



**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del  
Instituto Politécnico Nacional**

**Unidad de Genómica Avanzada**  
Laboratorio Nacional de Genómica para la Diversidad  
Vegetal y Microbiana

**“Reconstitución del replisoma mitocondrial de  
*Saccharomyces cerevisiae in vitro*”**

Tesis que presenta:

M. en C. Maria Eugenia Sánchez Sandoval

Para obtener el Grado de:  
Doctor en Ciencias en la especialidad de Biotecnología de Plantas

Director de Tesis: Dr. Luis Gabriel Brieba de Castro

Irapuato, Guanajuato

Este trabajo de tesis se desarrolló en el Laboratorio de Bioquímica Estructural bajo la dirección del Dr. Luis Briebe de Castro en LANGEBIO-CINVESTAV. Km 9.6 Libramiento Norte Carretera León 36821 Irapuato, Guanajuato, México.

A CONACYT-MÉXICO la beca de Doctorado Nacional a nombre de Maria Eugenia Sánchez Sandoval con número de registro 216178.

Al proyecto Estrategias para Contrarrestar los Efectos del Envejecimiento, Miopatías y Síndrome Metabólico Derivados de Disfunciones Mitocondriales con número CONACYT-213915 del grupo Bioquímica Estructural correspondiente al Dr. Luis Gabriel Brieba.

A CINVESTAV-LANGEBIO por las facilidades prestadas para el desarrollo de este trabajo.

A mi asesor de tesis, Dr. Luis Gabriel Brieba de Castro, por la dirección a lo largo del desarrollo de este trabajo y todos los comentarios para lograr el producto presente.

A la I.A. Corina Díaz Quezada, por su contribución en los experimentos de este trabajo y su perseverancia para el desarrollo del mismo.

A mis asesores de tesis: Dr. Alfredo H. Herrera Estrella, Dr. Axel Tiessen Favier, Dr. José Ruiz Herrera y Dr. Samuel Lara González por los aportes a este trabajo, su apoyo constante e interés en el desarrollo del mismo.

A Norinelly Almanza Martínez, Annia Rodríguez, Luis Fernando Navarro y Gilberto Velázquez Juárez, gracias por los reactivos, por su colaboración y por la ayuda para la realización de experimentos de este trabajo.

A los miembros y ex miembros del laboratorio 4 por su presencia a lo largo de este trabajo.

## **ABREVIATURAS**

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
ADN	Ácido desoxirribunucleico
dNTP's	Dexoxiribonucleótidos
EMSA	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética
POLG	ADN polimerasa mitocondrial de <i>Homo sapiens</i>
POLRMT	ARN polimerasa mitocondrial de <i>Homo sapiens</i>
HsmtSSB	Proteína de unión a ADN de cadena sencilla mitocondrial de <i>Homo sapiens</i>
T7ADNpol	ADN polimerasa del bacteriófago T7
T7SSB	Proteína de unión a ADN de cadena sencilla del bacteriófago T7
<i>RPO41</i>	Gen codificante de ARN polimerasa mitocondrial de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>MTF1</i>	Gen codificante del Factor de Transcripción Mitocondrial de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>MIP1</i>	Gen codificante de ADN polimerasa mitocondrial de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>RIM1</i>	Gen codificante de la proteína de unión a ADN de cadena sencilla mitocondrial de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ADNmt	ADN mitocondrial
RNA	Ácido rionucleico
ADNpol $\Phi$	ADN polimerasa del bacteriófago Phi
a.a.	Aminoácidos
rNTP's	Ribonucleótidos

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>III</b>
<b>ÍNDICE</b>	<b>IV</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>IX</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XII</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>XIII</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 <i>La mitocondria</i>	1
1.2 <i>Replicación y transcripción del ADN mitocondrial</i>	2
1.3 <i>Sistema de replicación del ADN: El Replisoma</i>	2
1.3.1 <i>Componentes del replisoma del bacteriófago T7</i>	2
1.3.2 <i>Componentes del replisoma del bacteriófago T4</i>	4
1.3.3 <i>Componentes del replisoma de Escherichia coli</i>	5
1.3.4 <i>Componentes del replisoma mitocondrial humano</i>	7
1.4 <i>Replicación mitocondrial en Saccharomyces cerevisiae</i>	10
1.4.1 <i>Genoma mitocondrial de S. cerevisiae</i>	10
1.5 <i>Elementos replicativos en la mitocondria de S. cerevisiae</i>	11
1.5.1 <i>Características de las ADN polimerasas mitocondriales</i>	12
1.5.1a <i>ADN polimerasa mitocondrial de S. cerevisiae (Mip1)</i>	12
1.5.2 <i>Proteína de unión a ADN de cadena sencilla (SSB)</i>	15
1.5.2a <i>Proteína de unión a ADN de cadena sencilla mitocondrial de S. cerevisiae (Rim1)</i>	17
1.5.3 <i>ARN polimerasas mitocondriales</i>	17
1.5.3a <i>ARN polimerasa mitocondrial de S. cerevisiae (Rpo41) y el factor de transcripción mitocondrial (Mtf1)</i>	17
1.5.4 <i>Factor accesorio de la transcripción (Mtf1)</i>	18
1.5.4a <i>Importancia de Mtf1 en el inicio de la transcripción mitocondrial en S. cerevisiae</i>	20

<i>1.6 Proceso replicativo mitocondrial: Orígenes de replicación en la mitocondria.</i>	21
<i>1.7 Helicasas replicativas mitocondriales de S. cerevisiae</i>	21
<b>II. JUSTIFICACIÓN:</b>	<b>23</b>
<b>III. HIPÓTESIS</b>	<b>23</b>
<b>IV. OBJETIVO GENERAL:</b>	<b>24</b>
<b>V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:</b>	<b>24</b>
<b>VI. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>25</b>
<i>6.1 Clonación de los genes utilizados para la expresión de proteínas</i>	<i>25</i>
<i>6.1.1 Clonación de ADN polimerasa mitocondrial de S. cerevisiae (MIP1)</i>	<i>25</i>
<i>6.1.2 Obtención de mutantes de la proteína de unión a ADN de cadena sencilla de S. cerevisiae (RIM1)</i>	<i>25</i>
<i>6.2 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes</i>	<i>26</i>
<i>6.2.1 Protocolo de expresión y purificación de Mip1</i>	<i>26</i>
<i>6.2.2 Protocolo de expresión y purificación de Rim1</i>	<i>27</i>
<i>6.2.3 Expresión y purificación de Rpo41 y Mtf1.</i>	<i>28</i>
<i>6.3 Determinación de la capacidad de Mip1 para utilizar iniciadores de ADN y ARN.</i>	<i>29</i>
<i>6.3.1 Formación de templados para los ensayos.</i>	<i>29</i>
<i>6.3.2 Ensayo de actividad de polimerasa y exonucleasa de Mip1.</i>	<i>29</i>
<i>6.4 Eficiencia de transcripción por Rpo41: importancia de la secuencia del templado</i>	<i>30</i>
<i>6.4.1 Ensayo de transcripción</i>	<i>30</i>
<i>6.5 Determinar si la apertura de las cadenas se relaciona con un elemento diferente a Mtf1</i>	<i>30</i>
<i>6.5.1 Ensayo de transcripción en un templado de doble cadena o burbuja para evaluar el efecto de Mtf1</i>	<i>30</i>
<i>6.6 Reconstitución del replisoma in vitro</i>	<i>31</i>
<i>6.6.1 Síntesis de ADN utilizando sustratos cortos de ADN de doble cadena</i>	<i>31</i>

6.6.2. Ensayo de síntesis de ADN utilizando como sustrato ADN de doble cadena	31
6.6.3 Ensayo de procesividad de Mip1	31
6.7 Evaluación de la función de Rim1 en la síntesis de iniciadores por Rpo41 y la actividad de Mip1	32
6.7.1 Efecto de Rim1 sobre la síntesis de iniciadores de ARN	32
6.7.2 Efecto de Rim1 sobre el uso de iniciadores de ARN	32
6.7.3 Efecto del extremo C-terminal de Rim1 sobre la procesividad de Mip1	32
6.8 Evaluación de la capacidad de unión a ADN por Mip1 y Rim1	33
6.8.1 Ensayo de unión a ADN mediante anisotropía	33
6.8.1a Unión a ADNcs por Rim1	33
6.8.1a Unión a ADNdc por Mip1	33
6.8.2 Ensayo de movilidad electroforética (EMSA).	34
6.8.2a Unión a ADNcs por Rim1 mediante el ensayo de retardo.	34
<b>VII. RESULTADOS</b>	<b>35</b>
7.1 Obtención de las proteínas silvestres	35
7.1.1 Expresión y purificación de Mip1	35
7.2 Mip1 es capaz de utilizar iniciadores de ADN y ARN	36
7.2.1 Evaluación de la actividad de Mip1 sobre templados ADN:ADN	36
.	36
7.2.2 Evaluación de la actividad de Mip1 sobre templados híbridos de ARN:ADN	38
7.2.3 Rpo41 sintetiza iniciadores sobre ADN de cadena sencilla y son utilizados por Mip1	40
7.3 Rpo41 tiene baja eficiencia con las secuencias de orígenes de replicación	42
7.3.1 Evaluación de la actividad de Rpo41 en la formación de transcritos con secuencias de orígenes de replicación	42
7.4 Rpo41 es capaz de sintetizar iniciadores sobre ADN de doble cadena en presencia de Mtf1	45
7.5 Mip1 puede utilizar iniciadores cortos o largos de ARN	48
7.5.1 Determinación de la longitud de iniciador necesaria para Mip1	48

<i>7.6 Mtf1 es necesario para la apertura del promotor de doble cadena, pero no para el uso de iniciadores por Mip1</i>	51
<i>7.7 Rim1 es capaz de i la síntesis de iniciadores por Rpo41 e incrementa la eficiencia de su uso por Mip1</i>	53
<i>7.8 Evaluación de la importancia del extremo C-terminal de Mip1 en la replicación</i>	58
<i>7.8.1 Diseño y purificación de las versiones de Mip1 truncas en el extremo carboxilo terminal</i>	58
<i>7.8.2 La delección del C-terminal de Mip1 afecta la síntesis de ADN</i>	60
<i>7.8.3 La eliminación del C-terminal de Mip1 afecta la capacidad de desplazamiento de hebra</i>	62
<i>7.8.4 El C-terminal de Mip1 regula su capacidad de unión al ADN</i>	66
<i>7.9 Evaluación de la importancia del extremo C-terminal de Rim1 en la replicación</i>	68
<i>7.9.1 Diseño de las versiones de Rim1 truncas en el extremo carboxilo terminal</i>	68
<i>7.9.2 El extremo C-terminal de Rim1 modula la capacidad de unión a ADN</i>	71
<i>7.9.3 Rim1 regula la sintesis de Mip1 mediante el C-terminal.</i>	75
<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	<b>78</b>
<i>8.1 Rpo41 sintetiza iniciadores de ARN que pueden ser extendidos y degradados por Mip1</i>	79
<i>8.2 La síntesis de iniciadores y su longitud depende de la secuencia templado</i>	80
<i>8.3 Mtf1 no se requiere para el uso de iniciadores por Mip1</i>	81
<i>8.4 Rim1 incrementa la extensión de iniciadores por Mip1 y regula la síntesis de ADN mediante el C-terminal</i>	83
<i>8.5 El C-terminal de Mip1 es necesario para la actividad de polimerasa</i>	83
<i>8.6 El C-terminal de Rim1 regula la actividad de Mip1</i>	85
<b>9. CONCLUSIONES</b>	<b>87</b>



<b>10. PERSPECTIVAS</b>	<b>89</b>
<b>11. ANEXO I.</b>	<b>90</b>
<b>12. REFERENCIAS.</b>	<b>94</b>
<b>ARTÍCULO DERIVADO DE ESTA TESIS</b>	<b>104</b>

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

<i>Figura 1. Replisoma de los bacteriófagos T7 y T4</i>	3
<i>Figura 2. Replisoma de E. coli</i>	6
<i>Figura 3. Replisoma mitocondrial humano.</i>	9
<i>Figura 4. Análisis filogenético de las ADN polimerasas mitocondriales</i>	14
<i>Figura 5. Modelo del funcionamiento del extremo C-terminal de T7SSB</i>	16
<i>Figura 6. Modelo de la formación del complejo Rpo41-Mtf1-ADN.</i>	19
<i>Figura 7. Replicación del ADN de doble cadena por el modelo de círculo rodante y recombinación homóloga.</i>	22
<i>Figura 8. Purificación de Mip1 y Rim1</i>	35
<i>Figura 9. Mip1 es capaz de extender iniciadores de ADN y muestra actividad de 3'-5' exonucleasa sobre un templado ADN-ADN</i>	37
<i>Figura 10. Mip1 es capaz de extender iniciadores de ARN y muestra actividad de 3'-5' exonucleasa sobre un híbrido de ARN-ADN</i>	39
<i>Figura 11. Los fragmentos pequeños de ARN sintetizados por Rpo41 son utilizados por Mip1 como iniciadores</i>	41
<i>Figura 12. Diferencias en los patrones de transcripción entre el templado con secuencia de inicio (oris) en comparación con la de secuencias promotoras 14S y COX II</i>	44
<i>Figura 14. Ensayo para determinar la longitud mínima del iniciador.</i>	50
<i>Figura 15. Mtf1 es requerido para la apertura del promotor en la replicación</i>	52
<i>Figura 16. Rim1 disminuye la síntesis de iniciadores por Rpo41 e incrementa la eficiencia de Mip1</i>	54

<i>Figura 17. Rpo41 puede utilizar secuencias de orígenes de replicación para la síntesis de iniciadores extendidos por Mip1</i>	<i>56</i>
<i>Figura 18. Rpo41 es capaz de utilizar secuencias promotoras y de orígenes de replicación para la síntesis de iniciadores utilizados por Mip1</i>	<i>57</i>
<i>Figura 23 Versiones de Rim1 deletadas en el C-terminal</i>	<i>70</i>
<i>Figura 26. Efecto del extremo C-terminal de Rim1 sobre la actividad de Mip1</i>	<i>76</i>

## ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Secuencias codificantes en el genoma mitocondrial de S. cerevisiae</i>	10
<i>Tabla 2. Secuencias de posibles orígenes de replicación</i>	11
<i>Tabla 3. Componentes necesarios para la replicación y transcripción de diferentes sistemas</i>	13
<i>Tabla 4. Secuencias promotoras utilizadas como templado</i>	43
<i>Tabla 5.- Afinidad de Mip1 por ADN de doble cadena</i>	66

## **ABSTRACT**

A replisome is a protein complex involved in DNA replication. The smallest replisomes described are those for T7 phage and human mitochondria. The fundamental components of the replisome are a DNA polymerase, a primase, an helicase and a single stranded DNA binding protein. The mitochondrial replisome of *Saccharomyces cerevisiae* has been determined to contain only a DNA polymerase (Mip1), an RNA polymerase (Rpo41), a mitochondrial transcription factor (Mtf1) and a single strand DNA binding protein (SSB or Rim1). Curiously, no replicative helicase or primase has been found. Mip1 has both a polymerase and an exonuclease function. In addition Mip1 has a longer C-terminal extension than other polymerases and may be associated with polymerase-exonuclease equilibrium regulation or protein-protein interaction in the mitochondrial system. Rpo41 can synthesize RNA primers, like the human mitochondrial RNA polymerase, and requires Mtf1 as a cofactor for duplex opening. Rim1 prevents the formation of DNA secondary structures during DNA replication. Rim1 also contains an acidic C-terminal tail, like other SSBs capable of stimulating other proteins through physical interaction with its acidic tail. The similarities between replicative components of *S. cerevisiae* with T7 phage and human mitochondrial proteins, indicate similarities between these systems. Here was demonstrated that Rpo41 synthesizes RNA short fragments with single and duplex DNA strands and transcripts are more abundant using a replication origin sequence as a template. Mip1 is primed by Rpo41 and needs a 10 nt minimal length primer, but Mtf1 is dispensable for primers synthesis and primer extension. On the other hand, 227 residues from the C-terminal of Mip1 regulate DNA binding, and are unrelated to either polymerase or strand displacement activity. Removal of acidic residues in Rim1 C-terminal tail increased the DNA binding affinity of Rim1 and inhibited Mip1 activity because the C-terminal tail is required to complex (Mip1-DNA) stabilization. Rim1 deletion mutants arrest Mip1 and decrease length DNA product synthesized. All of these data show that Rpo41 is a primase for leading and lagging strands using replication origins or promotor sequences as template for mitochondrial genome maintenance. The minimal components required for DNA replication are Mip1 and Rpo41, while Mtf1 and Rim1 are regulatory elements in the *S. cerevisiae* mitochondrial replisome necessary to produce a successful replication apparatus.

## **RESUMEN**

Un replisoma es un complejo proteico involucrado en la replicación del ADN. Los replisomas más pequeños que han sido descritos es el del bacteriófago T7 y del sistema mitocondrial humano. Los componentes fundamentales en un replisoma son una ADN polimerasa, una primasa, una helicasa y una proteína de unión a ADN de cadena sencilla. En la replicación mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae* solamente se han relacionado una ADN polimerasa (Mip1), una ARN polimerasa (Rpo41), un factor de transcripción (Mtf1) y una proteína de unión a ADN de cadena sencilla (Rim1). Curiosamente no se ha encontrado una helicasa replicativa o una primasa. Mip1 es una proteína con función de polimerasa y exonucleasa. Además Mip1 tiene una extensión en el carboxilo terminal relacionado con la regulación del equilibrio polimerasa-exonucleasa o con una interacción proteína-proteína en el sistema replicativo. Rpo41 es capaz de sintetizar iniciadores de ARN de manera semejante a la ARN polimerasa mitocondrial humana, y requiere de Mtf1 como cofactor para la apertura del ADN de cadena doble. Rim1 evita la formación de estructuras secundarias durante la replicación del ADN, también presenta C-terminal ácido parecido a otras SSBs, capaz de estimular a otras proteínas mediante interacción física con este fragmento ácido. Las similitudes entre los componentes replicativos de *S. cerevisiae* con el bacteriófago T7 y las proteínas mitocondriales humanas, indican semejanza entre estos sistemas. En este trabajo demostramos que Rpo41 sintetiza fragmentos cortos de ARN con ADN de cadena sencilla y doble como templado. Mip1 utiliza los iniciadores sintetizados por Rpo41, los cuales deben tener una longitud mínima de 10 nt, pero Mtf1 es dispensable para la síntesis de iniciadores y para su extensión por Mip1. Estos resultados muestran que Rpo41 funciona como primasa para la cadena sencilla y retardada usando secuencias promotoras y de orígenes de replicación como templado para el mantenimiento eficiente del genoma mitocondrial. Los componentes mínimos necesarios requeridos para la replicación son Mip1 y Rpo41, utilizando a Mtf1 y a Rim1 como proteínas reguladoras mediante interacciones con el replisoma mitocondrial de *S. cerevisiae* y así obtener un proceso de replicación exitoso.

# **I. INTRODUCCIÓN**

## **1.1 La mitocondria**

La mitocondria es un organelo celular con dos membranas, una externa que lo separa del citosol y la interna que forma crestas rodeando la matriz mitocondrial. La membrana interna contiene algunas de las enzimas involucradas en el sistema de fosforilación oxidativa, proceso por el cual se lleva a cabo la generación de energía en eucariotas (Hatefi, 1985).

El genoma mitocondrial es independiente del nuclear por lo que el origen de este organelo se ha tratado de dilucidar mediante reconstrucciones filogenéticas. Se considera derivado de un evento endosimbiótico mediante la incorporación de una  $\alpha$ -proteobacteria en un hospedero del tipo árquea (Margulis, 1971). Es decir, a partir de un organismo protomitocondriado como un ancestro común de todas las mitocondrias, que por endosimbiosis adquirió una  $\alpha$ -proteobacteria (Marguliset al., 2006). En eucariotas no fotosintéticos, las funciones mitocondriales guardan similitudes con la respiración bacteriana lo que concuerda con la teoría endosimbiótica (Margulis & Bermudes, 1985). De acuerdo a estas suposiciones se piensa que una  $\alpha$ -proteobacteria u organismos de la familia *Rickettsiaceae* podrían ser los ancestros de la mitocondria (Andersson et al., 2003).

Por ejemplo, el genoma de *Reclinomonas americana* codifica proteínas que se encuentran en la mitocondria, incluso un tipo de ARN polimerasa similar a las de eubacterias. Planteando dos posibilidades acerca del origen de las proteínas: 1) los genes de la mitocondria en levadura tienen un cambio mayor en la secuencia que no se parecen a eubacterias o 2) los genes originales en el genoma proto-mitocondrial han sido substituidos funcionalmente por genes con un origen evolutivo distinto (Gray, 1999; Langet al., 1997). Debido a que se ha considera que existe una semejanza entre el sistema replicativo y transcripcional de la mitocondria con proteínas de origen fágico (Shutt y Gray, 2006a)

## 1.2 Replicación y transcripción del ADN mitocondrial

Para la replicación y transcripción mitocondrial, se requiere de proteínas codificadas en el núcleo y transportadas al interior de la mitocondria. En el caso del humano este tiene 1500 proteínas (Pagliarini et al., 2008) y la levadura tiene 1000 proteínas en la mitocondria (Sickmann et al., 2003), de las cuales 99% son codificadas en el núcleo (Bolender et al., 2008).

