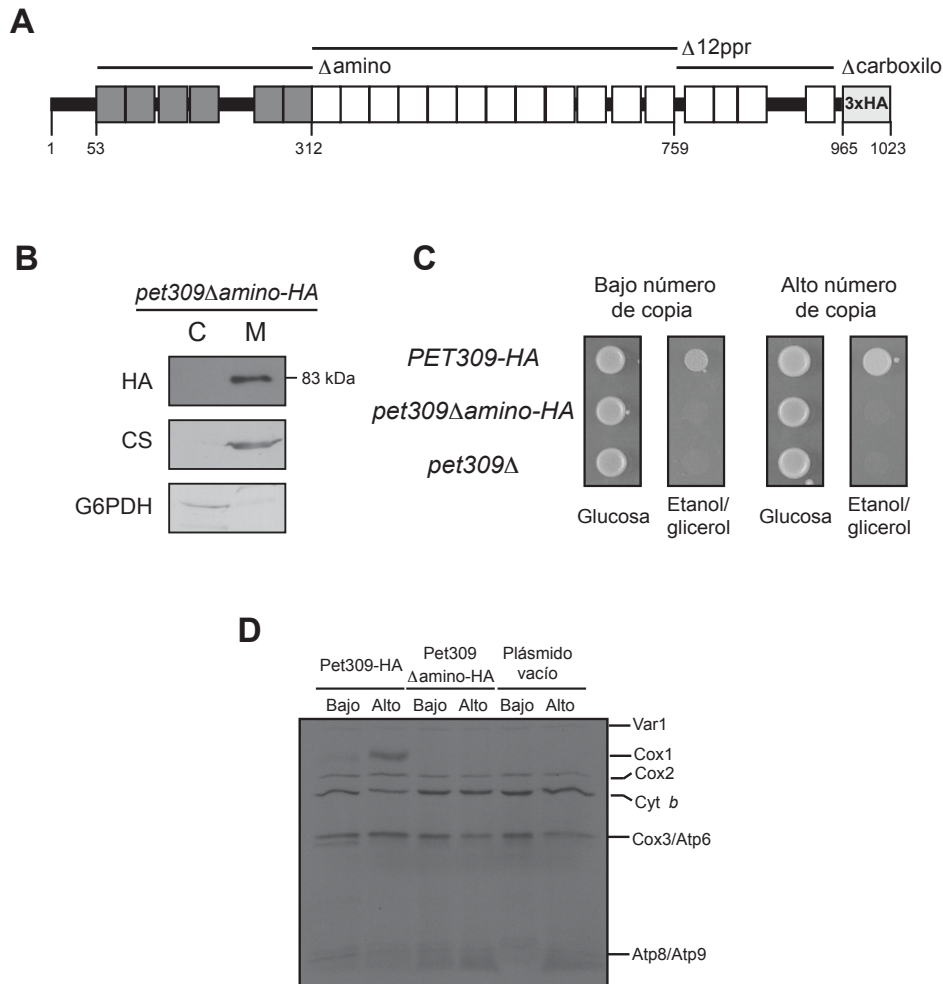


Figura 18. Los primeros 6 motivos PPR de Pet309 no son necesarios para su localización mitocondrial pero sí para la síntesis de Cox1. **A)** Esquema de Pet309-HA que indica en color gris los motivos PPR eliminados en la mutante *pet309Δamino-HA*. **B)** Análisis por western blot de la fracción citosólica (C) y la fracción mitocondrial (M) de la cepa *pet309Δamino-HA*. CS, citrato sintasa (control de proteína mitocondrial). G6PDH, Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (control de proteína citosólica). **C)** Fenotipo fermentativo (glucosa) y respiratorio (etanol/glicerol) de las cepas *PET309-HA*, *pet309Δamino-HA* y *pet309Δ* en baja y alta expresión. Las células se incubaron por 3 días a 30°C. **D)** Marcaje radiactivo con ^{35}S -metionina de proteínas codificadas en el DNA mitocondrial en la cepa *PET309-HA* y *pet309Δamino-HA* en bajo y alto número de copia.

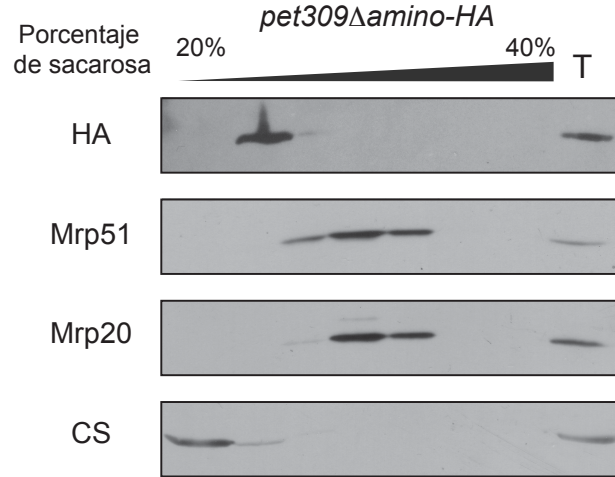


Figura 19. Los primeros 6 motivos PPR de Pet309 son necesarios para su interacción con el ribosoma mitocondrial. El lisado mitocondrial de la cepa *pet309Δamino-HA* se separó en un gradiente de sacarosa como se indica para la figura 14A y las fracciones se analizaron por western blot. Mrp51, proteína de la subunidad chica del ribosoma mitocondrial. Mrp20, proteína de la subunidad grande del ribosoma mitocondrial. CS, citrato sintasa. T, total equivalente al 7% del lisado total.

Mss51 interactúa con el ribosoma mitocondrial

Al igual que Pet309, Mss51 también es necesaria para la traducción del mRNA de *COXI* (Decoster et al, 1990). En los experimentos de co-inmunoprecipitación no detectamos una interacción entre Mss51 y el mRNA de *COXI*. Por lo tanto, nos interesaba saber si Mss51 interactúa físicamente con la maquinaria traduccional o si su papel en el inicio de la traducción se da de una forma indirecta. Para ello se analizó su interacción con el ribosoma centrifugando el lisado mitocondrial de una cepa *MSS51-HA* en un gradiente de sacarosa (figura 20A).

El análisis por western blot mostró que la mayor parte de Mss51-HA se encuentra en la superficie del gradiente. Sin embargo, se detectó una pequeña proporción de Mss51-HA en las mismas fracciones que el ribosoma mitocondrial. Este resultado sugiere que Mss51 se encuentra al menos en dos poblaciones, una de las cuales interactúa con la maquinaria traduccional. Para comprobar la interacción entre Mss51-HA y el ribosoma, se repitió el

mismo experimento de gradiente en una cepa *MSS51-HA*, ρ^0 (Figura 20A). A diferencia de lo observado para Pet309, en esta cepa, Mss51-HA es igual de estable que en una cepa con DNA mitocondrial silvestre (Rodolfo García Villegas, tesis de licenciatura).

El resultado mostró que en mitocondrias que no ensamblan al ribosoma, toda la proteína Mss51-HA migra en la superficie del gradiente. Estos resultados demuestran que al menos una pequeña proporción de Mss51 interactúa con el ribosoma mitocondrial.

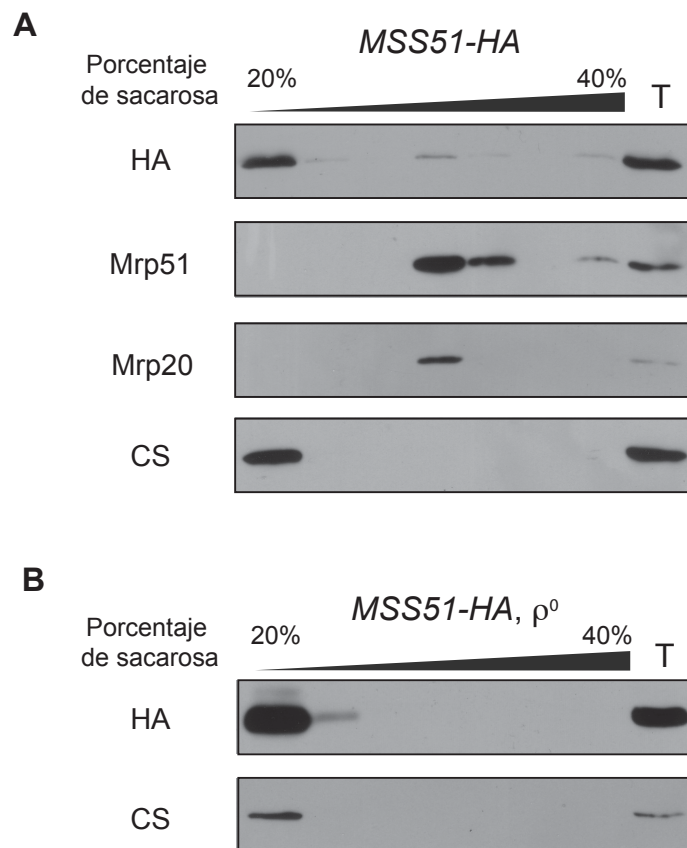


Figura 20. Una población de Mss51 interactúa con el ribosoma mitocondrial. **A)** El lisado mitocondrial de la cepa *MSS51-HA* se cargó en un gradiente de sacarosa como se indica para la figura 14A y las fracciones se analizaron por western blot. Mrp51, proteína de la subunidad chica del ribosoma mitocondrial. Mrp20, proteína de la subunidad grande del ribosoma mitocondrial. CS, citrato sintasa. T, total equivalente al 7% del lisado total. **B)** El mismo experimento explicado en A) se repitió con mitocondrias de la cepa *MSS51-HA* sin DNA mitocondrial (ρ^0). No se muestra el análisis por western blot de las dos proteínas ribosomales, ya que son indetectables cuando la cepa no tiene genoma mitocondrial.

El mRNA de *COX1* no es necesario para la interacción entre Mss51 y el ribosoma

Una vez comprobada la interacción de Mss51 con el ribosoma, quisimos saber si dicha interacción dependía de la traducción activa del mRNA de *COX1*. Para ello, el experimento de gradiente de sacarosa se realizó utilizando mitocondrias de una cepa *MSS51-HA, cox1Δ*. La ausencia del gen de *COX1* garantiza que la proteína Cox1 no pueda sintetizarse. El lisado mitocondrial de dicha cepa se cargó y centrifugó en un gradiente de sacarosa y las fracciones se analizaron por western blot (figura 21).

El resultado mostró que Mss51 interactúa con el ribosoma a pesar de la ausencia del mRNA de *COX1*. Este resultado indica que la interacción entre Mss51 y el ribosoma no depende de una traducción activa del mRNA de *COX1*.

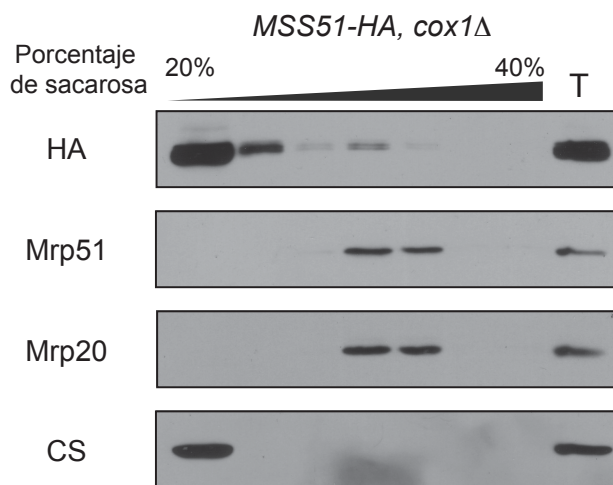


Figura 21. La interacción de Mss51-HA con el ribosoma mitocondrial no depende de la presencia del mRNA de *COX1*. El lisado mitocondrial de la cepa *MSS51-HA, cox1Δ*, se separó en un gradiente de sacarosa como se indica para la figura 14A y las fracciones se analizaron por western blot. Mrp51, proteína de la subunidad chica del ribosoma mitocondrial. Mrp20, proteína de la subunidad grande del ribosoma mitocondrial. CS, citrato sintasa. T, total equivalente al 7% del lisado total.

Resumen de los resultados de la segunda sección

Pet309 interactúa con el ribosoma mitocondrial a partir de su región amino terminal. Por otro lado, Mss51 se divide al menos en dos poblaciones, una de las cuales interactúa con el mitorribosoma. La presencia del mRNA de *COXI* no es necesaria para la interacción de ambos activadores con el ribosoma mitocondrial.

Tercera sección: estudio sobre la interacción física y funcional entre Pet309 y Mss51

Pet309 y Mss51 interactúan físicamente

Hasta el momento, las únicas interacciones descritas entre Pet309 y Mss51 son de tipo funcional (ambas activan la síntesis de Cox1) y genético (ambas actúan en el extremo 5'UTR del mRNA de *COX1*) (Decoster et al, 1990; Manthey & McEwen, 1995; Perez-Martinez et al, 2003; Perez-Martinez et al, 2009). Sin embargo, no se ha descrito una interacción física entre Pet309 y Mss51. Debido a que observamos que ambas proteínas interactúan con la maquinaria traduccional, decidimos investigar si existe una interacción física entre ellas o si su papel en la activación de la traducción de *COX1* se da de forma separada.

Para saber si existe una interacción física entre Pet309 y Mss51, utilizamos una cepa en la que Pet309 está etiquetada con un triple epítoto de hemaglutinina en el extremo carboxilo terminal (Pet309-HA) y Mss51 se encuentra etiquetada con un triple epítoto de c-Myc en el extremo carboxilo terminal (Mss51-Myc). Las etiquetas no afectaron el crecimiento de la cepa en medio fermentable o medio respiratorio (datos no mostrados).

Utilizando el mismo amortiguador que el usado para las co-inmunoprecipitaciones de proteína-RNA previamente descritas, Pet309-HA se inmunoprecipitó con anticuerpo anti-HA acoplado a perlas de sefarosa. Se purificaron las proteínas de la fracción total y del inmunoprecipitado, y se analizaron por western blot. El experimento mostró una inmunoprecipitación eficiente de Pet309-HA. Una pequeña parte de Mss51-Myc se detectó reproduciblemente en el inmunoprecipitado de Pet309-HA (figura 22A). Este resultado indica que una pequeña proporción de Mss51 interactúa físicamente con Pet309.

A continuación se inmunoprecipitó a Mss51-Myc con anticuerpo anti-myc acoplado a perlas de sefarosa. Se ha reportado la interacción física entre Mss51 y la proteína Cox1 (Perez-Martinez et al, 2003), por lo que la detección de dicha proteína en el inmunoprecipitado nos indicó que las interacciones proteicas se preservaron (figura 22B). Se observó que una pequeña fracción de Pet309-HA estaba presente en el

inmunoprecipitado de Mss51-Myc, confirmando la interacción física entre Pet309 y Mss51.

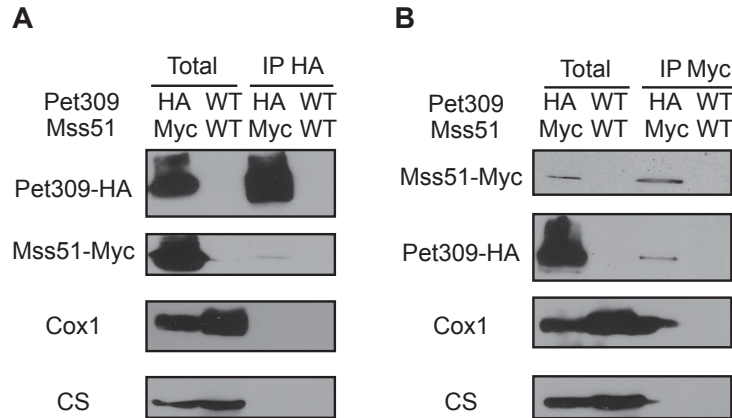


Figura 22. Pet309 interactúa físicamente con Mss51. **A)** 1 mg de mitocondrias de la cepa *PET309-HA*, *MSS51-MYC* y de la cepa sin etiquetas (WT) se lisó con 0.7% de DDM. La proteína Pet309-HA se inmunoprecipitó con anticuerpo anti HA. La proteína de la fracción total (equivalente al 8% del lisado) y de la inmunoprecipitación se analizó por SDS-PAGE y western blot. CS, citrato sintasa. **B)** Se repitió el experimento en A) pero la proteína Mss51-Myc se inmunoprecipitó con anticuerpo anti Myc.

Con estos resultados podemos concluir que además de interactuar funcional y genéticamente, Pet309 y Mss51 interactúan físicamente, probablemente formando parte del mismo complejo proteico. Debido a que Pet309 sólo es detectable en las fracciones donde se encuentra el ribosoma mitocondrial (figura 14A), es probable que la población de Mss51 que interactúa con Pet309 sea la misma que interactúa con la maquinaria traduccional.

La ausencia de Mss51 modifica la interacción entre Pet309 y el mRNA de *COX1*

Mss51 y Pet309 comparten el sitio de activación de la traducción de *COX1*: el extremo 5'UTR de dicho mensajero (Manthey & McEwen, 1995; Perez-Martinez et al, 2003; Perez-Martinez et al, 2009). En nuestros experimentos comprobamos la interacción física entre Pet309 y el mRNA de *COX1* (Figura 5) pero no logramos comprobarla para Mss51 (Figura 13). Debido a que demostramos una interacción física entre Pet309 y Mss51,

surgió la hipótesis de que la función de Mss51 podría ser la de activar o capacitar a Pet309 para su interacción con el mRNA de *COXI* sin que Mss51 interactúe directamente con dicho mRNA. Para probar esta hipótesis, analizamos si la interacción entre Pet309 y el mRNA de *COXI* se alteraba en ausencia de Mss51. Para ello se llevó a cabo un experimento de co-inmunoprecipitación con mitocondrias de una cepa que contiene a *PET309-HA* y que tiene eliminado al gen *MSS51(mss51Δ)*.

De forma reproducible, observamos que la inmunoprecipitación de Pet309-HA en la cepa *mss51Δ* fue muy ineficiente (Figura 23A). Esto sugiere que la ausencia de Mss51 podría provocar un cambio de conformación en Pet309-HA, lo que daría lugar a que el epítipo no se exponga de la misma forma que en una cepa que sí contiene a Mss51. En estas condiciones no se pudo detectar a *COXI* en el inmunoprecipitado de Pet309-HA (datos no mostrados). Sin embargo esto podía deberse a que, con una inmunoprecipitación tan ineficiente, los niveles de mRNA de *COXI* en el precipitado se encontrarán por debajo del umbral de detección del ensayo. Por lo tanto decidimos sobreexpresar a Pet309-HA en la cepa *mss51Δ*. De esta forma, aunque la inmunoprecipitación fuera ineficiente, obtendríamos una mayor cantidad de Pet309-HA en el inmunoprecipitado con lo que la detección del RNA de *COXI* mediante RT-PCR sería más confiable. Para sobreexpresar a la proteína, la cepa *mss51Δ* se transformó con un plásmido de alto número de copia (YEp352) que contenía a *PET309-HA*. Las mitocondrias de esta cepa se utilizaron para hacer un ensayo de co-inmunoprecipitación de RNA (Figura 23 B y C).

A pesar de tener una inmunoprecipitación de Pet309-HA similar a la observada en la cepa silvestre en bajo número de copia, el gen *COXI* no se detectó en el inmunoprecipitado de la cepa *mss51Δ* con *PET309-HA* sobreexpresada. Este resultado sugiere que en ausencia de Mss51, Pet309 no interactúa con el mRNA de *COXI*, o que esta interacción es muy débil para ser detectada con nuestro ensayo.

Para estudiar de otra forma el papel de Mss51 en la interacción de Pet309 con el mRNA de *COXI*, se analizaron los niveles de dicho RNA mensajero en ausencia de Mss51. Como se dijo anteriormente, los niveles de mRNA de *COXI* se incrementan hasta un 400% cuando Pet309-HA se sobreexpresa (Tavares-Carreón et al, 2008). Si Pet309 no interactuara con el mRNA de *COXI* en ausencia de Mss51, entonces una cepa *mss51Δ* que sobreexpresara a *PET309* no acumularía el RNA mensajero de *COXI*. Para probar esta

hipótesis, se purificó RNA total de la cepa *mss51Δ* expresando a *PET309-HA* en plásmidos de bajo y alto número de copia. Los niveles del mRNA de *COX1*, *COX2* y

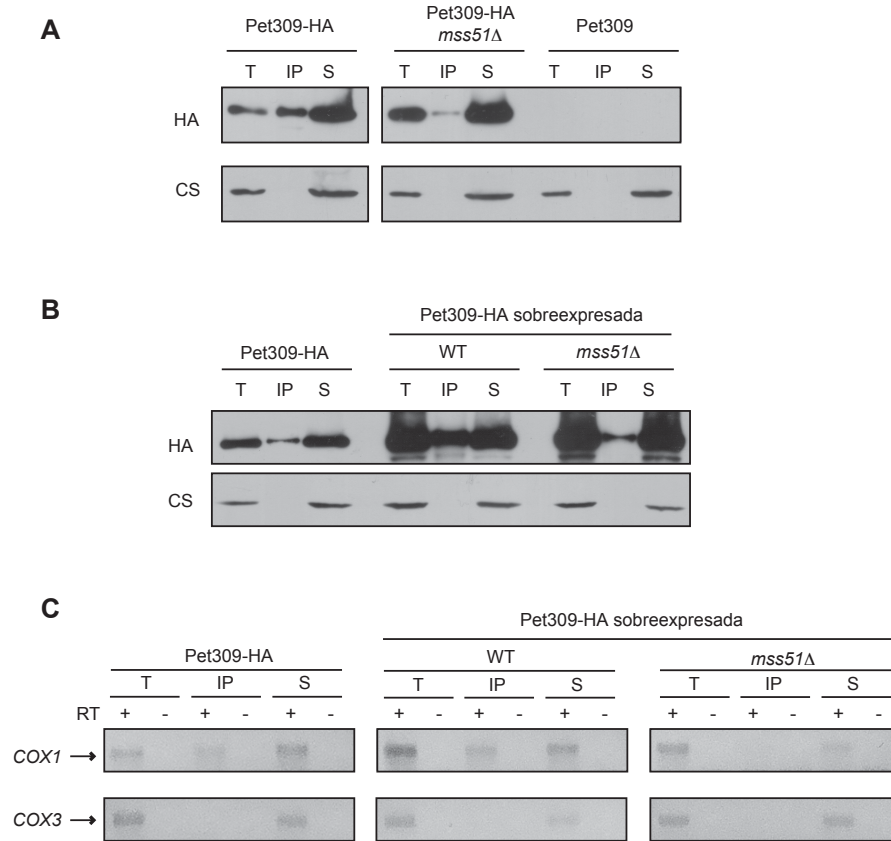


Figura 23. La interacción entre Pet309-HA y el mRNA de *COX1* es indetectable en ausencia de Mss51. **A)** 1 mg de mitocondrias de las cepas *PET309-HA*, *PET309-HA mss51Δ* y *PET309* se lisaron con 0.7% de DDM y Pet309-HA se precipitó con anticuerpo anti HA acoplado a perlas de sefarosa. 4% del lisado total y 25% de la fracción inmunoprecipitada y del sobrenadante se precipitaron con TCA. La proteína obtenida se analizó mediante SDS-PAGE y western blot con los anticuerpos indicados. CS, anticuerpo anti citrato sintasa. **B)** El mismo proceso descrito en A) se realizó con mitocondrias de la cepa *PET309-HA* y de las cepas que sobreexpresan a *PET309-HA* en presencia y ausencia de *MSS51* (WT y *mss51Δ* respectivamente). **C)** El RNA de la fracción total (T), fracción inmunoprecipitada (IP) y fracción del sobrenadante (S) mostradas en B), se purificó y se utilizó para obtener cDNA por medio de transcripción reversa (RT) y oligos específicos para cada gen mitocondrial. El cDNA se empleó como molde para amplificar los genes *COX1* y *COX3*. Los signos + y - indican la adición y ausencia de transcriptasa reversa durante la síntesis de cDNA, respectivamente, y es un control para descartar contaminación con DNA. Para mayor claridad se invirtió el color de la fotografía del gel de agarosa.

15S rRNA se analizaron por northern blot (Figura 24 A y B). El experimento indicó que el mRNA de *COX1* se acumula de forma similar en la cepa silvestre y en la cepa $\Delta mss51$ cuando Pet309-HA se sobreexpresa, sugiriendo que la interacción entre Pet309 y el mRNA de *COX1* está presente en ausencia de Mss51.

