

EL CARBOXILO TERMINAL DE Pet309p Y SU PAPEL EN LA SÍNTESIS DE COX1

Zamudio-Ochoa A. R. ; Camacho-Villasana Y. Pérez-Martínez X.*

Instituto de Fisiología Celular. UNAM

Universidad 3000. Col. Copilco el Alto. CP. 04510. Del Coyoacán. Fax 56225630.

e-mail: xperez@ifc.unam.mx

El paso final en la cadena respiratoria es la transferencia de 4 electrones del citocromo *c* al O₂, formando H₂O. Esta reacción es catalizada por la citocromo *c* oxidasa (COX).

En *S. cerevisiae* este complejo está formado por 12 subunidades y solo 3 de ellas están codificadas en el genoma mitocondrial: Cox1p, Cox2p y Cox3p.

Cox1p es la subunidad más grande de la enzima y la que contiene el sitio catalítico. Cruza 12 veces la membrana interna mitocondrial por lo que es altamente hidrofóbica. Su biogénesis no se comprende del todo bien, sin embargo, se conocen algunos factores nucleares que participan en su transcripción, traducción e inserción en la membrana.

En la levadura, los activadores traduccionales son factores nucleares que participan en la traducción de los RNA mensajeros mitocondriales. Estos actúan sobre el extremo 5'UTR de su mRNA específico y facilitan su traducción e incluso la correcta inserción en la membrana del péptido naciente.

Pet309p es un activador traduccional requerido en la biogénesis de Cox1p. Es una proteína periférica de la membrana interna mitocondrial que participa en la estabilidad del mensajero de COX1. Analizando su secuencia se han identificado unos dominios llamados PPR, los cuales se cree que pueden unir al RNA mensajero de COX1 para facilitar su traducción.

Además de estos dominios, Pet309p tiene una región carboxilo terminal de 300 residuos que no tiene dominios predichos en su secuencia. Sin embargo, está altamente conservada entre hongos.

Para este estudio se construyeron dos diferentes mutantes en la región carboxilo terminal. En una de ellas se suprimieron los últimos 300 aminoácidos y en la otra los últimos 200. Ambas construcciones se introdujeron en la levadura en dos diferentes plásmidos: uno de alto y otro de bajo número de copia. Todas las cepas mutantes fueron incapaces de respirar. Las mutaciones no afectaron la localización de Pet309p en la célula, ya que la proteína mutada se encontró como proteína periférica de membrana en mitocondrias puras. Sin embargo, Cox1p solo se detectó en la cepa silvestre.

Para diferenciar el proceso de traducción de COX1 del proceso de inserción en la membrana de la proteína ya traducida, se utilizó el gen reportero ARG8m el cual se encuentra en el DNA mitocondrial flanqueado por los extremos UTR de COX1. Ambas cepas mutantes fueron incapaces de crecer en un medio sin arginina y la proteína Arg8 no se detectó en extracto celular. Esto indica que la región carboxilo terminal de Pet309 se requiere para sintetizar a Cox1p.

Para analizar la estabilidad del RNA mensajero de COX1 se hicieron experimentos de Northern blot. En las mutantes de bajo número de copia se observó una disminución en la estabilidad del mensajero comparable a una cepa nula en Pet309p. Sin embargo, en sobreexpresión este efecto fue contrarrestado y se observó una acumulación del mensajero de COX1.

De estos resultados podemos concluir que la región carboxilo terminal de Pet309p es necesaria para la síntesis de Cox1p y también participa en la estabilidad del RNA mensajero de COX1. Sin embargo, no es necesaria para su localización subcelular.