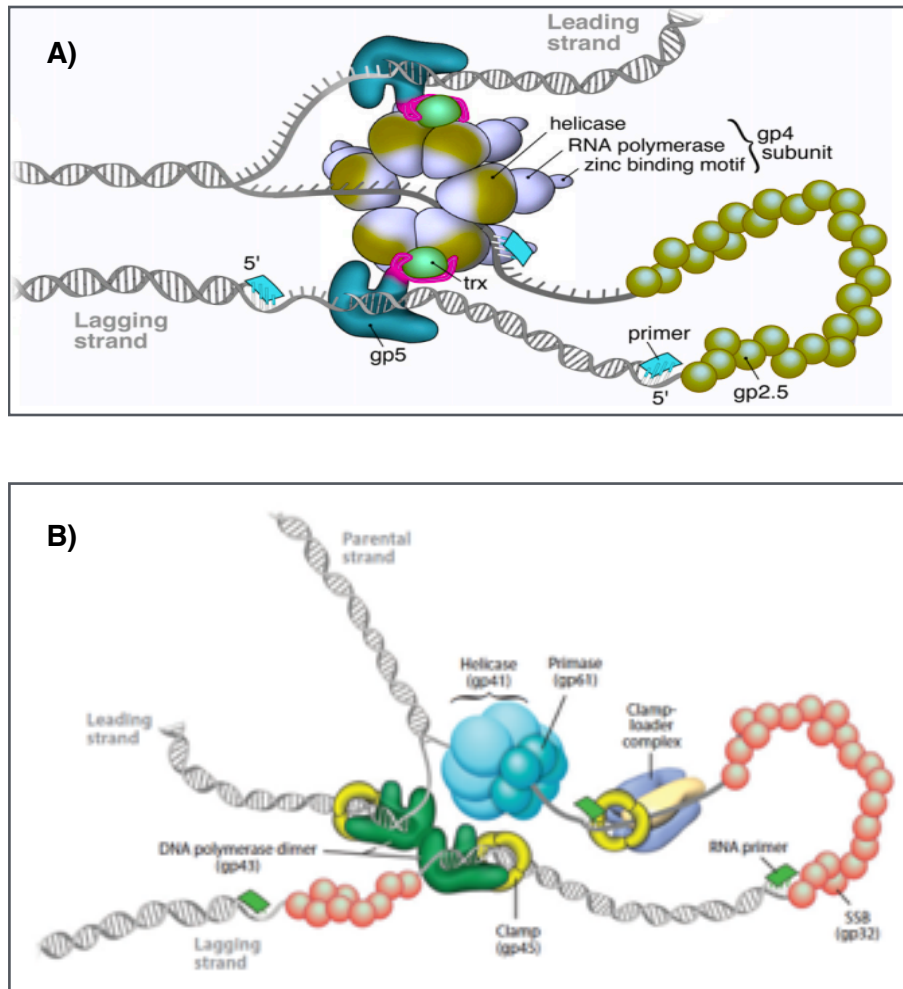
## 1.3 Sistema de replicación del ADN: El Replisoma

La replicación del ADN requiere de la acción de múltiples enzimas que trabajan en conjunto, a éste sistema se le denomina replisoma (Benkovic et al., 2001). Los replisomas descritos con mayor profundidad son el que se presenta en el bacteriófago T7 (Figura 1A), el del bacteriófago T4 (Figura 1B), el de *Escherichia coli* (Figura 2) y el de la mitocondria de células humanas (Figura 3). Estos replisomas en general están constituidos por una ADN polimerasa, una proteína de unión al ADN de cadena sencilla, una primasa y una helicasa (Engler y Richardson, 1983; Korhonen et al., 2004).

### 1.3.1 Componentes del replisoma del bacteriófago T7

El genoma del bacteriófago T7, es de doble cadena y tiene un tamaño aproximado de 40 kb (Dunn y Studier, 1983; Studier, 1969). El replisoma encargado de la replicación del genoma del bacteriófago T7, es el más simple y requiere solamente de cuatro proteínas (Perumal et al., 2010) (Figura 1). La proteína bifuncional (**gp4**), con actividad de helicasa y primasa (Kusakabe y Richardson, 1996), 2) una ADN polimerasa (**gp5**), con actividad de polimerasa y exonucleasa 3'-5' (Engler y Richardson, 1983), 3) una proteína de unión a ADN de cadena sencilla (**gp2.5**) y 4) una proteína (**tioredoxina**) como factor de procesividad (*E. coli*).





**Figura 1. Replisoma de los bacteriófagos T7 y T4**

**A)** La imagen muestra los elementos que participan en la replicación del genoma del bacteriófago T7. En color verde la ADN polimerasa (gp5), en color verde claro la tioredoxina como factor de procesividad de *E. coli* (trx), en color lila se observa una proteína hexamérica con actividad de helicasa-primasa (gp4) y en amarillo una proteína de unión a ADN de cadena sencilla (gp 2.5). En el modelo se observa de que manera se forma el complejo entre gp5 y trx, en contacto con el dominio de helicasa. Además la proteína gp4 separa las cadenas de ADN y así gp2.5 es capaz de unirse y cubrir el fragmento de ADN en la cadena líder. Por otro lado el mismo complejo gp5/trx con gp4 inicia la replicación cuando se forman los fragmentos de Okazaki mediante la extensión de iniciadores de ARN que se esquematizan en color azul sintetizados por el dominio de primasa de gp4. **B)** Representación del replisoma del bacteriófago T4 donde la helicasa p41 desdobra el ADN y la ADN polimerasa (gp43) es un homodímero con un factor de procesividad trimérico (gp45), como se puede observar p43 es anclada mediante la interacción con la helicasa y el complejo de anclaje esta conformado por p44 y p62 en una relación 4:1, iniciando la síntesis de iniciadores mediante la actividad de la primasa (gp61) con la helicasa, mientras el ADN es cubierto por la proteína de unión a ADN de cadena sencilla (gen 32). De tal manera que con estos elementos del bacteriófago T7 y T4 se logra el proceso de replicación del ADN. Estas imágenes fueron tomadas de (Hamdan y Richardson, 2009).

Es importante resaltar que la ADN polimerasa del bacteriófago T7 se puede disociar después de la incorporación de solamente 1-50 nucleótidos, presentando por lo tanto baja procesividad (Taboret al., 1987). Para incrementar la síntesis de ADN interacciona con la proteína **tioredoxina** ( Modrich y Richardson, 1975a), una proteína proveniente del huésped (*E. coli*) que actúa como un factor accesorio (Modrich y Richardson, 1975b) quizás por la semejanza con una proteína ortóloga de la bacteria (Lechneret al., 1983). El incremento es de miles de nucleótidos incorporados por un sólo evento de unión, mediante la estabilización de complejo iniciador-templado-polimerasa (Huberet al., 1987; Tabor et al., 1987).

La ADN polimerasa además de requerir a la tioredoxina para incrementar la procesividad, interacciona con la proteína de unión a ADN de cadena sencilla (**gp2.5**) que además de evitar la formación de estructuras secundarias en el ADN (Ghoshet al., 2010), regula la actividad de síntesis de ADN (Kim y Richardson, 1993) y la actividad de la helicasa-primasa durante la síntesis de la cadena retardada (Nakai y Richardson, 1988).

En conclusión el proceso de replicación del bacteriófago T7 puede ser completado solamente con cuatro proteínas, haciendo de éste este el replisoma más pequeño que se ha descrito (Lee y Richardson, 2011) y el cual presenta diferencias con otros sistemas como se describe a mayor detalle a continuación.

### **1.3.2 Componentes del replisoma del bacteriófago T4**

El genoma del bacteriófago T4 es de un tamaño aproximado de 169 kb (Milleret al., 2003) y su sistema de replicación presenta una ADN polimerasa (**gp43**), una helicasa (**gp41**), una primasa (**gp61**), una proteína de anclaje (**gp45**) y una proteína de unión a ADN de cadena sencilla (**gp32**) (Ishmaelet al., 2003). Estos componentes son similares a los del replisoma del bacteriófago T7, sin embargo la conformación de los complejos es diferente (Figura 1B).

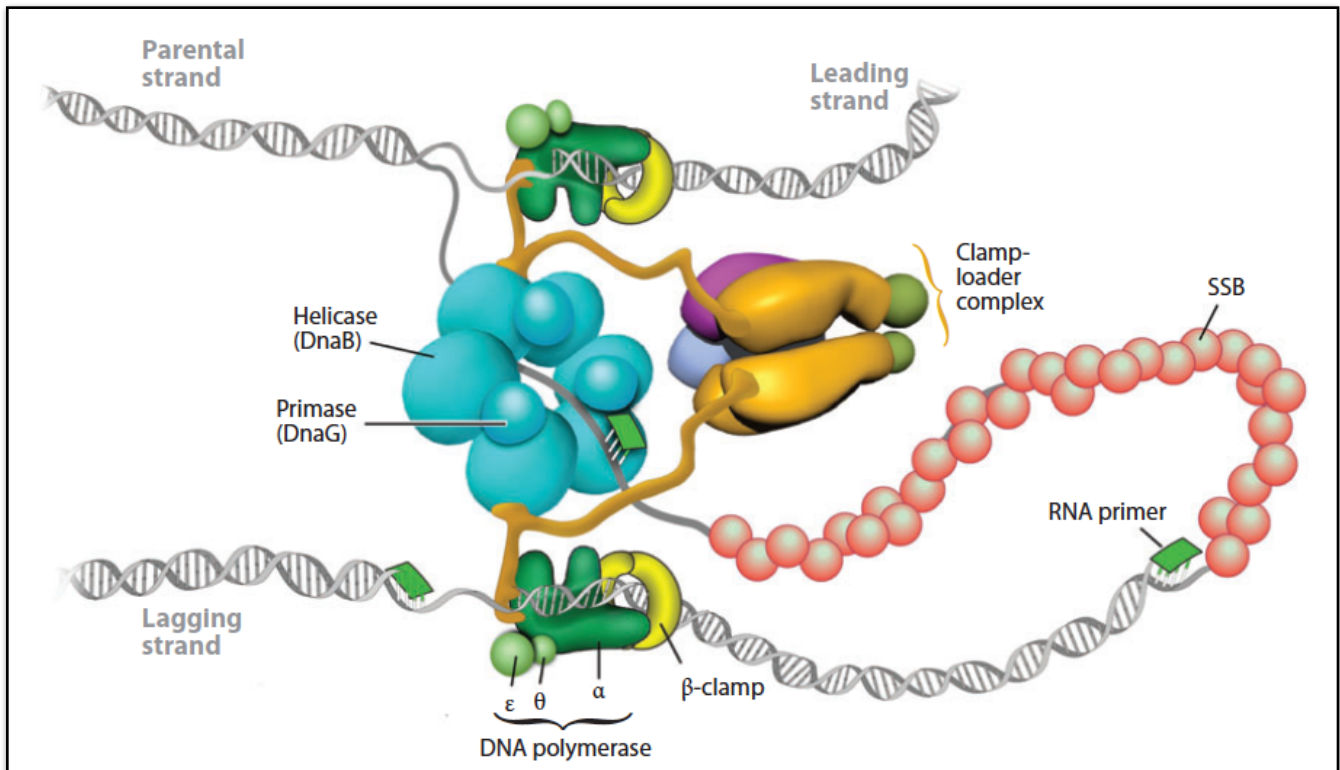
La ADN polimerasa del bacteriófago T4 (**gp43**) tiene actividad de polimerasa como de 3'-5' exonucleasa (Capson et al., 1992) y además interactúa con una proteína de anclaje que se ensambla de forma trimérica (**gp45**), mediante la región C-terminal de la ADN polimerasa (Delagoutte y von Hippel, 2001).

La primasa del bacteriófago T4 es similar a la del bacteriófago T7, ya que es capaz de reconocer una secuencia de trinucleótidos y dar inicio a la síntesis de ADN (Salinas y Benkovic, 2000). También cuenta con una proteína de unión a ADN de cadena sencilla (**gp32**) similar a la T7SSB (Krassa et al., 1991), capaz de modular la interacción con otras proteínas mediante el extremo C-terminal con carácter ácido para la interacción con otras proteínas (Benkovic et al., 2001; Ishmael et al., 2003).

### **1.3.3 Componentes del replisoma de *Escherichia coli***

En *E. coli*, a diferencia de lo que ocurre en el sistema del bacteriófago T7, se requiere de la asistencia de proteínas para anclar la ADN polimerasa (**PolIII**) al ADN (Figura 2). Similar al replisoma del bacteriófago T7 tiene una helicasa hexamérica (**DnaB**) que interacciona con la Pol III y con la primasa (**DnaG**) durante la síntesis de iniciadores (Tougu y Marians, 1996). Además necesita una proteína que le permite el anclaje, la **abrazadera- $\beta$**  que funciona como pinza para cada unidad de la polimerasa (Georgescu et al., 2012).

Al igual que en el caso del replisoma del bacteriófago T7, el sistema de *E. coli* necesita de la presencia de una proteína de unión a ADN de cadena sencilla (**SSB**), para evitar la formación de estructuras secundarias, incrementar la velocidad de síntesis por parte de Pol III (Maki y Kornberg, 1988) y así estimular la actividad del replisoma mediante una interacción especie-específica (Georgescu et al., 2014).



**Figura 2. Replisoma de *E. coli***

En el esquema se muestran los elementos responsables de la replicación de ADN en *E. coli*, en color cyan se presenta la helicasa DnaB, capaz de desdoblarse el ADN de doble cadena, en verde la ADN polimerasa III como un multímero de tres subunidades (polimerasa, exonucleasa y teta) que utiliza la cadena ya abierta y polimeriza tanto la cadena líder como la retardada, en amarillo el factor de procesividad la unidad beta, que permite la síntesis de fragmentos más grandes por parte de la ADN polimerasa, en morado/lila/amarillo el complejo de anclaje, en cyan la primasa (DnaG) capaz de interactuar con la helicasa en una relación 1:2 unidades para la síntesis de los iniciadores y en rojo se muestra la proteína de unión a ADN de cadena sencilla, cubriendo el sustrato para evitar la formación de estructuras secundarias. Tomado de (Hamdan y Richardson, 2009).

El mecanismo de interacción entre la SSB y el ADN es dependiente de las condiciones de fuerza iónica, ya que la concentración de sales regula el número de nucleótidos cubiertos por tetrámero de la proteína, 33 o 65 nt en baja o alta concentración de sal respectivamente. Por lo que se ha propuesto que esta diferencia puede servir como un sistema de regulación en la formación de los complejos dependiendo de su participación en la replicación, recombinación o reparación, (Lohman y Overman, 1985).

Se sabe que la SSB de *E. coli* es capaz de interactuar con otras 14 proteínas, entre ellas; la polimerasa Pol III (Kelmanet al., 1998; Witteet al., 2003), la primasa (Sun y Godson, 1998), proteínas de recombinación (Sheredaet al., 2007), de reparación (Lu y Keck, 2008; Sandigurskyet al., 1996) y de inicio de la replicación como PriA (Cadman y McGlynn, 2004). Donde la interacción con PriA y Pol III es mediante los 9 aminoácidos del extremo carboxilo terminal (Kozlov et al., 2010).

#### **1.3.4 Componentes del replisoma mitocondrial humano**

El genoma mitocondrial humano es de doble cadena y tiene un tamaño aproximado de 16.6 kb (Anderson et al., 1981), con dos secuencias correspondientes a orígenes de replicación (OriL y OriH) (Falkenberget al., 2007). Para la replicación de este genoma se requiere de cuatro proteínas (Figura 3), una ADN polimerasa (**POLG**), una helicasa (**Twinkle**), una proteína de unión a ADN de cadena sencilla (**HsmtSSB**) y una ARN polimerasa mitocondrial con actividad de primasa (**POLRMT**) (Korhonen et al., 2004).

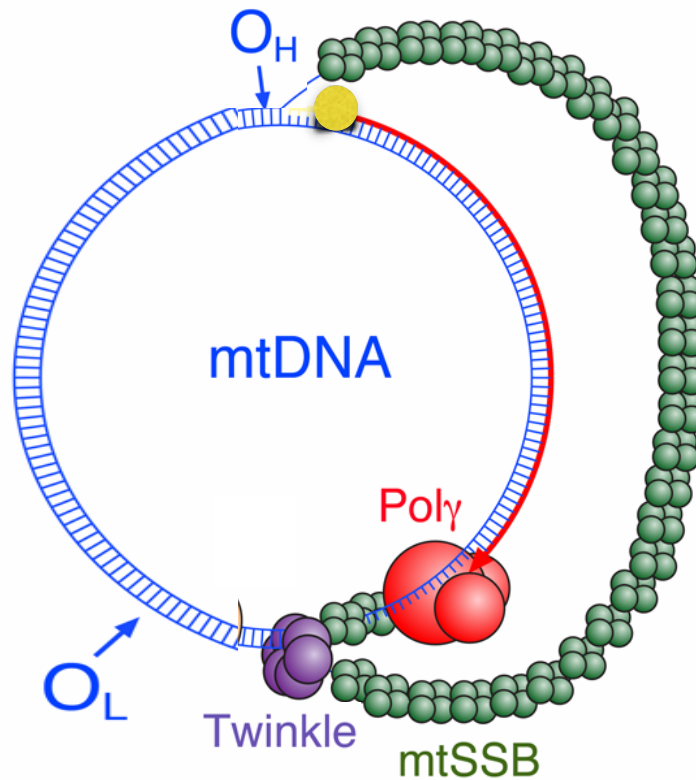
La ADN polimerasa mitocondrial (**POLG**), *in vitro* puede utilizar los fragmentos cortos de ARN (<75 nt) como iniciadores en la síntesis de ADN (Wanrooijet al., 2008), comenzando en la región con la secuencia del origen de replicación en la cadena ligera (OriL) y el de la cadena pesada (OriH) (Fusteet al., 2010), para obtener un híbrido de ADN-ARN sobre el templado de cadena sencilla (Xu y Clayton, 1996).

La POLG es una proteína altamente conservada con ortólogos en otros organismos, presenta una similitud del 79% con la proteína ADNpol  $\gamma$ B de *Xenopus* y del 54% con la ADNpol  $\gamma$ B de *Drosophila* (Carrodeguas y Bogenhagen, 2000). Dadas estas similitudes la subunidad de humano y *Xenopus* son capaces de funcionar como factores de procesividad para la subunidad polyA mitocondrial de humano considerando que podría haberse adquirido durante la evolución para incrementar la procesividad en la replicación (Carrodeguaset al., 1999).

Al igual que en los replisomas descritos, la mitocondria humana tiene una proteína de unión a ADN de cadena sencilla (SSB), aunque no es esencial (Korhonen et al., 2004) La SSB durante la replicación cubre exclusivamente la cadena pesada y permite restringir la iniciación de la cadena retardada en el OriL, lo cual establece la importancia de una replicación mediante el desplazamiento de hebra (Miralles Fuste et al., 2014).

La helicasa (**Twinkle**) es indispensable para la replicación (Korhonen et al., 2004) y un posible candidato para cumplir con la actividad de primasa. Sin embargo, aunque es una proteína que tiene dedos de zinc y motivos característicos de primasas, carece de las cisteínas necesarias para síntesis de iniciadores (Kusakabe y Richardson, 1996) a diferencia de las de otros metazoos (Shutt y Gray, 2006b).

La POLRMT además de encargarse de la transcripción mitocondrial al formar fragmentos largos de ARN sobre ADN de doble cadena (Clayton, 1991), funciona como primasa al ser capaz de reconocer las secuencias de inicio y sintetizar fragmentos cortos de ARN (<75 nt), resultando un híbrido ADN-ARN sobre templado de cadena sencilla (Xu y Clayton, 1996). El híbrido contiene fragmentos cortos de ARN sintetizados por la POLRMT utilizados como iniciadores tanto de la cadena líder como de la cadena retardada en la replicación mitocondrial (Wanrooij et al., 2008), comenzando sobre OriL y después con cadena retardada como templado (Fuste et al., 2010) mediante una síntesis asimétrica entre las dos cadenas (Chang y Clayton, 1985; Changet al., 1985).



**Figura 3. Replisoma mitocondrial humano.**

El esquema representa los componentes indispensables para la replicación mitocondrial de humano. En rojo se muestra la ADN polimerasa (POLG) conformada por tres subunidades, en morado la helicasa hexamérica (Twinkle), en amarillo la ARN polimerasa (RPOLMT) capaz de sintetizar iniciadores de ARN para utilizarse por POLG y en verde la proteína de unión a ADN de cadena sencilla. Además las flechas señalan los dos sitios de origen de replicación de la cadena pesada ( $O_H$ ) donde inicia la síntesis hasta el origen de la ligera ( $O_L$ ) modificado de (Younget al., 2015).

## 1.4 Replicación mitocondrial en *Saccharomyces cerevisiae*

### 1.4.1 Genoma mitocondrial de *S. cerevisiae*

En *S. cerevisiae*, el genoma mitocondrial está conformado por una molécula de ADN de doble cadena de aproximadamente 85.8 kb (Chen y Butow, 2005). Este genoma codifica algunas subunidades correspondientes a los complejos involucrados en la fosforilación oxidativa (Tabla 1), la citocromo c oxidasa, ATP sintasa, así como también 14S ARNr y 21S ARNr, RNasa P y los ARN de transferencia (ARNt<sup>Met</sup>, ARNt<sup>Glu</sup>, ARNt<sup>Phe</sup>, ARNt<sup>Ala</sup>, ARNt<sup>Thr<sub>CUN</sub></sup>, ARNt<sup>Thr<sub>ACNV</sub></sup> y ARNt<sup>Cys</sup>).