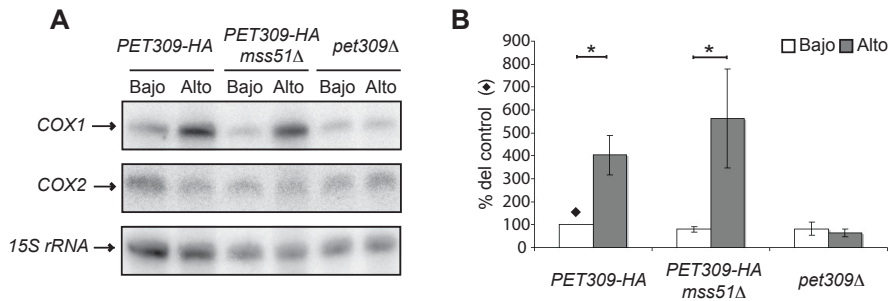


Figura 24. El mRNA de *COX1* se acumula cuando *PET309-HA* se sobreexpresa independientemente de la presencia de Mss51. **A)** El RNA total de las cepas *pet309Δ* y *pet309Δ/mss51Δ* transformadas con *PET309-HA* en plásmidos de bajo y alto número de copia, así como con plásmidos vacíos se separó en un gel de agarosa desnaturalizante. La señal de *COX1*, *COX2* y *15S* rRNA se analizó por northern blot. Los niveles del mRNA de *COX2* son un control de un gen mitocondrial no relacionado con Pet309. **B)** La señal del mRNA de *COX1* normalizada con la señal del rRNA *15S* de tres experimentos independientes se cuantificó tomando los niveles de la cepa *PET309-HA* en bajo número de copia (rombo negro) como el 100%. Las diferencias estadísticamente significativas se obtuvieron con un análisis de varianza ANOVA y un análisis de Bon-Ferroni. Las diferencias significativas relevantes se indican con un asterisco *.

Debido a que en el experimento de coimmunoprecipitación en ausencia de Mss51 no detectamos la interacción entre Pet309-HA y el mRNA de *COX1*, podemos concluir que en ausencia de Mss51, Pet309-HA sí interacciona con el mRNA de *COX1*, pero esta interacción se modificó de forma que en nuestros ensayos de coimmunoprecipitación de RNA no podemos detectarla. Ya que no logramos inmunoprecipitar eficientemente a Pet309-HA en ausencia de Mss51, creemos que la conformación de Pet309-HA podría ser diferente en esta condición, de forma que el epítipo de HA no se exponga al solvente.

Mss51 no es necesaria para la interacción entre Pet309 y el ribosoma

Nuestros resultados previos mostraron que Pet309 tiene una interacción muy estable con el ribosoma mitocondrial, ya que en el gradiente de sacarosa, Pet309-HA únicamente se detecta en las fracciones donde migra el mitoribosoma. Este no es el caso de Mss51-HA, que se detecta principalmente en la superficie del gradiente, con muy poca proporción de la proteína migrando con el ribosoma. Esto podría sugerir que la interacción de Mss51 con el ribosoma es inestable y/o transitoria. Esta interacción podría deberse a que Mss51 entra brevemente en contacto con la maquinaria traduccional para capacitar a Pet309 para que pueda interactuar con el ribosoma. Esto explicaría que el sitio de acción de Mss51 sea el extremo 5'UTR del mRNA de *COX1* a pesar de que no hayamos observado interacción de Mss51 con dicho mRNA.

Para probar esta hipótesis se realizó el experimento de centrifugación en gradientes de sacarosa de una cepa *PET309-HA, mss51Δ*. Si Mss51 es necesaria para que Pet309 interactúe con el mitoribosoma, en una cepa *mss51Δ* no se detectaría la comigración de Pet309-HA con el ribosoma (figura 25).

El resultado mostró que en ausencia de Mss51, Pet309-HA migra con el ribosoma mitocondrial, lo que indica que Mss51 no es necesaria para la interacción entre Pet309 y el ribosoma.

Pet309 no es necesaria para la interacción entre Mss51 y el ribosoma

Mss51 interactúa con el ribosoma aún en ausencia del mRNA de *COX1*, lo que indica que esta interacción no depende de una traducción activa. Sin embargo, esta interacción podría depender de Pet309, quien parece tener una asociación muy estable con el ribosoma, y podría reclutar a Mss51 al sitio de activación de la traducción de *COX1* para que ejerza su función. Para probar esta hipótesis, se realizó el experimento de centrifugación en gradiente de sacarosa con mitocondrias de una cepa *MSS51-HA, pet309Δ*. El análisis de las fracciones del gradiente mostró una migración de Mss51-HA como el de una cepa silvestre (figura 26). Este resultado indica que Mss51 no necesita de Pet309 para interactuar con la maquinaria traduccional.

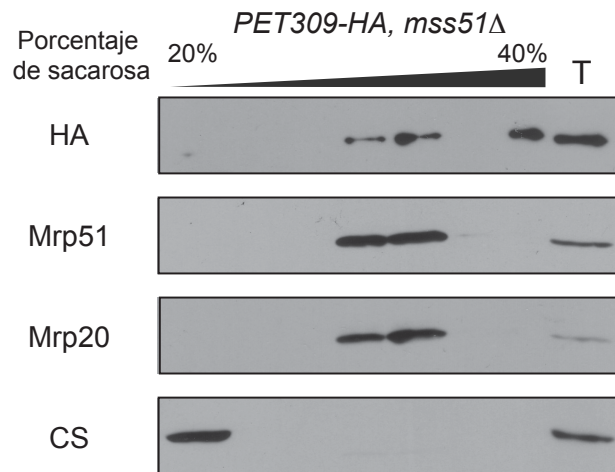


Figura 25. La interacción de Pet309-HA con el ribosoma mitocondrial no depende de Mss51. 500 μ g de mitocondrias de la cepa *PET309-HA, mss51Δ*, se lisaron con 1% de digitonina y se cargaron en un gradiente discontinuo de 20 al 40% de sacarosa. La proteína obtenida de cada fracción se cargó en un gel SDS-PAGE y se analizó por western blot. Mrp51, proteína de la subunidad chica del ribosoma mitocondrial. Mrp20, proteína de la subunidad grande del ribosoma mitocondrial. CS, citrato sintasa. T, total equivalente al 7% del lisado total.

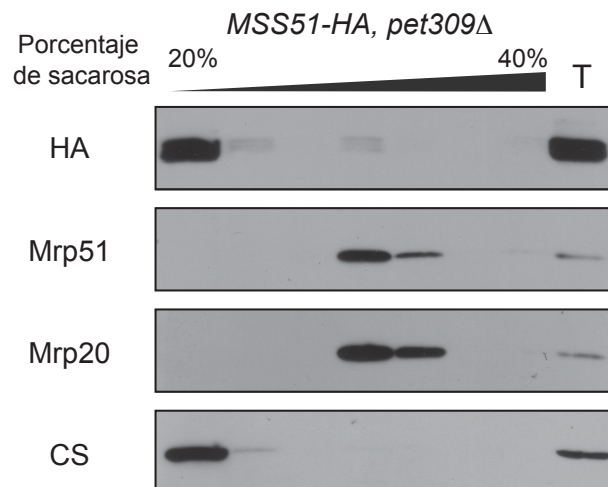


Figura 26. La interacción de Mss51-HA con el ribosoma mitocondrial no depende de Pet309. El lisado mitocondrial de la cepa *MSS51-HA, pet309Δ*, se cargó en un gradiente de sacarosa como se indica para la figura 25 y las fracciones se analizaron por western blot. Mrp51, proteína de la subunidad chica del ribosoma mitocondrial. Mrp20, proteína de la subunidad grande del ribosoma mitocondrial. CS, citrato sintasa. T, total equivalente al 7% del lisado total.

Resumen de los resultados de la tercera sección

En ausencia de Mss51, la interacción de Pet309 con el mRNA de *COXI* no es detectable. Sin embargo, Pet309 sobreexpresada en un fondo *mss51Δ* acumula al mRNA de *COXI* a los mismos niveles que la cepa silvestre. Esto sugiere que Pet309 interactúa con el mRNA de *COXI* en ausencia de Mss51, pero esta interacción cambia de forma que no la podemos detectar por nuestra técnica. Pet309 y Mss51 interactúan físicamente o al menos forman parte del mismo complejo. Sin embargo, Mss51 no necesita de Pet309 para interactuar con el ribosoma y Pet309 tampoco necesita a Mss51 para interactuar con la maquinaria traduccional.

Discusión

En mitocondria, la activación de la traducción es una etapa muy regulada. En general los activadores traduccionales se encuentra en concentraciones limitantes para la activación de la traducción de su mRNA (Fox, 1996; Perez-Martinez et al, 2009), y su expresión se reprime en presencia de glucosa (Steele et al, 1996) o se activa en condiciones aeróbicas (Marykwas & Fox, 1989). Además de regularse a este nivel, la expresión de *COXI* también se regula por el estado de ensamblaje de la citocromo *c* oxidasa, complejo del cual forma parte la proteína Cox1. La función de Mss51 como sensor de ensamblaje de la CcO ha sido muy estudiada y se han descubierto otras proteínas que cooperan con ella en este proceso, además de que se ha logrado identificar a la región carboxilo terminal de Cox1 como el sitio de unión de Mss51 (Shingu-Vazquez et al, 2010). Sin embargo, poco se sabe del mecanismo de activación traduccional de Mss51 y de cómo se relaciona con la función de Pet309. Por otro lado, la presencia de motivos de unión a RNA dentro de la secuencia de Pet309 aunada a su interacción genética con el extremo 5'UTR del mRNA de *COXI*, sugería una interacción física entre Pet309 y su mRNA blanco que no había sido comprobada.

Los resultados de esta tesis aportan datos acerca del mecanismo por el cual se activa la síntesis de Cox1, principalmente por medio del estudio de las interacciones de sus dos activadores traduccionales con el ribosoma mitocondrial y con el mRNA de *COXI*.

Este trabajo es la primera comprobación *in vivo* de una interacción física entre un activador traduccional mitocondrial y su RNA mensajero blanco. La interacción de Pet309 con el mRNA de *COXI* es detectable aún cuando la traducción no se encuentre activa. Esto sugiere una asociación estable entre Pet309 y el RNA mensajero de *COXI* en el que ambos componentes se encuentran acoplados independientemente del estado de traducción del RNA. La sobreexpresión de Pet309-HA provoca una acumulación del mRNA de *COXI* 4 veces mayor que la observada para la cepa que expresa a Pet309-HA en niveles basales. Es común que las proteínas PPR estabilicen a su RNA blanco: algunas proteínas con motivos PPR se unen al RNA para bloquear la actividad de exonucleasas, ya sea en dirección 3' o 5', protegiendo la región río abajo o río arriba de su sitio de

unión, respectivamente (Loiselay et al, 2008; Pfalz et al, 2009). Tal es el caso de la proteína Cbp1 de mitocondrias de levadura, la cual bloquea la actividad de Pet127, una exonucleasa con actividad 5' a 3'. La protección a degradación del extremo 5' debida a la unión de Cbp1, determina el extremo 5' del mRNA maduro de *COB*. (Fekete et al, 2008). Por otro lado, la proteína PPR5 de cloroplasto se une a una secuencia dentro de su RNA blanco bloqueando endonucleasas (Beick et al, 2008). No sabemos si el mecanismo por el cual Pet309 acumula al mRNA de *COX1* es protegiéndolo de exonucleasas o endonucleasas, aunque no podemos descartar que el mRNA de *COX1* se acumule debido a un aumento en su tasa de transcripción causado por la sobreexpresión de Pet309. Se ha reportado que Pet309 interactúa con la proteína Nam1, que a su vez interactúa con la RNA polimerasa (Markov et al, 2009; Naithani et al, 2003; Rodeheffer et al, 2001). Nam1 participa en la estabilización de los mRNAs mitocondriales y se cree que su papel es el de distribuir dichos mRNAs hacia los activadores traduccionales (Wallis et al, 1994). La interacción de Pet309 con Nam1 sugiere que la transcripción del mRNA de *COX1* se encuentra acoplada a su traducción mediante la asociación con Pet309. En este trabajo se comprobó que el mRNA de *ATP6/8* co-precipita con Pet309-HA. Sabemos que *COX1* es transcrito como un policistrón junto con *ATP8* y *ATP6*, y que dicho transcrito es procesado para liberar al mRNA de *COX1* (Pelissier et al, 1992; Simon & Faye, 1984). La identificación de todo el policistrón en el inmunoprecipitado de Pet309-HA indica que la interacción de Pet309 con el mRNA de *COX1* tiene lugar de forma previa al procesamiento del mRNA de *ATP6/8*. Sin embargo, Pet309 no participa en la activación de la traducción del mRNA de *ATP6/8*. Este descubrimiento apoya un acoplamiento entre la transcripción y la traducción del mRNA de *COX1*, mediado por Nam1 y Pet309. Pet111, otra proteína PPR que funciona como activador traduccional del mRNA de *COX2*, también interactúa físicamente con Nam1 (Naithani et al, 2003), lo que sugiere que el acoplamiento entre la transcripción y la traducción es general en la mitocondria. Este trabajo también aporta evidencia sobre la naturaleza cooperativa de los motivos PPR. La eliminación de 8 motivos PPR no afectó la detección de la asociación entre Pet309 y el mRNA de *COX1*. Sin embargo, la eliminación adicional de 4 motivos fue suficiente para que no se pudiera detectar esta interacción por nuestra técnica. Estos 4 motivos adicionales no parecen ser más necesarios para la interacción que los 8 motivos

eliminados en Pet309 Δ 8ppr-HA, ya que pudimos detectar la asociación entre Pet309 Δ 4ppr-HA y el mRNA de *COXI*. Por el contrario, la interacción entre Pet309 Δ 12ppr-HA y el mRNA de *COXI* se detectó únicamente sobreexpresando al activador, lo que sugiere que dicha proteína presenta una menor afinidad por el mRNA de *COXI* que la proteína silvestre. Este resultado se comprobó al analizar los niveles del mRNA de *COXI* y observar que la sobreexpresión de Pet309 Δ 12ppr-HA no acumula a dicho mRNA a los mismo niveles que lo hace la sobreexpresión de la proteína silvestre. Esto sugiere que, debido a la afinidad disminuida de la proteína mutante por su RNA blanco, se requieren muchas más moléculas de Pet309 Δ 12ppr-HA que de Pet309-HA para proteger eficientemente al mRNA de *COXI* de degradación por nucleasas. Lejos de sugerir que algunos motivos PPR aportan más a la interacción que otros, este conjunto de resultados apoya que existe cooperatividad entre los motivos PPR, en los que cada PPR aporta un porcentaje de afinidad para la interacción. La importancia de cada motivo PPR para la afinidad total de la proteína por su RNA blanco se ha observado en otros casos. Por ejemplo: estudios con la proteína LRPPRC de mamífero, necesaria para la expresión y estabilidad de los mRNAs de *COXI* y *COX3* (Xu et al, 2004), han mostrado que la eliminación individual de 19 de sus 20 motivos PPR disminuye la afinidad de la proteína por su RNA blanco (Xu et al, 2012). Interesantemente, la eliminación del motivo PPR más cercano al extremo carboxilo terminal no afectó la afinidad de LRPPRC por su RNA blanco. Es probable que el último motivo PPR de LRPPRC tenga una función diferente a la de los otros 19 motivos. Si fuera el caso, no sería el primer reporte de motivos PPR con diferente función en la misma proteína. Se sabe que los primeros 16 motivos PPR de la proteína PGR3 de *Arabidopsis thaliana* son suficientes para la estabilización de su mRNA blanco, mientras que los otros 11 participan únicamente en el proceso de traducción de dicho RNA (Fujii et al, 2013). Aún no sabemos qué tan importantes son los motivos PPR de la región amino y carboxilo terminal de Pet309 en su asociación con el mRNA de *COXI*, pero creemos que la proteína Pet309 Δ 12ppr-HA mantiene su interacción con dicho RNA gracias a estos 10 motivos.

La naturaleza no cuantitativa de nuestro experimento no permite discernir si Pet309 Δ 8ppr-HA o incluso Pet309 Δ 4ppr-HA presentan menor afinidad por el mRNA de *COXI* que la proteína silvestre. Sin embargo, sabemos que ambas proteínas son incapaces

de activar la síntesis de Cox1. Estudios previos mostraron que la eliminación de solamente 1 motivo PPR hace a Pet309 incapaz de ejercer su función (Tavares-Carreón et al, 2008). Es posible que la eliminación de uno o varios motivos PPR no supriman pero sí afecten la interacción de la proteína con el mRNA de *COXI*. De esta forma, el ribosoma no sería posicionado en el codón correcto para iniciar la traducción. Alternativamente, la eliminación de motivos PPR podría afectar la conformación de Pet309, evitando que algunas proteínas necesarias para la traducción de *COXI* identifiquen su sitio de acción.

Hasta el momento no sabemos con qué nucleótidos del extremo 5'UTR de *COXI* interactúa Pet309, por lo que los 450 nucleótidos de este UTR son candidatos para dicha interacción. En estudios *in vitro* (Pfalz et al, 2009; Prikryl et al, 2011; Williams-Carrier et al, 2008) y en la estructura obtenida por cristalografía de proteínas PPR (Ke et al, 2013; Yin et al, 2013) se ha observado que cada motivo de 35 aminoácidos une un solo nucleótido. Esto significaría que Pet309 interactúa con alrededor de 22 nucleótidos. Hasta el momento los intentos de nuestro grupo para identificar la región exacta de interacción de Pet309 en el extremo 5'UTR de *COXI* han sido infructuosos. Sin embargo, hemos podido hacer una aproximación por medio de análisis *in silico* tomando como referencia estudios recientes de proteínas PPR y de sus RNAs blancos.

Varios estudios bioquímicos y estructurales han comprobado que los aminoácidos que proveen la especificidad de cada motivo por el nucleótido con el que interactúan se encuentran en la posición 2, 5 y 35 de cada motivo PPR (Barkan et al, 2012; Fujii et al, 2013; Takenaka et al, 2013). En 2013, el grupo de Yagi analizó las secuencias de 327 motivos PPR de 24 proteínas de *Arabidopsis thaliana* correlacionando el aminoácido en cada una de estas posiciones con el nucleótido que une dicho motivo PPR (Yagi et al, 2013). De esta forma, calculó la probabilidad de que determinados aminoácidos en la posición 2, 5 y 35 unan un nucleótido determinado. Por ejemplo, la secuencia de una valina en la posición 2, una asparagina en la posición 5 y un ácido aspártico en la posición 35 se encontró en 16 motivos de los 327 analizados. Un 62% de las veces el PPR interactuaba con uracilo, un 31% con una citosina y 6% de las veces unía adenina. En algunos casos, un patrón de aminoácidos en esas tres posiciones no se encontraba en suficientes motivos PPR como para obtener una probabilidad confiable. En estos casos,

únicamente se tomaron los aminoácidos encontrados en la posición 5 y 35 o únicamente en la posición 35.

Observamos que 4 de los 22 motivos PPR identificados en Pet309 coinciden en la posición 5 y 35 con motivos PPR reportados por Yagi y colaboradores, mientras que 8 motivos coinciden únicamente en la posición 5. Ningún motivo coincidió con algún patrón en las 3 posiciones. 10 motivos PPR de Pet309 no coincidieron con ningún patrón de aminoácidos reportado.

En la tabla 2 se muestran los patrones de motivos junto con la probabilidad que tendría cada patrón de unir a cada nucleótido. El asterisco indica que en esa posición puede estar cualquiera de los 20 aminoácidos. Se resaltan en negritas los valores de probabilidad más altos.

Tabla 2. Patrones de aminoácidos en motivos PPR de Pet309 y la probabilidad que tienen de unir determinados nucleótidos (Yagi et al, 2013)					
Número de PPR	Patrón (2,5,35)	Probabilidad			
		A	C	G	U
1	* S *	0.36	0.13	0.21	0.30
4	* N *	0.12	0.34	0.12	0.42
5	* T *	0.47	0.09	0.28	0.16
6	* T *	0.47	0.09	0.28	0.16
8	* GT	0.31	0.29	0.06	0.34
10	* T *	0.47	0.09	0.28	0.16
12	* SD	0.22	0.16	0.32	0.29
13	* NN	0.17	0.47	0.16	0.21
14	* M*	0.1	0.15	0.06	0.69
16	* A *	0.27	0.20	0.18	0.35
17	* A *	0.27	0.20	0.18	0.35
19	* PD	0.07	0.09	0.1	0.74

Utilizando las predicciones de nucleótidos cuyas probabilidades se muestran en negritas se realizó el siguiente alineamiento. En azul se muestra el número de motivo PPR. En amarillo se muestran los nucleótidos que tienen una probabilidad mayor de ser unidos por ese motivo PPR, y en verde los que tienen una probabilidad moderada. Los guiones indican un motivo PPR en el que no se encontró ningún nucleótido de unión probable.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
A	-	-	U	A	A	-	A/C/U	-	A	-	G/T	C/T	T	-	T/A	T/A	-	U	-	-	-
U	-	-	C	G	G	-	-	G	-	-	G/A	-	-	C/G	C/G	-	-	-	-	-	-

El posible sitio de unión es una secuencia altamente degenerada difícil de buscar manualmente dentro de los 450 nucleótidos que contiene el extremo 5'UTR del mRNA de *COXI*. Para encontrar los posibles sitios de unión dentro de esta secuencia, se utilizó un software llamado “Degenerate motif finder Insilicase” (<http://www.insilicase.co.uk/Web/DegenerateSites.aspx>) ingresando tanto la secuencia degenerada como la secuencia del extremo 5'UTR del mRNA de *COXI*. El programa mostró 6 secuencias dentro del extremo 5'UTR que cumplen con los criterios indicados en la tabla. Dichas secuencias se muestran en negritas en la figura 27. Cuatro de estas secuencias cumplen con casi todos los nucleótidos con mayor probabilidad mostrada en la tabla, y se muestran subrayados en azul. En verde se muestra el codón AUG de inicio del mRNA.

Considerando la A del codón de inicio como la posición +1, las últimas 3 secuencias identificadas comienzan en las posiciones -206, -141 y -76. Estas secuencias llamaron nuestra atención porque las tres tienen una separación de exactamente 44 nucleótidos entre sí. Además de presentar la misma distancia entre ellas, 44 nucleótidos suman el doble de los nucleótidos que uniría Pet309, lo que nos hace sospechar que Pet309 podría actuar como un polímero lineal sobre el extremo 5'UTR del mRNA de *COXI*. Aún no tenemos evidencia de que Pet309 polimerice pero la estructura obtenida por cristalografía de dos proteínas PPR: THA8 y PPR10 mostraron homodímeros (Ke et al, 2013; Yin et al, 2013). El dímero de la proteína THA8 incluso fue más estable en presencia de su mRNA

UAAUAAUAUUUAAUAUUUUUAUAUAAAUAUAU
 UAAUAAUAUAGAUUAUGAAAGAGAGUAUUAAUAU
 CAUUAUUUAUAUAUAUAUGUUUAUAUA **AUUUAAAU**
GAUUUAAUAUAUAUAUAUAUAUUUAUA**UUUAUAGA**
UUUAUGAUACAUUUAUAUAAAUAUAUAUAUA**UAA**
AAAUUAAUUAUACUAUUACUUUAUAAUAUAUAUA
 UAUUUUAUUUAUAAAGAUUAAAAGAAUUGUUUAA
 AGUUUAU **AACUAAAUAUUUAUAGUAUU**CAUUA
 UAAUUAUAUAUUUAUUAAAUAUUGUUUAUAUU
 UAU **AAUAGAAUAUAUAUUUAUU**CCUUUAAGA
 UAUAACAAUAUUUAUUUAAAUAUUAAAUAUAUA
AUUUAAUUAUUUUUUUUUUUAAUGAAUAUAUA
 AUAAUAUAUAUUUAUUAAAUAUAUAUAUUAAAAA
 AAGUAAAA **AUG**

Figura 27. Secuencias en el extremo 5'UTR del mRNA de *COXI* a las que probablemente se une Pet309. En negritas se muestran las 6 secuencias que concuerdan con la predicción obtenida al comparar los aminoácidos de Pet309 en la posición 5 y 35 con el reporte de (Yagi et al, 2013). Resaltadas en azul se muestran las 4 secuencias que cumplen con los nucleótidos de unión más probables según la misma predicción. El codón de inicio del mRNA se resalta en verde.

blanco; además de que en presencia del RNA, la proteína THA8 podía formar dímeros, trímeros y hasta tetrámeros (Ke et al, 2013). Alternativamente, los 44 nucleótidos de distancia entre estos 3 posibles sitios de unión podrían tener una estructura secundaria que permitan que las 3 moléculas de Pet309 unidas a dichos sitios interactúen entre sí. Será necesario estudiar si Pet309 polimeriza para contestar esta pregunta.

Si alguno de los sitios encontrados fuera en realidad el sitio de unión de Pet309 en el mRNA de *COXI*, éste se encontraría lejos del codón de inicio de la traducción, lo que hace difícil imaginar cómo es que Pet309 posicionaría al ribosoma en el sitio de inicio. Este mecanismo podría ser similar al de la proteína PPR10 de cloroplasto de maíz, quien interactúa con una secuencia específica en el extremo 5'UTR del mRNA de ATPH para activar su traducción (Pfalz et al, 2009). Se propone que la unión de PPR10 a su sitio específico deshace una estructura secundaria en el mRNA, lo que provoca que la secuencia tipo Shine Dalgarno sea expuesta y el ribosoma pueda encontrar el codón de

inicio (Prikryl et al, 2011). En el caso de Pet309, la secuencia expuesta podría ser el mismo AUG de inicio. Alternativamente, podrían existir estructuras secundarias en el mRNA de *COXI* que permitan que el AUG de inicio y Pet309 se aproximen.