**Tabla 1. Secuencias codificantes en el genoma mitocondrial de *S. cerevisiae***

Complejo	Subunidades
Citocromo C oxidasa	COXI, COXII y COXIII
ATP sintasa	ATP6, ATP8 y ATP9
ARN ribosomal	21S ARNr y 14S ARNr
RNasa P	RPM1
ARN de transferencia	ARNt <sup>Met</sup> , ARNt <sup>Glu</sup> , ARNt <sup>Phe</sup> , ARNt <sup>Ala</sup> , ARNt <sup>Thr<sub>CUN</sub></sup> , ARNt <sup>Thr<sub>ACN</sub></sup> , ARNt <sup>Cys</sup>

Para dar inicio a la replicación del genoma mitocondrial de *S. cerevisiae* se presentan siete secuencias con identidad a orígenes de replicación (*ori*) (Fouryet al., 1998), a diferencia del genoma mitocondrial humano que cuenta solamente con dos orígenes de replicación (Fuste et al., 2010).

En *S. cerevisiae* tres secuencias *oris* (*ori4*, *ori7* y *ori8*) contienen una zona rica en G+C por lo que no se consideran viables para dar inicio a la replicación y cuatro (*ori1*, *ori2*, *ori3* y *ori5*), mantienen nueve nucleótidos conservados con sitios de replicación descritos, por lo que se consideran como posibles secuencias de inicio (Tabla 2) (Baldacciet al., 1984; Biswas, 1999).



**Tabla 2. Secuencias de posibles orígenes de replicación**

<b>Origen de replicación</b>	<b>Secuencia</b>
<b><i>ori1</i></b>	TATAAATA <b>TATAAGTA</b> ATAAATTAAGTTTTATAGGGGGAGGGGGTGGGTGA
<b><i>ori2</i></b>	TGTAAATA <b>TATAAGTA</b> ATAAATTAAGTTTTATAGGGGGAGGGGGTGGGTGA
<b><i>ori3</i></b>	TCTGGATA <b>TATAAGTA</b> ATAGGGGGAGGGGGTGGGTGATTAGAACTAGAAT
<b><i>ori5</i></b>	ATTTAAAA <b>TATAAGTA</b> ATAGGGGGAGGGGGTGGGTGATAATAACAGAATA

\*En negritas se muestra la secuencia promotora conservada y subrayada se señala la posición de inicio de la transcripción. Tabla modificada de (Biswas, 1999).

## 1.5 Elementos replicativos en la mitocondria de *S. cerevisiae*

Las proteínas que intervienen en la replicación y transcripción del genoma mitocondrial de *S. cerevisiae* son codificadas y transcritas en el núcleo, para luego ser transportadas al interior de la mitocondria (Elo, 2003), de igual manera que ocurre en sistema mitocondrial del humano (de Zamaroczy y Bernardi, 1986).

Las proteínas que participan en la replicación y transcripción mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae* (Tabla 3) descritos son: una ADN polimerasa (**Mip1**) que participa en procesos de replicación y reparación del ADN (Foury, 1989; Viikovet al., 2011), una proteína de unión a ADN de cadena sencilla (**Rim1**) encargada de evitar la formación de estructuras secundarias en las cadenas de ADN y una ARN polimerasa mitocondrial (**Rpo41**) (Greenleaf et al., 1986), acompañada de un factor de transcripción mitocondrial (**Mtf1**) que permite el reconocimiento de la secuencia promotora como elemento indispensable en la transcripción (Yanget al., 2015).

Las ARN y ADN polimerasas mitocondriales de *S. cerevisiae* han sido relacionadas filogenéticamente con las del bacteriófago T7 (Gray, 1999; Shutt y Gray, 2006a) por lo tanto el sistema replicativo de la levadura podría guardar semejanzas con los de algunos bacteriófagos, como los descritos previamente.

### **1.5.1 Características de las ADN polimerasas mitocondriales**

En general las ADN polimerasas pueden participar en procesos tales como replicación, reparación y recombinación, son clasificadas en familias de acuerdo a la actividad que realizan (Fileeet al., 2002) . En la familia A, se clasifican las enzimas involucradas en el proceso de replicación, capaces de catalizar la adición de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP's) en el extremo 3'-OH de un iniciador y con actividad de 3' a 5' exonucleasa (Bebenek y Kunkel, 2004). Las proteínas de esta familia se han relacionado filogenéticamente con las de los bacteriófagos de la familia T (Shutt y Gray, 2006a), siendo la ADN polimerasa mitocondrial de *S. cerevisiae* (Mip1) miembro de esta familia.

#### **1.5.1a ADN polimerasa mitocondrial de *S. cerevisiae* (Mip1)**

Aunque Mip1 pertenece a la familia A de ADN polimerasas, a diferencia de las enzimas de los bacteriófagos, contiene un extremo carboxilo terminal extendido. Esta es una característica compartida con otros hongos que poseen desde 47 hasta 338 a.a. (Figura 4A) (Younget al., 2006).

Mip1 tiene un extremo carboxilo de 279 a.a. (Figura 4A), donde los residuos más alejados del dominio de polimerasa no son tan conservados como los más cercanos. En *S. cerevisiae*, este extremo C-terminal se ha descrito como una región requerida para el mantenimiento del genoma mitocondrial *in vivo* (Young et al., 2006), y es responsable del equilibrio entre la actividad de polimerasa y exonucleasa *in vitro* (Viikovet al., 2012).

Además Mip1 es una polimerasa capaz de ser procesiva por sí misma al sintetizar fragmentos >6 kb *in vitro*, en contraste con la POLG (ADN polimerasa mitocondrial de humano) y la ADN polimerasa de T7, que requieren de un factor de procesividad (p55 y tioredoxina respectivamente) para incrementar la longitud de las cadenas de ADN (Viikov et al., 2011).

Lo anterior ha llevado a la hipótesis de que Mip1 debe contener un sitio que le permita prescindir de factores accesorios, siendo la extensión del carboxilo terminal un candidato para cumplir este requisito, además de posiblemente interactuar con otros elementos, o estar involucrado con la capacidad de desplazamiento de hebra (Viikov et al., 2012).

**Tabla 3. Componentes necesarios para la replicación y transcripción de diferentes sistemas**

<b>Proteína</b>	<b>Bacteriófago T7</b>	<b>Bacteriófago t4</b>	<b><i>E. coli</i></b>	<b>Mitocondria de humano</b>	<b>Mitocondria de <i>S. cerevisiae</i></b>
<b>ADN polimerasa</b>	gp45 (T7ADNpol)	gp43 (T4ADNpol)	ADN pol ( $\alpha, \epsilon, \theta$ )	Pol $\gamma$ (subunidad A)	Mip1 (ADN pol $\gamma$ )
<b>Factor de procesividad</b>	Thiorredoxina ( <i>E. coli</i> )	-	-	Pol $\gamma$ (subunidad B)	-
<b>Complejo de anclaje</b>	-	+	+	-	-
<b>Helicasa replicativa</b>	gp4	gp41	DnaB	Twinkle	?
<b>Primasa</b>	gp4 (hexamérica)	gp61 (hexamérica)	DnaG	POLRMT	?
<b>Proteína de unión a ADNcs</b>	gp2.5 (T7SSB)	gp32 (T4SSB)	EcoSSB	HsmtSSB	Rim1
<b>ARN polimerasa</b>	T7RNAP	T4RNAP	RNApol	POLRMT	Rpo41
<b>Factor de transcripción</b>	-	-	TFB	TFAM1 TFAM2	Mtf1

\*El signo (-) significa que no están presentes y (+) que si están presentes. El signo (?) hace referencia a la ausencia de estas proteínas.



**Figura 4. Análisis filogenético de las ADN polimerasas mitocondriales**

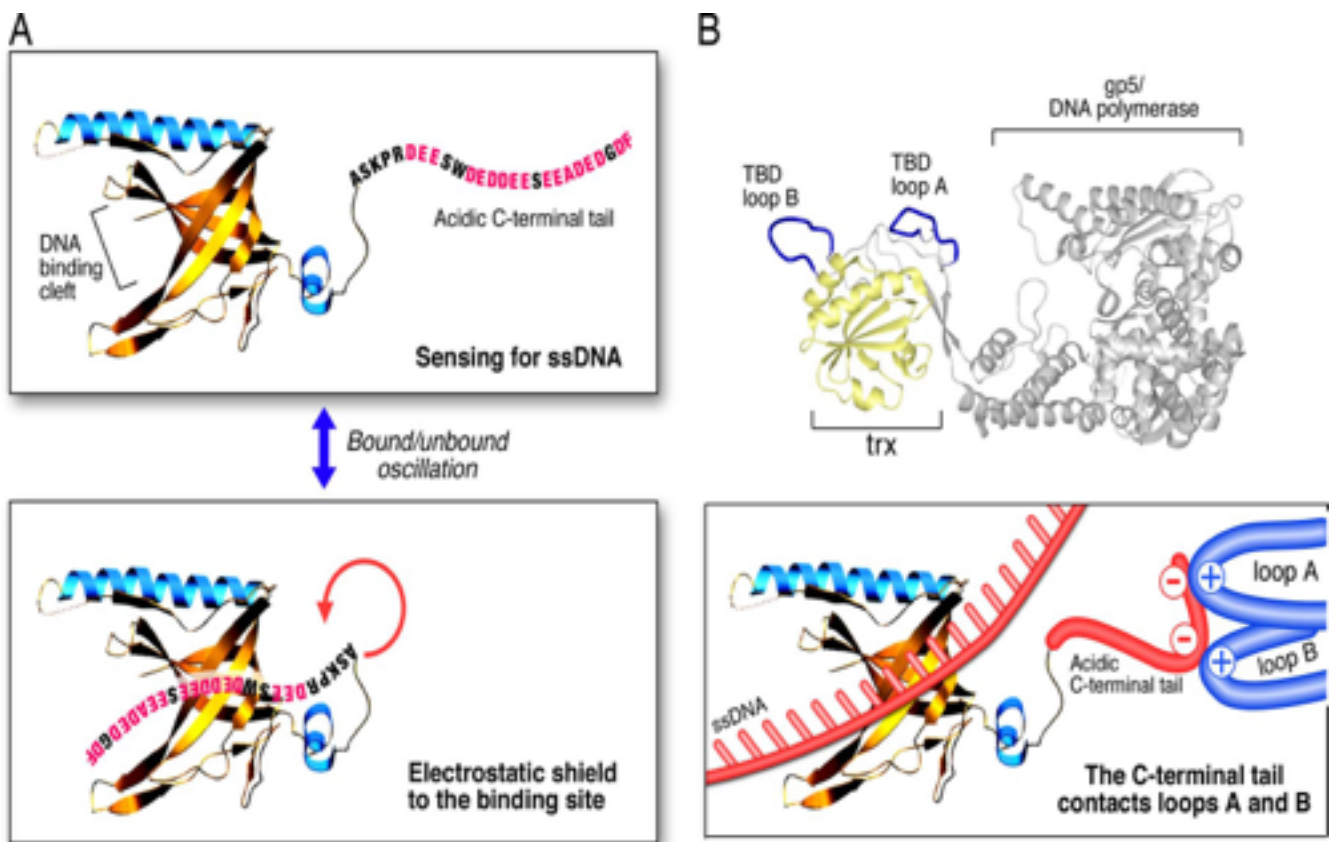
**A)** Representación esquemática de la relación filogenética entre las ADN polimerasas mitocondriales y la longitud del dominio C-terminal. **B)** Análisis comparativo de las secuencias aminoacídicas del C-terminal. Alineamiento obtenido empleando el programa PRALINE que muestra el nivel de conservación de las posiciones de los residuos mediante un código de colores (azul menor conservación y rojo mayor conservación). Tomado de (Young et al., 2006).

### **1.5.2 Proteína de unión a ADN de cadena sencilla (SSB)**

Las proteínas de unión a ADN de cadena sencilla (SSB), se encargan de evitar la formación de estructuras secundarias durante la replicación y mantienen interacción con otras proteínas replicativas (Holliset al., 2001).

En el replisoma mitocondrial de *Drosophila melanogaster*, la proteína SSB incrementa la actividad de la ADN polimerasa (Farret al., 2004; Farret al., 1999). En el caso del bacteriófago T7, T7SSB estimula la actividad de la proteína gp4 (una helicasa-primasa) durante la síntesis de iniciadores de ADN o ARN (Kim y Richardson, 1994). Se sabe que en la mitocondria de humano HsmtSSB es capaz de estimular a la helicasa Twinkle e incrementar el uso de los iniciadores para la síntesis de ADN (McKinney y Oliveira, 2013).

Basados en la relación entre T7SSB-T7ADNP y de que manera permite el incremento en la síntesis de ADN, ésta se ha tratado de explicar mediante un modelo (Figura 5), donde se afirma la unión mediante el extremo carboxilo terminal de la SSB cargado negativamente con el sitio unión a ADN, regulada por la presencia del sustrato para incrementar la procesividad del sistema (Ghosh et al., 2010). La explicación que ofrece este modelo también se ha considerado válida para las proteínas de la mitocondria del humano (HsmtSSB y la POLG) (Marintcheva et al., 2008) y podría ser similar en la levadura.



**Figura 5. Modelo del funcionamiento del extremo C-terminal de T7SSB**

**A)** Funciones del extremo C-terminal como un escudo electrostático. En ausencia de ADN, el extremo carboxilo (en rosa se señalan los residuos ácidos que le confieren la carga parcialmente negativa) puede estar libre o unido al sitio de unión al ADN de cadena sencilla. **B)** Mecanismo de interacción entre el C-terminal con la proteína gp5 que se muestra en gris en la parte superior del panel (T7ADN polimerasa). En presencia de ADN representado como una cadena color rojo (esquema inferior), el sitio de unión a ADN de la T7SSB se encuentra ocupado y el extremo C-terminal queda libre e interacciona con las asas A y B de la T7ADN polimerasa representada en color azul. Tomado de (Marintcheva et al., 2008)

### **1.5.2a Proteína de unión a ADN de cadena sencilla mitocondrial de *S. cerevisiae* (Rim1)**

En *S. cerevisiae*, el gen nuclear *RIM1* codifica una proteína mitocondrial de 13 kDa (Rim1), con capacidad de unión a ADN de cadena sencilla, considerada esencial para el mantenimiento del genoma mitocondrial (Van Dycket al., 1992) y capaz de estimular la actividad de una helicasa de reparación mitocondrial (Pif1) (Ramanagoudr-Bhojappaet al., 2013). Sin embargo, hasta el momento no ha sido determinado otra función o relación con otras proteínas de la replicación.

### **1.5.3 ARN polimerasas mitocondriales**

Las ARN polimerasas mitocondriales presentan relación filogenética con las de los bacteriófagos T7 y T3 (Cermakianet al., 1996). Sin embargo, las enzimas mitocondriales suelen requerir factores accesorios para la formación de una estructura tipo burbuja, necesaria para tener disponible la cadena templado, y así dar inicio a la transcripción (Figura 6) (Masterset al., 1987)

En lo que respecta a las ARN polimerasas mitocondriales de *S. cerevisiae* y *A. thaliana*, los factores accesorios son dispensables si los templados son superenrollados o de tipo burbuja, ya que no requieren de la formación de la estructura de inicio (Matsunaga y Jaehning, 2004).

### **1.5.3a ARN polimerasa mitocondrial de *S. cerevisiae* (Rpo41) y el factor de transcripción mitocondrial (Mtf1)**

En *S. cerevisiae* los genes nucleares RPO41 y MTF1 codifican la ARN polimerasa mitocondrial (Rpo41) de 153 kDa (Greenleaf et al., 1986) y su factor de transcripción (Mtf1) de 43 kDa consideradas como las proteínas responsables de la transcripción de genes mitocondriales (Carrodeguaset al., 1996).

La Rpo41 tiene un carboxilo terminal similar a las ARN polimerasas de los bacteriófagos T3 y T7, con un sitio catalítico y el dominio de reconocimiento del promotor (Cermakian et al., 1996).

El dominio amino terminal de Rpo41 mantiene la regulación entre el inicio y la enlongación durante la transcripción, mediante la interacción con Mtf1 (Figura 6b) (Masters et al., 1987). Mtf1 es la proteína requerida para comenzar la apertura de tres o cuatro bases alrededor del sitio de inicio de la transcripción (Figura 6a), comenzando la discriminación de los nucleótidos río arriba de la secuencia promotora para la incorporación de nucleótidos por Rpo41 (Paratkar y Patel, 2010; Savkina et al., 2010).

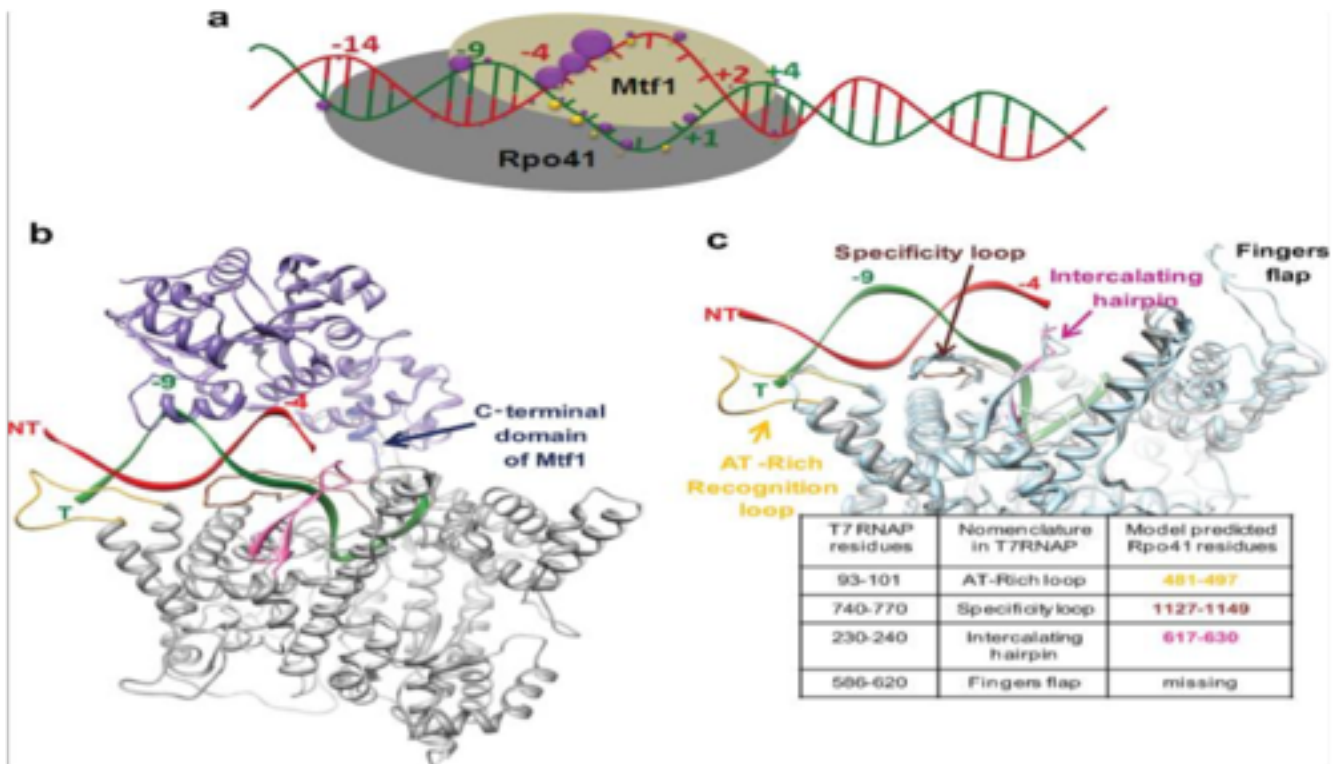
La ARN polimerasa Rpo41 es una proteína sin reconocimiento específico de secuencia, pero si dependiente de la estructura del templado mediante la modificación de Mtf1 al unirse al ADN formando una estructura tipo burbuja por la apertura de la doble cadena (Figura 6a) (Yang et al., 2015).

Otro elemento estructural importante de Rpo41 es el pulgar, dominio relacionado con la regulación de la procesividad y cuando este se ve afectado el número de fragmentos abortivos se incrementa, ya que el complejo se encuentra inestable (Velazquez et al., 2015).

#### **1.5.4 Factor accesorio de la transcripción (Mtf1)**

Mtf1 es una proteína de 43 kDa que interacciona con Rpo41 mediante diversas regiones de la proteína (Figura 6a) y con un extremo carboxilo terminal que se une con la cadena abierta del templado de ADN (Figura 6b) y así permitir la formación del complejo Mtf1-Rpo41-ADN (Temiakov et al., 2000).