Además de comprobar la interacción de Pet309 con el mRNA de *COXI*, en este estudio también se comprobó la interacción entre Pet309 y el ribosoma mitocondrial. Esta interacción depende de los primeros 6 motivos PPR de Pet309, los cuales al ser motivos de unión a RNA, podrían interactuar directamente con el rRNA de alguna de las dos subunidades ribosomales. Si este fuera el caso, los primeros motivos PPR de Pet309 no estarían interactuando con el mRNA de *COXI*. Alternativamente, la interacción podría mediarse por proteínas ribosomales y la estructura externa de los primeros motivos PPR de Pet309. La asociación entre Pet309 y el ribosoma mitocondrial parece ser muy estrecha, ya que la ausencia de un mitoribosoma ensamblado debido a la falta del genoma mitocondrial, provoca que Pet309 sea casi indetectable por western blot. Este comportamiento también se observa para proteínas que son parte integral del ribosoma mitocondrial (Warner, 1989). Aunado a esto, Pet309-HA se detecta únicamente en fracciones donde migra el ribosoma, lo que sugiere que toda la proteína Pet309 presente en la mitocondria se encuentra interactuando con el mitoribosoma. El mRNA de *COXI* no fue necesario para esta interacción, lo que confirma que la interacción Pet309-ribosoma es directa y no se da a partir del RNA mensajero en proceso de traducción.

No es inusual que las proteínas PPR interactúen con el ribosoma mitocondrial. En mamífero, la proteína PPR Mrps27 es un componente de la subunidad chica ribosomal y su ausencia provoca una disminución en la tasa de traducción de los mRNAs mitocondriales (Davies et al, 2012b). La proteína TbPPR5 interactúa con el rRNA 12S en mitocondrias de *Trypanosoma brucei*. PPR336 interactúa con los ribosomas mitocondriales de *Arabidopsis thaliana*, aunque su papel en la traducción mitocondrial aún se desconoce (Uyttewaal et al, 2008). La interacción entre la proteína de cloroplasto de maíz Atp4 con el ribosoma mitocondrial no se ha confirmado, pero en su ausencia su mRNA blanco es incapaz de interactuar con la maquinaria traduccional (Zoschke et al, 2012).

Además de descubrir que la región amino terminal de Pet309 es la responsable de la interacción con el ribosoma, observamos que Pet309 Δ amino-HA forma parte de un complejo de alto peso molecular. Según su migración en el gradiente, este complejo podría tener un peso de aproximadamente 800 kDa. La formación de este complejo depende de la presencia del genoma mitocondrial, ya que en la cepa ρ^0 se observó a Pet309-HA en la superficie del gradiente. Es probable que el mRNA de *COX1* tenga un papel en la formación de este complejo, aunque no sería su único componente. Se han reportado interacciones físicas entre Pet309 y otros activadores traduccionales como Pet122, Pet494, Pet54 y Cbp1 (Krause et al, 2004; Naithani et al, 2003). Es probable que algunos de ellos se encuentren en el complejo con Pet309 Δ amino-HA.

En este estudio, también se exploró la función de Mss51 como activador traduccional, ya que esta función no se comprende. Por medio de experimentos de triple híbrido se encontró que Mss51 interactúa con una región que va del nucleótido -97 al +23 del extremo 5'UTR del mRNA de *COX1* (Zambrano et al, 2007). Con este dato como antecedente, esperábamos observar dicha interacción por medio de nuestros experimentos de co-inmunoprecipitación. A pesar de una inmunoprecipitación muy eficiente de Mss51-HA, *COX1* no se detectó en el precipitado. Este resultado no implica necesariamente que Mss51 no interactúe con el mRNA de *COX1*. Esta asociación podría ser transitoria o tan débil que podría perderse durante el proceso de solubilización de las mitocondrias. Alternativamente, la interacción observada por triple híbrido entre Mss51 y el mRNA de *COX1* podría ser un falso positivo promovido por un entorno diferente al mitocondrial. Ciertamente, si esta interacción existe se trataría de una asociación más débil o transitoria que la que hay entre Pet309 y el mRNA de *COX1*.

Por otro lado, Mss51 mostró una clara interacción con el ribosoma mitocondrial. Mientras que la mayor parte de Mss51-HA migró en la superficie del gradiente, una muy pequeña proporción se detectó co-migrando con el ribosoma. La interacción física quedó comprobada al observar que dicha población desaparece cuando el ribosoma no se ensambla (cepa ρ^0). Al igual que Pet309, Mss51 no necesita del mRNA de *COX1* para interactuar con el ribosoma mitocondrial. Es probable que ambos activadores se

encuentren unidos a la maquinaria traduccional, preparados para recibir al mRNA de *COXI* recién transcrito.

El perfil de migración de Mss51-HA en el gradiente contrasta con lo observado para Pet309-HA, que únicamente se detectó comigrando con el mitorribosoma. La diferencia en la migración de Pet309 y Mss51 podría reflejar la diferencia de sus funciones. Mientras que la activación de la traducción de *COXI* es la única función descrita para Pet309 (Manthey & McEwen, 1995; Tavares-Carreón et al, 2008), Mss51 también participa en el correcto ensamblaje de Cox1 (Barrientos et al, 2004; Pérez-Martínez et al, 2003). Por lo tanto, la población de Mss51 observada en la superficie del gradiente podría estar interactuando con Cox1 y los subcomplejos de la CcO, mientras que la población que comigra con el mitorribosoma podría ser la población traduccionalmente activa.

En esta investigación se demostró que Mss51 y Pet309 interactúan físicamente. Esta interacción podría no ser directa, sino estar mediada por un complejo proteico del que Pet309 y Mss51 sean componentes. Debido a que Pet309 únicamente se detecta interactuando con el ribosoma, creemos que la interacción física encontrada con Mss51 ocurre en la maquinaria traduccional, donde ambas proteínas ejercerían su papel como activadores traduccionales. A pesar de la interacción física entre ambas proteínas, ninguno de los dos activadores necesita del otro para interactuar con el ribosoma. Sin embargo, la ausencia de Mss51 provocó que Pet309-HA inmunoprecipitara de forma ineficiente, lo cual sugiere que Mss51 es necesaria para que Pet309 tenga una conformación determinada. En la cepa *mss51Δ*, Pet309 comigró con el ribosoma, lo que indica que esta conformación no es esencial para que Pet309 interactúe con la maquinaria traduccional, pero podría necesitarse para que se una correctamente al mRNA de *COXI* y por lo tanto para que active la síntesis de Cox1. Mp15, un péptido aberrante de 15 kDa que únicamente se detecta en ausencia de Mss51 podría apoyar esta hipótesis (Zambrano et al, 2007). La traducción de Mp15 depende de Pet309. Por lo tanto, creemos que en ausencia de Mss51, Pet309 posiciona al ribosoma en un codón incorrecto, activando la síntesis del péptido Mp15 derivado del transcrito de *COXI*.

Llama la atención que en el experimento de co-inmunoprecipitación con RT-PCR de la cepa *mss51Δ*, no observamos interacción entre Pet309 y el mRNA de *COXI*. Sin

embargo, al analizar los niveles del mRNA de *COX1* en cepas que sobreexpresan a Pet309-HA existía una acumulación de dicho RNA mensajero incluso en ausencia de Mss51. Esto sugiere que Pet309 no necesita a Mss51 para interactuar con el mRNA de *COX1*, pero que sí lo necesita para una interacción detectable por nuestra técnica de co-inmunoprecipitación. La interacción "alterada" entre Pet309 y el mRNA de *COX1* podría dar lugar a un inicio de la traducción en un lugar equivocado, sintetizando a Mp15.

Los resultados de este trabajo y la interacción de Pet309 con Nam1 (Markov et al, 2009; Naithani et al, 2003) sugieren que la interacción de Pet309 con el mRNA de *COX1* tiene lugar de forma co-transcripcional. Esto implicaría que Pet309 en contacto con el mitorribosoma se encuentra en una conformación preparada para recibir al RNA naciente. Este modelo apoyaría una entrada del mRNA de *COX1* a la cavidad interna de Pet309 a partir de su extremo 5', lo que energéticamente es más favorable que el enrollamiento de Pet309 sobre su sitio de unión específico una vez sintetizado todo el policistrón. Pet309 podría moverse a lo largo del extremo 5'UTR de *COX1* hasta encontrar su sitio específico de unión, un movimiento probablemente auxiliado por Mss51, lo cual explicaría el cambio de estructura de Pet309-HA en una cepa *mss51Δ*.

Con la información obtenida en este estudio proponemos un modelo de acción de Pet309 y Mss51 (figura 28). Creemos que en el momento de ser importada a la matriz mitocondrial, Pet309 contacta al ribosoma mitocondrial por medio de su región amino terminal. Si Mss51 se encuentra libre del complejo con la proteína Cox1, interactúa con Pet309 para cambiar su conformación y permitir que interactúe con el mRNA de *COX1* en el sitio correcto. Cuando Pet309 interactúa con 22 nucleótidos específicos dentro del extremo 5'UTR del mRNA de *COX1*, posiciona al ribosoma mitocondrial en el codón AUG de inicio de dicho mRNA y la traducción comienza. Mss51 no se separa del complejo de traducción mitocondrial luego de interactuar con Pet309, ya que espera a que Cox1 recién sintetizada emerja por el túnel de salida de la subunidad grande ribosomal para interactuar con ella. Cuando sucede esta interacción, Mss51 se libera del complejo

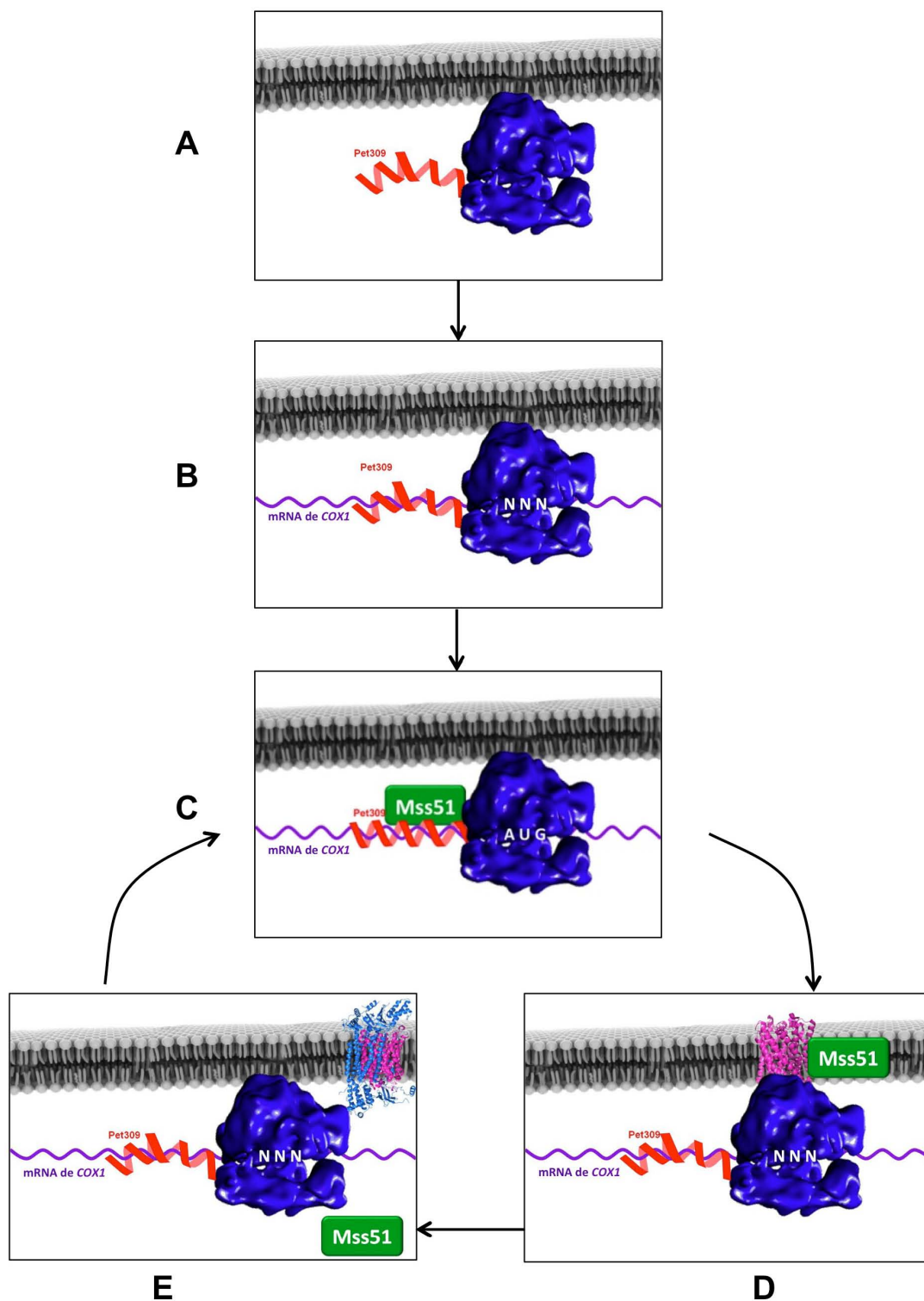


Figura 28. Modelo de acción de Pet309 y Mss51 para la activación de la traducción del mRNA de *COX1*. **A)** Desde el momento en que es importada a la matriz mitocondrial, Pet309 interactúa con el ribosoma mitocondrial a partir de su región amino terminal. **B)** Si Mss51 no se encuentra disponible para la activación de la traducción, Pet309

interactúa con una región inespecífica del mRNA de *COX1* que no permite posicionar al ribosoma en el sitio de inicio de la traducción (NNN). **C)** Cuando Mss51 se encuentra disponible, interactúa físicamente con Pet309 para cambiar su conformación y capacitarla para interactuar en la región correcta del mRNA de *COX1*. Con esta interacción, el ribosoma se posiciona en el AUG de inicio y la traducción se activa. **D)** Cuando la traducción del mRNA termina, Mss51 se separa de la maquinaria traduccional e interactúa con la proteína Cox1 recién sintetizada (Barrientos et al, 2004; Perez-Martinez et al, 2003). Al no estar Mss51 presente, Pet309 cambia su conformación y deja de interactuar con la región correcta del mRNA de *COX1*, por lo que no se puede comenzar un nuevo ciclo de traducción del mRNA. **E)** Mss51 se libera del complejo con Cox1 cuando las demás subunidades de la CcO se ensamblan, por lo que está libre para activar un nuevo ciclo de traducción del mRNA de *COX1* (Perez-Martinez et al, 2009).

de traducción para participar en el ensamblaje de la CcO (Barrientos et al, 2004; Perez-Martinez et al, 2003), regresando a Pet309 a su conformación inicial en la que no reconoce el sitio de unión específico en el mRNA de *COX1*. Una vez que el ensamblaje de la CcO está completo, Mss51 se libera para poder participar en un nuevo ciclo de traducción del mRNA de *COX1* (Barrientos et al, 2004; Perez-Martinez et al, 2009; Zambrano et al, 2007).

La activación de la traducción mediada por Mss51 y Pet309 no es el único ejemplo de regulación traduccional acoplada a ensamblaje en mitocondrias de *S. cerevisiae*. Los activadores traduccionales del mRNA de *COB*, Cbp3 y Cbp6, interactúan con la proteína Cytb recién sintetizada (Gruschke et al, 2011). Si algunas subunidades no se ensamblan en el complejo, la traducción del mRNA de *COB* se detiene debido al secuestro de ambos activadores traduccionales en el subcomplejo de Cytb (Gruschke et al, 2012). Otro ejemplo de este tipo de regulación es el de la ATP sintasa de *S. cerevisiae*. *ATP6* y *ATP8* codifican para subunidades de la porción Fo de la ATP sintasa. Si la porción F1 de este complejo no se ensambla, Atp6 y Atp8 no se sintetizan. El mecanismo de esta regulación es diferente al de Mss51 y Cbp3-Cbp6, ya que no existe un activador traduccional que sea secuestrado en subcomplejos de ensamblaje de la ATP sintasa (Rak & Tzagoloff, 2009) y no se ha descrito el mecanismo por el cual se detiene la traducción de ambos genes.

La regulación de la traducción acoplada al ensamblaje también está presente en otros organismos y compartimentos celulares: el grupo de Choquet descubrió este tipo de regulación para el mRNA de PetA en el cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii*.

Mca1 es una proteína PPR que junto con Tca1 activa la síntesis del citocromo f, codificado por el mRNA de PetA (Raynaud et al, 2007; Wostrikoff et al, 2001). Ambos activadores actúan en el extremo 5'UTR del mRNA de PetA para estabilizarlo y activar su traducción (Loiselay et al, 2008). La síntesis de citocromo f se inhibe cuando el ensamblaje del complejo b₆f, del cual forma parte, se bloquea por la ausencia de otras subunidades del complejo (Choquet et al, 2003). Cuando el complejo b₆f no se ensambla correctamente, la región carboxilo terminal del citocromo f interactúa con Mca1, degradándola por una vía desconocida. La ausencia de Mca1 evita que una nueva ronda de traducción del mRNA de petA tenga lugar, lo que inhibe la síntesis de citocromo f (Boulouis et al, 2011).

Probablemente los estudios de activadores traduccionales en mitocondria y cloroplasto revelen que este tipo de regulación de la traducción mediada por ensamblaje es más común de lo que se supone actualmente, y que las mitocondrias de mamífero no son la excepción.

Debido a las ventajas que aporta como modelo de estudio, *S. cerevisiae* se ha utilizado para estudiar diversas enfermedades mitocondriales en humano (Baile & Claypool, 2013). LRPPRC es una proteína PPR que se identificó originalmente como el ortólogo de Pet309 en mamífero y que participa en la estabilización y traducción de los mRNAs de *COX1* y *COX3* (Xu et al, 2004). Las mutaciones en LRPPRC causan una enfermedad llamada Síndrome de Leigh franco-canadiense, cuyo síntoma principal es la acidosis metabólica debida a la disfunción de la cadena respiratoria (Debray et al, 2011). Hasta el momento no se ha identificado algún homólogo de Mss51 en mamífero. Sin embargo, el homólogo de Shy1, una proteína que coopera con Mss51 en el ensamblaje de la CcO (Barrientos et al, 2002; Mick et al, 2010), se encuentra mutado en otro tipo de síndrome de Leigh (Tiranti et al, 1998). Un estudio demostró que dos mutaciones puntuales en Shy1 y en su homólogo humano SURF-1, causan que los niveles de traducción del mRNA de *COX1* disminuyan, un mecanismo en el que el circuito regulatorio de Mss51, o de su homólogo funcional, podría estar involucrado (Reinhold et al, 2011).

La traducción mitocondrial es un proceso complicado y poco conocido, no sólo en levadura sino también en mamíferos y otros organismos. La levadura *S. cerevisiae* es una excelente herramienta para llegar a comprender este proceso.

Conclusiones

- Pet309 interactúa con el mRNA de *COX1* independientemente de una traducción mitocondrial activa.
- Los motivos PPR de Pet309 participan en la interacción con el mRNA de *COX1* de forma cooperativa.
- No se detectó una interacción física entre Mss51 y el mRNA de *COX1*.
- Pet309 interactúa con el ribosoma mitocondrial a partir de su región amino terminal independientemente de la presencia del mRNA de *COX1*.
- Una pequeña población de Mss51 interactúa con el ribosoma mitocondrial independientemente de la presencia del mRNA de *COX1*.
- Pet309 y Mss51 interactúan físicamente.
- La ausencia de Mss51 cambia el tipo de interacción entre Pet309 y el mRNA de *COX1*, y Mss51 podría necesitarse para que Pet309 tenga una conformación de tipo silvestre.
- Mss51 no es necesaria para la interacción entre Pet309 y el ribosoma mitocondrial.
- Pet309 no es necesaria para la interacción entre Mss51 y el ribosoma mitocondrial.

Perspectivas

- Encontrar la región de interacción de Pet309 en el mRNA de *COX1* e investigar si ésta cambia en ausencia de Mss51. Identificar esta secuencia aclararía la forma en que Pet309 posiciona al ribosoma en el codón de inicio del mRNA. Este experimento podría hacerse purificando a Pet309 y haciendo geles de retardo añadiendo diferentes oligonucleótidos que correspondan a fracciones del extremo 5'UTR de *COX1*. Sería interesante observar si el resultado del experimento cambia en presencia o ausencia de Mss51.
- Comprobar el resultado del experimento anterior con mutaciones en el extremo 5'UTR de *COX1*. Esperaríamos que las mutaciones en la región probable de unión de Pet309 reduzcan o eliminen la síntesis de Cox1. También podríamos buscar supresoras en las que Pet309 cambie su secuencia y así lograr identificar residuos de la proteína que participen en la interacción con el nucleótido mutado.
- Identificar la subunidad ribosomal con la que interactúan Pet309 y Mss51. De esta forma podríamos entender más acerca del mecanismo de acción de ambas proteínas. Para ello se podrían correr el lisado mitocondrial en un gradiente de sacarosa que contenga NH_4Cl para separar las subunidades mitocondriales e identificar con cuál de ellas comigra Pet309 y Mss51.
- Investigar qué proteínas forman parte del complejo de alto peso molecular de Pet309 Δ amino-HA. Para ello Pet309 Δ amino-HA podría inmunoprecipitarse y por MALDI-TOF identificar a las proteínas de dicho precipitado. Esto nos ayudaría a encontrar proteínas que participen junto con Pet309 en la activación de la traducción del mRNA de *COX1*.
- Estudiar el patrón de migración de Mss51-HA en gradientes de sacarosa en mutantes de ensamblaje de la CcO. Si el modelo que se propone en esta tesis es verdadero, esperaríamos que en una mutante de ensamblaje, Mss51 no comigre con el ribosoma mitocondrial, ya que se encontraría secuestrada en los subcomplejos de Cox1.

- Estudiar el patrón de migración en gradientes de sacarosa del mRNA de *COXI* en una cepa silvestre, una cepa *pet309Δ* y una cepa *mss51Δ*. Si los activadores traduccionales realmente posicionan al ribosoma en el sitio de inicio de la traducción, en su ausencia esperaríamos que su mRNA blanco no interactuara con el ribosoma.

The Pet309 pentatricopeptide repeat motifs mediate efficient binding to the mitochondrial *COX1* transcript in yeast

Angélica Zamudio-Ochoa[†], Yolanda Camacho-Villasana[†], Aldo E García-Guerrero, Xochitl Pérez-Martínez*.

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México,;

[†]These authors contributed equally to this work.

Keywords: *COX1* mRNA, cytochrome *c* oxidase, mitochondria, pentatricopeptide repeat, translation, yeast.

Mitochondrial synthesis of Cox1, the largest subunit of the cytochrome *c* oxidase complex, is controlled by Mss51 and Pet309, two mRNA-specific translational activators that act via the *COX1* mRNA 5'-UTR through an unknown mechanism. Pet309 belongs to the pentatricopeptide repeat (PPR) protein family, which is involved in RNA metabolism in mitochondria and chloroplasts, and its sequence predicts at least 12 PPR motifs in the central portion of the protein. Deletion of these motifs selectively disrupted translation but not accumulation of the *COX1* mRNA. We used RNA coimmunoprecipitation assays to show that Pet309 interacts with the *COX1* mRNA in vivo and that this association is present before processing of the *COX1* mRNA from the *ATP8/6* polycistronic mRNA. This association was not affected by deletion of 8 of the PPR motifs but was undetectable after deletion of the entire 12-PPR region. However, interaction of the Pet309 protein lacking 12 PPR motifs with the *COX1* mRNA was detected after overexpression of the mutated form of the protein, suggesting that deletion of this region decreased the binding affinity for the *COX1* mRNA without abolishing it entirely. Moreover, binding of Pet309 to the *COX1* mRNA was affected by deletion of Mss51. This work demonstrates an in vivo physical interaction between a yeast mitochondrial translational activator and its target mRNA and shows the cooperativity of the PPR domains of Pet309 in interaction with the *COX1* mRNA.

Introduction

The biogenesis of mitochondria and chloroplasts is controlled by protein factors encoded in the nucleus, many of which interact with organellar RNAs. Among these protein factors are the pentatricopeptide repeat proteins (PPR), a major sequence-specific RNA binding family. PPR proteins contain degenerate 35-amino acid units that are usually present in tandem arrays of 2 to 26 repeats throughout the protein. The crystal structures of the mitochondrial RNA polymerase¹ and ribonuclease P,² and more recently the chloroplast THA8L,³ THA8⁴ and PPR10,⁵ show that each PPR folds into a pair of antiparallel α -helices. The structure of PPR10 demonstrate that the stacking of 19 repeats form a right-handed superhelical structure. THA8 and PPR10 were crystallized in the presence of their cognate RNA.^{4,5} PPR proteins are mainly localized to mitochondria and chloroplasts and have been found in all eukaryotes,⁶ although the family is particularly expanded in land plants, with more than 450 members in *Arabidopsis thaliana*.⁷ The PPR proteins described to date have roles in transcription, RNA processing, intron splicing, RNA stability and editing, tRNA biogenesis, translation, and

mRNA polyadenylation.^{8,9} Recent work has begun to shed light on the mechanisms of action of PPR proteins as well as the molecular basis of PPR-RNA interaction and recognition. Physical interactions of some PPR proteins with RNA have been demonstrated in vitro (for example, see¹⁰⁻¹⁶) and in vivo¹⁷⁻¹⁹. What is known is that some members of this family have no recognizable domains apart from the PPR motifs and are usually involved in mRNA stability.^{18,20,21} Others have motifs that are unrelated to PPRs, usually located at the C-terminal end, and in some cases have been implicated in the recruitment of catalytic factors for RNA processing.^{8,22}

The genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* predicts the presence of 15 PPR protein members.^{8,23} Some of these proteins are involved in general mitochondrial RNA maturation and translation (e.g., Cbp1, Rpm2, Rmd9, Dmr1, Aep3),²⁴⁻²⁸ whereas others (e.g., Msc6, Rmd9L, Yer077c, Sov1) have unknown functions. An important group of PPR proteins found in yeast are the mRNA-specific translational activators (Pet111, Pet309, Atp22, Aep1, Aep2) that function in translational regulation of mitochondrially-encoded mRNAs (reviewed in^{29,30}). Pet309 is a translational activator specific for the mitochondrial *COX1* mRNA, which encodes subunit 1 of the cytochrome *c* oxidase

*Correspondence to: Xochitl Pérez-Martínez; Email: xperez@ifc.unam.mx.
Submitted: 04/04/2014; Revised: 06/16/2014; Accepted: 06/30/2014; Published Online: 07/24/2014
<http://dx.doi.org/10.4161/rna.29780>

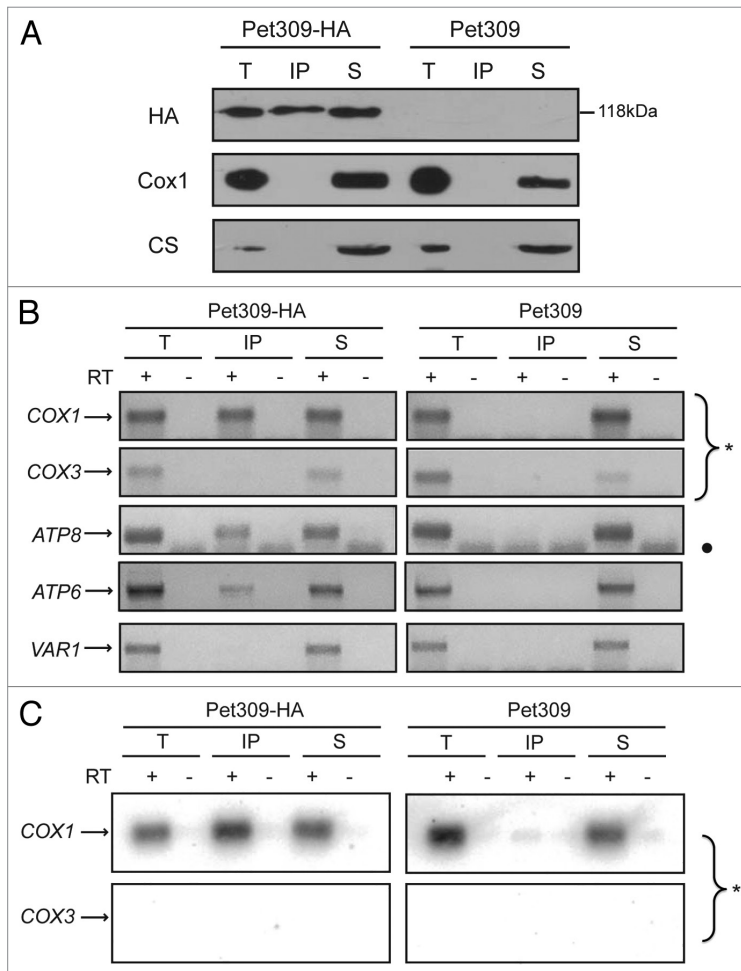


Figure 1. Pet309 interacts with the *COX1* mRNA. **(A)** Mitochondria were solubilized with dodecyl maltoside and Pet309-HA or untagged Pet309 were subjected to immunoprecipitation with anti-HA antibody. One fourth of the immunoprecipitate (IP) and the supernatant fraction representing non-bound proteins (S) were separated by SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane for western blot. The membrane was probed with anti-HA antibody (HA), with anti-Cox1 antibody, and with anti-citrate synthase antibody (CS) as a negative control for interaction. The total fraction (T) represents 5% of the mitochondrial extract used for immunoprecipitation. **(B)** RNA was extracted from the total (T), immunoprecipitate (IP) and supernatant (S) fractions. Each fraction was divided in two, and cDNA was prepared in the presence (+) or absence (-) of reverse transcriptase (RT) using primers for the *COX1*, *COX3*, *ATP8*, *ATP6* or *VAR1* 5'-UTRs. The (-) RT lanes represent a negative control for DNA contamination. The PCR products were run on an agarose gel, and for clarity, the gel pictures were color inverted. The circle (•) indicates bands due to primer dimers. **(C)** The agarose gels from B) were transferred to a Nylon membrane and the portion of the membrane with the *COX1* and *COX3* amplification products (*) were hybridized with probes for *COX1* and *COX3*. This experiment represents one of three independent repeats.

complex (CcO).³¹ Cox1 is the largest subunit of the complex and bears the metallic centers heme *a*, *a*₃, and Cu_b for oxygen reduction. Synthesis of Cox1 is highly regulated and is coupled to CcO assembly.^{32,33} Together with Pet309, Mss51 activates

translation of the *COX1* mRNA.^{31,34} In addition, Mss51 is involved in coordination between Cox1 synthesis and CcO assembly through an interaction with newly synthesized Cox1 protein in high-molecular-weight complexes that are CcO assembly intermediates.³³

Pet309 is a 965-residue, peripheral inner membrane protein that faces the matrix and acts on the *COX1* mRNA 5'-UTR to activate its translation.^{31,35} This is the only known site of action of Pet309, based on the finding that replacement of the *COX1* 5'-UTR by the *COX2*, *COX3*, or *COB* 5'-UTRs abolished the requirement of Pet309 for Cox1 synthesis.^{31,34} In addition to its role in translation, Pet309 affects *COX1* mRNA accumulation, and this function is particularly relevant in strains containing introns in *COX1*.³¹ The Pet309 ortholog in *Schizosaccharomyces pombe*, Ppr4, is also involved in *COX1* mRNA translational activation and accumulation, although the target sequence in the mRNA remains elusive.³⁶

We are interested in the mechanism of action of Pet309 and, in particular, in how the PPR motifs present in the protein participate in translation. Our previous data indicated that the 8 central PPR motifs are necessary for translation but not for accumulation of the *COX1* mRNA.³⁵ By site-directed mutagenesis it was observed that two basic amino acids that are predicted to be in the inner groove of the superhelical structure of Pet309 are necessary for translation, and it was proposed that this might be due to the presence of electrostatic interactions with the *COX1* mRNA. In order to better understand the mechanism of action of Pet309, we analyzed if the protein could physically interact with the *COX1* mRNA in vivo by immunoprecipitation of Pet309-RNA complexes from solubilized mitochondria and determined what conditions affect the interaction of Pet309 with the *COX1* mRNA. Specifically, we investigated whether mutated forms of the protein lacking different numbers of PPR motifs or the presence of inactive ribosomes affected this interaction. We conclude that Pet309 physically interacts with the *COX1* mRNA, that the PPR motifs act cooperatively to promote a high-affinity interaction with the *COX1* mRNA, and that these PPR motifs are necessary for the activity of Pet309 in activating *COX1*

mRNA, that the PPR motifs act cooperatively to promote a high-affinity interaction with the *COX1* mRNA, and that these PPR motifs are necessary for the activity of Pet309 in activating *COX1*

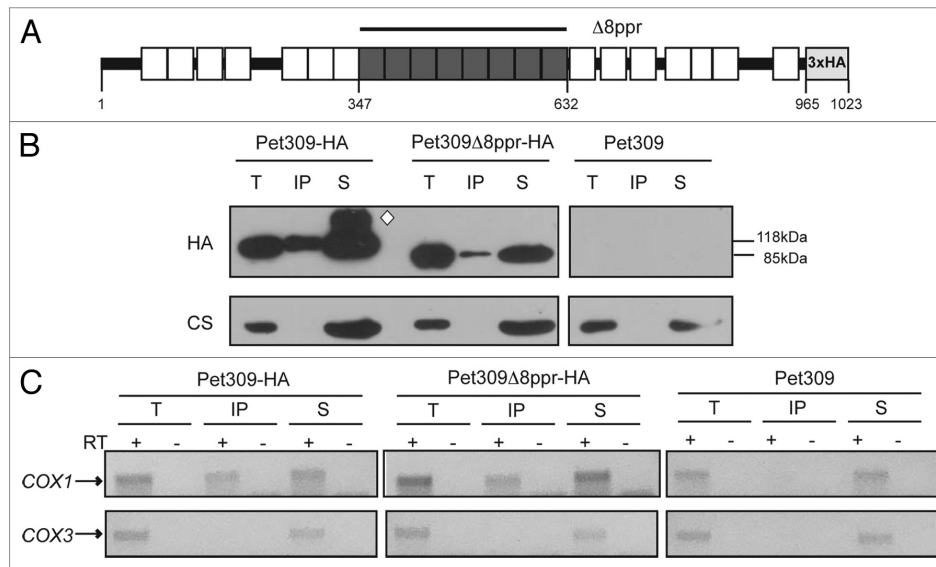


Figure 2. Deletion of the eight central PPR motifs do not interfere with the association of Pet309 with the *COX1* mRNA. (A) Diagram representing Pet309 with the 22 predicted PPR motifs by the SCIPHER algorithm²³ (boxes), as well as the 8 PPR central motifs that are most strongly predicted by the TPRpred software⁴⁰ and that were deleted in this study (dark gray boxes). Residue numbers, as well as the triple hemagglutinin epitope used for detection and immunoprecipitation of Pet309 are indicated. (B) Mitochondrial extracts from strains bearing the wild-type Pet309-HA, the mutated Pet309Δ8ppr-HA protein or the untagged Pet309 proteins were subjected to immunoprecipitation with anti-HA antibody as described in Figure 1. Immunoprecipitation fractions were analyzed by western blot. Wild-type Pet309-HA migrates with an apparent molecular weight of 118 KDa, and the mutated Pet309Δ8ppr-HA protein with a molecular weight of 85 KDa. The white diamond indicates probable aggregation products of Pet309-HA. (C) The presence of the *COX1* or *COX3* mRNAs in the precipitate fractions was analyzed by cDNA synthesis and PCR amplification.

translation. This work contributes to our understanding of the mechanism of action of PPR proteins as well as of translational activation of yeast mitochondrial mRNAs.

Results

Pet309 interacts with the *COX1* mRNA

Genetic evidence suggests that mitochondrial translational activators specifically act on the 5'-UTRs of their target mRNAs. However, to date there is no experimental evidence that this group of proteins physically interacts with their target mRNAs in vivo. We therefore asked whether Pet309 could interact with the *COX1* mRNA. To allow detection of Pet309, we added a sequence encoding three hemagglutinin epitopes at the C-terminal end of Pet309 (Pet309-HA). These epitopes did not affect respiratory growth of otherwise wild-type strains.³⁵ In addition, in order to minimize RNA degradation, we deleted the *NUC1* gene encoding a mitochondrial nuclease that is usually activated after solubilization; this is particularly important in the presence of divalent cations,³⁷⁻³⁹ (and our own unpublished observations). Deletion of *NUC1* did not cause a respiratory phenotype in our strains. Mitochondria were purified and solubilized with dodecyl maltoside. Pet309-HA was immunoprecipitated with anti-HA antibodies, and RNA

was isolated from the supernatant and immunoprecipitate fractions. Western blot analysis of the immunoprecipitate fractions indicated that Pet309-HA was precipitated with partial efficiency, whereas no HA signal was detectable in the precipitate in a control experiment using untagged Pet309 cells (Figure 1A). In contrast, the unrelated mitochondrial citrate synthase protein was exclusively present in the total and supernatant fractions, further demonstrating that the immunoprecipitation reaction was specific for Pet309-HA. Cox1 was also observed in the total and supernatant fractions but not in the anti-HA precipitate containing Pet309, as expected. With the aim to investigate if *COX1* mRNA was associated with Pet309, RNA was purified from the total, supernatant, and precipitation fractions. The presence of the *COX1*, *COX3*, *VARI*, *ATP8*, and *ATP6* mRNA was analyzed by cDNA synthesis and PCR amplification. The primers used were designed against the 5'-UTR sequence of each gene. PCR amplification showed that *COX1* mRNA was present in the Pet309-HA immunoprecipitation fraction, as well as in the total and supernatant fractions (Fig. 1B); however, it was absent from the immunoprecipitation fraction from untagged Pet309 mitochondria. As expected, *COX3* and *VARI* mRNAs were absent from the immunoprecipitate, as translation of these mRNAs is independent of Pet309. Interestingly, we observed that the *ATP8* and *ATP6* genes, which are co-transcribed with *COX1*, are also enriched in the immunoprecipitate fraction (Fig. 1B).

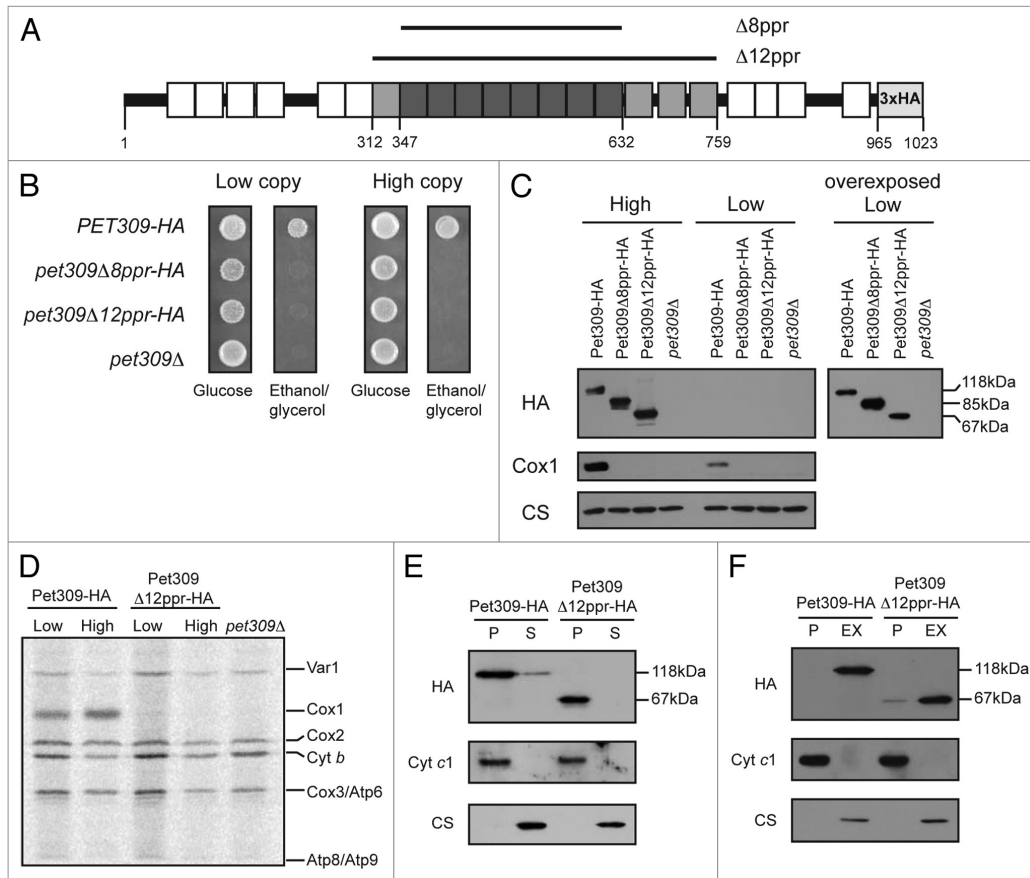


Figure 3. Pet309 Δ 12ppr-HA is a peripheral inner membrane protein and is impaired for COX1 mRNA translation. (A) Diagram representing Pet309 as in Figure 2. The 12 PPR central motifs that were deleted are indicated in gray boxes. The 8 PPR motifs that were deleted in Figure 2 are shown in dark gray boxes. Residue numbers are as indicated. (B) Δ pet309 cells were transformed with low-copy or high-copy number plasmids containing the wild-type PET309-HA, the pet309 Δ 8ppr-HA, the pet309 Δ 12ppr-HA genes or empty vector (pet309 Δ). Cells were spotted on synthetic complete medium lacking uracil with glucose or ethanol/glycerol, and incubated for 4 days at 30 °C. (C) 10 μ g of mitochondrial protein from the wild-type (PET309-HA), pet309 Δ 8ppr-HA, and pet309 Δ 12ppr-HA constructs expressed from high-copy or low-copy number plasmids were analyzed by SDS-PAGE and western blot. The membrane was probed with anti-HA, anti-Cox1 or anti-citrate synthase (CS) antibodies. In order to visualize the HA signal from the low copy plasmids, the blot was overexposed (right panel). (D) Wild-type, pet309 Δ 12ppr-HA and pet309 Δ cells were labeled with 35 S methionine in the presence of cycloheximide for 15 min at 30 °C, the proteins were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. Cytochrome c oxidase subunit 1, Cox1; subunit 2, Cox2; subunit 3, Cox3; cytochrome b, Cytb; ATPase subunit 6, Atp6; subunit 8, Atp8; subunit 9, Atp9; ribosomal protein, Var1. (E) 100 μ g of mitochondrial protein from the wild-type and pet309 Δ 12ppr-HA strains were sonicated and centrifuged to separate the membrane (P) and soluble (S) fractions, and were analyzed by western blot using antibodies to HA, citrate synthase as a soluble protein marker, and cytochrome c, as a membrane protein control. (F) 100 μ g of mitochondrial protein from the strains in (E) were incubated with alkaline, 100 mM Na₂CO₃. The integral membrane (P) and soluble, extracted (EX) proteins were analyzed by western blot as in (E).

This indicates that Pet309 can interact with the COX1 mRNA before it is processed from the polycistronic mRNA.

To confirm that the observed PCR amplification product was derived from COX1, the agarose gel from Figure 1B was transferred to a membrane and subjected to Southern blot analysis using a probe for COX1. As expected, the PCR amplification product

of COX1 was detected with the radioactive probe, whereas the COX3 products did not give signal with this probe (Fig. 1C).

The sequence of Pet309 predicts up to 22 PPR motifs present throughout the protein²³; however, the most strongly predicted PPR domains using the TPRpred software are located at the center of the protein.⁴⁰ We investigated whether

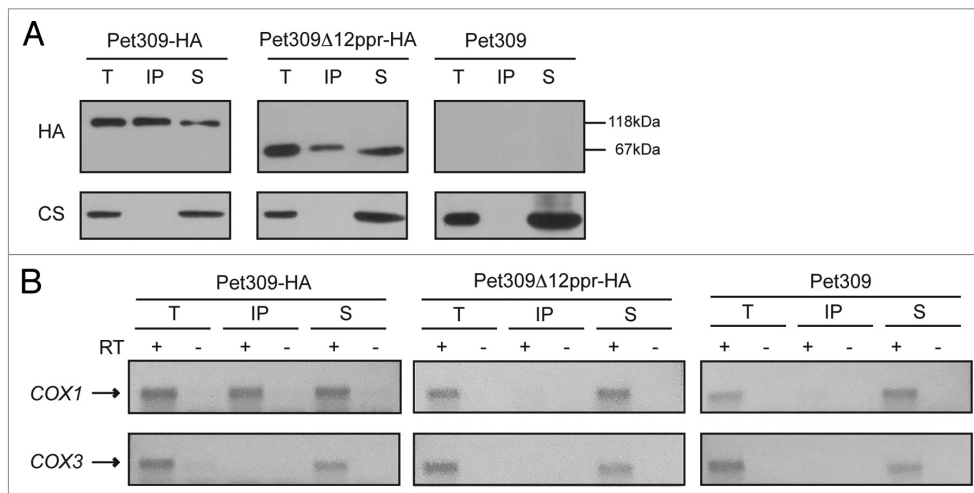


Figure 4. No interaction was detected between the Pet309Δ12ppr-HA protein and the COX1 mRNA. Mitochondrial extracts from strains bearing the wild-type Pet309-HA protein, the mutated Pet309Δ12ppr-HA expressed from a low-copy number plasmid or the untagged Pet309 were subjected to immunoprecipitation with anti-HA antibody as described in Figure 1. (A) Western blot analysis of the immunoprecipitation fractions. (B) Agarose gel of the RT-PCR reactions from the immunoprecipitations with anti-HA antibody.

mutated forms of the protein lacking the central PPR motifs would retain the capacity to bind RNA. We previously demonstrated that the eight central motifs (residues 347 to 632, which include repeats 8 to 15 according to the model of Lipinski and collaborators; Figure 2A), are necessary for COX1 mRNA translation.³⁵ In this case, cells transformed with plasmids expressing the *pet309Δ8ppr-HA* mutation at either low or high copy number did not grow on nonfermentable carbon sources (see below). To search for an interaction between Pet309Δppr8-HA and the COX1 mRNA, mitochondria were solubilized with dodecyl maltoside, and Pet309-HA was immunoprecipitated with an anti-HA antibody. Western blot analysis indicated that the immunoprecipitation was less efficient with *pet309Δ8ppr-HA* than with the wild-type control (Fig. 2B). The presence and absence, respectively, of COX1 and COX3 mRNAs was confirmed by cDNA synthesis and PCR amplification (Fig. 2C). Similar to what was observed for the wild-type strain, the mutated protein Pet309Δ8ppr was still able to interact with COX1 mRNA. Unfortunately, after several attempts we were unable to obtain quantitative data on the COX1 mRNA binding, so we cannot tell if the binding affinity of the mutated form of the protein is the same as in wild-type Pet309.

Together these data indicate that Pet309 physically interacts with the COX1 mRNA. This interaction occurs before COX1 is processed from the precursor transcript that includes the *ATP8* and *ATP6* genes. In addition, deletion of the 8 central PPR motifs does not abolish Pet309 interaction with the COX1 mRNA.

The 12 central PPR repeats of Pet309 are necessary for translation of the COX1 mRNA

In addition to the eight central PPR motifs, the TPRpred server predicts another four repeats, one upstream and three downstream of this region, albeit with lower score (i.e., having higher *P*

values). In order to understand the role of these additional PPR motifs, we created a deletion from residues 312 to 759 (Pet309Δ12ppr-HA), which corresponds to the 12 central PPR motifs. This construct included a triple HA epitope fused to the C-terminal end of the protein for immunoprecipitations and western blot analysis (Fig. 3A).

Both, the wild-type *PET309-HA* and the *pet309Δ12ppr-HA* genes (as was previously done for the *pet309Δ8ppr-HA* gene³⁵) were cloned in ARS/CEN and 2μ vectors to allow low-copy or multiple-copy dependent expression, respectively, in a yeast *pet309Δ::LEU2* mutant strain. Neither the *pet309Δ8ppr-HA*-expressing strain nor the *pet309Δ12ppr-HA*-expressing strain could grow on a nonfermentable carbon source when it contained either single-copy or multiple-copy expression plasmids of these PPR deletion constructs, whereas the wild-type, HA-tagged construct was sufficient for growth (Fig. 3B). To investigate the basis of the non-respiratory phenotype of the *pet309Δ12ppr-HA* strain, we first investigated whether the mutated protein was stable. Western blot analysis of mitochondrial protein extracts showed that the Pet309-HA protein was recognized by the anti-HA antibody as a 118 KDa band for the wild-type gene or as a 67 KDa band corresponding to the *pet309Δ12ppr-HA* mutant (Fig. 3C). Pet309-HA signals for all constructs were more abundant under overexpression conditions. The same blot was probed with an antibody to Cox1, which showed no accumulation of Cox1 protein in the *pet309Δ12ppr-HA* mutant, even in the presence of high-copy expression, suggesting that Cox1 was not produced.