**Figura 6. Modelo de la formación del complejo Rpo41-Mtf1-ADN.**

**A)** Modelo de interacción entre Rpo41-Mtf1-ADN basado en análisis de entrecruzamiento. **B)** Dominio C-terminal de Mtf1 y su interacción con el sustrato. **C)** Elementos estructurales análogos entre T7RNAP y Rpo41. La cadena no templada se muestra en color rojo y el templado de color verde, y se muestra internalizando el Mtf1 de color lila, observando de que manera internaliza la secuencia promotora entre Rpo41 y el Mtf1 representando la apertura del promotor el comienzo de la transcripción de esta región. La tabla en **C** muestra la comparación con el sistema del bacteriófago T7 de acuerdo al modelo por homología. Tomado de (Paratkar y Patel, 2010).

### **1.5.4a Importancia de Mtf1 en el inicio de la transcripción mitocondrial en *S. cerevisiae***

El complejo descrito como Mtf1-Rpo41 da inicio al proceso de transcripción mediante la formación de la estructura tipo burbuja por parte de Mtf1 (Figura 6a), y Rpo41 comienza la síntesis de ARN utilizando como templado las secuencias promotoras del genoma mitocondrial (Biswas, 1999). La relación física entre las proteínas está dada entre el dominio N-terminal de Rpo41 con Mtf1, por lo que la eliminación de un fragmento del dominio amino (185 a.a.) da lugar a levaduras con un fenotipo *petite* (colonias de menor tamaño por su lento crecimiento) (Wang y Shadel, 1999).

La ARN polimerasa de T7 (T7RNAP) y de humano (POLRMT) comparten la composición y el mecanismo de interacción con el ADN mediante el dominio denominado horquilla de intercalación  $\beta$ , que se encuentra entre las posiciones 1127 y 1149 en T7RNAP y entre 610 y 620 en humano. La importancia de este dominio se ha descrito en POLRMT, al determinar que la eliminación de dichos residuos inactiva la transcripción de un templado de doble cadena, pero no en un promotor parcialmente abierto, por lo que se considera de importancia durante la apertura del promotor (Ringelet al., 2011).

Por homología con estos modelos, en un trabajo previo se consideró que en Rpo41 corresponde a la región entre los aminoácidos 641 y 643. Región encargada de la apertura de un sustrato de cadena doble, al formar un complejo en conjunto con Mtf1 (Figura 6). Por lo que la deleción de dicho dominio ( 641-643 a.a.), incapacita la formación de la estructura de burbuja aún en presencia de Mtf1, y solamente si el sustrato es ADN superenrollado o de tipo burbuja, la versión deletada presenta actividad de transcripción (Matsunaga y Jaehning, 2004; Velazquez et al., 2012). Esto es similar a lo que ocurre con el asa de reconocimiento descrita para T7ARNP donde se sabe que la región entre los residuos 226 y 245 es indispensable para la apertura del promotor (Figura 6c) (Briebe y Sousa, 2001).

## **1.6 Proceso replicativo mitocondrial: Orígenes de replicación en la mitocondria.**

En el sistema de replicación mitocondrial de humano, dos secuencias correspondientes a orígenes de replicación (OriL y OriH) son utilizadas como templado por la ARN polimerasa (POLRMT) para sintetizar los iniciadores que requiere la ADN polimerasa gamma (POLG) y así dar inicio a la replicación (Fuste et al., 2010; Wanrooij et al., 2008).

En el genoma mitocondrial de *S. cerevisiae* existen cuatro orígenes de replicación funcionales, similares a las secuencias presentes en la mitocondria humana (Biswas, 1999). Se piensa que éstas son secuencias específicas para dar inicio a la replicación ya que son semejantes a la estructura de OriL y OriH (de Zamaroczy et al., 1984) y que sirven como templado para la formación de un híbrido de ARN-ADN complementarios a las secuencias *oris* durante la replicación (Baldacci et al., 1984).

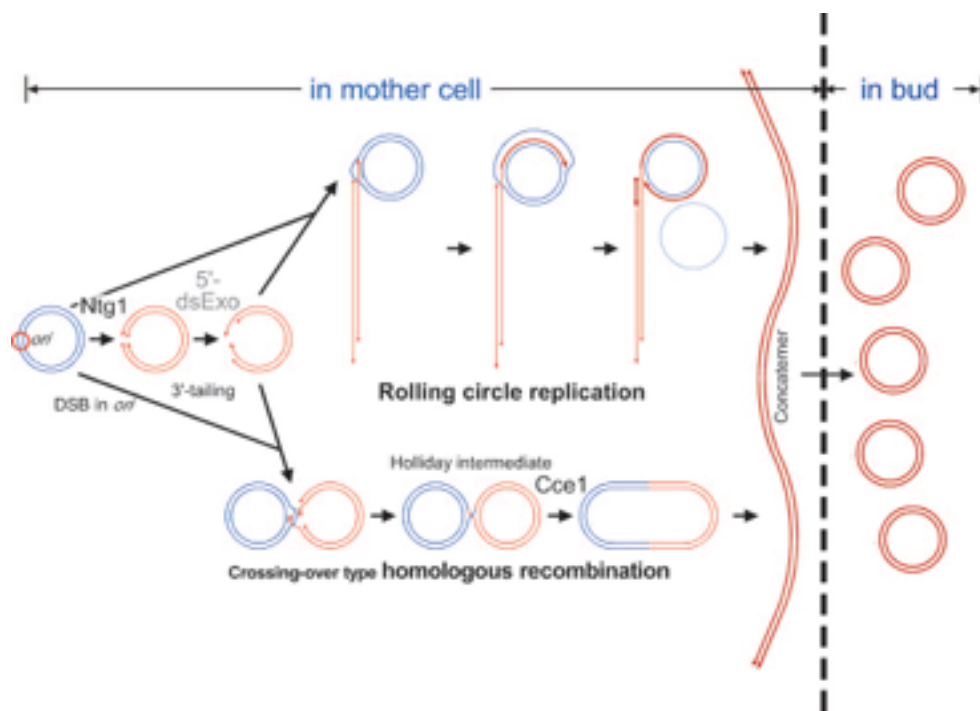
La replicación mitocondrial del humano se lleva a cabo mediante el desplazamiento de hebra (Korhonen et al., 2004). En contraste en el sistema mitocondrial de *S. cerevisiae*, se han propuesto dos caminos (Figura 7): 1) donde Rpo41 es capaz de sintetizar pequeños fragmentos de ARN utilizados como iniciadores (Baldacci et al., 1984; Bernardi, 2005) y 2) donde por acción de la ADN glicosilasa *Ntg1* al romper la doble cadena de *ori5* se genera un extremo 3'OH que sirve como sitio de inicio para la recombinación del ADN (Figura 7) (Linget et al., 2007).

## **1.7 Helicasas replicativas mitocondriales de *S. cerevisiae***

En la mitocondria de *S. cerevisiae* hay dos helicasas involucradas en la recombinación (Hmi1 y Pif1) pero no una helicasa replicativa (Ramanagoudr-Bhojappa et al., 2013; Sedman et al., 2005), por lo que se considera que quizá el sistema replicativo mitocondrial no requiere de la presencia de la función de helicasa o primasa de Twinkle perdiendo este tipo de enzima (Shutt y Gray, 2006b).

Por lo tanto, el comportamiento en cuanto a estas funciones podría ser parecido a lo que se observa en la mitocondria de células humanas, ya que el resto de las proteínas involucradas en la replicación ya han sido descritas.

Estas dos propuestas sirven como base para la idea de conocer más a fondo la interacción entre los elementos conocidos y aquellos que no han sido dilucidados hasta el momento, como son la helicasa y primasa en el sistema replicativo de la levadura *S. cerevisiae*.



**Figura 7. Replicación del ADN de doble cadena por el modelo de círculo rodante y recombinación homóloga.**

Representación esquemática del modelo de replicación mediante el rompimiento de la cadena doble y la recombinación mediante el círculo rodante. Se observa representado el ADN con el sitio de origen de replicación en cual se introduce la enzima *Ntg1*. En la doble cadena que fue cortada quedando expuestos dos extremos 3' de cadena sencilla por acción de una exonucleasa. Si uno de los extremos 3' de cadena sencilla se une con un ADN mitocondrial circular se logra la replicación mediante el círculo rodante formando un heterodúplex. La segunda manera en la cual puede llevarse a cabo es mediante la unión de dos moléculas mediante el entrecruzamiento de las mismas al reparar los extremos expuestos. Tomado de (Ling et al., 2007).

## **II. JUSTIFICACIÓN:**

En el replisoma mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae* las proteínas involucradas durante el proceso de replicación descritas hasta el momento son Mip1 y Rim1. Se desconocen las proteínas encargadas de la actividad de primasa y helicasa replicativa, así como, la relación entre los elementos participantes.

Por lo tanto, este trabajo pretende definir la función de primasa entre los elementos del sistema y si esta esta primasa es específica de una secuencia conservada. También se pretende evaluar los componentes necesarios para reconstruir el complejo de replisoma *in vitro*.

## **III. HIPÓTESIS**

El replisoma mitocondrial de *S. cerevisiae* requiere solamente de cuatro proteínas (Mip1 , Rpo41, Mtf1 y Rim1) para funcionar *in vitro*.

#### **IV. OBJETIVO GENERAL:**

Evaluar las actividades de 4 proteínas (Mip1, Rpo41, Mtf1 y Rim1) y su forma de interacción funcional para reconstruir el replisoma mínimo de la mitocondria de *S. cerevisiae*.

#### **V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

**1) Establecer el sistema de replicación *in vitro* con el mínimo número de componentes del replisoma mitocondrial de *S. cerevisiae*.**

*i) Definir si Mip1 es capaz de utilizar iniciadores de ARN o ADN.*

*ii) Determinar si Rpo41 es capaz de sintetizar iniciadores utilizando secuencias promotoras y de orígenes de replicación como templado.*

*iii) Determinar los elementos mínimos para la síntesis de ADN y evaluar si la interacción promueve la síntesis de producto.*

**2) Evaluar la importancia de los dominios C-terminal de Mip1**

*i) Relacionar la importancia del C-terminal de Mip1 en la síntesis de ADN y el desplazamiento de hebra.*

**3) Determinar el efecto de relación entre Mip1, Rpo41, Mtf1 y Rim1 en el replisoma.**

*i) Evaluar la importancia de la presencia de Mtf1 en la replicación.*

*ii) Distinguir el efecto de Rim1 en la síntesis de iniciadores por Rpo41*

*iii) Determinar la importancia de Rim1 sobre la actividad de Mip1*

## **VI. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1 Clonación de los genes utilizados para la expresión de proteínas**

#### **6.1.1 Clonación de ADN polimerasa mitocondrial de *S. cerevisiae* (MIP1)**

La clonación del gen sintético Mip1 sin la secuencia correspondiente al péptido señal fue hecha en el vector pET19b con una etiqueta de histidinas con sitio de corte para la enzima *Precisión Protease*® entre los sitios *Nde* I y *Bam* HI, por el Dr. Luis Brieba.

La construcción anterior (Mip1::pET19b) se utilizó para la obtención de mutantes deletadas en el C-terminal (175, 196, 227 y 263 a.a.) mediante mutagénesis sitio-dirigida utilizando el protocolo descrito para la polimerasa Q5 mutagenesis® con los iniciadores correspondientes para cada una de las versiones deletadas (Anexo I).

#### **6.1.2 Obtención de mutantes de la proteína de unión a ADN de cadena sencilla de *S. cerevisiae* (RIM1)**

La secuencia codificante de Rim1 sin el péptido señal se encuentra clonada entre los sitios de restricción *Nde* I y *Bam* HI en el vector pET19b con una etiqueta de 6 histidinas y modificado con sitio de corte para la enzima *Precision Protease*® (esta construcción fue donada por el Dr. Luis Brieba de Castro).

Las mutantes de Rim1 con la eliminación de 11 y 15 a.a. en el C-terminal fueron obtenidas mediante mutagénesis sitio-dirigida usando el kit “Quick Change, Site directed Mutagenesis”® (Stratagene). Se utilizaron 2 oligonucleótidos de 45 pb para cada una, con la mutación a introducir en el centro (Anexo 1), y mediante una reacción de PCR se amplificó el plásmido completo. Para eliminar el plásmido silvestre se digirió la reacción con Dpn I a 37 °C toda la noche. El amplificado digerido se transformó en células quimio-competentes mediante choque térmico y de las colonias obtenidas, se extrajo ADN plasmídico. Los plásmidos se secuenciaron para confirmar la mutación codifican para un codón de paro.

## 6.2 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes

### 6.2.1 Protocolo de expresión y purificación de Mip1

La versión silvestre y las mutantes delecionadas fueron expresadas transformando células quimio-competentes de *E. coli* ArticExpress® mediante choque térmico según el protocolo descrito (Sambrook, 2006). Las transformantes fueron inoculadas sobre placas de LB con ampicilina (100 mg/ml) y gentamicina (75 mg/ml), y crecidas a 37 °C toda la noche, para utilizarse como inóculo.

El inóculo se preparó directamente por desprendimiento de las colonias de la caja con lavados de LB y se depositaron en un matraz con 1 L de LB. El cultivo se creció por 3 h a 37 °C y 200 rpm. El cultivo se enfrió a 10 °C y se adicionó IPTG a una concentración final de 0.5 mM, se mantuvieron a 10 °C por 24 h a 200 rpm durante toda la noche. Posteriormente fueron centrifugados a 4,400 x g para obtener el paquete celular que fue congelado a -80 °C hasta ser utilizado.

Para la purificación de Mip1 y sus variantes se utilizó un protocolo modificado de Viikov (2012), donde las células fueron resuspendidas en buffer A (50 mM Hepes pH 8.4, 500 mM NaCl, 10% glicerol, y 1 mM PMSF). Para su lisis se adicionó lisozima a una concentración final de 0.5 µg/ml y se incubó a 4 °C por 30 min, la muestra se congeló en nitrógeno líquido y se descongeló 3 veces, para después sonicar en hielo durante 7 ciclos de 30 seg por 1 min de descanso en hielo entre cada ciclo.

Al lisado se adicionó 1 mM PMSF y se centrifugó a 17,300 x g a 4 °C durante 1 h. El extracto libre de células se filtró a través de una membrana de poro 0.45 µm y se utilizó para la purificación mediante afinidad a Níquel. En columnas His-trap® que se equilibraron con 20 volúmenes de buffer A, se cargó el sobrenadante y se efectuaron los lavados con el buffer A adicionado con imidazol 20 y 40 mM, para finalmente eluir la proteína con 500 mM de imidazol. La elución fue dializada contra el buffer B (50 mM



Hepes pH 8.4, 100 mM NaCl, 10% glicerol, 2 mM EDTA y 1 mM DTT) durante toda la noche a 4 °C.

Para el segundo paso de la purificación se utilizó una columna de intercambio iónico His-Heparin® equilibrada usando el buffer B. La elución dializada se añadió a la columna y se le hicieron lavados con 30 volúmenes de buffer B conteniendo 150 mM NaCl y 40 volúmenes con 250 mM NaCl. Finalmente, la proteína se eluyó utilizando 500 mM NaCl y fue dializada contra el buffer de mantenimiento (20 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5 mg/ml de BSA y 50% de glicerol) durante toda la noche a 4 °C y almacenada a -20 °C.

### **6.2.2 Protocolo de expresión y purificación de Rim1**

Se utilizaron las construcciones conteniendo el gen *RIM1* y las versiones deletadas para transformar células quimio-competentes de la cepa *E. coli* BL21star® mediante choque térmico según el protocolo descrito (Sambrook, 2006). Las transformantes fueron inoculadas sobre placas de medio LB con ampicilina (100 µg/ml) y crecidas a 37 °C toda la noche.

Las colonias resultantes se lavaron con medio LB para inocular 1 L de cultivo. El cultivo fue crecido a 37 °C en y 200 rpm hasta una D.O. de 0.6 a 600 nm, e inducido adicionando 0.5 mM IPTG. El cultivo se mantuvo a 16 °C y 200 rpm durante toda la noche. Posteriormente las células fueron centrifugados a 4,400 x g y se congelaron a – 80 °C hasta ser utilizadas.

La proteína se purificó con un protocolo modificado al descrito por Ramanagoudr-Bhojappa (2013). Las células se resuspendieron en buffer A (20 mM fosfato de sodio pH 7.5, 300 mM NaCl, 10 % glicerol y 1 mM PMSF). Para la lisis se adicionó lisozima a una concentración final de 0.5 µg/ml e incubó a 4 °C por 30 min. La muestra fue sonicada en hielo durante 10 ciclos de 30 seg por 1 min de descanso en hielo entre cada ciclo.

El lisado fue adicionado con 1mM PMSF y centrifugado a 17,300 x g a 4 °C durante 1 h. El sobrenadante filtrado se utilizó para la purificación mediante afinidad a níquel, usando la columna ya descrita.

Se utilizaron 15 volúmenes de buffer A para equilibrarla y añadir el extracto filtrado. La columna se lavó tres veces con 20 volúmenes del buffer A conteniendo respectivamente imidazol 0, 20, 40 y 50 mM, para eluir con 3 volúmenes del buffer A con imidazol 500 mM. El eluido fue dializado contra buffer B (20 mM Tris-HCl pH8, 20 mM NaCl, 10% de glicerol), adicionado inmediatamente con 1 mM EDTA, 2 mM DTT y la enzima *Presicion Protease*® e incubado a 4 °C por toda la noche.

Para el segundo paso de la purificación se utilizó una columna de intercambio iónico His-Heparin® equilibrada con el buffer B. La fracción dializada se añadió a la columna y se hicieron lavados de 30 volúmenes de buffer B con 50 mM NaCl y 30 volúmenes con 100 mM NaCl. La elución se hizo utilizando 500 mM NaCl para ser dializado contra el buffer de mantenimiento (20 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5 mg/ml BSA y 30% glicerol) a 4 °C durante toda la noche y almacenada a -80 °C.

### **6.2.3 Expresión y purificación de Rpo41 y Mtf1.**

La expresión y purificación se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado por (Velazquez, 2013).

## **6.3 Determinación de la capacidad de Mip1 para utilizar iniciadores de ADN y ARN.**

### **6.3.1 Formación de templados para los ensayos.**

Se utilizaron oligonucleótidos complementarios de 24 nt y de 45 nt (Anexo I). El iniciador de 24 nt fue marcado en el extremo 5' con  $\gamma$ -[P<sup>32</sup>]-ATP, usando T4 polinucleótido cinasa y fue purificado con el kit de eliminación de nucleótidos (Qiagen®) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Los sustratos fueron hibridados (24-45) a una concentración final de 10 nM en buffer de hibridación (20 mM Tri-HCl pH 7.5 y 150 mM NaCl) incubando a 95 °C por 5 min y se dejó bajar la temperatura paulatinamente hasta 20 °C aproximadamente antes de almacenarlos a -20 °C hasta su uso.

### ***6.3.2 Ensayo de actividad de polimerasa y exonucleasa de Mip1.***

La capacidad de polimerización de Mip1 fue evaluada con un sustrato de cadena doble constituido por una cadena templado de 45 nt hibridado a un iniciador de 24 nt de ADN o ARN, etiquetado con  $\gamma$ -[P<sup>32</sup>]-ATP a una concentración final de 1 nM.

La reacción se llevó a cabo en el buffer de reacción (20 mM Tris-HCl pH8, 20 mM KCl, 1 mM DTT y 0.5 mg/ml BSA) en presencia de 1 nM de sustrato (DNA-DNA o RNA-DNA), 0.3 nM de Mip1 e inicio al adicionar 10 mM MgCl<sub>2</sub> y 100  $\mu$ M de dNTP's incubando a 30 °C por los tiempos indicados en cada caso. La actividad de exonucleasa se analizó en reacciones bajo las mismas condiciones, en ausencia de dNTP's.

En ambos casos, para detener la reacción se utilizó buffer de paro (90% formamida, 50 mM EDTA y 0.01% xilen cianol), las muestras fueron desnaturalizadas al calentarse a 95 °C por 5 min y se pusieron en hielo inmediatamente.

Posteriormente, las muestras se analizaron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 16 % conteniendo 8 M de urea, a 50 watts constantes. El gel se dejó exponiendo toda la noche para visualizarse con un equipo Storm 840 PhosphorImager al día siguiente.

## **6.4 Eficiencia de transcripción por Rpo41: importancia de la secuencia del templado**

### **6.4.1 Ensayo de transcripción**

Las mezclas de reacción se hicieron utilizando buffer de transcripción (20 mM Tris-HCl pH 8, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT), 150 μM NTP's, 2 μCi/μl [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-ATP (3000 μCi/mmol), 5 μM de ADN del promotor sintético previamente hibridado (*14S*, *ori1*, *ori2*, *ori3*, *ori5* y *COX II*), 1 μM de Rpo41 y 3 μM de Mtf1 como se ha reportado anteriormente (Velazquez et al., 2012).

Las reacciones se incubaron a 30 °C y se detuvieron mediante la adición del buffer de paro ya descrito a los tiempos indicados. Las muestras se analizaron en un gel de poliacrilamida desnaturizante al 25%. Fueron reveladas mediante PhosphorImager después de 12 h de exposición.

## **6.5 Determinar si la apertura de las cadenas se relaciona con un elemento diferente a Mtf1**

### **6.5.1 Ensayo de transcripción en un templado de doble cadena o burbuja para evaluar el efecto de Mtf1**

El ensayo se llevó a cabo de igual manera que el ensayo de transcripción utilizando los templados *ori1* y *ori5* a una concentración 1 μM hibridados para formar un sustrato de doble cadena o de tipo burbuja (Anexo 1).