To investigate the effect of the *pet309Δ12ppr-HA* mutation on COX1 mRNA translation, we analyzed ³⁵S methionine-labeled proteins from mitochondria carrying the *pet309Δ12ppr-HA* mutation in low-copy or high-copy-expression plasmids

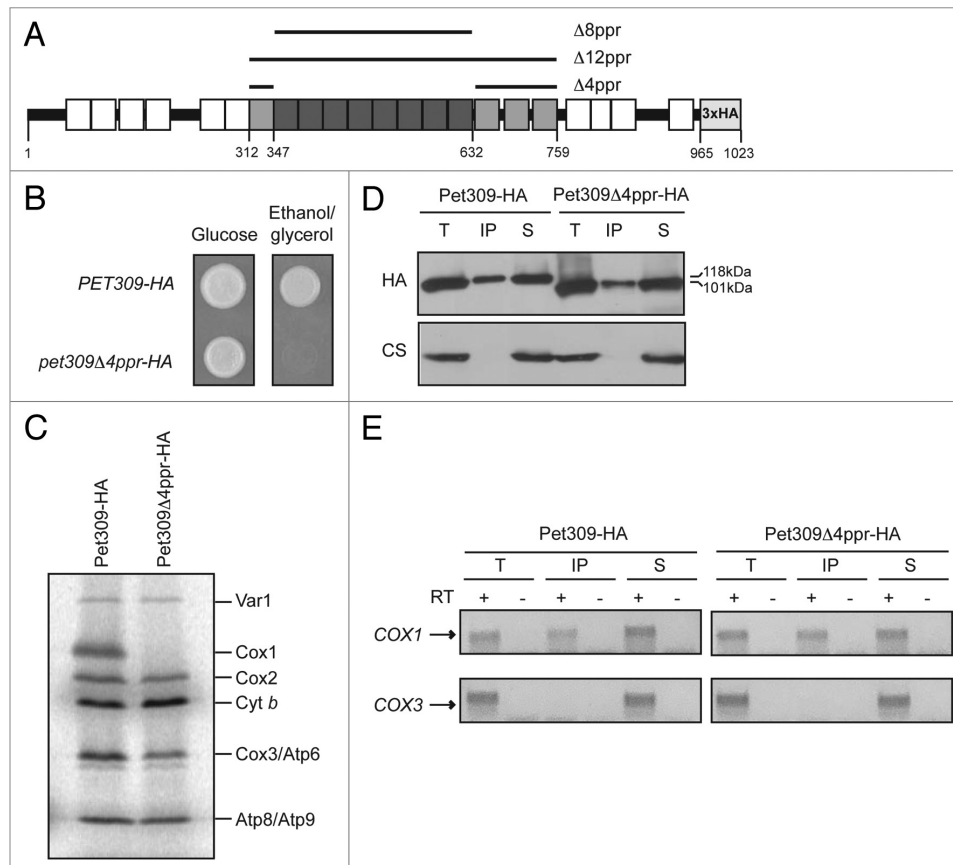


Figure 5. Pet309Δ4ppr-HA interacts with the *COX1* mRNA. (A) Diagram showing Pet309 as in Figure 2. The 4 PPR motifs that were present in the Pet309Δ8ppr-HA mutation but not in the Pet309Δ12ppr-HA are indicated in light gray boxes. They were deleted to create the protein Pet309Δ4ppr-HA. (B) Δ*pet309* cells were transformed with low-copy number plasmids containing the wild-type *PET309-HA* or the *pet309Δ4ppr-HA* constructs. Cells were spotted on synthetic complete medium lacking uracil with glucose or ethanol/glycerol, and incubated for 4 d at 30 °C. (C) Wild-type and Pet309Δ4ppr-HA cells were labeled with ³⁵S methionine in the presence of cycloheximide. The proteins were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. (D) Western blot analysis of the immunoprecipitation fractions. (E) Co-immunoprecipitation of the *COX1* or *COX3* mRNAs in the different fractions was analyzed by cDNA synthesis and PCR amplification.

(Fig. 3D). The *pet30912ppr-HA* mutation completely prevented Cox1 labeling even under overexpression conditions. As expected, labeling of Cox1 in strains expressing wild-type *PET309-HA* was normal, whereas a null mutation (*pet309*) completely prevented Cox1 labeling. These results confirm that the 12 PPR domains of Pet309 are necessary for *COX1* mRNA translation.

We next investigated whether Pet309Δ12ppr-HA was membrane bound or soluble. Mitochondria from strains bearing the *PET309-HA* or the *pet30912ppr-HA* low-copy plasmids were sonicated and centrifuged. Both wild-type Pet309-HA and the mutated Pet309Δ12ppr-HA proteins were enriched in the membrane pellet (Fig. 3E). Alkaline Na₂CO₃ extraction of the mitochondrial membranes solubilized wild-type Pet309-HA and Pet309Δ12ppr-HA proteins (Fig. 3F), indicating that both behave as peripheral membrane proteins.

We conclude that the 12 PPR domains present in the central portion of Pet309 do not affect the association of the protein with the membrane but are necessary for translation of *COX1* mRNA.

The 12 central PPR motifs of Pet309 are necessary for high-affinity interaction with the *COX1* mRNA

We sought to investigate whether the 12 PPR motifs on Pet309 were necessary to maintain interaction with the *COX1* mRNA. Immunoprecipitation with anti-HA antibody was performed in mitochondrial extracts carrying either wild-type *PET309-HA* or *pet30912ppr-HA* genes. Western blot analysis of the precipitate and supernatant fractions showed that Pet309Δ12ppr-HA immunoprecipitated with anti-HA antibody. The unrelated protein citrate synthase was present only in the total and supernatant fractions (Fig. 4A). We then looked for the presence of *COX1* or *COX3* mRNAs in the immunoprecipitate.

None of these mRNAs were found to be associated with the Pet309 Δ 12ppr-HA protein, indicating that deletion of the 12 PPR motifs decreased the interaction between Pet309 and *COX1* mRNA to undetectable levels (Fig. 4B).

This result suggested that binding of Pet309 to *COX1* mRNA might depend on the four additional PPR motifs that were deleted from Pet309 Δ 12ppr-HA relative to Pet309 Δ 8ppr-HA. Alternatively, binding of *COX1* mRNA to Pet309 might be progressively decreased with deletion of more motifs. To try to understand if the interaction of Pet309 with *COX1* mRNA is specifically determined by the four additional motifs surrounding the eight central PPR repeats, we created a mutant lacking only these four repeats (Pet309 Δ 4ppr-HA, Figure 5A). Even though respiratory growth and translation were abolished (Figs. 5B, C), interaction of the mutated Pet309 Δ 4ppr-HA protein with *COX1* mRNA was detectable (Figs. 5D, E), indicating that these motifs are not essential for *COX1* mRNA binding. This also suggests that the lack of interaction between Pet309 Δ 12ppr-HA and *COX1* mRNA observed in Figure 4B might be because binding decreased below the threshold of detection in our experimental conditions.

We then tested if overexpressed Pet309 Δ 12ppr-HA protein could bind *COX1* mRNA more efficiently. Mitochondrial extracts from a strain carrying a 2 μ plasmid with *pet30912ppr-HA* were immunoprecipitated with an antibody to HA (Fig. 6A). RT-PCR analysis of the isolated RNA showed that over-produced Pet309 Δ 12ppr-HA recovered detectable levels of *COX1* mRNA binding (Fig. 6B).

Pet309 has also been implicated in *COX1* mRNA stability, as null mutants show reduced accumulation of the mature *COX1* mRNA. This function is particularly relevant in the presence of introns.³¹ It was previously demonstrated that the *pet3098ppr-HA* mutation did not affect *COX1* mRNA accumulation.³⁵ We analyzed whether deletion of the 12 PPR repeats present in

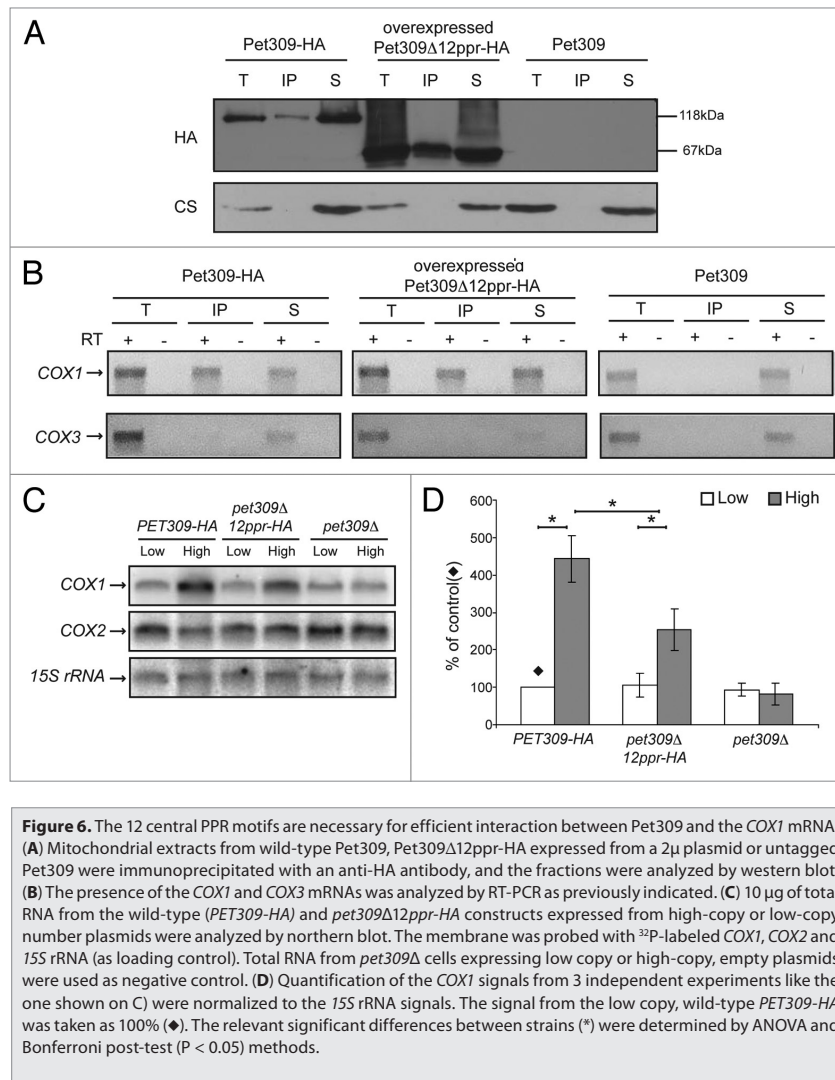


Figure 6. The 12 central PPR motifs are necessary for efficient interaction between Pet309 and the *COX1* mRNA. (A) Mitochondrial extracts from wild-type Pet309, Pet309 Δ 12ppr-HA expressed from a 2 μ plasmid or untagged Pet309 were immunoprecipitated with an anti-HA antibody, and the fractions were analyzed by western blot. (B) The presence of the *COX1* and *COX3* mRNAs was analyzed by RT-PCR as previously indicated. (C) 10 μ g of total RNA from the wild-type (*PET309-HA*) and *pet309 Δ 12ppr-HA* constructs expressed from high-copy or low-copy number plasmids were analyzed by northern blot. The membrane was probed with ³²P-labeled *COX1*, *COX2* and *15S rRNA* (as loading control). Total RNA from *pet309 Δ* cells expressing low copy or high-copy, empty plasmids were used as negative control. (D) Quantification of the *COX1* signals from 3 independent experiments like the one shown on C) were normalized to the *15S rRNA* signals. The signal from the low copy, wild-type *PET309-HA* was taken as 100% (♦). The relevant significant differences between strains (*) were determined by ANOVA and Bonferroni post-test ($P < 0.05$) methods.

Pet309 could affect *COX1* mRNA accumulation. Levels of *COX1* mRNA were analyzed by northern blot and normalized to the mitochondrial *15S rRNA* (Figs. 6C, D). In wild-type cells expressing high-copy *PET309-HA*, *COX1* mRNA signal was increased four times compared with low-copy *PET309-HA* cells. A similar pattern was obtained for *pet30912ppr-HA* cells, except that *COX1* accumulation was increased only 2-fold. This effect was specific for *COX1*, as *COX2* mRNA levels were not affected in any sample. In contrast, the null *pet309* mutant did not show accumulation of *COX1* mRNA in the presence of the high-copy, empty plasmid (Fig. 6C,D). It has been suggested that high levels of translational activators could stabilize their target mRNAs.⁴¹ Our result indicated that Pet309 lacking the 12 PPR repeats still has the capacity to induce accumulation of *COX1* mRNA when

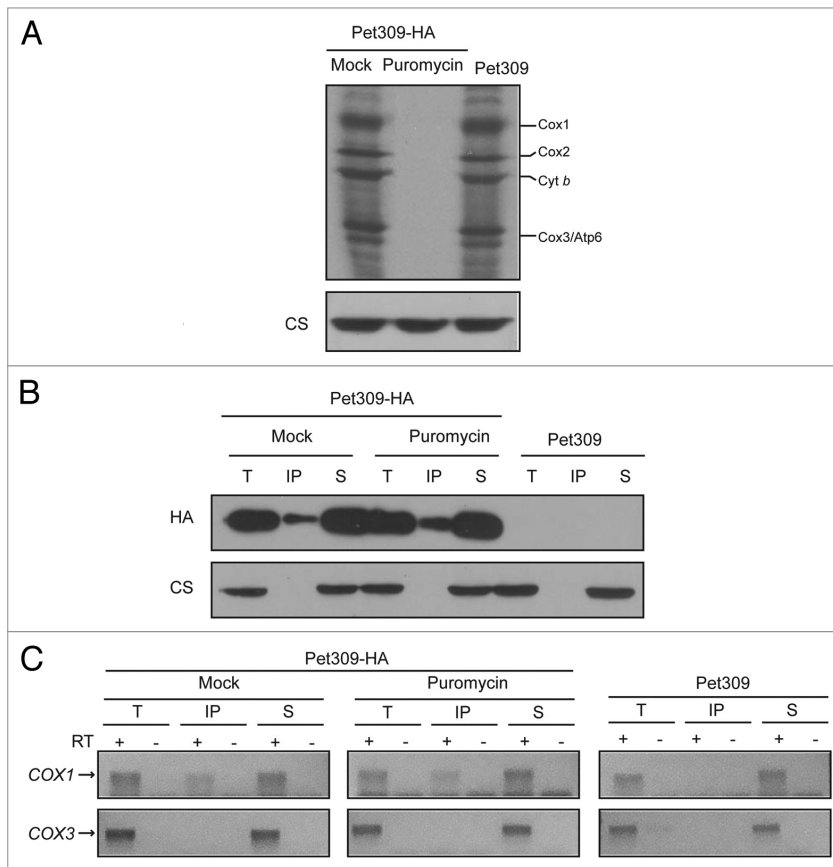


Figure 7. The interaction of Pet309 with the *COX1* mRNA is independent of active ribosomes. Purified mitochondria (1 mg) from a strain with tagged Pet309-HA were incubated with translation buffer in the absence (mock) or presence of 25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of puromycin. Mitochondria from a strain with untagged Pet309 were also mock treated. **(A)** 50 μg of this sample were incubated with ^{35}S methionine, and the translation products were separated by SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane and revealed by autoradiography. The membrane was probed with an antibody to citrate synthase (CS) as a loading control. **(B)** After incubation of mitochondria with translation buffer for 30 min, the dodecyl maltoside extracts were subjected to immunoprecipitation with anti-HA antibody as described in Figure 1. The total (T), supernatant (S) and immunoprecipitate (IP) fractions were analyzed by western blot with an antibody to HA and citrate synthase (CS). **(C)** Agarose gel of the RT-PCR reactions from the immunoprecipitations with anti-HA antibody.

it is overexpressed. A similar behavior was previously observed for the protein Pet309 Δ 8ppr-HA, which under overexpression conditions accumulated *COX1* transcript.³⁵

In conclusion, our data indicate that Pet309 Δ 12ppr-HA still has the capacity to bind to *COX1* mRNA but with decreased affinity. The fact that Pet309 Δ 8ppr-HA and Pet309 Δ 4ppr-HA proteins interact with the *COX1* mRNA with apparent higher affinity (at least over the level of detection of the IP/RT-PCR assay) suggests that the number of PPR motifs present in the protein is important for RNA binding rather than specific repeats. However we cannot discard the possibility that the differences observed for RNA interaction of the Pet309 Δ 12ppr-HA protein

translate the *COX1* mRNA. Both proteins have targets that map to the *COX1* 5'-UTR,^{31,34} independent of the *COX1* coding region, as demonstrated by the fact that expression of the mitochondrial *ARG8^m* reporter gene in place of the *COX1* coding region (*cox1::ARG8^m*) depends on both proteins.^{34,44} To try to understand how Pet309 and Mss51 can cooperate to activate translation of the *COX1* mRNA, we first analyzed whether Mss51 was able to interact with the *COX1* mRNA as Pet309 does. We used a strain in which Mss51 is tagged at the C-terminal end with a triple epitope of hemagglutinin (Mss51-HA). This epitope does not interfere with the catalytic function of Mss51.⁴⁴ Mss51-HA mitochondrial extracts were

could also be due to an effect on Pet309-folding.

Interaction of Pet309 with *COX1* mRNA does not depend on active ribosomes

It has been observed that Pet309 interacts with the mitochondrial ribosome⁴² (Zamudio-Ochoa, Camacho-Villasana and Pérez-Martínez, unpublished data). Therefore, we investigated whether Pet309 was still able to bind to the *COX1* mRNA in the presence of puromycin, which inhibits mitochondrial translation. This antibiotic causes premature chain termination and release.⁴³ Purified mitochondria were incubated with puromycin prior to carrying out protein synthesis in the presence of ^{35}S methionine (Fig. 7A). After Pet309-HA immunoprecipitation, we observed that *COX1* mRNA co-precipitated with Pet309 regardless of the presence of puromycin (Figs. 7B, 7C). This indicated that the interaction of Pet309 with *COX1* mRNA does not depend on whether ribosomes are translationally active.

Mss51 acts differently from Pet309 as a translational activator

Pet309 and Mss51 are translational activators of the *COX1* mRNA; however, very little is understood about their mechanisms of action as translational activators and about whether both proteins act in a similar way to cooperatively

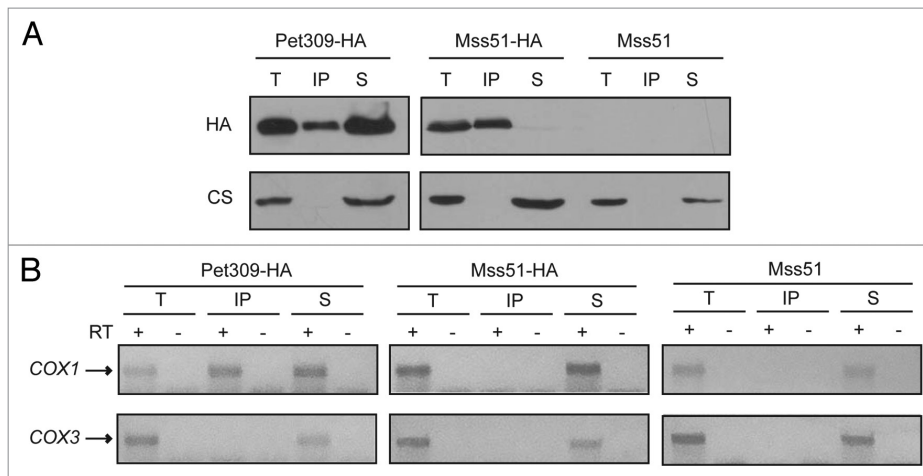


Figure 8. The interaction of Mss51 with the *COX1* mRNA is undetectable. (A) Mitochondrial extracts of Pet309-HA, Mss51-HA, and an untagged strain were immunoprecipitated as in Figure 1. Total (T), immunoprecipitate (IP) and supernatant (S) fractions were analyzed by western blot using the indicated antibodies. (B) RNA from the immunoprecipitation fraction was isolated and analyzed as in Figure 1.

immunoprecipitated with an anti-HA antibody in a similar way as was done previously for Pet309-HA mitochondria. As a control for the quality of Mss51 immunoprecipitation we observed that in our experimental conditions Mss51 was coprecipitated with the Cox1 protein as previously reported^{44,45} (data not shown). *COX1* and *COX3* mRNAs were analyzed by RT-PCR. Even though immunoprecipitation of Mss51-HA was highly efficient (Fig. 8A), no evident interaction of Mss51-HA with the *COX1* mRNA was detected (Fig. 8B). We next asked if the interaction of Pet309-HA with the *COX1* mRNA depends on the presence of Mss51. Pet309-HA was immunoprecipitated from mitochondrial extracts of wild-type and *mss51* cells. First, Pet309-HA was immunoprecipitated from mitochondria carrying a low-copy plasmid of this gene, however no *COX1* mRNA presence was observed on the precipitated fraction with *mss51* cells (data not shown). Next, Pet309-HA was expressed from a high-copy plasmid and was immunoprecipitated as previously described. Again, we were unable to detect an interaction of Pet309-HA with the *COX1* mRNA on the *mss51* strain (Fig. 9A, 9B). As observed in Figure 9A, Pet309 immunoprecipitation efficiency decreased by deletion of Mss51. However on *mss51* cells, the amount of precipitated Pet309 when overexpressed was similar to the amount of Pet309 precipitated under low expression levels on *MSS51* cells, yet no *COX1* RNA was amplified. We performed a northern blot analysis to detect the *COX1* mRNA levels on *mss51* cells expressing *PET309* from low-copy or high-copy plasmids. We observed that deletion of *mss51* did not affect accumulation of the *COX1* mRNA (Fig. 9C, 9D). This is consistent to what was previously reported.⁴⁶ In addition we observed that, as in wild-type strains, expression of high-copy *PET309* in *mss51* cells increased the *COX1* signal four times compared with low-copy *PET309* cells. These results suggest that the interaction of Pet309-HA with the RNA was present but modified by the

absence of Mss51 so we could not detect it under our experimental conditions.

We sought to investigate if Pet309 and Mss51 physically interact by creating a strain where the *PET309-3xHA* and *MSS51-3xMyc* genes were integrated on their original chromosomal loci. The triple HA or Myc epitopes fused to the C-terminal end of Pet309 or Mss51, respectively, did not affect the respiratory growth of the cells (data not shown). Mitochondrial extracts from this strain and from the untagged strain were immunoprecipitated with antibodies against the HA or Myc epitopes under the same experimental conditions used before. After western blot, we detected a small fraction of Mss51 and Pet309 co-precipitating (Fig. 9E).

In conclusion, we observed that a small fraction of Pet309 and Mss51 physically interacted. Even though the site of action of Mss51 and Pet309 map to the *COX1* 5'-UTR,^{31,34} in our conditions no physical interaction of Mss51 with the *COX1* mRNA was detected. Moreover, in the absence of Mss51 the interaction of Pet309-HA with the *COX1* mRNA was not detected, indicating that the Pet309-RNA interaction was modified by Mss51.

Discussion

PPR-containing proteins are members of a eukaryote-specific RNA-binding family involved in genome expression in mitochondria and chloroplasts. More than ten years after their discovery,^{47,48} our understanding of the mechanisms underlying the functions of PPR proteins is starting to unravel. Mitochondrial translational activators like Pet309 are proposed to interact with their target mRNAs to localize the ribosome at the AUG start codon^{30,49}; however, the details of the mechanism of action of these proteins have not been demonstrated

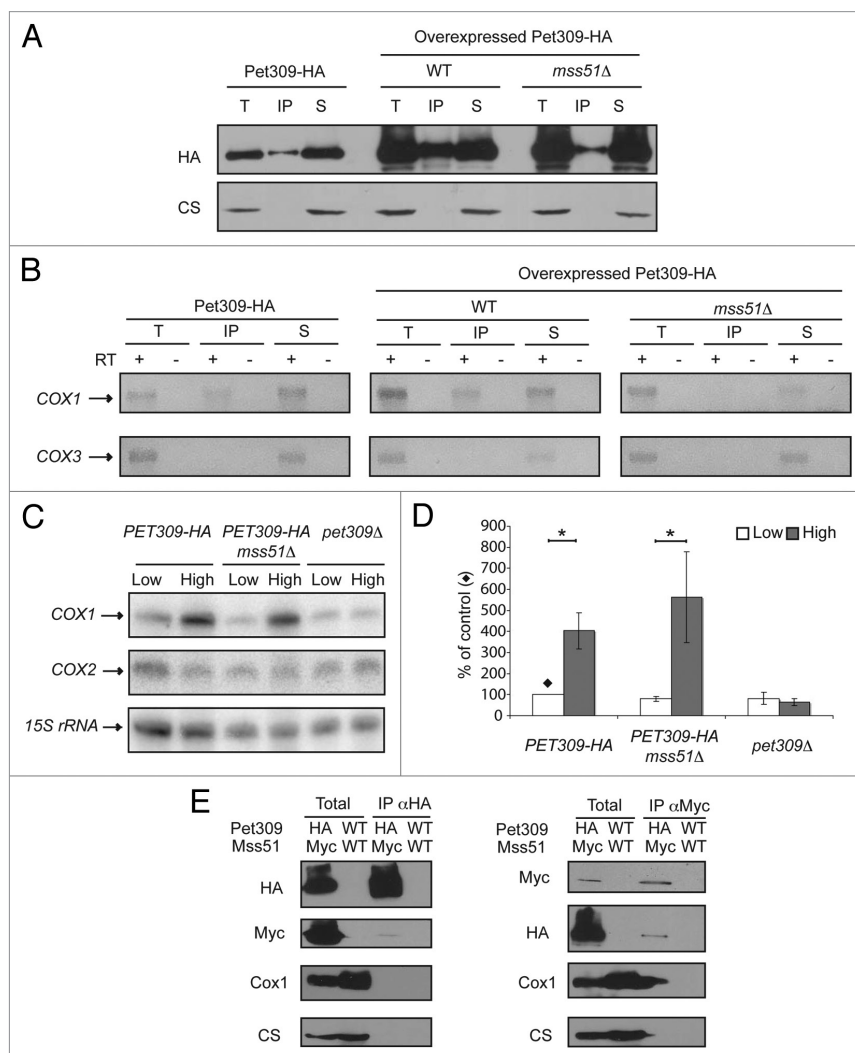


Figure 9. The interaction of Pet309 with the *COX1* mRNA is modified by the absence of Mss51. (A) *pet309Δ* cells were transformed with a low-copy expression plasmid expressing *PET309-HA*. In addition, *pet309Δ* (WT) or *pet309Δ/mss51Δ* cells (*mss51Δ*) were transformed with a high-copy plasmid expressing *PET309-HA* (overexpressed Pet309-HA). Mitochondria were solubilized with dodecyl maltoside, and Pet309-HA was immunoprecipitated with anti-HA antibody as described in Figure 1. The total (T), supernatant (S) and immunoprecipitate (IP) fractions were analyzed by western blot with an antibody to HA and citrate synthase (CS). (B) The presence of *COX1* and *COX3* mRNAs on the immunoprecipitated fractions was analyzed as in Figure 1B. (C) Total RNA from *pet309Δ* and *pet309Δ/mss51Δ* cells transformed with low-copy or high-copy plasmids expressing *PET309-HA* was isolated and analyzed by northern blot as in Figure 6C. (D) The *COX1* signals from 3 independent experiments like the one shown in (C) were quantified as in Figure 6D. The relevant significant differences between strains (*) were determined by ANOVA and Bonferroni post-test ($P < 0.05$) methods. (E) Mitochondria (4mg/ml) of a strain bearing Pet309-3xHA (HA) and Mss51-3xMyc (Myc) or an untagged strain (WT) were solubilized with dodecyl maltoside. The extracts were immunoprecipitated with an antibody against the HA or the Myc epitopes as described in Figure 1. The Total and immunoprecipitate fractions were analyzed by western blot using antibodies as indicated. The total fraction represents 8% of the mitochondrial extract.

experimentally. Our results demonstrate that Pet309 interacts with the *COX1* mRNA and that this interaction is independent of the presence of active ribosomes. This is the first demonstration of a physical interaction in vivo between a yeast mitochondrial

translational activator and its target mRNA and provides important in vivo validation of a physical interaction like that previously observed in vitro for the translational activator Pet54 with the target *COX3* mRNA as well as with the *atL5β* intron

Table 1. List of strains used in this study

Strain	Genotype	Reference
FTC25	Mata, ura3Δ, ade2 PET309–3xHA nuc1Δ::KanMX4 [ρ ⁺] ^a	Faviola Tavares-Carreón (unpublished)
FTC26	Mata, ura3–52, leu2–3, 112 lys2 arg8::hisG pet309Δ::LEU2 nuc1Δ::KanMX4 ρ ⁺ , ΔΣai] ^b	Faviola Tavares-Carreón (unpublished)
JPM13	Mata, ura3Δ, ade2 PET309–3xHA, MSS51–3xMYC [ρ ⁺]	Juan Pablo Mayorga-Juárez (unpublished)
XPM232	Mata, ura3–52, leu2–3, 112 lys2 arg8::hisG pet309Δ::LEU2 [ρ ⁺ , ΔΣai]	³⁵
YC128	Mata, ura3–52, leu2–3, 112 lys2 arg8::hisG pet309Δ::LEU2, mss51Δ::KanMX4 [ρ ⁺ , ΔΣai]	This work
YC131	Mata, ura3Δ, ade2, mss51Δ::URA3, PET309–3xHA nuc1Δ::KanMX4 [ρ ⁺] ^a	This work
YC132	Mata, ura3Δ, ade2 MSS51::3xHA nuc1Δ::KanMX4 [ρ ⁺]	This work
YC133	Mata, ura3Δ, ade2 nuc1Δ::KanMX4 [ρ ⁺]	This work
AGG54	Mata, ura3–52, ade2, arg8::hisG, lys2, leu2–3, 112, mss51Δ::LEU2, PET309::3xHA nuc1Δ::KanMX4 [ρ ⁺]	This work

All strains are isogenic or congenic to D273–10B; ^a The mitochondrial phenotype is shown between brackets; ^b The mitochondrial *COX1* gene has no introns.

of the *COX1* transcript.⁵⁰ The Pet309-*COX1* mRNA interaction that we detected could be direct or mediated by a second protein. However a direct interaction is more plausible because there is increasing evidence by in vitro^{10–16} and crystallography^{4,5} experiments of the direct RNA binding capacity of proteins with PPR motifs. The immunoprecipitate of Pet309 was enriched not only with *COX1* mRNA but also with *ATP8* and *ATP6* mRNAs, which are co-transcribed with *COX1*. This suggests that Pet309 interacts with the *COX1* precursor transcript before processing. However, this interaction does not appear to regulate expression of *ATP8* and *ATP6*, given that deletion of Pet309 does not affect translation of these mRNAs.³¹ It is possible that Pet309 interacts co-transcriptionally with the *COX1* mRNA 5'-UTR. This would be consistent with the observation that Pet309 physically interacts with Nam1, which was previously found to couple transcription and translation,⁵¹ as well as with the mitochondrial RNA polymerase.^{52,53}

We previously demonstrated that the absence of eight PPR motifs located in the middle portion of Pet309 abolished translational activity.³⁵ Here, we showed that this mutated protein retains the capacity to bind to the *COX1* mRNA. However, it was possible to detect interaction of a mutated form of the protein lacking the 12 most strongly predicted central PPR motifs with the mRNA only after overexpression of the protein, suggesting that 12 PPR motifs are necessary for high-affinity interaction of Pet309 with the *COX1* mRNA. Cooperativity between PPR motifs has been observed in vitro for the human LRPPRC protein,^{15,54} although it is still possible that, in addition to binding cooperativity, specific PPR motifs are more important for RNA binding than others, as observed for the *Arabidopsis* PGR3 protein.⁵⁵ In addition to the central motifs predicted by TPRpred, Lipinsky *et. al.*²³ predicted ten additional motifs; of these, we deleted the last four PPR motifs located at the C-terminal end of the protein, and found that even though translation of *COX1* was abolished, the mutated Pet309 still retained capacity to bind the *COX1* mRNA (our unpublished data). This result is similar to

what we observed for the mutated forms of the protein reported here. Because our interaction experiments are not quantitative, it is possible that the mutated proteins lacking four or eight PPR motifs already have compromised interaction with the *COX1* mRNA, explaining the lack of translational capacity. However, even if binding is compromised we were still able to detect this interaction. Interestingly, deletion of any one of the central PPR motifs abolished translation.³⁵ This suggests that there could be another explanation for the observation that mutated forms of the protein lacking some of the central PPR motifs is translationally inactive even when the protein retains the capacity to bind RNA. In these mutants the binding of Pet309 to the mRNA could be sub-optimal for ribosome recognition of the AUG start codon. This is supported by the finding that the chloroplast PPR protein Atp4 enhances association of its target mRNA, *ATPB/E*, to the ribosome.⁵⁶ It is possible that the external surface of Pet309 is a target for interaction of other proteins necessary for adequate ribosome localization and that deletion of a few PPR motifs affects this surface. This is similar to what has been described for the Pumilio family of proteins, whose activity is regulated by the proteins Nanos and Brat, which bind to the external surface of the Pumilio structure.⁵⁷ However, only few examples exist of factors that interact with PPR proteins and seem to be important for their function,^{58–60} and their mechanisms of action remain to be described.

As for many other PPR proteins, in addition to its role on translation, Pet309 is proposed to be involved in stabilization of the *COX1* transcript.³¹ It has been observed that overexpression of Pet309 or the mutated forms lacking some of the PPR motifs accumulate *COX1* transcript (³⁵; present study), although we cannot rule out the possibility that this accumulation is due to increased transcription. Growing evidence suggests that PPR proteins can bind to their target RNAs and block exonuclease cleavage from the 5' and 3' ends.^{12,16} Pet309 could bind to an RNase-sensitive site to prevent access by an endonuclease, making the mRNA stable, as observed for the yeast mitochondrial-targeted

protein Cbp1, which is necessary to protect the *COB* mRNA from the nuclease Pet127.⁶¹ Another example is the chloroplast PPR5 protein, which stabilizes the *trnG*-UCC precursor by binding to an internal group II intron.¹⁷ The maize chloroplast PPR10 protein is involved in stabilization of the adjacent *atpI* and *atpH* RNAs, as well as in the stimulation of *atpH* mRNA translation.^{12,13} Through ribosome profiling experiments it was demonstrated that the primary function of PPR10 is to enhance *atpH* translation.⁶² It binds to the *atpI*-*atpH* intergenic region to block 5' and 3' exonuclease activities. It also recognizes a stem-loop structure which is located upstream of the AUG start codon and binds to single-stranded RNA to enhance translation.^{12,13} Pet309 could have a similar mechanism of action to accumulate and translate the *COXI* mRNA.

Considerable progress has been made to understand and predict the RNA recognition code of plant PPR proteins.^{4,5,55,63-65} A polar amino acid (primarily N, T or S) at position 5 (according to amino acid positions in the PPR10 crystal structure) appears to be the determinant for base specific recognition.^{4,5,63,64} Positions 2 and 35 seem also to be important for RNA binding. Residues at position 2 of adjacent PPR motifs (primarily V, F, I, R) sandwich one nucleotide base mainly through van der Waals interactions.⁵ The residue at position 35 is close to the base, and could make hydrogen bonds with it through water molecules; in addition, some of them could stabilize the conformation of the residue at the fifth position of the same repeat.⁵ Some of the 22 PPR motifs predicted on Pet309 match this recognition code. For example, position 5 is an N, T or S in 8 of the 22 repeats, while position 35 seems to match one of the expected residues in 9 repeats. Mutagenesis studies are needed to understand if the recognition code for plants has the same relevance in yeast PPR proteins.

Binding of Pet309 to the RNA might not be the only requisite for correct binding and/or start site selection of the ribosome. Mss51, the second translational activator specific for the *COXI* mRNA, could have an essential role in this step. In the present work we observed that in the absence of Mss51, the interaction of Pet309 with the *COXI* mRNA was not detected after immunoprecipitation assays, yet the accumulation of the transcript was not affected. These results suggest that in the absence of Mss51, Pet309 retained the ability to bind the *COXI* mRNA, but this interaction was modified so we could not detect it on our experimental conditions. It was previously demonstrated that, in the absence of Mss51, an aberrant peptide (mp15) derived from the *COXI* gene is produced. Synthesis of mp15 depends on Pet309,⁶⁶ suggesting that *COXI* mRNA translation can proceed in the absence of Mss51; however, Pet309 could not have an appropriate interaction with the mRNA to activate translation, as the ribosome might not be able to find the correct AUG start codon on the mRNA. More studies are needed to unravel the mechanism by which Mss51 and Pet309 act together on translational activation of the *COXI* mRNA. In addition, we searched for an interaction between Mss51 and the *COXI* mRNA. However, even when immunoprecipitation of Mss51 was highly efficient, no association with the *COXI* mRNA was observed, indicating that either Mss51 does not directly interact with the mRNA or that the interaction is transient. Zambrano

and colleagues observed an interaction with the *COXI* mRNA using a segment of Mss51 in a triple hybrid experiment.⁶⁶ They proposed that the most probable region of interaction for Mss51 was around -97 to +23 nucleotides with respect to the *COXI* AUG start codon. Here we detected a physical interaction between Mss51 and Pet309, which could be direct or mediated by the translational machinery to promote translation initiation. In this scenario, Mss51 would interact with the *COXI* mRNA only transiently, whereas the interaction of Pet309 with the *COXI* mRNA would be more stable, but regulated by Mss51 through a mechanism yet to be revealed.

Materials and Methods

Strains, media, and genetic methods

The *S. cerevisiae* strains used in this study are listed in **Table 1**. Standard genetic methods and media recipes were as described previously.^{67,68} Complete fermentable media were YPD or YPrAf (containing 2% glucose or 2% raffinose). Minimal media contained 0.67% yeast nitrogen base, 2% glucose or 3% glycerol/3% ethanol, and Complete Supplement Mixtures (CSMs) purchased from Bio 101 (Vista, CA) and ForMedium (UK). Gene deletion constructs with *KanMX4*, *LEU2*, or *URA3* cassettes were generated by PCR.

Molecular biology methods

Standard molecular biology methods for cloning, northern and Southern blot analyses were as described previously.⁶⁹ The plasmids used and generated during this work were derivatives of pXP96 (derivative of the pBluescript backbone), pXP97 (ARS/CEN plasmid derived from pRS416), and pXP104 (2 μ plasmid derived from YEp352) and contain the *PET309::HA* sequence, including 310 and 205 nt of the *PET309* 5' and 3'-UTRs, respectively.³⁵ The *pet3098ppr* was previously created,³⁵ and lacks residues 347 to 632. During the cloning of this construct the TPRpred software⁴⁰ did not predict the sequence F562 to D596 to be a PPR motif, so the construct was claimed to be a deletion of 7 PPR motifs. As the database was enriched with PPR motif sequences, the TPRpred software identified sequence F562 to D596 as a PPR motif. The *pet309 Δ 12ppr* and *pet309 Δ 4ppr* mutated forms of the protein were generated by fusion PCR⁷⁰ using Accuzyme DNA polymerase (Bioline) and pXP97 as the DNA template. The construct *pet309 Δ 12ppr* lacks residues N312 to N759, and the *pet309 Δ 4ppr* construct lacks residues N312 to I346 and I638 to N759. PCR products were digested with PstI and EcoRI and cloned into similarly digested pXP96. The *XbaI* - *XhoI* DNA fragments from *pet309 Δ 12ppr* and *pet309 Δ 4ppr* were ligated into pXP97 to generate the ARS/CEN, low-copy-number plasmids. In addition, the *XbaI* - *XhoI* insert of *pet309 Δ 12ppr* was ligated into a 2 μ , high-copy-number plasmid. For northern blot analysis, total RNA was extracted using the RNeasy Mini kit (Qiagen) from yeast cultures grown to late log phase on raffinose-synthetic complete media lacking uracil. RNA was separated by agarose gel electrophoresis and blotted to Hybond XL membranes (GE Healthcare). Blots were probed with radioactively labeled probes recognizing *COXI*

exon 4, *COX2*, and *15S* rRNA.⁷¹ *15S* rRNA signal was used to standardize loading. Blots were analyzed with a Typhoon 8600 PhosphorImager (GE Healthcare) and quantitated with ImageQuant. The probe for Southern blot hybridization was obtained from the HindIII fragment of pXPM19, which contains the full-length *COXI* 5'-UTR.⁴⁴

RNA immunoprecipitation assay

This technique is based on chloroplast RNA IP assays that have been described previously.^{18,72} To reduce the risk of RNA degradation during solubilization of mitochondria, we deleted the *NUC1* gene encoding a mitochondrial nuclease with a *nucl::KanMX4* cassette. Mitochondria (1 mg) were lysed with 500 μ l of 0.7% n-Dodecyl β -D-maltoside, 100 mM NaCl, 20 mM TRIS-HCl pH 7.4, 200 U of RNaseOUT (Invitrogen), and a cocktail of protease inhibitors (Roche). The solubilized fraction was subjected to a clarifying spin for 10 min at 12,000 g. The supernatant was incubated with an anti-HA high-affinity antibody (Roche or Pierce), which was coupled to protein A-sepharose (GE Healthcare) for two hours at 4 °C with constant rocking. After centrifugation, the supernatant was kept in a separate tube, and excess liquid was discarded with a microsyringe. The immunoprecipitate was washed twice with 500 μ l of lysis buffer and twice with 1 ml of 20 mM HEPES-KOH pH 7.4 and then resuspended in 150 μ l of the same buffer. One-fourth of the supernatant and precipitate fractions were saved for western blot analysis, and the remainder was used for RNA extraction. RNA from total, immunoprecipitated, and supernatant fractions was extracted by incubation with 1 ml of TRIzol® reagent (Invitrogen). Twenty ng of RNA were treated with 1 unit of DNase I (Invitrogen) for 15 min at 25 °C. After inactivation with 25 mM EDTA and incubation at 65 °C, the first strand of cDNA was prepared by addition of primers for *COXI*, *COX3*, *VARI* *ATP8* or *ATP6* in the presence of SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). The reaction was incubated at 25 °C for 5 min, then at 50 °C for 60 min, and then at 70 °C for 15 min. The resulting cDNA was used as template for PCR reactions to amplify the *COXI*, *COX3*, *VARI*, *ATP8* or *ATP6* 5'-UTRs using 35 cycles. Note that under these conditions RT-PCR is not quantitative. For clarity, RT-PCR agarose gel

pictures shown in the figures were color-inverted, resulting in dark bands on a white background.

Analysis of Mitochondrial Proteins

Yeast cells were grown in raffinose medium until late log phase. Mitochondria were isolated as previously described.⁷³ Proteins were separated by SDS-PAGE.⁷⁴ For western blotting, proteins were transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes and probed with anti-Cox1 (Rodolfo García-Villegas), anti-hemagglutinin (HA) (Roche), anti c-MYC (Roche), anti-citrate synthase (Thomas D. Fox), or anti-cytochrome *cl* (Diego González-Halphen and Miriam Vázquez-Acevedo) antibodies. Immune complexes were detected with either goat anti-rabbit immunoglobulin (IgG) or anti-mouse IgG conjugated to horseradish peroxidase (Invitrogen) and the enhanced chemiluminescence kit (Pierce), with the exception that the anti-HA signal was detected using the Immobilon substrate (Millipore) or WestPico Kit (Pierce). Mitochondrial translation products were radiolabeled with ³⁵S methionine in whole cells in the presence of cycloheximide or in purified mitochondria as previously described.⁷⁵ Mitochondrial separation into membrane and soluble fractions and alkaline carbonate extractions of membranes was as described.^{35,73}

Acknowledgments

We thank Rodolfo García-Villegas, Diego González-Halphen, Miriam Vázquez-Acevedo and Thomas Fox for the gift of antisera, Gabriel del Río-Guerra and Teresa Lara-Ortiz for the gift of yeast deletion strains, and Faviola Tavares-Carreón for yeast strains and preliminary experiments. We are also indebted to Felix Recillas-Targa for critical review of the manuscript. This work was supported by research grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (47514 to X. P-M, fellowship 298954 to A. Z-O, fellowship 255917 to AE. G-G), Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Universidad Nacional Autónoma de México (IN208711 and IN204414 to X. P-M), and Fundación Miguel Alemán, A.C. (to X. P-M). This manuscript is part of the Ph. D. thesis of A. Z-O from the Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

References

1. Ringel R, Sologub M, Morozov YI, Litonin D, Cramer P, Temiakov D. Structure of human mitochondrial RNA polymerase. *Nature* 2011; 478:269-73; PMID:21947009; <http://dx.doi.org/10.1038/nature10435>
2. Howard MJ, Lim WH, Fierke CA, Koutmos M. Mitochondrial ribonuclease P structure provides insight into the evolution of catalytic strategies for precursor-tRNA 5' processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109:16149-54; PMID:22991464; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1209062109>
3. Ban T, Ke J, Chen R, Gu X, Tan MH, Zhou XE, Kang Y, Melcher K, Zhu JK, Xu HE. Structure of a PLS-class pentatricopeptide repeat protein provides insights into mechanism of RNA recognition. *J Biol Chem* 2013; 288:31540-8; PMID:24047899; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M113.496828>
4. Ke J, Chen RZ, Ban T, Zhou XE, Gu X, Tan MH, Chen C, Kang Y, Brunzelle JS, Zhu JK, et al. Structural basis for RNA recognition by a dimeric PPR-protein complex. *Nat Struct Mol Biol* 2013; 20:1377-82; PMID:24186060; <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.2710>
5. Yin P, Li Q, Yan C, Liu Y, Liu J, Yu F, Wang Z, Long J, He J, Wang HW, et al. Structural basis for the modular recognition of single-stranded RNA by PPR proteins. *Nature* 2013; 504:168-71; PMID:24162847; <http://dx.doi.org/10.1038/nature12651>
6. O'Toole N, Hattori M, Andres C, Iida K, Lurin C, Schmitz-Linneweber C, Sugita M, Small I. On the expansion of the pentatricopeptide repeat gene family in plants. *Mol Biol Evol* 2008; 25:1120-8; PMID:18343892; <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msn057>
7. Lurin C, Andrés C, Aubourg S, Bellaoui M, Bitton F, Bruyère C, Caboche M, Debast C, Gualberto J, Hoffmann B, et al. Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* 2004; 16:2089-103; PMID:15269332; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.104.022236>
8. Schmitz-Linneweber C, Small I. Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. *Trends Plant Sci* 2008; 13:663-70; PMID:19004664; <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2008.10.001>
9. Aphasizheva I, Maslov D, Wang X, Huang L, Aphasizhev R. Pentatricopeptide repeat proteins stimulate mRNA adenylation/uridylation to activate mitochondrial translation in trypanosomes. *Mol Cell* 2011; 42:106-17; PMID:21474072; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2011.02.021>