Para el ensayo se utilizó como control Rpo41ΔHNG (una mutante deletada en los residuos 641-643, correspondientes a la horquilla de intercalación necesaria para la apertura del promotor en un sustrato de doble cadena aún en presencia de Mtf1) (Velazquez et al., 2012).

## **6.6 Reconstitución del replisoma *in vitro***

### **6.6.1 Síntesis de ADN utilizando sustratos cortos de ADN de doble cadena**

Se utilizaron como sustrato los oligonucleótidos correspondientes a las secuencias promotoras que fueron hibridados previamente (ver Anexo 1). Las reacciones se hicieron utilizando el buffer de transcripción, 1  $\mu$ M de templado, 1  $\mu$ M de Rpo41, 3  $\mu$ M de Mtf1 y 3 nM de Mip1, 150  $\mu$ M NTP's, 250  $\mu$ M dATP, 250  $\mu$ M dTTP, 250  $\mu$ M dCTP, 10  $\mu$ M dGTP y 2  $\mu$ Ci/ $\mu$ l  $\alpha$ -[P<sup>32</sup>]-ATP (3000  $\mu$ Ci/mmol), condiciones modificadas de (Velazquez et al., 2012).

Las muestras fueron incubadas a 30 °C por 15 min y la reacción se detuvo adicionando buffer de paro y calentadas a 95 °C por 5 minutos para después ser analizadas en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 25% y 6 M urea. El gel fue expuesto toda la noche y revelado utilizando PhosphorImager.

### **6.6.2. Ensayo de síntesis de ADN utilizando como sustrato ADN de doble cadena**

Se utilizó el plásmido pUC19 conteniendo las secuencias promotoras clonadas entre los sitios *Hind* III y *Bam* HI (Velazquez et al., 2012). Las reacciones contenían el ADN a una concentración de 1 nM, 1  $\mu$ M de Rpo41, 3  $\mu$ M de Mtf1 y 3 nM de Mip1, 150  $\mu$ M NTP's, 250  $\mu$ M dATP, 250  $\mu$ M dTTP, 250  $\mu$ M dCTP, 10  $\mu$ M dGTP y los productos fueron marcados utilizando 2  $\mu$ Ci/ $\mu$ l [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-dGTP (3000  $\mu$ Ci/mmol). Se resolvieron en un gel nativo de agarosa al 0.8% que fue corrido a 3 volts/cm, secado al vacío y revelado mediante el PhosphorImager después de 12 h de exposición.

### **6.6.3 Ensayo de procesividad de Mip1**

El ensayo se llevó a cabo con el buffer de reacción (20 mM de Tris-HCl pH 8, 10 mM KCl, DTT 1 mM, BSA 100 mg/ml), utilizando 4 nM M13mp18 y 4 nM Mip1. La mezcla de reacción se incubó por 2 min a 30 °C y se dió inicio con la adición de 5 mM dNTP's y 2 mM MgCl<sub>2</sub>. La reacción se detuvo utilizando buffer de paro conteniendo 50 mM NaOH, 1 mM EDTA y 30% ficoll y la muestra se analizó en un gel de agarosa

desnaturalizante (alcalino) a 1.5 volts/cm por aproximadamente 14-16 h para después secarse al vacío a 40°C por 8 h.

## **6.7 Evaluación de la función de Rim1 en la síntesis de iniciadores por Rpo41 y la actividad de Mip1**

### **6.7.1 Efecto de Rim1 sobre la síntesis de iniciadores de ARN**

Se utilizó como templado el ADN de cadena sencilla M13mp18 (New England Biolabs) a una concentración de 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M de Rpo41, 3  $\mu$ M de Mtf1 y diferentes concentraciones de Rim1 (0.6, 1.2 y 2.4  $\mu$ M), 150  $\mu$ M de NTP's y los productos se marcaron con 2  $\mu$ Ci/ $\mu$ l  $\alpha$ -[P<sup>32</sup>]-ATP (3000  $\mu$ Ci/mmol).

Las reacciones se incubaron a 30 °C por 20 minutos y se detuvieron añadiendo buffer de paro. Los productos fueron separados en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 6% y 8 M urea.

### **6.7.2 Efecto de Rim1 sobre el uso de iniciadores de ARN**

Las reacciones se hicieron de igual manera que en el ensayo anterior, añadiendo 100 nM Mip1 y 250  $\mu$ M dNTP's, pero en este caso los productos fueron marcados con 2  $\mu$ Ci/ $\mu$ l  $\alpha$ -[P<sup>32</sup>]-dGTP (3000  $\mu$ Ci/mmol). Los productos de ADN se analizaron por medio de electroforesis en un gel de agarosa alcalino al 0.8 % a 1.5 v/cm, que fue posteriormente secado al vacío por aproximadamente 6 h a 40 °C.

### **6.7.3 Efecto del extremo C-terminal de Rim1 sobre la procesividad de Mip1**

El ensayo se llevó a cabo de igual manera que el de procesividad de Mip1, en presencia de 160, 320, 640 y 1280 nM Rim1. La reacción se detuvo mediante el buffer de paro (60 mM NaOH, 1 mM EDTA, 30% ficoll (v/v) y 0.025% azul de bromofenol). los productos se corrieron en un gel de agarosa alcalino al 0.8% de acuerdo al protocolo descrito a 2.5 volts/cm (Sambrook, 2006). El gel fue secado al vacío a 40 °C por aproximadamente 6 h, después fue expuesto por 12 h y revelado mediante PhosphorImager.

## **6.8 Evaluación de la capacidad de unión a ADN por Mip1 y Rim1**

### **6.8.1 Ensayo de unión a ADN mediante anisotropía**

#### **6.8.1a Unión a ADNcs por Rim1**

La afinidad de unión a ADN por Rim1 y sus mutantes truncadas en el C-terminal fue determinado por los cambio de anisotropía de los oligonucleótidos dT de cadena sencilla de 45 y 70 nt etiquetados en el extremo 3', el ensayo fue similar al descrito previamente (Ramanagoudr-Bhojappa et al., 2013).

Las reacciones contenían buffer de unión (25 mM Hepes pH 7.5 25 mM, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT y 0.1 mg/ml BSA), 33 nM de sustrato de ADN de cadena sencilla y diferentes concentraciones de Rim1 (0, 0.25, .5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64 nM) en placas de 96 pozos negros de fondo plano (Greiner Bio-One). Fueron incubadas a 25 °C por 5 min y los cambios de anisotropía fueron medidos utilizando el lector de microplacas con detector de fluorescencia (TECAN Infinite M1000) a una longitud de onda de emisión de 475 nm y de absorción de 520 nm. Se utilizó como solución de referencia una muestra de 1 nM fluoresceína. Los valores de K<sub>d</sub> fueron estimados usando el programa Prism 5.01 mediante el modelo de la ecuación  $Y=B_{max} * X/(K_d+X)$ . Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

#### **6.8.1a Unión a ADNdc por Mip1**

Para el ensayo de unión a ADN por Mip1 se utilizó un sustrato idéntico al del ensayo de actividad (24-45 nt), donde el sustrato de 24 nt se encuentra marcado con el fluoróforo. Las reacciones se realizaron en placas negros de 96 pozos de fondo plano (Greiner Bio-One) y contenían el buffer de reacción descrito en el ensayo de actividad, 1 nM ADN de cadena doble, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, concentraciones crecientes de las versiones de Mip1 (0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 128 nM) en presencia y ausencia de 5 μM ddGTP. Fueron incubadas a 30 °C por 5 min y los cambios de anisotropía fueron medidos utilizando el lector de microplacas con detector de fluorescencia (TECAN Infinite M1000) a una longitud de onda de emisión de 475 nm y de absorción de 520 nm. Se utilizó como solución de referencia una muestra de 1 nM

fluoresceína. Los valores de Kd fueron estimados usando el programa Prism 5.01 mediante el modelo de la ecuación de Michaelis Menten  $Y = V_{max} * X / (K_m + X)$ . Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### **6.8.2 Ensayo de movilidad electroforética (EMSA).**

#### **6.8.2a Unión a ADNcs por Rim1 mediante el ensayo de retardo.**

Se utilizó un sustrato idéntico al del ensayo de anisotropía (dT 45 y 70 nt) que fueron marcados con  $\gamma$ -[P<sup>32</sup>]-ATP en el extremo 5'. Las condiciones de reacción fueron las mismas que las del ensayo de anisotropía. Los productos fueron analizados mediante un gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes al 10 %. El gel fue revelado por autoradiografía, los datos analizados por densitometría utilizando el software Quant TL® y la Kd calculada con Prism 5.01.

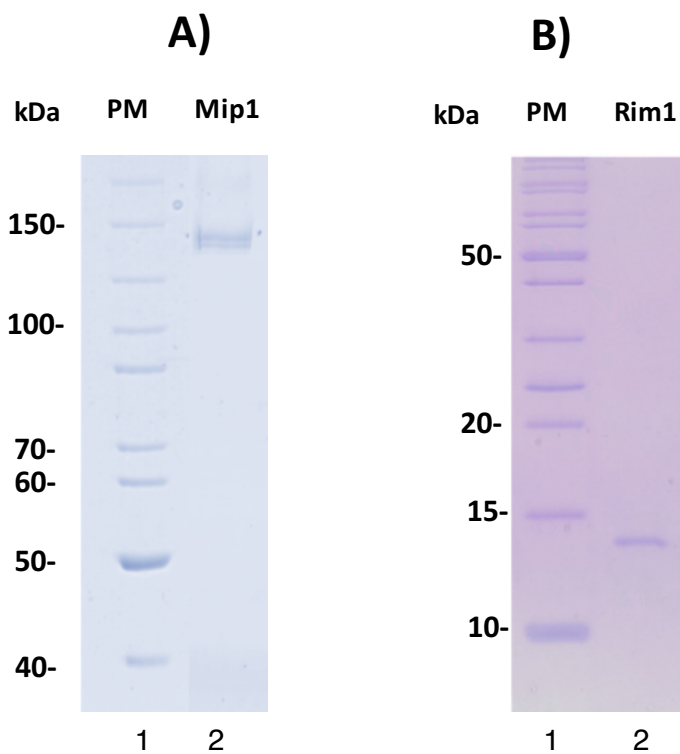


## VII. Resultados

### 7.1 Obtención de las proteínas silvestres

#### 7.1.1 Expresión y purificación de Mip1

Las proteínas Mip1 y Rim1 se obtuvieron por expresión en la cepa de *E. coli* Artic®. El rendimiento para Mip1 (144 kDa) fue de ~0.2 mg por litro de cultivo y el de Rim1 (13 kDa) de ~0.5 mg por litro de cultivo. En la Figura 8, se presentan los geles desnaturalizantes con las proteínas purificadas.



**Figura 8. Purificación de Mip1 y Rim1**

A) Gel SDS-PAGE al 8 % teñido con azul de Coomassie R250. Mip1 fue purificada de acuerdo al protocolo descrito en la Sección de Material y Métodos, obteniendo un rendimiento de 0.2 mg por 1 L de cultivo. Carril 1: marcadores de peso molecular. Carril 2: Mip1. B) Gel SDS-PAGE al 17% teñido con azul de Coomassie R250. Rim1 se purificó como se indica en material y métodos con un rendimiento de 0.5 mg/ml por 1 L de cultivo. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Rim1.

## **7.2 Mip1 es capaz de utilizar iniciadores de ADN y ARN**

### **7.2.1 Evaluación de la actividad de Mip1 sobre templados ADN:ADN**

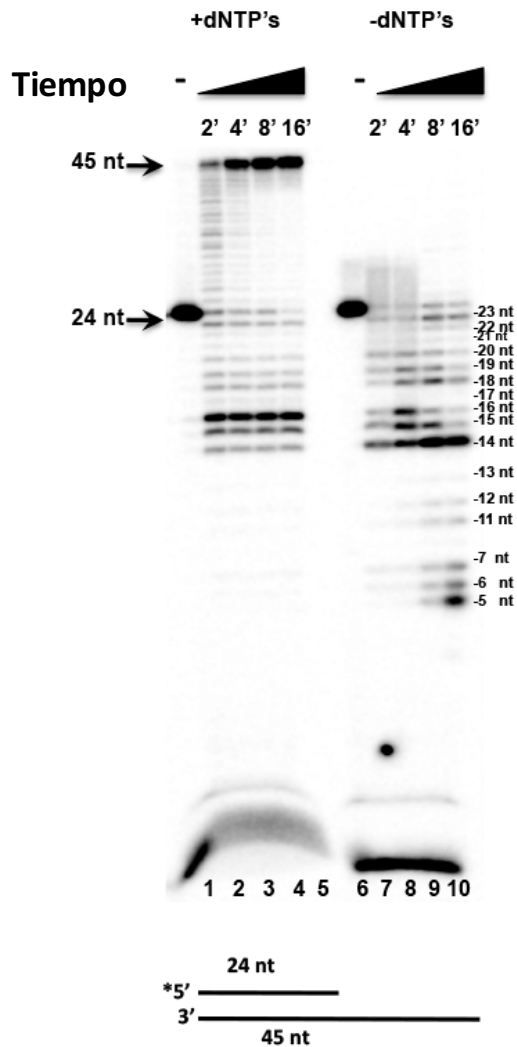
La capacidad de incorporación de dNTP's por Mip1, se determinó con un sustrato formado por un iniciador de ADN (24 nt) marcado con  $\gamma$ -[P<sup>32</sup>]-ATP e hibridado a un ADN templado de 45 nt. La reacción se detuvo a los 0, 2, 4, 8 y 16 min, tomando muestra en cada tiempo.

La figura 9 muestra que Mip1 es capaz de extender el iniciador de ADN de 24 nt hasta un producto de 45 nt en presencia de dNTP's. Cuando el tiempo de reacción fue de 4 minutos, se ha utilizado el ~90% del sustrato de acuerdo a la intensidad de la banda.

La actividad 3'-5' exonucleasa fue demostrada por la aparición de bandas de menor tamaño, que son el resultado de la degradación del iniciador marcado (Figura 9, carriles 1 a 5). Por lo tanto, se puede concluir que Mip1 presenta un equilibrio entre la actividad de polimerasa y de exonucleasa de acuerdo al tiempo de incubación.

Por otro lado, se evaluó la actividad de exonucleasa utilizando el mismo sustrato en ausencia de dNTP's. Los productos de degradación fueron desde un tamaño de 23 hasta 5 nt, proporcional al tiempo de reacción (Figura 9, carriles 6 al 10), por lo que consideramos a Mip1 funcional en las condiciones de trabajo, al ser capaz de extender y degradar un iniciador de ADN. Este resultado es similar al que se ha observado en trabajos anteriores (Viikov et al., 2011).

±



**Figura 9. Mip1 es capaz de extender iniciadores de ADN y muestra actividad de 3'-5' exonucleasa sobre un templado ADN-ADN**

Gel de poliacrilamida desnaturalizante al 16%, que muestra el equilibrio entre la capacidad de extender un iniciador de ADN y la degradación por la actividad de exonucleasa. Se utilizó un sustrato de 45 nt hibridado a un oligonucleótido de 24 nt marcado con  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP, que sería utilizado como iniciador por Mip1, como se indica en el esquema en la parte baja de la imagen. La reacción se llevó a cabo en las condiciones indicadas en Material y Métodos; en presencia de dNTP's (carriles 1 al 5). Se puede observar la capacidad de formación de producto de manera progresiva de acuerdo al tiempo de incubación con productos de la extensión desde 25 hasta 45 nucleótidos, manteniendo un equilibrio con la actividad de exonucleasa. En ausencia de dNTP's (carriles 6 al 10), la actividad de exonucleasa se observa progresiva en relación al tiempo de reacción, obteniendo un producto de degradación desde 23 hasta 5 nucleótidos.

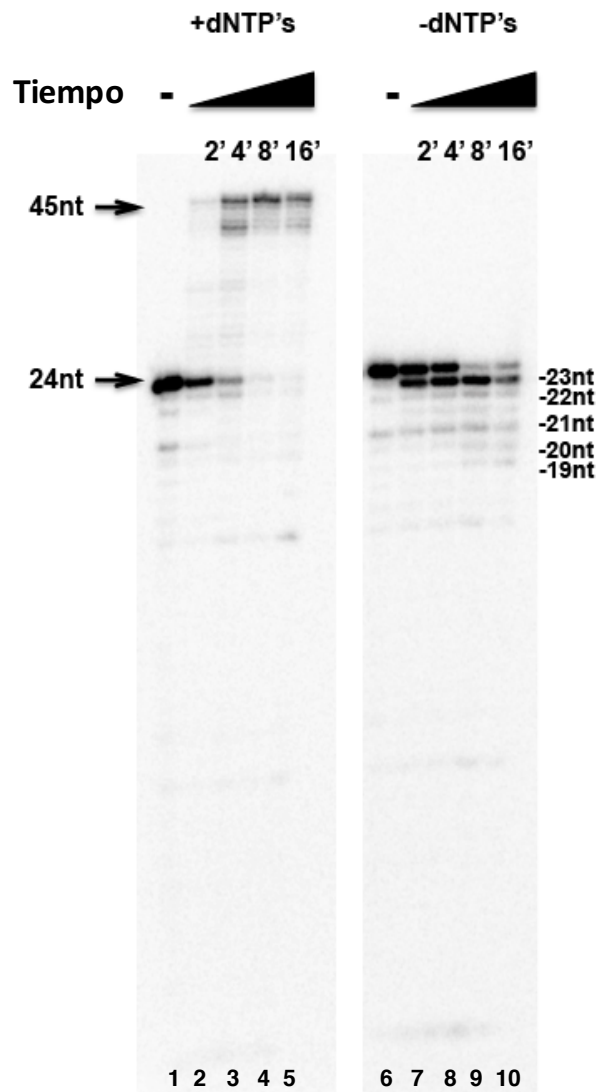
### **7.2.2 Evaluación de la actividad de Mip1 sobre templados híbridos de ARN:ADN**

En el replisoma mitocondrial de humano, la RPOLMT es la encargada de la síntesis de fragmentos cortos de ARN utilizados como iniciadores por POLG, funcionando como primasa (Wanrooij et al., 2008). Pensando en que Rpo41 al igual que la ARN polimerasa mitocondrial de humano sintetiza iniciadores de ARN, decidimos evaluar si Mip1 era capaz de utilizar fragmentos de ARN como iniciadores.

Para el ensayo utilizamos un sustrato similar al del ensayo anterior, con un templado híbrido formado con un iniciador de ARN (24 nt) marcado con  $\gamma$ -[P<sup>32</sup>]-ATP e hibridado a un oligonucleótido complementario de ADN (45 nt). La actividad se detuvo a los 0, 2, 4, 8 y 16 minutos.

El iniciador se extendió hasta un producto de 45 nt pero los productos de degradación son de mayor tamaño y en menor proporción que los obtenidos con un sustrato de ADN (Figura 10, carriles 1 al 5). Además al comparar con el sustrato ADN-ADN, Mip1 es más eficiente utilizando un iniciador de ADN que de ARN a los 4 minutos (Figura 9 y 10, carril 3) ya que sólo el 60% del iniciador fue extendido a los 4 min.

La evaluación de la actividad de exonucleasa se hizo sobre un sustrato de ARN en ausencia de dNTP's, similar al ensayo anterior. Los productos de degradación obtenidos fueron de 23, 22, 21, 20 y 19 nt (Figura 10, carriles 6 al 10) a diferencia del ensayo con ADN donde el fragmento más pequeño fue de 5 nt a los 8 y 16 minutos (Figura 9, carriles 9 y 10). De tal manera que se concluye que Mip1 es capaz de extender y degradar iniciadores de ADN y ARN, pero con diferente eficiencia.



**Figura 10. Mip1 es capaz de extender iniciadores de ARN y muestra actividad de 3'-5' exonucleasa sobre un híbrido de ARN-ADN**

Gel de poliacrilamida desnaturalizante al 16%, que muestra la capacidad de Mip1 de polimerasa y exonucleasa sobre un sustrato híbrido ARN-ADN. Se utilizó como sustrato un oligonucleótido de 24 nt de ARN marcado con  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$  hibridado a un oligonucleótido de ADN de 45 nt. La reacción se hizo bajo las condiciones indicadas en Material y Métodos. Mip1 tiene capacidad de polimerasa y exonucleasa de manera progresiva de acuerdo al tiempo en presencia de dNTP's (carriles 1 al 5). En ausencia de dNTP's (carriles 6 al 10), Mip1 tiene actividad de exonucleasa progresiva en relación al tiempo, hasta un fragmento de 19 nucleótidos. Mip1 es capaz de extender un híbrido ADN-ARN sin equilibrio entre polimerasa/exonucleasa.