10. Hammani K, des Francs-Small CC, Takenaka M, Tanz SK, Okuda K, Shikanai T, Brennicke A, Small I. The pentatricopeptide repeat protein OTP87 is essential for RNA editing of nad7 and atp1 transcripts in *Arabidopsis* mitochondria. *J Biol Chem* 2011; 286:21361-71; PMID:21504904; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.230516>
11. Okuda K, Nakamura T, Sugita M, Shimizu T, Shikanai T. A pentatricopeptide repeat protein is a site recognition factor in chloroplast RNA editing. *J Biol Chem* 2006; 281:37661-7; PMID:17015439; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M608184200>
12. Pfall J, Bayraktar OA, Prikryl J, Barkan A. Site-specific binding of a PPR protein defines and stabilizes 5' and 3' mRNA termini in chloroplasts. *EMBO J* 2009; 28:2042-52; PMID:19424177; <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2009.121>
13. Prikryl J, Rojas M, Schuster G, Barkan A. Mechanism of RNA stabilization and translational activation by a pentatricopeptide repeat protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108:415-20; PMID:21173259; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1012076108>
14. Williams-Carrier R, Kroeger T, Barkan A. Sequence-specific binding of a chloroplast pentatricopeptide repeat protein to its native group II intron ligand. *RNA* 2008; 14:1930-41; PMID:18669444; <http://dx.doi.org/10.1261/rna.1077708>
15. Xu F, Addis JB, Cameron JM, Robinson BH. LRPPRC mutation suppresses cytochrome oxidase activity by altering mitochondrial RNA transcript stability in a mouse model. *Biochem J* 2012; 441:275-83; PMID:21880015; <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20110985>
16. Zhelyazkova P, Hammani K, Rojas M, Voelker R, Vargas-Suárez M, Börner T, Barkan A. Protein-mediated protection as the predominant mechanism for defining processed mRNA termini in land plant chloroplasts. *Nucleic Acids Res* 2012; 40:3092-105; PMID:22156165; <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr1137>
17. Beck S, Schmitz-Linneweber C, Williams-Carrier R, Jensen B, Barkan A. The pentatricopeptide repeat protein PPR5 stabilizes a specific tRNA precursor in maize chloroplasts. *Mol Cell Biol* 2008; 28:5337-47; PMID:18591259; <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00563-08>
18. Schmitz-Linneweber C, Williams-Carrier R, Barkan A. RNA immunoprecipitation and microarray analysis show a chloroplast Pentatricopeptide repeat protein to be associated with the 5' region of mRNAs whose translation it activates. *Plant Cell* 2005; 17:2791-804; PMID:16141451; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.105.034454>
19. Mitchell SF, Jain S, She M, Parker R. Global analysis of yeast mRNPs. *Nat Struct Mol Biol* 2013; 20:127-33; PMID:23222640; <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.2468>
20. Yamazaki H, Tasaka M, Shikanai T. PPR motifs of the nucleus-encoded factor, PGR3, function in the selective and distinct steps of chloroplast gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J* 2004; 38:152-63; PMID:15053768; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02035.x>
21. Loiselay C, Gumpel NJ, Girard-Bascou J, Watson AT, Purton S, Wollman FA, Choquet Y. Molecular identification and function of cis- and trans-acting determinants for petA transcript stability in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *Mol Cell Biol* 2008; 28:5529-42; PMID:18573878; <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.02056-07>
22. Rivals E, Bruyère C, Toffano-Nioche C, Lecharny A. Formation of the *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat family. *Plant Physiol* 2006; 141:825-39; PMID:16825340; <http://dx.doi.org/10.1104/pp.106.077826>
23. Lipinski KA, Puchta O, Surendranath V, Kudla M, Golik P. Revisiting the yeast PPR proteins--application of an Iterative Hidden Markov Model algorithm reveals new members of the rapidly evolving family. *Mol Biol Evol* 2011; 28:2935-48; PMID:21546354; <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msr120>
24. Stribinskis V, Gao GJ, Ellis SR, Martin NC. Rpm2, the protein subunit of mitochondrial RNase P in *Saccharomyces cerevisiae*, also has a role in the translation of mitochondrially encoded subunits of cytochrome c oxidase. *Genetics* 2001; 158:573-85; PMID:11404323
25. Stribinskis V, Gao GJ, Sulo P, Ellis SR, Martin NC. Rpm2p: separate domains promote tRNA and Rpm1r maturation in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Nucleic Acids Res* 2001; 29:3631-7; PMID:11522833; <http://dx.doi.org/10.1093/nar/29.17.3631>
26. Nouet C, Bourens M, Hlavacek O, Marsy S, Lemaire C, Dujardin G. Rnd9p controls the processing/stability of mitochondrial mRNAs and its overexpression compensates for a partial deficiency of oxal1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 2007; 175:1105-15; PMID:17194787; <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.106.063883>
27. Puchta O, Lubas M, Lipinski KA, Piatkowski J, Malecki M, Golik P, DMR1 (CCM1/YGR150C) of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an RNA-binding protein from the pentatricopeptide repeat family required for the maintenance of the mitochondrial 15S ribosomal RNA. *Genetics* 2010; 184:959-73; PMID:20124025; <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.110.113969>
28. Lee C, Tibbetts AS, Kramer G, Appling DR. Yeast AEP3p is an accessory factor in initiation of mitochondrial translation. *J Biol Chem* 2009; 284:34116-25; PMID:19843529; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.055350>
29. Pérez-Martínez X, Funes S, Camacho-Villasana Y, Marjavaara S, Tavares-Carreón F, Shingú-Vázquez M. Protein synthesis and assembly in mitochondrial disorders. *Curr Top Med Chem* 2008; 8:1335-50; PMID:18991722; <http://dx.doi.org/10.2174/156802608786141124>
30. Herrmann JM, Woellhaf MW, Bonnefoy N. Control of protein synthesis in yeast mitochondria: the concept of translational activators. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1833:286-94; PMID:22450032; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamc.2012.03.007>
31. Manthey GM, McEwen JE. The product of the nuclear gene PET309 is required for translation of mature mRNA and stability or production of intron-containing RNAs derived from the mitochondrial COX1 locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 1995; 14:4031-43; PMID:7664742
32. Fontanesi F, Soto IC, Barrientos A. Cytochrome c oxidase biogenesis: new levels of regulation. *IUBMB Life* 2008; 60:557-68; PMID:18465791; <http://dx.doi.org/10.1002/iub.86>
33. Perez-Martinez X, Butler CA, Shingu-Vazquez M, Fox TD. Dual functions of Mss51 couple synthesis of Cox1 to assembly of cytochrome c oxidase in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Mol Biol Cell* 2009; 20:4371-80; PMID:19710419; <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E09-06-0522>
35. Tavares-Carreón F, Camacho-Villasana Y, Zamudio-Choa A, Shingú-Vázquez M, Torres-Larios A, Pérez-Martínez X. The pentatricopeptide repeats present in Pet309 are necessary for translation but not for stability of the mitochondrial COX1 mRNA in yeast. *J Biol Chem* 2008; 283:1472-9; PMID:18039654; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M708437200>
36. Kühl I, Dujancourt L, Gaisne M, Herbert CJ, Bonnefoy N. A genome wide study in fission yeast reveals nine PPR proteins that regulate mitochondrial gene expression. *Nucleic Acids Res* 2011; 39:8029-41; PMID:21727087; <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr511>
37. Dake E, Hofmann TJ, McIntire S, Hudson A, Zassenhaus HP. Purification and properties of the major nuclease from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1988; 263:7691-702; PMID:3286639
38. Iqbal J, Hudson AP. An in vitro transcription assay for yeast mitochondria using organellar lysates. *Anal Biochem* 1996; 243:270-6; PMID:8954560; <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1996.0516>
39. Miyakawa I, Fujimura R, Kadowaki Y. Use of the nucl null mutant for analysis of yeast mitochondrial nucleoids. *J Gen Appl Microbiol* 2008; 54:317-25; PMID:19164874; <http://dx.doi.org/10.2323/jgam.54.317>
40. Karpenahalli MR, Lupas AN, Söding J. TPRpred: a tool for prediction of TPR-, PPR- and SEL1-like repeats from protein sequences. *BMC Bioinformatics* 2007; 8:2; PMID:17199898; <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-8-2>
41. Fiori A, Perez-Martinez X, Fox TD. Overexpression of the COX2 translational activator, Pet11p, prevents translation of COX1 mRNA and cytochrome c oxidase assembly in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 2005; 56:1689-704; PMID:15916616; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04658.x>
42. Bauerschmitt H, Mick DU, Deckers M, Vollmer C, Funes S, Kehrein K, Ott M, Rehling P, Herrmann JM. Ribosome-binding proteins Mdm38 and Mba1 display overlapping functions for regulation of mitochondrial translation. *Mol Biol Cell* 2010; 21:1937-44; PMID:20427570; <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E10-02-0101>
43. Sohmen D, Harms JM, Schlünzen F, Wilson DN. SnapShot: Antibiotic inhibition of protein synthesis I. *Cell* 2009; 138:e1; PMID:19766574; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.001>
44. Perez-Martinez X, Broadley SA, Fox TD. Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. *EMBO J* 2003; 22:5951-61; PMID:14592991; <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/cdg566>
45. Barrientos A, Zambrano A, Tzagoloff A. Mss51p and Cox14p jointly regulate mitochondrial Cox1p expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 2004; 23:3472-82; PMID:15306853; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7600358>
46. Decoster E, Simon M, Hatat D, Faye G. The MSS51 gene product is required for the translation of the COX1 mRNA in yeast mitochondria. *Mol Gen Genet* 1990; 224:111-8; PMID:2177521; <http://dx.doi.org/10.1007/BF00259457>
47. Aubourg S, Boudet N, Kreis M, Lecharny A. In *Arabidopsis thaliana*, 1% of the genome codes for a novel protein family unique to plants. *Plant Mol Biol* 2000; 42:603-13; PMID:10809006; <http://dx.doi.org/10.1023/A:1006352315928>
48. Small ID, Peeters N. The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem Sci* 2000; 25:46-7; PMID:10664580; [http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004\(99\)01520-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01520-0)
49. Fox TD. Genetics of mitochondrial translation. In: Hershey JWB, Matthews MB, Sonenberg N, eds. *Translational Control*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press, 1996:733-58

50. Kaspar BJ, Bifano AL, Caprara MG. A shared RNA-binding site in the Pet54 protein is required for translational activation and group I intron splicing in yeast mitochondria. *Nucleic Acids Res* 2008; 36:2958-68; PMID:18388132; <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkn045>
51. Rodeheffer MS, Boone BE, Bryan AC, Shadel GS. Nam1p, a protein involved in RNA processing and translation, is coupled to transcription through an interaction with yeast mitochondrial RNA polymerase. *J Biol Chem* 2001; 276:8616-22; PMID:11118450; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M009901200>
52. Markov DA, Savkina M, Anikin M, Del Campo M, Ecker K, Lambowitz AM, De Gnore JP, McAllister WT. Identification of proteins associated with the yeast mitochondrial RNA polymerase by tandem affinity purification. *Yeast* 2009; 26:423-40; PMID:19536766; <http://dx.doi.org/10.1002/yea.1672>
53. Naithani S, Saracco SA, Butler CA, Fox TD. Interactions among COX1, COX2, and COX3 mRNA-specific translational activator proteins on the inner surface of the mitochondrial inner membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 2003; 14:324-33; PMID:12529447; <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E02-08-0490>
54. Mili S, Piñol-Roma S. LRP130, a pentatricopeptide motif protein with a noncanonical RNA-binding domain, is bound in vivo to mitochondrial and nuclear RNAs. *Mol Cell Biol* 2003; 23:4972-82; PMID:12832482; <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.23.14.4972-4982.2003>
55. Fujii S, Sato N, Shikanai T. Mutagenesis of individual pentatricopeptide repeat motifs affects RNA binding activity and reveals functional partitioning of Arabidopsis PROTON gradient regulation3. *Plant Cell* 2013; 25:3079-88; PMID:23975900; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.113.112193>
56. Zoschke R, Kroeger T, Belcher S, Schöttler MA, Barkan A, Schmitz-Linneweber C. The pentatricopeptide repeat-SMR protein ATP4 promotes translation of the chloroplast atpB/E mRNA. *Plant J* 2012; 72:547-58; PMID:22708543; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2012.05081.x>
57. Edwards TA, Pyle SE, Wharton RP, Aggarwal AK. Structure of Pumilio reveals similarity between RNA and peptide binding motifs. *Cell* 2001; 105:281-9; PMID:11336677; [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00318-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00318-X)
58. Sasarman F, Brunel-Guitton C, Antonicka H, Wai T, Shoubridge EA; LSFC Consortium. LRPPRC and SLIRP interact in a ribonucleoprotein complex that regulates posttranscriptional gene expression in mitochondria. *Mol Biol Cell* 2010; 21:1315-23; PMID:20200222; <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E10-01-0047>
59. Bentolila S, Heller WP, Sun T, Babina AM, Friso G, van Wijk KJ, Hanson MR. RIP1, a member of an Arabidopsis protein family, interacts with the protein RARE1 and broadly affects RNA editing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109:E1453-61; PMID:22566615; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1121465109>
60. Boussardon C, Salone V, Avon A, Berthomé R, Hammani K, Okuda K, Shikanai T, Small I, Lurin C. Two interacting proteins are necessary for the editing of the NdhD-1 site in Arabidopsis plastids. *Plant Cell* 2012; 24:3684-94; PMID:23001034; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.112.099507>
61. Fekete Z, Ellis TP, Schonauer MS, Dieckmann CL. Pet127 governs a 5' → 3'-exonuclease important in maturation of apocytochrome b mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 2008; 283:3767-72; PMID:18086665; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M709617200>
62. Zoschke R, Watkins KP, Barkan A. A rapid ribosome profiling method elucidates chloroplast ribosome behavior in vivo. *Plant Cell* 2013; 25:2265-75; PMID:23735295; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.113.111567>
63. Barkan A, Rojas M, Fujii S, Yap A, Chong YS, Bond CS, Small I. A combinatorial amino acid code for RNA recognition by pentatricopeptide repeat proteins. *PLoS Genet* 2012; 8:e1002910; PMID:22916040; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1002910>
64. Yagi Y, Hayashi S, Kobayashi K, Hirayama T, Nakamura T. Elucidation of the RNA recognition code for pentatricopeptide repeat proteins involved in organelle RNA editing in plants. *PLoS One* 2013; 8:e57286; PMID:23472078; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0057286>
65. Takenaka M, Zehrmann A, Brennicke A, Graichen K. Improved computational target site prediction for pentatricopeptide repeat RNA editing factors. *PLoS One* 2013; 8:e65343; PMID:23762347; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0065343>
66. Zambrano A, Fontanesi F, Solans A, de Oliveira RL, Fox TD, Tzagoloff A, Barrientos A. Aberrant translation of cytochrome c oxidase subunit 1 mRNA species in the absence of Mss51p in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 2007; 18:523-35; PMID:17135289; <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E06-09-0803>
67. Guthrie C, Fink GR, eds. *Guide to yeast genetics and molecular and cell biology*. San Diego: Academic Press, 2002
68. Burke D, Dawson D, Stearns T. *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000
69. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
70. Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 1989; 77:51-9; PMID:2744487; [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119\(89\)90358-2](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119(89)90358-2)
71. Shen ZH, Fox TD. Substitution of an invariant nucleotide at the base of the highly conserved '530-loop' of 15S rRNA causes suppression of yeast mitochondrial ochre mutations. *Nucleic Acids Res* 1989; 17:4535-9; PMID:2473436; <http://dx.doi.org/10.1093/nar/17.12.4535>
72. Osthheimer GJ, Williams-Carrier R, Belcher S, Osborne E, Gierke J, Barkan A. Group II intron splicing factors derived by diversification of an ancient RNA-binding domain. *EMBO J* 2003; 22:3919-29; PMID:12881426; <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/cdg372>
73. Diekert K, de Kroon AI, Kispal G, Lill R. Isolation and subfractionation of mitochondria from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Cell Biol* 2001; 65:37-51; PMID:11381604; [http://dx.doi.org/10.1016/S0091-679X\(01\)65003-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0091-679X(01)65003-9)
74. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-5; PMID:5432063; <http://dx.doi.org/10.1038/227680a0>
75. Westermann B, Herrmann JM, Neupert W. Analysis of mitochondrial translation products in vivo and in organello in yeast. *Methods Cell Biol* 2001; 65:429-38; PMID:11381608; [http://dx.doi.org/10.1016/S0091-679X\(01\)65025-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0091-679X(01)65025-8)

Apéndice 2. Otros artículos derivados de mi trabajo en el laboratorio

Durante mi formación académica en el laboratorio de la Dra. Xochitl Pérez Martínez participé en la preparación de los siguientes manuscritos:

1.- Faviola Tavares-Carreón, Yolanda Camacho-Villasana, Angélica Zamudio-Ochoa, Miguel Shingú-Vázquez, Alfredo Torres-Larios and Xochitl Pérez-Martínez (2008) The pentatricopeptide repeats present in Pet309 are necessary for translation but not for stability of the mitochondrial *COX1* mRNA in yeast. *J. Biol. Chem.* 283 (3): 1472–1479.

En este trabajo se demostró que la mutante de Pet309 carente de los 8 motivos PPR centrales no traduce al mRNA de *COX1*. Sin embargo esta mutación no afectó la capacidad de acumular al mRNA de *COX1* cuando Pet309 Δ 8ppr-HA se sobreexpresa. También demostramos que con tan solo eliminar un motivo PPR la traducción del mRNA de *COX1* se abate, e identificamos dos amino ácidos básicos que se predicen dentro de la cavidad formada por las repeticiones PPR y que son importantes para la función de la proteína.

2. Juan Pablo Mayorga-Juárez, Angélica Zamudio-Ochoa, Yolanda Camacho-Villasana, Miguel Shingú-Vázquez and Xochitl Pérez-Martínez. Pet54 is a positive regulator of Cox1 synthesis in yeast mitochondria. Para ser enviado a la revista “*Mitochondrion*”.

En este trabajo describimos una nueva función para la proteína mitocondrial Pet54. Originalmente esta proteína se caracterizó como un activador traduccional del mRNA de *COX3*, y como una proteína necesaria en el procesamiento de un intrón de *COX1*. Nosotros encontramos que Pet54 es además un regulador positivo de la síntesis de Cox1. Esta nueva función es independiente de la presencia de intrones en este transcrito. Durante el estudio de esta nueva función encontramos que en ausencia de Pet54, la proteína Mss51 se encuentra principalmente en su estado "libre", el cual se relaciona con la población de Mss51 que participa en la activación traduccional del mRNA de *COX1*. Sin embargo, a pesar de que Mss51 se encuentra "libre", no está capacitado para activar

la síntesis de Cox1, indicando que existen más niveles de regulación de la actividad de Mss51, y que uno de esos estados depende de Pet54.

3. Angélica Zamudio-Ochoa, Yolanda Camacho-Villasana and Xochitl Pérez-Martínez. Pet309 interacts with the mitochondrial ribosome to activate translation of the COX1 mRNA in yeast mitochondria. Para ser enviado a la revista "Molecular Biology of the Cell".

En este artículo se reportarán los resultados de la sección 2 y parte de la sección 3 de esta tesis. Se reportará que Pet309 interactúa con el ribosoma mitocondrial a partir de su región amino terminal. Una pequeña proporción de Mss51 también interactúa con el mitorribosoma. La interacción de ambos activadores con la maquinaria traduccional no depende de una traducción activa del mRNA de *COX1*. La presencia de Mss51 no es necesaria para la interacción de Pet309 con el mitorribosoma, y viceversa.

**Apéndice 3. Cepas, amortiguadores y secuencias de oligonucleótidos
utilizados en este trabajo**

Tabla A3.1. Cepas utilizadas en este trabajo

Cepa	Genotipo	Referencia
AGG54	<i>Mata</i> , <i>ura3-52</i> , <i>ade2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>lys2</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>mss51Δ::LEU2</i> , <i>PET309::3xHA</i> , <i>nuc1Δ::KanMX4</i> [ρ^+].	(Zamudio-Ochoa et al, 2014)
AZO53	<i>Mata</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112 lys2 arg8::hisG</i> , <i>pet309Δ::LEU2</i> , <i>cox1Δ</i> .	Angelica Zamudio-Ochoa. No publicada.
AZO86	<i>Mata</i> , <i>ura3Δ</i> , <i>ade2</i> , <i>MSS51-3xHA</i> , <i>cox1Δ</i> .	Angelica Zamudio-Ochoa. No publicada.
FTC25	<i>Mata</i> , <i>ura3Δ</i> , <i>ade2</i> , <i>PET309-3xHA</i> , <i>nuc1Δ::KanMX4</i> [ρ^+].	(Zamudio-Ochoa et al, 2014)
FTC26	<i>Mata</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112 lys2</i> , <i>arg8::hisG</i> , <i>pet309Δ::LEU2</i> , <i>nuc1Δ::KanMX4</i> ρ^+ , $\Delta\Sigma ai$].	(Zamudio-Ochoa et al, 2014)
JPM13	<i>Mata</i> , <i>ura3Δ</i> , <i>ade2</i> , <i>PET309-3xHA</i> , <i>MSS51-3xMYC</i> [ρ^+].	(Zamudio-Ochoa et al, 2014)
JPM16	<i>Mata</i> , <i>ura3Δ</i> , <i>ade2</i> , <i>pet309Δ::URA3</i> , <i>MSS51-3xHA</i> [ρ^+].	Juan Pablo Mayorga-Juárez. No publicada.
JPM22	<i>Mata</i> , <i>ura3Δ</i> , <i>ade2</i> , <i>PET309-3xHA</i> , <i>mss51Δ::KanMX4</i> [ρ^+].	Juan Pablo Mayorga-Juárez. No publicada.

SB5	<i>Mataα, ura3Δ, ade2, PET309-3xHA, [ρ^+].</i>	(Tavares-Carreón et al, 2008)
SB7	<i>Mataα, ura3Δ, ade2, MSS51-3xHA, [ρ^+].</i>	(Perez-Martínez et al, 2003)
XPM232	<i>Mataα, ura3-52, leu2-3, 112 lys2, arg8::hisG, pet309Δ::LEU2 [ρ^+, $\Delta\Sigma ai$].</i>	(Tavares-Carreón et al, 2008)
YC128	<i>Mataα, ura3-52, leu2-3, 112 lys2 arg8::hisG, pet309Δ::LEU2, mss51Δ::KanMX4 [ρ^+, $\Delta\Sigma ai$].</i>	(Zamudio-Ochoa et al, 2014)
YC131	<i>Mataα, ura3Δ, ade2, mss51Δ::URA3, PET309-3xHA, nuc1Δ::KanMX4 [ρ^+].</i>	(Zamudio-Ochoa et al, 2014)
YC132	<i>Mataα, ura3Δ, ade2, MSS51::3xHA, nuc1Δ::KanMX4 [ρ^+].</i>	(Zamudio-Ochoa et al, 2014)
YC133	<i>Mataα, ura3Δ, ade2, nuc1Δ::KanMX4 [ρ^+].</i>	(Zamudio-Ochoa et al, 2014)

Apéndice A3.1. Medios de cultivo utilizados en este trabajo

Para 1L de:

YPD/Raf*

Extracto de levadura	10 g
Peptona	20 g
Glucosa/Rafinosa	20 g
Adenina	0.03 g

YPEG*

Extracto de levadura	10 g
Peptona	20 g
Glicerol	30 mL
Etanol	30 mL
Adenina	0.03 g

-URA Glucosa/Rafinosa*

Base nitrogenada sin aminoácidos	6.7g
Glucosa/Rafinosa	20g
Medio drop out sin uracilo	770mg

-URA EG*

Base nitrogenada sin aminoácidos	6.7g
Medio dropout sin uracilo	770mg
Glicerol	30ml
Etanol	30ml

-Met Raf*

Base nitrogenada sin aminoácidos	6.7g
Rafinosa	20g
Medio dropout sin metionina	750mg

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

Apéndice A3.2. Amortiguadores para la purificación de mitocondrias**TD**

Tris-SO ₄ pH 9.4	0.1 M
DTT	10 mM

MPZ

Sorbitol	1.2 M
Amortiguador de fosfatos (pH 7.4)	20 mM
Zimoliasa	3mg/g peso húmedo

Dounce

Tris pH 7.4	10 mM
EDTA	1 mM
BSA (libre de ácidos grasos)	0.2%
PMSF (preparar al momento en Etanol)	1 mM
TLCK	50 µg/ml
Sorbitol	0.6 M

SEH

HEPES pH 7.4	20 mM
EDTA pH 8	1mM
Sorbitol	0.6 M

SH

HEPES pH 7.4	20 mM
Sorbitol	0.6 M

Tabla A3.2. Diluciones de anticuerpos para western blot

Anticuerpo	Marca/donación	Dilución
Anti HA	Roche	1:2000
Anti Cox1	Rodolfo García Villegas	1:10000
Anti citrato sintasa	Thomas Fox	1:1000
Anti Mrp51	Thomas Fox	1:20000
Anti Mrp20	Rosemary Stuart	1:5000
Anti conejo	Santa Cruz	1:5000
Anti ratón	Santa Cruz	1:5000
Anti G6PDH	Sigma	1:10000

Apéndice A3.3. Amortiguadores para la réplica en western

Solución de blot

Leche en polvo descremada marca Svelty	0.1 g
Tris 1M, pH 7.6	100 μ l
NaCl 5M	200 μ l
EDTA 500mM	20 μ l
Tween-20 al 50%	200 μ l
H ₂ O	a 10 ml

Agregar el anticuerpo a la dilución adecuada

Solución de lavado

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

Solución de eliminación

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

Apéndice A3.4. Amortiguador para traducción *in vivo* de proteínas mitocondriales

SHP

Sorbitol	0.6M
HEPES	20mM
Inhibidor de proteasas (Sigma)	3.3 μ l/10ml de amortiguador

Apéndice A3.5. Amortiguadores para el gel desnaturalizante de RNA

Amortiguador MOPS 10X

MOPS (Sigma)	41.8g
Acetato de Sodio	6.8g
EDTA	3.7g
H ₂ O-DEPC	a 1 l

Amortiguador de corrida

Diluir el MOPS10X a 1X con H₂O-DEPC.

Amortiguador de carga para RNA

Glicerol	5ml
EDTA pH8	200ml
Azul de bromofenol	25mg
Xylene cianol	25mg
H ₂ O-DEPC	a 10ml

Amortiguador SSC 20x para transferencia de RNA

NaCl	175.3g
Citrato de Sodio	88.2g
Ajustar a 1 litro con H ₂ O	
Ajustar pH a 7.0 con HCl	

Solución Denhardt's 50X

1% BSA
1% Ficoll
1% PVP (polivinil pirrolidona)
Filtrar con membrana de 0.45mm

Apéndice A3.6. Amortiguadores para el experimento de gradiente de sacarosa

Amortiguador de lisis

Acetato de Mg	10mM
NaCl	50mM
Hepes-KOH pH 7.4	20mM
PMSF	1mM
Digitonina	1%

Amortiguador MT5X

TRIS-HCl pH 7.4	50mM
Acetato de Mg	50mM

Amortiguador para gradiente de sacarosa

Amortiguador MT	1X
DTT	40mM
PMSF	1mM
Digitonina	0.1%
Sacarosa	20%, 30% o 40%

Apéndice A3.7. Amortiguadores para inmunoprecipitación

Amortiguador de lisis para inmunoprecipitaciones

	Concentración final
Dodecil β maltósido	0.7%
NaCl 5M	100mM
Tris pH 7.4- HCl 1M	20mM
RNase OUT Invitrogen	400 U/ml
Mini Complete Roche	1/5 de pastilla*

*Disolver 1 pastilla de Mini Complete Roche en 1ml de H₂O, añadir 200µl por cada ml de amortiguador

Tabla A3.3. Secuencias de oligonucleótidos para RT-PCR

Secuencias de oligonucleótidos para transcripción reversa	
Nombre del oligonucleótido	Secuencia 5'-3'
ATP6R2-CODIF	CCTCAATTTTTACCTCCAATTTGTCC
ATP8R-CODIF	CTAGATACATATAATCTTAAGATC
CO1E4-R2	TTGTAGCTCCAATTATTAATGGTAATAAATAG
COX3R-CODIF	CCTAAATATGTAGCTTCAGC
VAR1R3	TTATAATTATAAATTTGTAGATTTC
Secuencias de oligonucleótidos para PCR	
Nombre del oligonucleótido	Secuencia 5'-3'
ATP6F5'UTR	GAGTAATAAAAATTATTATTAAATAC
ATP6R5'UTR	GTATTTAATAAATTAACATAAT
ATP8F-5'UTR	GTCAGTTATTTTATATTAATGTTTAA
ATP8R-5'UTR	GGAACTAATTGTGGCATTTTTA
CO15'-400F	CATATATATATATTTAATGATATTAATACTCTC
CO1R5-5'	TAATCATCTTTGTACCATTTTAC
COX3F-5'UTR	CCTTTAATATTAATAAATTAAT
COX3R-5'UTR	CTAAATTGTCATAAATTTATTG
VAR1F1	AAGAATATAATGTTATTAATAACTGC
VAR1R1	CGGTGAACAACCGGATTGG

Apéndice A3.8. Amortiguador para traducción *in organello*

Amortiguador 1.5X (3 ml)

Sorbitol 2.4M	1125 μ l
KCl 1M	675 μ l
Amortiguador de fosfatos pH 7.2 1M	67.5 μ l
Tris-HCl pH 7.4 1M	90 μ l
MgSO ₄ 1M	57 μ l
Albumina 100mg/ml	135 μ l
ATP 200mM ^{&}	90 μ l
GTP 50mM ^{&}	45 μ l
Aminoácidos (-met, -tyr, -cys) 2mg/ml	27.3 μ l
Cisteína 10mM	30 μ l
Tirosina 1mg/ml	54.6 μ l
Ácido α -cetoglutárico	5.1mg
Fosfoenol piruvato	10.5mg
Piruvato cinasa 0.2U/ μ l ^{&}	6 μ l

[&]Agregar al final

Bibliografia

Ackerman SH, Gatti DL, Gellefors P, Douglas MG, Tzagoloff A (1991) ATP13, a nuclear gene of *Saccharomyces cerevisiae* essential for the expression of subunit 9 of the mitochondrial ATPase. *FEBS letters* **278**: 234-238

Alberts B, Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002) *Molecular Biology of the Cell*, Fourth edition edn.: Garland Science.