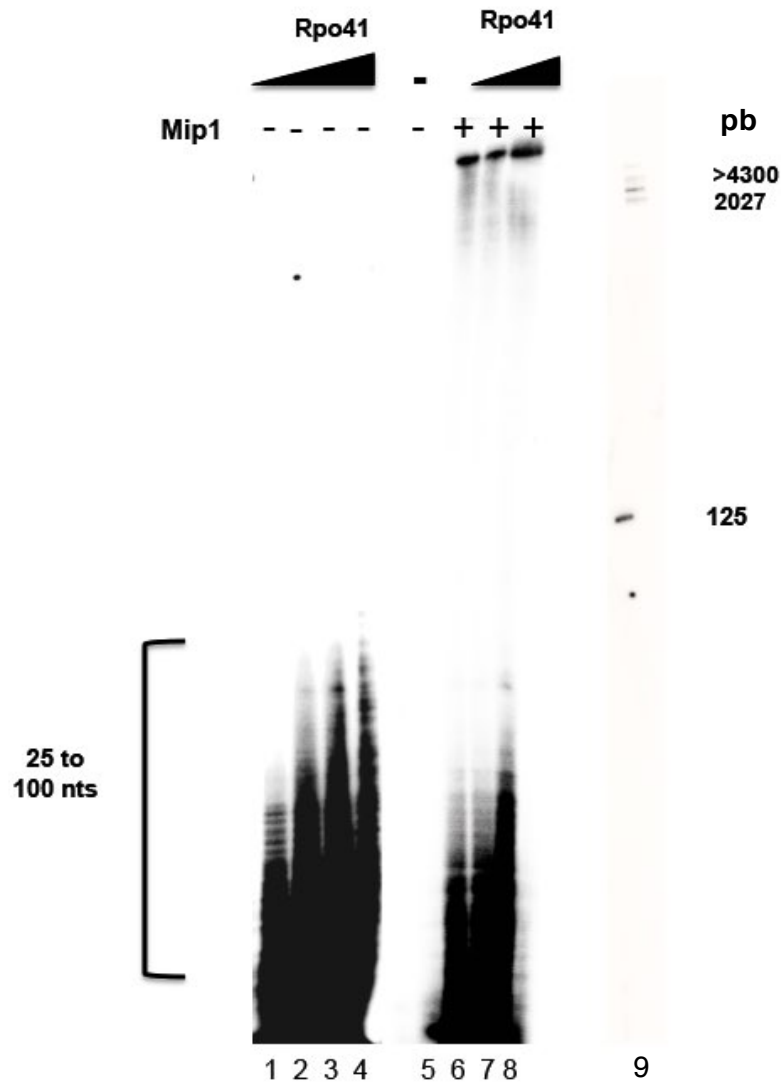
### **7.2.3 Rpo41 sintetiza iniciadores sobre ADN de cadena sencilla y son utilizados por Mip1**

De acuerdo a los datos anteriores, Mip1 es capaz de utilizar fragmentos de ARN como iniciadores y de degradarlos. Por lo tanto, Rpo41 podría funcionar como primasa similar a lo que ocurre en la mitocondria de humano (Wanrooij et al., 2008). Partiendo de esta premisa, decidimos evaluar la actividad de Rpo41 en conjunto con Mip1.

Para el ensayo se utilizaron diferentes concentraciones de Rpo41 (1, 4, 16 y  $64 \times 10^{-7}$  M), M13mp18 ADN de cadena sencilla como sustrato en presencia de  $\alpha$ - $[P^{32}]$ -ATP. Se obtuvieron productos de ARN de ~25-100 nt de acuerdo a la concentración de Rpo41 (Figura 11, carriles 1 al 4). Al tener la formación de estos fragmentos de ARN, era importante determinar si Mip1 podría utilizarlos como iniciador y extenderlos hasta un producto de mayor tamaño por adición de dNTP's.

Para determinar la extensión de los fragmentos de ARN por Mip1, las reacciones se hicieron bajo las mismas condiciones del ensayo anterior, adicionando 2 mM dNTP's y  $1 \times 10^{-7}$  M Mip1, con 15 min de incubación a 30 °C.

Se obtuvo un producto de ADN >4 kb, lo que indica, que Mip1 fue capaz de extender los fragmentos de ARN (~100 nt) sintetizados por Rpo41 desde la concentración más pequeña (Figura 11, carriles 5 al 8)



**Figura 11. Los fragmentos pequeños de ARN sintetizados por Rpo41 son utilizados por Mip1 como iniciadores**

Gel de poliacrilamida desnaturalizante al 6%. El ensayo se hizo utilizando como sustrato ADN de cadena sencilla M13mp18 en presencia de  $\alpha$ -[ $P^{32}$ ] ATP y Rpo41 en concentraciones crecientes (1, 4, 16 or  $64 \times 10^{-7}$  M), el cual fue capaz de sintetizar productos cortos de ARN (carriles 1 al 4) y al adicionar Mip1 a una concentración constante ( $1 \times 10^{-7}$  M) fue capaz de extender dichos fragmentos de ARN hasta obtener un producto de  $>4$  kb (carriles 5 al 8). El marcador de peso molecular, se muestra en negro (ADN del bacteriófago  $\lambda$  *Hind*III, NEB®) (carril 9). Estos resultados revelan que los fragmentos cortos de ARN sintetizados por Rpo41 son utilizados como iniciadores por Mip1.

## 7.3 Rpo41 tiene baja eficiencia con las secuencias de orígenes de replicación

### 7.3.1 Evaluación de la actividad de Rpo41 en la formación de transcritos con secuencias de orígenes de replicación

Tomando en cuenta que se han descrito en el genoma mitocondrial de *S. cerevisiae* secuencias conservadas de nueve nucleótidos (5'-TATAAGTAA[+2]) en 14 secuencias promotoras, 4 orígenes de replicación y algunas no codificantes (Biswas, 1999). Decidimos utilizar las secuencias de los orígenes de replicación (*oris*), para evaluar si son templados activos para la transcripción en comparación con secuencias promotoras fuertes reportadas previamente por el grupo de laboratorio (*14S* y *COX II*) (Velazquez et al., 2012).

En el ensayo se utilizó como sustrato el plásmido pUC19 conteniendo las secuencias de *ori1*, *ori2*, *ori3* y *ori5*, *14S* o *COX II* (Tabla 4) previamente linearizados con *Hind* III, en presencia de  $\alpha$ -[P<sup>32</sup>]-ATP para evidenciar la formación de ARN por actividad de Rpo41.

Los transcritos sintetizados fueron de 2 a 10 nucleótidos en el sustrato *14S*, *COX II*, *ori1* y *ori2* (Figura 12, carriles 1-4), además de un producto terminal de 65 nt de igual manera que con las secuencias de *ori3* y *ori5*, las cuales tienen el mismo patrón de bandeo (Figura 12, carriles 5 y 6).

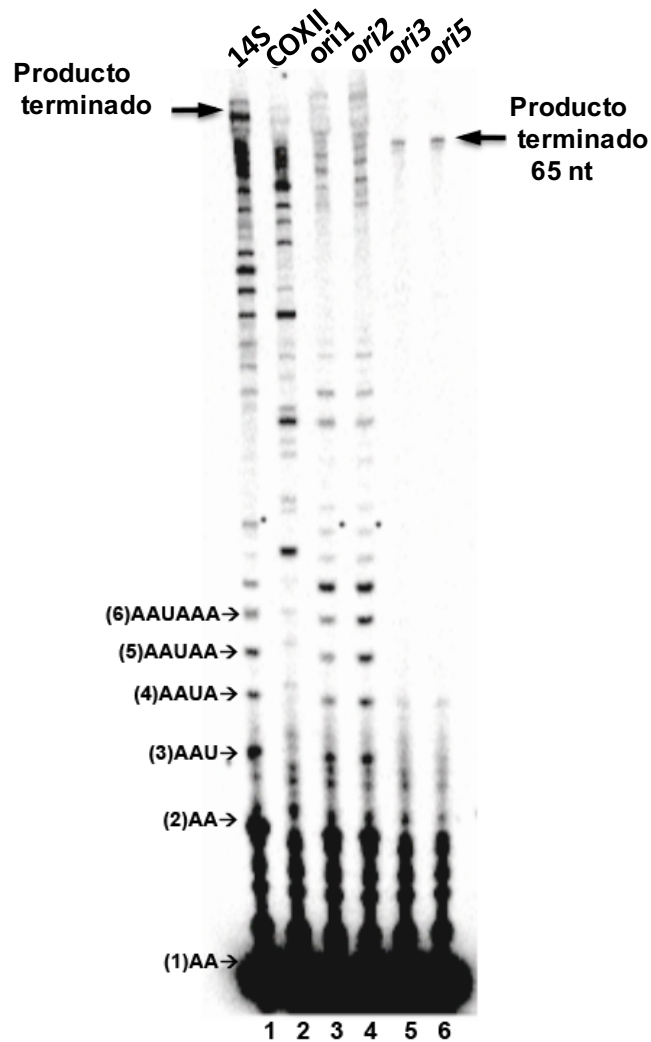
Cuándo se cuantificó de acuerdo a la intensidad de banda, el producto final fue ~4.3 veces más abundante al utilizar *14S* como templado en comparación con *ori1* y *ori2* (Figura 12, carriles 1, 3, y 4 respectivamente) y ~2.7 veces mayor en comparación con *ori3* y *ori5* (Figura 12, carriles 1, 5 y 6 respectivamente).



**Tabla 4. Secuencias promotoras utilizadas como templatado**

Nombre	Secuencia
<b>14S</b>	5'-AATTCATTTATTTATTATTATATAAGT <u>AATAAAGAATAGTTT</u> TATATACTAATAATAATATAG-3'
<b>COX II</b>	5'-CTTGAATTCATTTTAATTAAGT <u>AGTATTAACATATTATAAATAGACAAAAGAGTCTA</u> -3'
<b>ori1</b>	5'-CTTGAATTCATAAATATATAAGT <u>AATAAATTAAGTTT</u> TATAGGGGGAGGGGGTGGGTGAGGATCCCTTG-3'
<b>ori2</b>	5'-CTTGAATTCGTAAATATATAAGT <u>AATAAATTAAGTTT</u> TATAGGGGGAGGGGGTGGGTGGGATCCCTTG-3'
<b>ori3</b>	5'-CTTGAATTCCTGGATATATAAGT <u>AATAGGGGGAGGGGGTGGGTGATTAGAACTAGAATGGATCCCTTG</u> -3'
<b>ori5</b>	5'-CTTGAATTCATTTAAATATAAGT <u>AATAGGGGGAGGGGGTGGGTGATAATAACCAGAATGGATCCCTTG</u> -3'

\*En negritas se muestra la posición [+1], el dominio subrayado se comparte entre las secuencias y la secuencia en rojo presenta el posible g-quadrúplex.



**Figura 12. Diferencias en los patrones de transcripción entre el templado con secuencia de inicio (*oris*) en comparación con la de secuencias promotoras 14S y COX II**

Gel de poliacrilamida desnaturalizante al 25%. Productos transcritos por Rpo41 sobre secuencias promotoras y de orígenes de replicación. El templado fue el plásmido pUC19 conteniendo la secuencia correspondiente, linealizado con *Hind* III. El ensayo se realizó de acuerdo a lo descrito en la Sección de Material y Métodos. Los productos abortivos se señalan a la izquierda de la figura indicando el número de nucleótidos entre paréntesis y los productos completos (run-off o de término) se muestran con una flecha. La secuencia del templado determina el producto obtenido y la procesividad.

## 7.4 Rpo41 es capaz de sintetizar iniciadores sobre ADN de doble cadena en presencia de Mtf1

De acuerdo a los datos obtenidos en cuanto a las secuencias promotoras y de *oris*, donde Rpo41 lo utiliza como sustrato para la síntesis de ARN y estos fragmentos pueden ser extendidos por Mip1. Nosotros decidimos evaluar la capacidad de Rpo41 para formar iniciadores sobre ADN de doble cadena y así ser utilizados por Mip1.

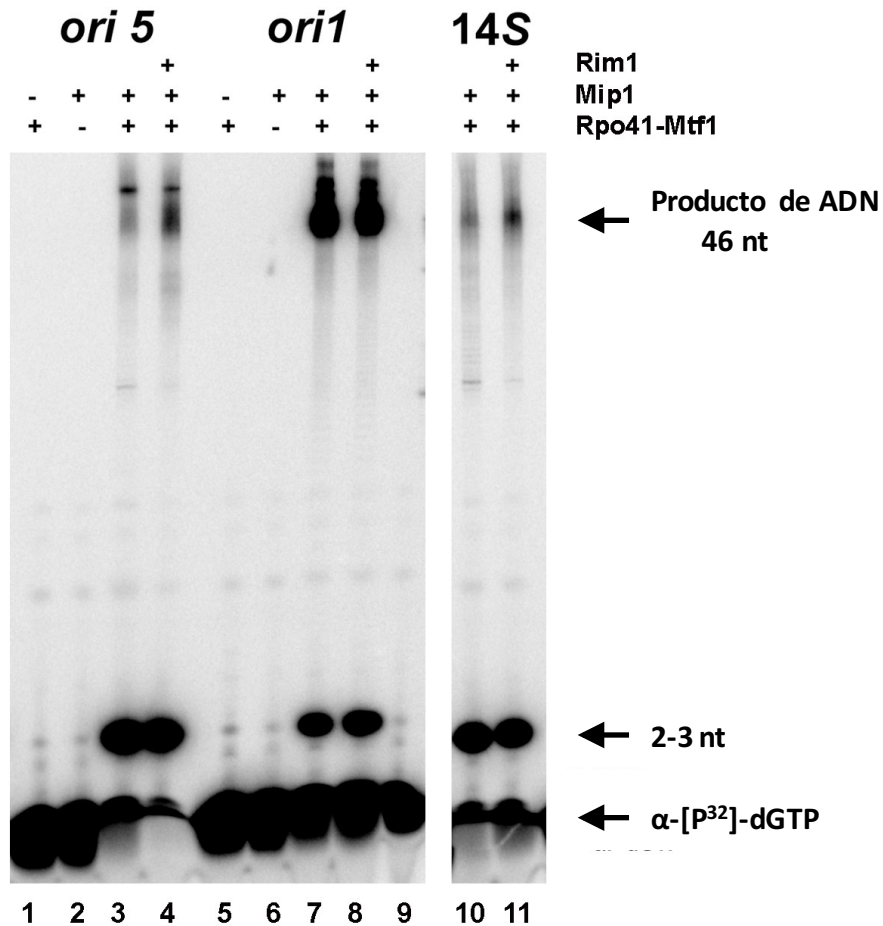
Para el ensayo se utilizaron oligonucleótidos sintéticos hibridados, correspondientes a la cadena templado y no templado de la secuencia de *ori1*, *ori5* o *14S* (ver Anexo 1), en presencia de Rpo41, Mtf1 y Mip1, como se indica en cada caso.

El producto observado es la incorporación de  $\alpha$ -[P<sup>32</sup>]-dGTP por parte de Mip1, por lo tanto cuando solamente estuvo presente el complejo Rpo41-Mtf1 no hay un producto visible, ya que Rpo41 no puede incorporar dNTP's (Figura 13, carriles 1 y 5). En presencia exclusiva de Mip1, tampoco se formó un producto ya que requiere de un iniciador para la incorporación de dGTP (Figura 13, carriles 2 y 6). En ambos casos solamente se presenta la señal correspondiente a  $\alpha$ -[P<sup>32</sup>]-dGTP, de acuerdo al control sin proteínas (Figura 13, carril 9).

Cuando el ensayo se efectuó con el complejo Rpo41-Mtf1 en presencia de Mip1, se logró la formación de un producto de ADN de ~46 nt en todos los templados utilizados (Figura 13, carriles 3, 7 y 10). Aunque *ori1* provoca la síntesis de un producto ~12 veces más intensa en comparación con *ori5* y *14S* (Figura 13, carriles 3, 7 y 10 respectivamente).

Debido a que Rim1 es una proteína de unión a ADN de cadena sencilla que permite evitar estructura secundarias y se considera importante para el mantenimiento del genoma mitocondrial en levadura (Van Dyck et al., 1992). Además de que proteínas similares en otros sistemas permiten la estimulación de las ADN polimerasas (Farr et al., 2004; Ghosh et al., 2010).

Considerando este antecedente, en el ensayo incluimos a Rim1 (Figura 12, carriles 4 y 8). La concentración del producto de ADN fue ~1.5 veces mayor con el sustrato *ori1* y *14S* (Figura 13, carriles 4 y 8 respectivamente). Además hay un fragmento de 2 a 3 nt (Figura 13, carriles 3, 4, 7, 8, 10 y 11), se atribuye a un error de Mip1 en la incorporación del nucleótido, que quizá no se presenta cuando la enzima sola está en contacto con el sustrato debido a la estructura de doble cadena que evita la incorporación (Figura 13, carriles, 2 y 6).



**Figura 13. Síntesis de iniciadores por Rpo41 utilizados por Mip1 en sustratos cortos de doble cadena**

Gel de poliacrilamida desnaturalizante al 25%. Incorporación de  $\alpha$ -[P<sup>32</sup>]-dGTP sobre ADN sintético conteniendo la secuencia de *ori1*, *ori5* y *14S*. El complejo Rpo41-Mtf1 y Mip1 sola no es capaz de incorporar  $\alpha$ -[P<sup>32</sup>]-dGTP sobre el sustrato (Carriles 1 y 5, 2 y 6 respectivamente). Rpo41, Mtf1 y Mip1 sintetizaron un producto de ~46 nt (Carriles 3, 7 y 10). Rim1 incrementó el producto 1.5 veces sobre *ori1* y *14S* (carriles 4 y 11). Carril 9: Control de  $\alpha$ -[P<sup>32</sup>]-dGTP en ausencia de proteínas.

## 7.5 Mip1 puede utilizar iniciadores cortos o largos de ARN

### 7.5.1 Determinación de la longitud de iniciador necesaria para Mip1

Rpo41 sintetiza iniciadores que pueden ser utilizados por Mip1 utilizando secuencias correspondientes a orígenes de replicación y al promotor *14S*. Sin embargo, no está definida la longitud mínima de iniciador que Mip1 puede reconocer. Por lo tanto, para responder a esto se llevó a cabo la síntesis de iniciadores por Rpo41 utilizando diferentes mezclas de NTP's, en presencia de  $\alpha$ -[P<sup>32</sup>]-ATP, para todos los casos. Esto nos permitiría observar iniciadores de diferentes longitudes, ya fuesen extendidos o no por Mip1, utilizando las secuencias de *ori1* y *ori5* debido a la diferencia del contenido nucleotídico como se observa en la Tabla 4.

En primer lugar se evaluó solamente con ATP, lo que permitiría obtener un producto de 2 a 3 nt de acuerdo a la secuencia descrita (Tabla 4), los transcritos obtenidos cumplen con el tamaño esperado pero no son extendidos por Mip1 (Figura 14, carriles 1 y 5). Cuando la mezcla contenía ATP+UTP, el transcrito para *ori1* fue de 10 nt y para *ori5* de 4 nt, lo cual concuerda con la secuencia, y estos no tienen la longitud para servir como iniciadores (Figura 14, carriles 2 y 6).

Finalmente, en presencia de ATP+UTP+GTP y de ATP+UTP+GTP+CTP el transcrito formado puede ser de 11-40 nt en el caso de *ori1* y de 5-28 nt en el caso de *ori5*. Estos iniciadores fueron funcionales y se obtuvo un producto final de 46 nt (Figura 14, carriles 3-4 y 7-8 respectivamente), lo cual indica la importancia de la longitud mínima necesaria que es de 11 nt para que Mip1 sea capaz de llevar a cabo la extensión a partir de una cadena de ARN *in vitro*.

Con la idea de abordar desde otro punto de vista la importancia de la longitud de los iniciadores y determinar si los productos abortivos son utilizados por Mip1, se utilizaron dideoxynucleótidos (ddNTP's) en presencia de  $\alpha$ -[P<sup>32</sup>]-dGTP, que serían incorporados por Mip1. Se utilizó como control la reacción en presencia de

todos los dNTP's, observándose la formación de un producto de 46 nt en *ori1* y *ori5* (Figura 14, panel C y D, carril 1).

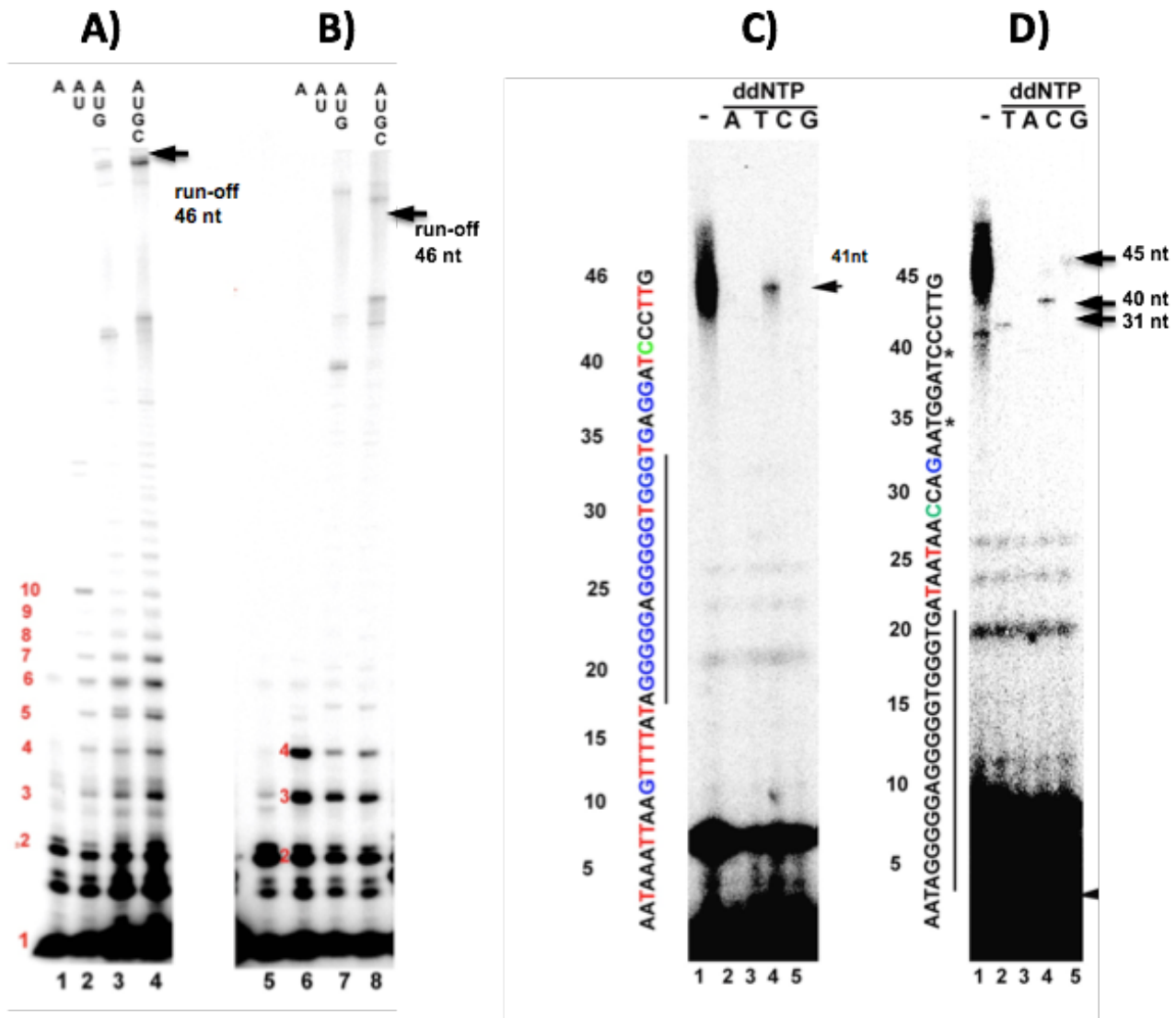
Al utilizar el ddNTP correspondiente al final de la cadena, Mip1 sería incapaz de seguir incorporando nucleótidos debido a la falta de un grupo hidroxilo libre en el ddNTP. En primer lugar, en *ori1* (Figura 14, panel C) utilizado como templado de doble cadena, los dATP, dTTP y dGTP utilizados fueron sustituidos por el ddNTP correspondiente, y no se observó la formación de producto (Figura 14, panel C, carriles 2, 3 y 5).

Al utilizar ddCTP como sustituto de dCTP, se obtuvo un producto de 41 nt, que representa la posición +11, correspondiente a la primera incorporación de dCTP señalada en azul en la secuencia (Figura 14, panel C, carril 4). Esto indica que un iniciador de 10 nt puede ser utilizado por Mip1, lo cual concuerda con el experimento anterior.

En lo que respecta a *ori5*, en presencia de ddTTP, ddCTP y ddGTP se observaron productos de 31, 40 y 45 nt (Figura 14D, carriles 2, 4 y 5), los cuales corresponderían a un iniciador de 3 nt y 5 nt en presencia de ddTTP y ddGTP, respectivamente.

Es claro que hay diferencias entre el uso de *ori1* y *ori5*, podrían deberse a la secuencia presente en cada uno y la formación de una estructura putativa denominada G-cuadrúplex, debido a la presencia de las secuencias ricas en dGTP en las posiciones +19 a +34 en *ori1* y +5 a +20 en *ori5*.

Estos resultados sugieren que en *ori1*, los transcritos cortos previos a la formación de la estructura funcionan como un iniciador, y en *ori5* necesita de un transcrito de 29 nt.



**Figura 14. Ensayo para determinar la longitud mínima del iniciador.**

Gel de poliacrilamida desnaturalizante al 25%. Se muestra la incorporación de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dGTP}$  sobre ADN sintético correspondiente a las secuencias de *ori1* y *ori5* (A-C y B-D respectivamente). El ensayo se llevó a cabo en las condiciones indicadas en la Sección de Material y Métodos. En la parte superior de cada gel se indica los nucleótidos que fueron utilizados en cada caso (A y B) o el deoxinucleótido utilizado (C y D) para detener la síntesis y determinar la longitud mínima necesaria para la replicación. Carriles 1-4: Adición de NTP's continuos sobre *ori1* y carriles 5-8 sobre *ori5*. Se determinó la formación de G-quadruplex en la secuencia mediante adición de ddNTP en *ori1* (panel C) y *ori5* (panel D). Como se puede observar en estos resultados se requiere de 11 nt mínimo para dar inicio a la síntesis de ADN.



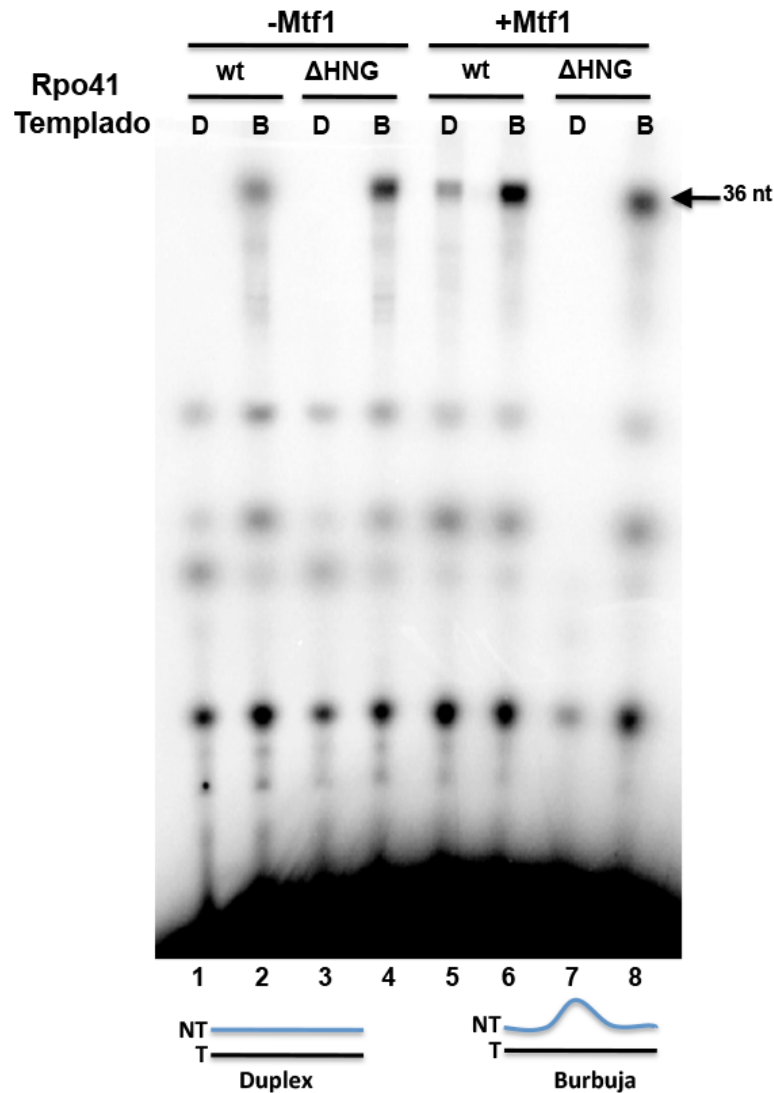
## **7.6 Mtf1 es necesario para la apertura del promotor de doble cadena, pero no para el uso de iniciadores por Mip1**

En estudios previos, se ha descrito la importancia de Mtf1 en la apertura del promotor en templados de doble cadena durante el inicio de la transcripción por parte de Rpo41 (Matsunaga y Jaehning, 2004). La región de los residuos 641-643 de Rpo41 forman una estructura con función análoga a la horquilla de intercalación  $\beta$  de la T7RNAP, asociadas con la apertura del promotor durante la etapa de iniciación (Briebaet al., 2001). Por lo tanto, decidimos utilizar Rpo41 y como control una mutante deficiente en la capacidad de apertura del promotor ( $\Delta$ HNG), con una deleción en los residuos 641-643 obtenida en un trabajo previo (Velazquez et al., 2012), para determinar si Mtf1 es el encargado de la apertura del promotor.

Para este ensayo se evaluó la incorporación de  $\alpha$ -[P<sup>32</sup>]-dGTP utilizando dos tipos de templados mediante ensayos de transcripción de termino ("run-off"). Los templados fueron en conformación de doble cadena complementaria (totalmente hibridados), y el otro posee una región de burbuja (región con nucleótidos desapareados de la posición -4 a +2).

Mtf1 fue necesario para la formación de transcritos por parte de Rpo41, en el sustrato de doble cadena (Figura 15, carril 5) y no para el sustrato tipo burbuja (Figura 15, carriles 2 y 6). La mutante  $\Delta$ HNG incapaz de abrir el promotor aún en presencia de Mtf1 no sintetizó transcritos y por consiguiente no se observa producto de ADN (Figura 15, carriles 3 y 7), como había sido descrito (Velazquez, 2013).

Mip1 es capaz de utilizar los iniciadores de ARN sintetizados por Rpo41, independiente de la presencia de Mtf1, pero se requiere del factor de transcripción para la apertura de las cadenas y por tanto la disposición del templado en el sistema replicativo.



**Figura 15. Mtf1 es requerido para la apertura del promotor en la replicación**

Gel de poliacrilamida desnaturalizante al 20%. El ensayo se realizó bajo las condiciones indicadas en la Sección de Material y Métodos, utilizando un sustrato de doble cadena y otro tipo burbuja, con Rpo41 y proteínas accesorias en presencia de  $\alpha$ -[ $P^{32}$ ]-dGTP. La actividad de ADN polimerasa se evaluó utilizando Rpo41 (carriles 1,2, 5 y 6) o Rpo41 $\Delta$ HNG (carriles 3,4, 7 y 8) para la síntesis de iniciadores sobre un templado tipo duplex (carriles 1, 3, 5 y 7) y uno con estructura de burbuja (carriles 2, 4, 6 y 8), en presencia (carriles 1-4) y ausencia de Mtf1 (carriles 5-8). Al pie de la figura se muestra un esquema que representa los sustratos utilizados. Por lo tanto se observa que Mtf1 es indispensable para la formación de la estructura tipo burbuja, así como que la orquilla  $\beta$  de Rpo41 se requiere para permitir la síntesis de iniciadores y estos sean utilizados por Mip1.

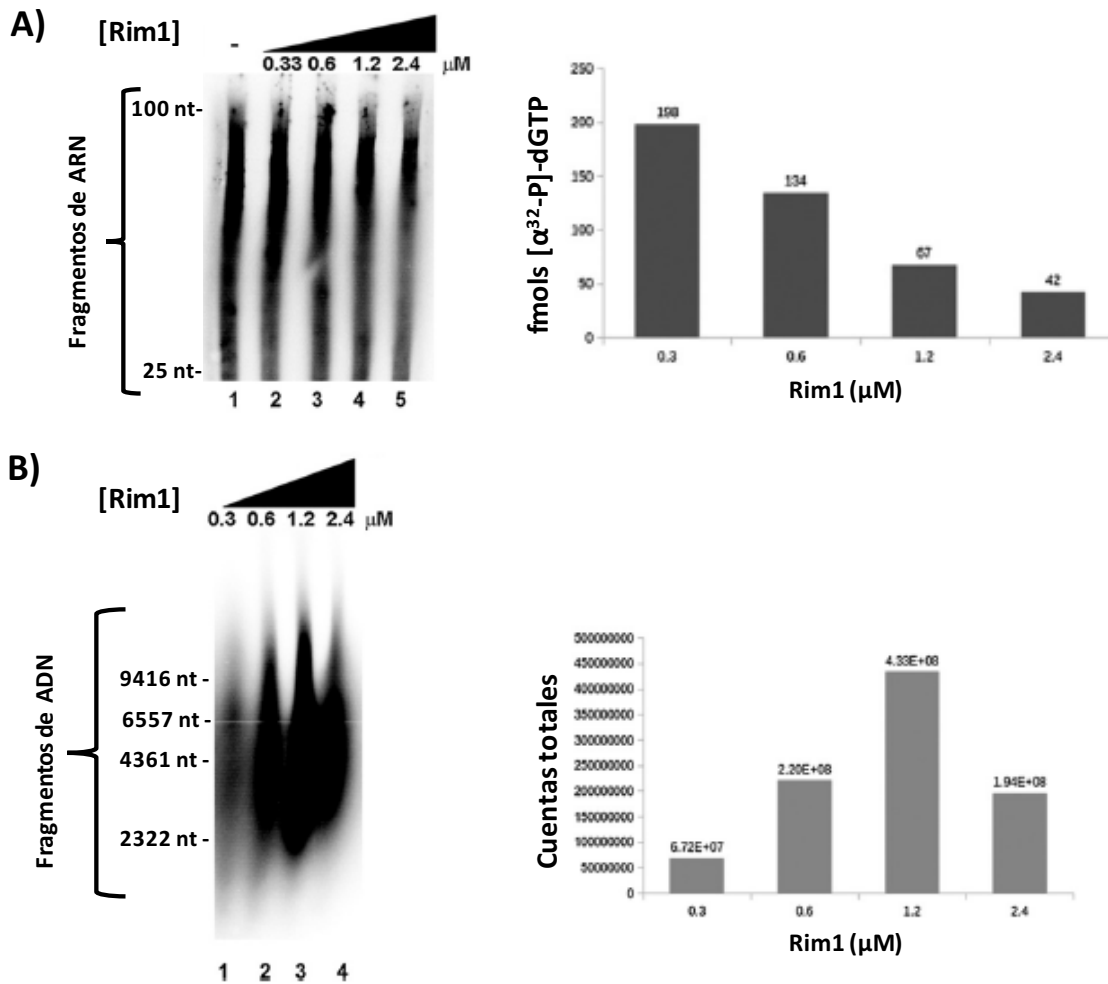
## **7.7 Rim1 es capaz de i la síntesis de iniciadores por Rpo41 e incrementa la eficiencia de su uso por Mip1**

En el sistema de replicación mitocondrial humano SSB disminuye la formación de iniciadores por parte de POLRMT e incrementa la síntesis de ADN por la POLG (Wanrooij et al., 2008). Entonces evaluamos si Rim1 tenía algún efecto en la actividad de Rpo41 para la formación de fragmentos de ARN y sobre la capacidad de Mip1 para utilizarlos.

El ensayo se hizo mediante la incorporación de  $\alpha$ -[P<sup>32</sup>]-ATP por Rpo41 a una concentración fija de  $1 \times 10^{-7}$  M en presencia de concentraciones crecientes de Rim1 (0, 6.75, 12.5, 25 y  $50 \times 10^{-7}$  M), utilizando como templado ADN de cadena sencilla M13mp18. Para determinar si Rim1 afectaba la actividad de Mip1 para el uso de los iniciadores, el experimento fue similar pero en presencia de  $\alpha$ -[P<sup>32</sup>]-dGTP.

Rim1, al unirse al ADN de cadena sencilla es capaz de cubrirlo y consigue disminuir la síntesis de iniciadores de ARN por la Rpo41 (Figura 16, panel A, carriles 1 al 5). Se puede observar que la inhibición es proporcional al incremento de concentración de Rim1.

La incorporación de  $\alpha$ -[P<sup>32</sup>]-dGTP por Mip1 utilizando las mismas concentraciones de Rim1 y Rpo41, permitió darnos cuenta de que concentraciones crecientes de Rim1 estimulan la formación de ADN por parte de la actividad de Mip1 (Figura 16, panel B, carriles 1 al 4).



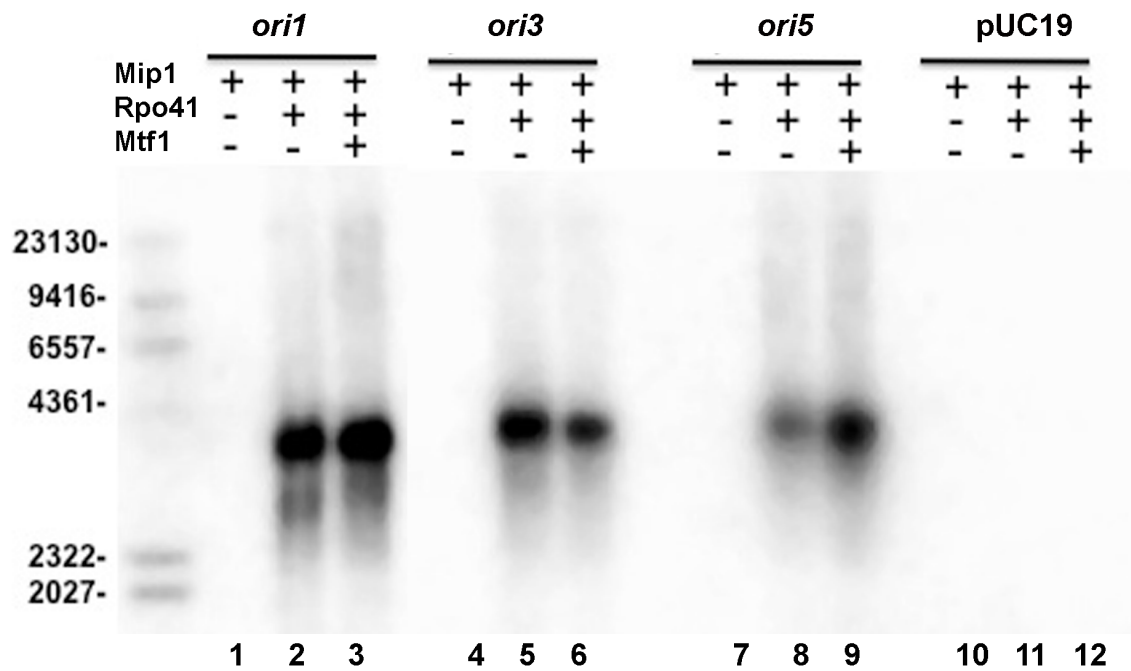
**Figura 16. Rim1 disminuye la síntesis de iniciadores por Rpo41 e incrementa la eficiencia de Mip1**

**A)** Gel de poliacrilamida desnaturalizante al 10%. Síntesis de ARN mediante la incorporación de  $\alpha\text{-}[P^{32}]\text{-ATP}$  por Rpo41 sobre M13mp18 de acuerdo a las condiciones descritas en Material y Métodos con concentraciones crecientes de Rim1 (0, 6.75, 12.5, 25, 50 y  $10^{-7}$  M). **B)** Síntesis de ADN. En un gel de agarosa desnaturalizante al 1 %, se muestra la incorporación de  $\alpha\text{-}[P^{32}]\text{-GTP}$  por Mip1 en las mismas condiciones. Por lo tanto la disminución en la síntesis de iniciadores por parte de Rpo41, mejora la eficiencia en su utilización e incrementa la concentración del producto cerca de dos veces con 1.2  $\mu\text{M}$  de Rim1.