Aphasizheva I, Maslov D, Wang X, Huang L, Aphasizhev R (2011) Pentatricopeptide repeat proteins stimulate mRNA adenylation/uridylation to activate mitochondrial translation in trypanosomes. *Molecular cell* **42**: 106-117

Baile MG, Claypool SM (2013) The power of yeast to model diseases of the powerhouse of the cell. *Frontiers in bioscience* **18**: 241-278

Barkan A, Rojas M, Fujii S, Yap A, Chong YS, Bond CS, Small I (2012) A combinatorial amino acid code for RNA recognition by pentatricopeptide repeat proteins. *PLoS genetics* **8**: e1002910

Barkan A, Small I (2014) Pentatricopeptide repeat proteins in plants. *Annual review of plant biology* **65**: 415-442

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

Barrientos A, Zambrano A, Tzagoloff A (2004) Mss51p and Cox14p jointly regulate mitochondrial Cox1p expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **23**: 3472-3482

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

Beick S, Schmitz-Linneweber C, Williams-Carrier R, Jensen B, Barkan A (2008) The pentatricopeptide repeat protein PPR5 stabilizes a specific tRNA precursor in maize chloroplasts. *Mol Cell Biol* **28**: 5337-5347

Berthold J, Bauer MF, Schneider HC, Klaus C, Dietmeier K, Neupert W, Brunner M (1995) The MIM complex mediates preprotein translocation across the mitochondrial inner membrane and couples it to the mt-Hsp70/ATP driving system. *Cell* **81**: 1085-1093

Bonnefoy N, Fox TD (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

Boulouis A, Raynaud C, Bujaldon S, Aznar A, Wollman FA, Choquet Y (2011) The nucleus-encoded trans-acting factor MCA1 plays a critical role in the regulation of cytochrome f synthesis in *Chlamydomonas* chloroplasts. *Plant Cell* **23**: 333-349

Brown NG, Costanzo MC, Fox TD (1994) Interactions among three proteins that specifically activate translation of the mitochondrial COX3 mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **14**: 1045-1053

Burke D DD, Stearns T (2000) *Methods in yeast genetics.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Chaban Y, Boekema EJ, Dudkina NV (2014) Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation. *Biochimica et biophysica acta* **1837**: 418-426

Choquet Y, Zito F, Wostrikoff K, Wollman FA (2003) Cytochrome f translation in *Chlamydomonas* chloroplast is autoregulated by its carboxyl-terminal domain. *Plant Cell* **15**: 1443-1454

Colby G, Wu M, Tzagoloff A (1998) MTO1 codes for a mitochondrial protein required for respiration in paromomycin-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**: 27945-27952

Costanzo MC, Fox TD (1990) Control of mitochondrial gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual review of genetics* **24**: 91-113

D. Nelson MC (2005) *Lehninger Principles of Biochemistry*, fourth edition edn. United States of America: W. H. Freeman and Company.

Davies KM, Anselmi C, Wittig I, Faraldo-Gomez JD, Kuhlbrandt W (2012a) Structure of the yeast F1Fo-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 13602-13607

Davies SM, Lopez Sanchez MI, Narsai R, Shearwood AM, Razif MF, Small ID, Whelan J, Rackham O, Filipovska A (2012b) MRPS27 is a pentatricopeptide repeat domain protein required for the translation of mitochondrially encoded proteins. *FEBS letters* **586**: 3555-3561

Debray FG, Morin C, Janvier A, Villeneuve J, Maranda B, Laframboise R, Lacroix J, Decarie JC, Robitaille Y, Lambert M, Robinson BH, Mitchell GA (2011) LRPPRC mutations cause a phenotypically distinct form of Leigh syndrome with cytochrome c oxidase deficiency. *Journal of medical genetics* **48**: 183-189

Decoster E, Simon M, Hatat D, Faye G (1990) The MSS51 gene product is required for the translation of the COX1 mRNA in yeast mitochondria. *Mol Gen Genet* **224**: 111-118

- Dieckmann CL, Staples RR (1994) Regulation of mitochondrial gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *International review of cytology* **152**: 145-181
- Diekert K, de Kroon AI, Kispal G, Lill R (2001) Isolation and subfractionation of mitochondria from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Cell Biol* **65**: 37-51
- Duina AA, Miller ME, Keeney JB (2014) Budding yeast for budding geneticists: a primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Genetics* **197**: 33-48
- Endo T, Yamano K (2010) Transport of proteins across or into the mitochondrial outer membrane. *Biochimica et biophysica acta* **1803**: 706-714
- Feagin JE (2000) Mitochondrial genome diversity in parasites. *International journal for parasitology* **30**: 371-390
- Fearon K, Mason TL (1988) Structure and regulation of a nuclear gene in *Saccharomyces cerevisiae* that specifies MRP7, a protein of the large subunit of the mitochondrial ribosome. *Mol Cell Biol* **8**: 3636-3646
- Fekete Z, Ellis TP, Schonauer MS, Dieckmann CL (2008) Pet127 governs a 5' -> 3'-exonuclease important in maturation of apocytochrome b mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **283**: 3767-3772
- Foury F (1989) Cloning and sequencing of the nuclear gene MIP1 encoding the catalytic subunit of the yeast mitochondrial DNA polymerase. *J Biol Chem* **264**: 20552-20560
- Foury F, Roganti T, Lecrenier N, Purnelle B (1998) The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters* **440**: 325-331
- Fox TD (1996) Translational control of endogenous and recoded nuclear genes in yeast mitochondria: regulation and membrane targeting. *Experientia* **52**: 1130-1135
- Fujii S, Sato N, Shikanai T (2013) Mutagenesis of individual pentatricopeptide repeat motifs affects RNA binding activity and reveals functional partitioning of Arabidopsis PROTON gradient regulation3. *Plant Cell* **25**: 3079-3088
- Gagliardi D, Stepien PP, Temperley RJ, Lightowlers RN, Chrzanowska-Lightowlers ZM (2004) Messenger RNA stability in mitochondria: different means to an end. *Trends in genetics : TIG* **20**: 260-267
- Ghosh SK, Hajra S, Jayaram M (2007) Faithful segregation of the multicopy yeast plasmid through cohesin-mediated recognition of sisters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 13034-13039

Graack HR, Wittmann-Liebold B (1998) Mitochondrial ribosomal proteins (MRPs) of yeast. *The Biochemical journal* **329 (Pt 3)**: 433-448

Gray MW (2012) Mitochondrial evolution. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **4**: a011403

Green-Willms NS, Fox TD, Costanzo MC (1998) Functional interactions between yeast mitochondrial ribosomes and mRNA 5' untranslated leaders. *Mol Cell Biol* **18**: 1826-1834

Gruschke S, Kehrein K, Rompler K, Grone K, Israel L, Imhof A, Herrmann JM, Ott M (2011) Cbp3-Cbp6 interacts with the yeast mitochondrial ribosomal tunnel exit and promotes cytochrome b synthesis and assembly. *J Cell Biol* **193**: 1101-1114

Gruschke S, Rompler K, Hildenbeutel M, Kehrein K, Kuhl I, Bonnefoy N, Ott M (2012) The Cbp3-Cbp6 complex coordinates cytochrome b synthesis with bc(1) complex assembly in yeast mitochondria. *J Cell Biol* **199**: 137-150

Guthrie C FG (2002) *Guide to yeast genetics and molecular and cell biology*, San Diego Academic Press.

Haffter P, Fox TD (1992) Suppression of carboxy-terminal truncations of the yeast mitochondrial mRNA-specific translational activator PET122 by mutations in two new genes, MRP17 and PET127. *Mol Gen Genet* **235**: 64-73

Haffter P, McMullin TW, Fox TD (1990) A genetic link between an mRNA-specific translational activator and the translation system in yeast mitochondria. *Genetics* **125**: 495-503

Hallberg BM, Larsson NG (2014) Making Proteins in the Powerhouse. *Cell metabolism* **20**: 226-240

Helfenbein KG, Ellis TP, Dieckmann CL, Tzagoloff A (2003) ATP22, a nuclear gene required for expression of the F0 sector of mitochondrial ATPase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **278**: 19751-19756

Herrmann JM, Woellhaf MW, Bonnefoy N (2013) Control of protein synthesis in yeast mitochondria: the concept of translational activators. *Biochimica et biophysica acta* **1833**: 286-294

Iqbal J, Hudson AP (1996) An in vitro transcription assay for yeast mitochondria using organellar lysates. *Anal Biochem* **243**: 270-276

Islas-Osuna MA, Ellis TP, Marnell LL, Mittelmeier TM, Dieckmann CL (2002) Cbp1 is required for translation of the mitochondrial cytochrome b mRNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**: 37987-37990

Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**: 163-168

Jacobs HT (2001) Making mitochondrial mutants. *Trends in genetics : TIG* **17**: 653-660

Karpenahalli MR, Lupas AN, Soding J (2007) TPRpred: a tool for prediction of TPR-, PPR- and SEL1-like repeats from protein sequences. *BMC bioinformatics* **8**: 2

Kaspar BJ, Bifano AL, Caprara MG (2008) A shared RNA-binding site in the Pet54 protein is required for translational activation and group I intron splicing in yeast mitochondria. *Nucleic acids research* **36**: 2958-2968

Ke J, Chen RZ, Ban T, Zhou XE, Gu X, Tan MH, Chen C, Kang Y, Brunzelle JS, Zhu JK, Melcher K, Xu HE (2013) Structural basis for RNA recognition by a dimeric PPR-protein complex. *Nature structural & molecular biology* **20**: 1377-1382

Khalimonchuk O, Bird A, Winge DR (2007) Evidence for a pro-oxidant intermediate in the assembly of cytochrome oxidase. *J Biol Chem* **282**: 17442-17449

Kitakawa M, Isono K (1991) The mitochondrial ribosomes. *Biochimie* **73**: 813-825

Koonin EV (2010) The origin and early evolution of eukaryotes in the light of phylogenomics. *Genome biology* **11**: 209

Krause K, Lopes de Souza R, Roberts DG, Dieckmann CL (2004) The mitochondrial message-specific mRNA protectors Cbp1 and Pet309 are associated in a high-molecular weight complex. *Mol Biol Cell* **15**: 2674-2683

Krause-Buchholz U, Barth K, Dombrowski C, Rodel G (2004) *Saccharomyces cerevisiae* translational activator Cbs2p is associated with mitochondrial ribosomes. *Curr Genet* **46**: 20-28

Kucej M, Kucejova B, Subramanian R, Chen XJ, Butow RA (2008) Mitochondrial nucleoids undergo remodeling in response to metabolic cues. *Journal of cell science* **121**: 1861-1868

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

Lang BF, Burger G, O'Kelly CJ, Cedergren R, Golding GB, Lemieux C, Sankoff D, Turmel M, Gray MW (1997) An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature* **387**: 493-497

Larosa V, Remacle C (2013) Transformation of the mitochondrial genome. *The International journal of developmental biology* **57**: 659-665

- Lewin B (2008) *Genes IX*, Sudbury MA, USA: Jones and Bartlett Publishers.
- Lill R, Neupert W (1996) Mechanisms of protein import across the mitochondrial outer membrane. *Trends in cell biology* **6**: 56-61
- Lipinski KA, Puchta O, Surendranath V, Kudla M, Golik P (2011) Revisiting the yeast PPR proteins--application of an Iterative Hidden Markov Model algorithm reveals new members of the rapidly evolving family. *Mol Biol Evol* **28**: 2935-2948
- Lisowsky T, Michaelis G (1989) Mutations in the genes for mitochondrial RNA polymerase and a second mitochondrial transcription factor of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **219**: 125-128
- Loiselay C, Gumpel NJ, Girard-Bascou J, Watson AT, Purton S, Wollman FA, Choquet Y (2008) Molecular identification and function of cis- and trans-acting determinants for petA transcript stability in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *Mol Cell Biol* **28**: 5529-5542
- Luttik MA, Overkamp KM, Kotter P, de Vries S, van Dijken JP, Pronk JT (1998) The *Saccharomyces cerevisiae* NDE1 and NDE2 genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH. *J Biol Chem* **273**: 24529-24534
- Maleszka R, Skelly PJ, Clark-Walker GD (1991) Rolling circle replication of DNA in yeast mitochondria. *EMBO J* **10**: 3923-3929
- Manthey GM, McEwen JE (1995) The product of the nuclear gene PET309 is required for translation of mature mRNA and stability or production of intron-containing RNAs derived from the mitochondrial COX1 locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **14**: 4031-4043
- Margulis L (1970) *Origin of eukaryotic cells*, New Haven, CT: Yale University Press.
- Markov DA, Savkina M, Anikin M, Del Campo M, Ecker K, Lambowitz AM, De Gnore JP, McAllister WT (2009) Identification of proteins associated with the yeast mitochondrial RNA polymerase by tandem affinity purification. *Yeast* **26**: 423-440
- Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* **87**: 206-210
- Marres CA, de Vries S, Grivell LA (1991) Isolation and inactivation of the nuclear gene encoding the rotenone-insensitive internal NADH: ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **195**: 857-862

- Martin W, Muller M (1998) The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* **392**: 37-41
- Marykwas DL, Fox TD (1989) Control of the *Saccharomyces cerevisiae* regulatory gene PET494: transcriptional repression by glucose and translational induction by oxygen. *Mol Cell Biol* **9**: 484-491
- McMullin TW, Haffter P, Fox TD (1990) A novel small-subunit ribosomal protein of yeast mitochondria that interacts functionally with an mRNA-specific translational activator. *Mol Cell Biol* **10**: 4590-4595
- Melo AM, Bandejas TM, Teixeira M (2004) New insights into type II NAD(P)H:quinone oxidoreductases. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* **68**: 603-616
- Merz S, Westermann B (2009) Genome-wide deletion mutant analysis reveals genes required for respiratory growth, mitochondrial genome maintenance and mitochondrial protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome biology* **10**: R95
- Mick DU, Vukotic M, Piechura H, Meyer HE, Warscheid B, Deckers M, Rehling P (2010) Coa3 and Cox14 are essential for negative feedback regulation of COX1 translation in mitochondria. *J Cell Biol* **191**: 141-154
- Mitchell P (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **191**: 144-148
- Mokranjac D, Neupert W (2010) The many faces of the mitochondrial TIM23 complex. *Biochimica et biophysica acta* **1797**: 1045-1054
- Mulero JJ, Fox TD (1993) PET111 acts in the 5'-leader of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial COX2 mRNA to promote its translation. *Genetics* **133**: 509-516
- Naithani S, Saracco SA, Butler CA, Fox TD (2003) Interactions among COX1, COX2, and COX3 mRNA-specific translational activator proteins on the inner surface of the mitochondrial inner membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **14**: 324-333
- Osinga KA, De Vries E, Van der Horst G, Tabak HF (1984) Processing of yeast mitochondrial messenger RNAs at a conserved dodecamer sequence. *EMBO J* **3**: 829-834
- Ott M, Herrmann JM (2010) Co-translational membrane insertion of mitochondrially encoded proteins. *Biochimica et biophysica acta* **1803**: 767-775
- Ott M, Prestele M, Bauerschmitt H, Funes S, Bonnefoy N, Herrmann JM (2006) Mba1, a membrane-associated ribosome receptor in mitochondria. *EMBO J* **25**: 1603-1610

Payne MJ, Schweizer E, Lukins HB (1991) Properties of two nuclear pet mutants affecting expression of the mitochondrial *oli1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **19**: 343-351

Pelissier PP, Camougrand NM, Manon ST, Velours GM, Guerin MG (1992) Regulation by nuclear genes of the mitochondrial synthesis of subunits 6 and 8 of the ATP synthase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **267**: 2467-2473

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

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

Pfalz J, Bayraktar OA, Prikryl J, Barkan A (2009) Site-specific binding of a PPR protein defines and stabilizes 5' and 3' mRNA termini in chloroplasts. *EMBO J* **28**: 2042-2052

Porcelli AM, Ghelli A, Zanna C, Pinton P, Rizzuto R, Rugolo M (2005) pH difference across the outer mitochondrial membrane measured with a green fluorescent protein mutant. *Biochemical and biophysical research communications* **326**: 799-804

Poutre CG, Fox TD (1987) PET111, a *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene required for translation of the mitochondrial mRNA encoding cytochrome c oxidase subunit II. *Genetics* **115**: 637-647

Prikryl J, Rojas M, Schuster G, Barkan A (2011) Mechanism of RNA stabilization and translational activation by a pentatricopeptide repeat protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 415-420

Rak M, Tzagoloff A (2009) F1-dependent translation of mitochondrially encoded Atp6p and Atp8p subunits of yeast ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 18509-18514

Raynaud C, Loiselay C, Wostrikoff K, Kuras R, Girard-Bascou J, Wollman FA, Choquet Y (2007) Evidence for regulatory function of nucleus-encoded factors on mRNA stabilization and translation in the chloroplast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 9093-9098

Reinhold R, Bareth B, Balleininger M, Wissel M, Rehling P, Mick DU (2011) Mimicking a SURF1 allele reveals uncoupling of cytochrome c oxidase assembly from translational regulation in yeast. *Human molecular genetics* **20**: 2379-2393

Rodeheffer MS, Boone BE, Bryan AC, Shadel GS (2001) Nam1p, a protein involved in RNA processing and translation, is coupled to transcription through an interaction with yeast mitochondrial RNA polymerase. *J Biol Chem* **276**: 8616-8622

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

Sambrook J RD (2001) *Molecular cloning, a laboratory manual*: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schmitz-Linneweber C, Small I (2008) Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. *Trends Plant Sci* **13**: 663-670

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

Shutt TE, Gray MW (2006) Bacteriophage origins of mitochondrial replication and transcription proteins. *Trends in genetics : TIG* **22**: 90-95

Simon JA, Bedalov A (2004) Yeast as a model system for anticancer drug discovery. *Nature reviews Cancer* **4**: 481-492

Simon M, Faye G (1984) Organization and processing of the mitochondrial *oxi3/oli2* multigenic transcript in yeast. *Mol Gen Genet* **196**: 266-274

Small ID, Peeters N (2000) The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem Sci* **25**: 46-47

Sohmen D, Harms JM, Schlunzen F, Wilson DN (2009) SnapShot: Antibiotic inhibition of protein synthesis I. *Cell* **138**: 1248 e1241

Solotoff V, Moseler R, Schulte U (2014) Two pentatricopeptide repeat domain proteins are required for the synthesis of respiratory complex I. *Curr Genet*

Sperrazza JM, Spremulli LL (1983) Quantitation of cation binding to wheat germ ribosomes: influences on subunit association equilibria and ribosome activity. *Nucleic acids research* **11**: 2665-2679

Srinivasan S, Avadhani NG (2012) Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. *Free radical biology & medicine* **53**: 1252-1263

Steele DF, Butler CA, Fox TD (1996) Expression of a recoded nuclear gene inserted into yeast mitochondrial DNA is limited by mRNA-specific translational activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 5253-5257

Stuart RA (2008) Supercomplex organization of the oxidative phosphorylation enzymes in yeast mitochondria. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **40**: 411-417

Szyrach G, Ott M, Bonnefoy N, Neupert W, Herrmann JM (2003) Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria. *EMBO J* **22**: 6448-6457

Takenaka M, Zehrmann A, Brennicke A, Graichen K (2013) Improved computational target site prediction for pentatricopeptide repeat RNA editing factors. *PLoS one* **8**: e65343

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

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

Uyttewaal M, Mireau H, Rurek M, Hammani K, Arnal N, Quadrado M, Giege P (2008) PPR336 is associated with polysomes in plant mitochondria. *Journal of molecular biology* **375**: 626-636

Wallis MG, Groudinsky O, Slonimski PP, Dujardin G (1994) The NAM1 protein (NAM1p), which is selectively required for cox1, cyt b and atp6 transcript processing/stabilisation, is located in the yeast mitochondrial matrix. *Eur J Biochem* **222**: 27-32

Warner JR (1989) Synthesis of ribosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological reviews* **53**: 256-271

Wiesenberger G, Fox TD (1997) Pet127p, a membrane-associated protein involved in stability and processing of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial RNAs. *Mol Cell Biol* **17**: 2816-2824

Williams KP, Sobral BW, Dickerman AW (2007) A robust species tree for the alphaproteobacteria. *J Bacteriol* **189**: 4578-4586

Williams-Carrier R, Kroeger T, Barkan A (2008) Sequence-specific binding of a chloroplast pentatricopeptide repeat protein to its native group II intron ligand. *Rna* **14**: 1930-1941

Williamson D (2002) The curious history of yeast mitochondrial DNA. *Nature reviews Genetics* **3**: 475-481

Woellhaf MW, Hansen KG, Garth C, Herrmann JM (2014) Import of ribosomal proteins into yeast mitochondria. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*: 1-10

Wostrikoff K, Choquet Y, Wollman FA, Girard-Bascou J (2001) TCA1, a single nuclear-encoded translational activator specific for petA mRNA in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Genetics* **159**: 119-132

Xu F, Addis JB, Cameron JM, Robinson BH (2012) LRPPRC mutation suppresses cytochrome oxidase activity by altering mitochondrial RNA transcript stability in a mouse model. *The Biochemical journal* **441**: 275-283

Xu F, Morin C, Mitchell G, Ackerley C, Robinson BH (2004) The role of the LRPPRC (leucine-rich pentatricopeptide repeat cassette) gene in cytochrome oxidase assembly: mutation causes lowered levels of COX (cytochrome c oxidase) I and COX III mRNA. *The Biochemical journal* **382**: 331-336

Yagi Y, Hayashi S, Kobayashi K, Hirayama T, Nakamura T (2013) Elucidation of the RNA recognition code for pentatricopeptide repeat proteins involved in organelle RNA editing in plants. *PloS one* **8**: e57286

Yang D, Oyaizu Y, Oyaizu H, Olsen GJ, Woese CR (1985) Mitochondrial origins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 4443-4447

Yin P, Li Q, Yan C, Liu Y, Liu J, Yu F, Wang Z, Long J, He J, Wang HW, Wang J, Zhu JK, Shi Y, Yan N (2013) Structural basis for the modular recognition of single-stranded RNA by PPR proteins. *Nature* **504**: 168-171

Zambrano A, Fontanesi F, Solans A, de Oliveira RL, Fox TD, Tzagoloff A, Barrientos A (2007) Aberrant translation of cytochrome c oxidase subunit 1 mRNA species in the absence of Mss51p in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **18**: 523-535

Zamudio-Ochoa A, Camacho-Villasana Y, Garcia-Guerrero A, Perez-Martinez X (2014) The Pet309 pentatricopeptide repeat motifs mediate efficient binding to the mitochondrial COX1 transcript in yeast. *RNA biology* **11**

Zhu H, Macreadie IG, Butow RA (1987) RNA processing and expression of an intron-encoded protein in yeast mitochondria: role of a conserved dodecamer sequence. *Mol Cell Biol* **7**: 2530-2537

Zoschke R, Kroeger T, Belcher S, Schottler MA, Barkan A, Schmitz-Linneweber C (2012) The pentatricopeptide repeat-SMR protein ATP4 promotes translation of the chloroplast atpB/E mRNA. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **72**: 547-558