Los resultados acerca de los transcritos formados por Rpo41, sugieren que estos pueden ser sintetizados utilizando secuencias promotoras y correspondientes a orígenes de replicación como templado. Por lo que, decidimos evaluar la incorporación de [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-dGTP en presencia y ausencia de Mtf1 en un templado pUC19 de doble cadena superenrollado, conteniendo las secuencias de cuatro *oris* y nueve secuencias promotoras obtenidas en un trabajo previo (Velazquez et al., 2012)

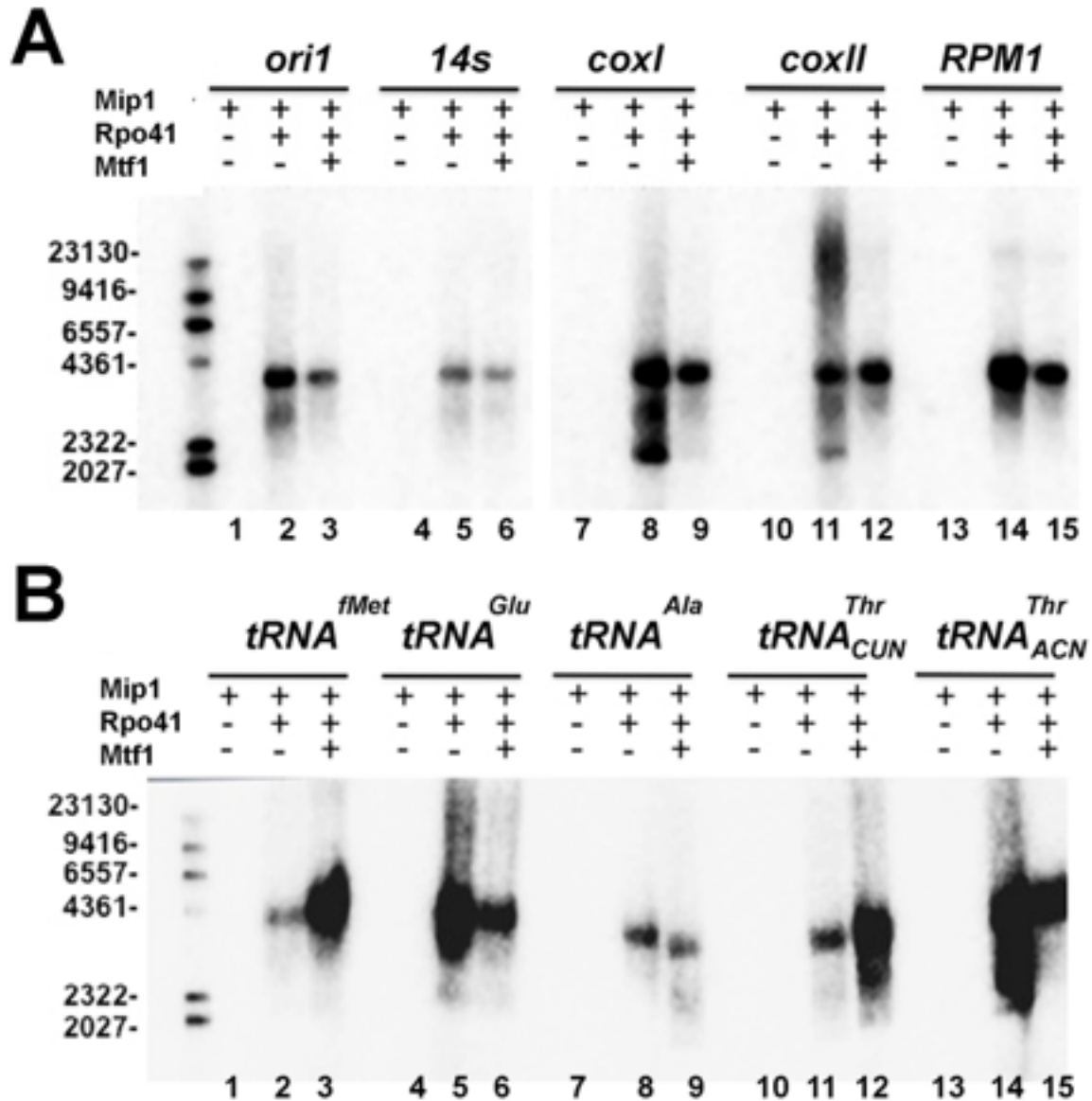
En el ensayo se observó que Mip1 por sí sola es incapaz de formar un producto de ADN (Figura 17, carriles 1, 4, 7 y 10), al adicionar Rpo41 el producto es mayor a 3 kb sin Mtf1 (Figura 17, carriles 2, 5 y 8) y en presencia de Mtf1 (Figura 17, carriles 3, 6 y 9). Además determinamos que la iniciación de la síntesis de ADN, está dada en función de los productos de transcripción por Rpo41 en las secuencias predichas, utilizando como control pUC19 sin secuencias promotoras clonadas.

Posteriormente, como templado se utilizaron secuencias codificadas en el genoma mitocondrial clonadas en pUC19, esas fueron *COXI*, *COXII*, *14S*, *ARNPasa P* y promotores de *ARNt* (Figura 18). En comparación con el producto utilizando *ori1* como control, a excepción de *14S* y *ARNt<sup>Ala</sup>* presentaron mayor cantidad de producto. Cuando se utilizó *COXII* y el promotor de *ARNPasa P* el producto de ADN fue de ~20 kb, esto muestra la capacidad de Mip1 en el desplazamiento de hebra (Viikov et al., 2011).



**Figura 17. Rpo41 puede utilizar secuencias de orígenes de replicación para la síntesis de iniciadores extendidos por Mip1**

Gel de agarosa nativo al 1%. El ensayo se llevó a cabo en las condiciones mencionadas en la sección de Material y Métodos. Incorporación de  $\alpha$ -[P<sup>32</sup>]-dGTP por Mip1 sobre secuencias de orígenes de replicación *ori1* (carriles 1 al 3), *ori3* (carriles 4 al 6) y *ori5* (carriles 7 al 9). Como control negativo se utilizó pUC19 sin secuencias promotoras (carriles 10 al 12). Las reacciones se realizaron utilizando Mip1, Rpo41 y Mtf1 como se indica. El tamaño correspondiente a fragmento del marcador de peso molecular se presenta a la izquierda. El complejo en un ADN de doble cadena dinámico depende de la presencia de Mip1 y Rpo41 pero Mtf1 no es indispensable.



**Figura 18. Rpo41 es capaz de utilizar secuencias promotoras y de orígenes de replicación para la síntesis de iniciadores utilizados por Mip1**

Gel de agarosa nativo al 1%. Se muestra la incorporación de  $[\alpha\text{-P}^{32}]\text{-dGTP}$  por Mip1 sobre *14S* (panel A, carriles 4 al 6), *COX I* (carriles 7 al 9), *COX II*(carriles 10 al 12), *RPM* (carriles 13 al 15) y secuencias promotoras de *ARNts* (panel B, carriles 1 al 15). Se utilizó como control de formación de producto *ori1* (panel A, carril 1 al 3). Las reacciones se realizaron utilizando Mip1, Rpo41 y Mtf1 como se indica. El tamaño correspondiente a fragmento del marcador de peso molecular se presenta a la izquierda.

## 7.8 Evaluación de la importancia del extremo C-terminal de Mip1 en la replicación

### **7.8.1 Diseño y purificación de las versiones de Mip1 trucas en el extremo carboxilo terminal**

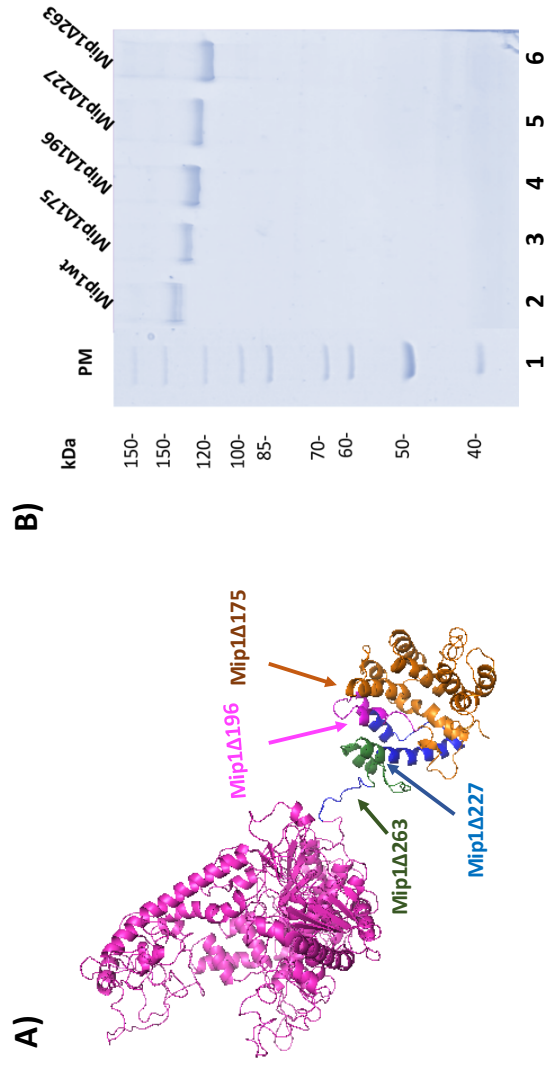
En estudios previos se determinó que el extremo C-terminal de Mip1 es requerido para el mantenimiento del genoma mitocondrial, ya que *in vivo* la eliminación de la extensión del C-terminal (279 a.a.) ocasiona la pérdida de ADNmt (Young et al., 2006). Además *in vitro* versiones trucas similares no tienen actividad de polimerización y cuando solamente se eliminaron 175 a.a., la actividad se mantiene pero se modifica la capacidad exonucleasa (Viikov et al., 2012).

Con estos antecedentes se decidió diseñar versiones trucas en el extremo C-terminal mediante mutaciones puntuales insertando un codón de paro en las posiciones 175, 196, 227 y 263, con la finalidad de contar con proteínas activas al no eliminar por completo el extremo C-terminal (279 a.a.).

En la Figura 19, panel A se indican los puntos donde fue truncada la proteína representados en un modelo obtenido por homología por el Dr. Luis Brieba de acuerdo a la estructura descrita para la ADN polimerasa mitocondrial de humano en presencia de ADN (PDB 4ZTU).

Las versiones trucas de Mip1 se purificaron bajo las mismas condiciones que la versión silvestre, se verificó la pureza y el tamaño mediante un gel desnaturizante. Las proteínas presentan diferente corrimiento de acuerdo a su peso molecular Mip1 (145 kDa), Mip1 $\Delta$ 175 (125.7 kDa), Mip1 $\Delta$ 196 (123.4 kDa), Mip1 $\Delta$ 227 (120 kDa), Mip1 $\Delta$ 263 (116 kDa) como se muestra en la Figura 14, panel B.





**Figura 19. Modelo de las versiones de Mip1 deletadas en el C-terminal y versiones truncas de Mip1**

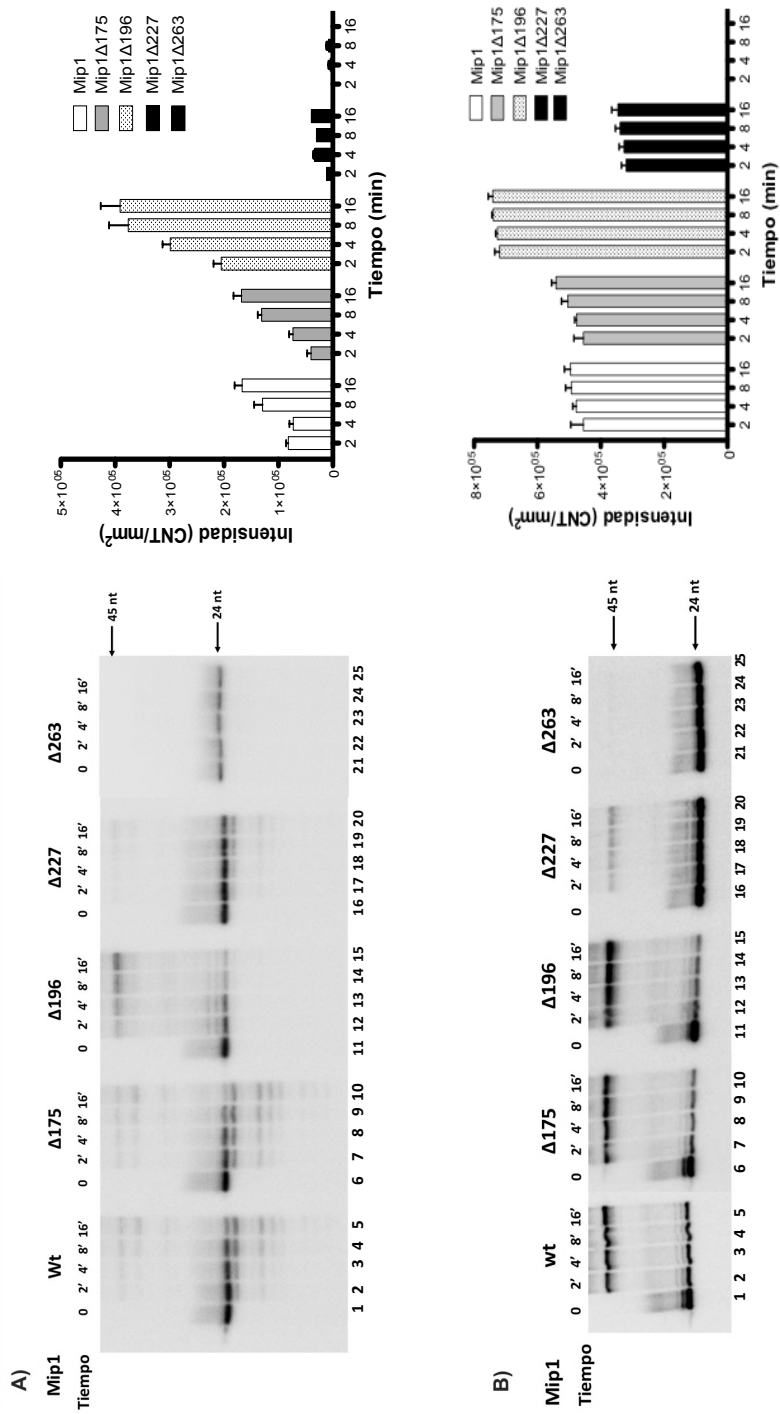
**A)** Modelo de Mip1 obtenido por homología. Las flechas señalan la posición del codón de paro en la posición 175 a.a. en amarillo, 196 a.a. en magenta, 227 a.a. en azul y 263 a.a. en verde. **B)** Gel SDS-PAGE al 8 % teñido con azul de Coomassie R250. Las proteínas fueron purificadas por afinidad a níquel y posteriormente por intercambio iónico, de acuerdo a lo descrito en la sección de material y métodos. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Mip1 completa. Carril 3-6 las versiones deletadas en el C-terminal indicadas en el modelo del panel A con distintos pesos moleculares; Mip1 (145 kDa), Mip1Δ175 (125.7 kDa), Mip1Δ196 (123.4 kDa), Mip1Δ227 (120 kDa), Mip1Δ263 (116 kDa).

### **7.8.2 La delección del C-terminal de Mip1 afecta la síntesis de ADN**

Con el propósito de determinar el efecto del extremo C-terminal en la actividad de polimerización sobre un sustrato corto de 45 nt, se llevó a cabo un ensayo en las mismas condiciones antes descritas, utilizando versiones a las que se eliminaron 175, 196, 227 y 263 a.a. del C-terminal de Mip1. Estas versiones se encuentran en un fondo genético en el cual la proteína conserva la actividad de exonucleasa (Figura 20, panel A) y otro donde esta capacidad ha sido eliminada (exo-) (Figura 20, panel B).

Con o sin actividad de exonucleasa Mip1 $\Delta$ 175 presenta la formación de un ~2% más producto que la versión completa (Figura 20A-B), mientras que Mip1 $\Delta$ 196 incrementa en ~51% la síntesis de producto (Figura 20A) y Mip1 $\Delta$ 196exo- un ~53% (Figura 20B) en comparación con Mip1.

Cuando Mip1 ha perdido 227 a.a. (Mip1 $\Delta$ 227), es capaz de mantener la capacidad de polimerasa a los 4-16 minutos, pero la eliminación de los residuos causó la disminución en la cantidad de producto formado en un ~80% en comparación con Mip1 (Figura 20, panel A) y Mip1 $\Delta$ 227 exo- disminuye solamente un 31% la síntesis (Figura 20, panel B). La versión Mip1 $\Delta$ 263 pierde por completo la capacidad de polimerasa (Figura 20A, carriles 21 al 25).



**Figura 20. El extremo C-terminal de Mip1 tiene importancia en la polimerización** Gel de poliacrilamida desnaturante al 16%, que muestra la extensión de un iniciador de 24 nt marcado con  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP hibridado a un sustrato de 45 nt. La reacción se llevo de acuerdo a lo descrito en Material y Métodos tomando alicato a los 0, 2, 4, 8 y 16 minutos. Para el ensayo se utilizó Mip1 con actividad de exonucleasa (panel A) y sin actividad de exonucleasa (panel B). Además de cada una se utilizaron las versiones completa y truncas en el extremo carboxilo terminal Mip1 (carriles 1-5 y 26-30), Mip1 $\Delta$ 175 (carriles 6-10 y 31-35), Mip1 $\Delta$ 196 (carriles 11-15 y 36-40), Mip1 $\Delta$ 227 (16-20 y 41-45) y Mip1 $\Delta$ 263 (carriles 21-25 y 46-50). La delección de 175 a.a. permite mantener un equilibrio entre la actividad de polimerasa vs exonucleasa, pero la delección de 196 a.a. dirige la reacción hacia la actividad de polimerasa, mientras la delección a partir de 227 a.a. ambas actividades se ven disminuidas hasta abatirse.

### **7.8.3 La eliminación del C-terminal de Mip1 afecta la capacidad de desplazamiento de hebra**

En el modelo de replicación mitocondrial de humano, se ha determinado que la pérdida de actividad de 3'-5' exonucleasa de POLG se relaciona con el incremento en las mutaciones del ADN mitocondrial y el envejecimiento prematuro (Heet al., 2013). Además de incrementar la capacidad de desplazamiento de hebra, comparado con las proteínas que mantienen la capacidad exonucleasa intacta (Macaoet al., 2015). Por lo tanto, se decidió evaluar si la ausencia de actividad de exonucleasa en conjunto con la eliminación de fragmentos del extremo C-terminal de Mip1 tenía algún efecto sobre la capacidad de desplazamiento de hebra (Figura 21).

Para el ensayo de desplazamiento de hebra el sustrato consistió en un oligonucleótido de 45 nt hibridado en el extremo 3' con un iniciador de 24 nt marcado con  $\gamma$ -[P<sup>32</sup>]-ATP y el extremo 5' con un oligonucleótido de 20 nt, manteniendo un espacio de 1 nt entre los dos oligonucleótidos, como se muestra en el esquema de la Figura 21. Las reacciones se detuvieron a los 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 y 8 min.

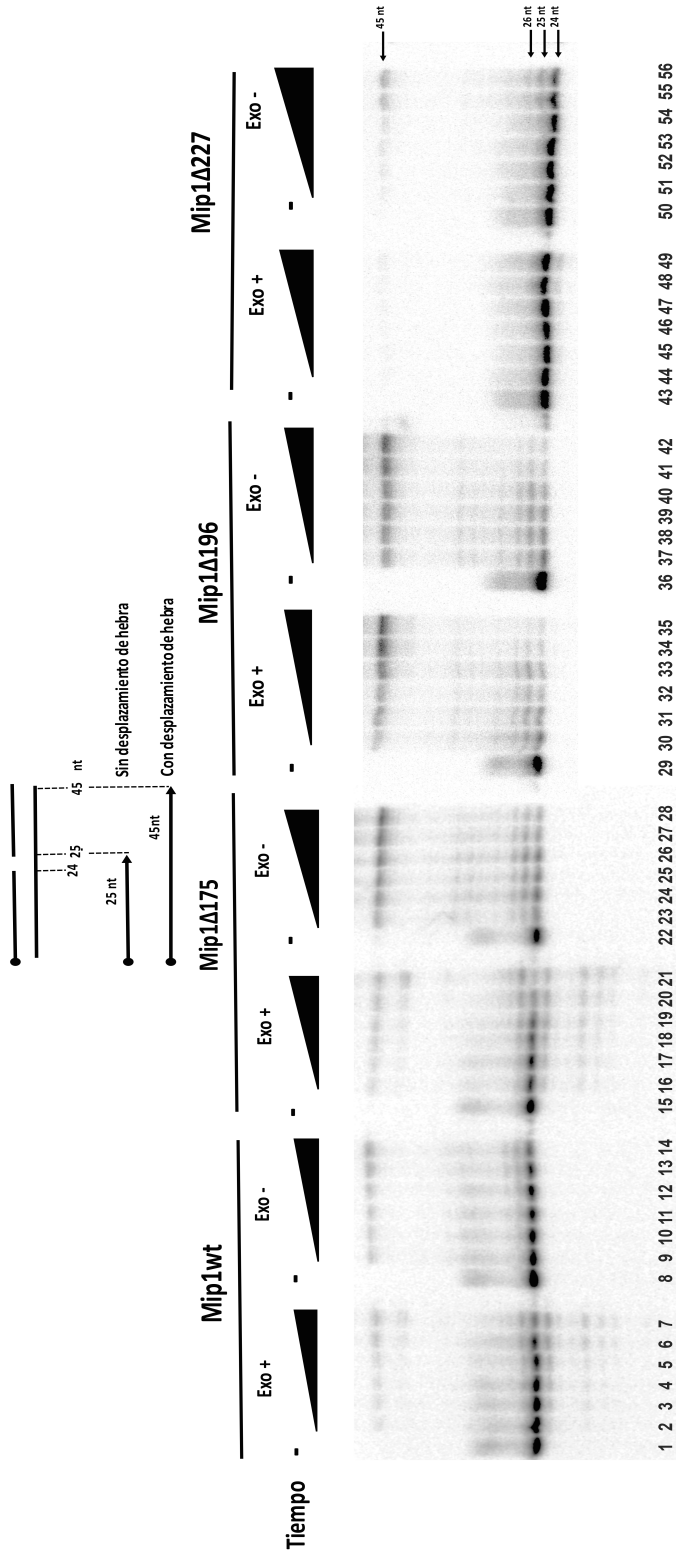
La evaluación se llevó a cabo con las mismas versiones de Mip1 del experimento anterior, usando las enzimas con y sin actividad de exonucleasa (exo+ ó exo-, respectivamente).

En todos los casos la síntesis de ADN después del espacio entre los fragmentos con 1 nt de separación desde los 15 seg. La versión sin exonucleasa (exo-) en los tiempos de 2, 4 y 8 minutos tiene un producto de 25 nt, que indica una posición de paro antes de iniciar con el desplazamiento (Figura 21, carriles 12-14).

La delección Mip1 $\Delta$ 175 con capacidad de exonucleasa (carriles 15-21) a diferencia de la versión sin exonucleasa (carriles 22-28), sintetiza un producto de 25 nt solamente a los 2, 4 y 8 min (carriles 26, 27 y 28), que representa la incorporación de 2, 3 y 4 nt antes del desplazamiento. Además la síntesis se detiene en la posición 25, 26, 27, 29 y 30, pero el producto final obtenido es 40% mayor que en la versión con exonucleasa (Figura 22).

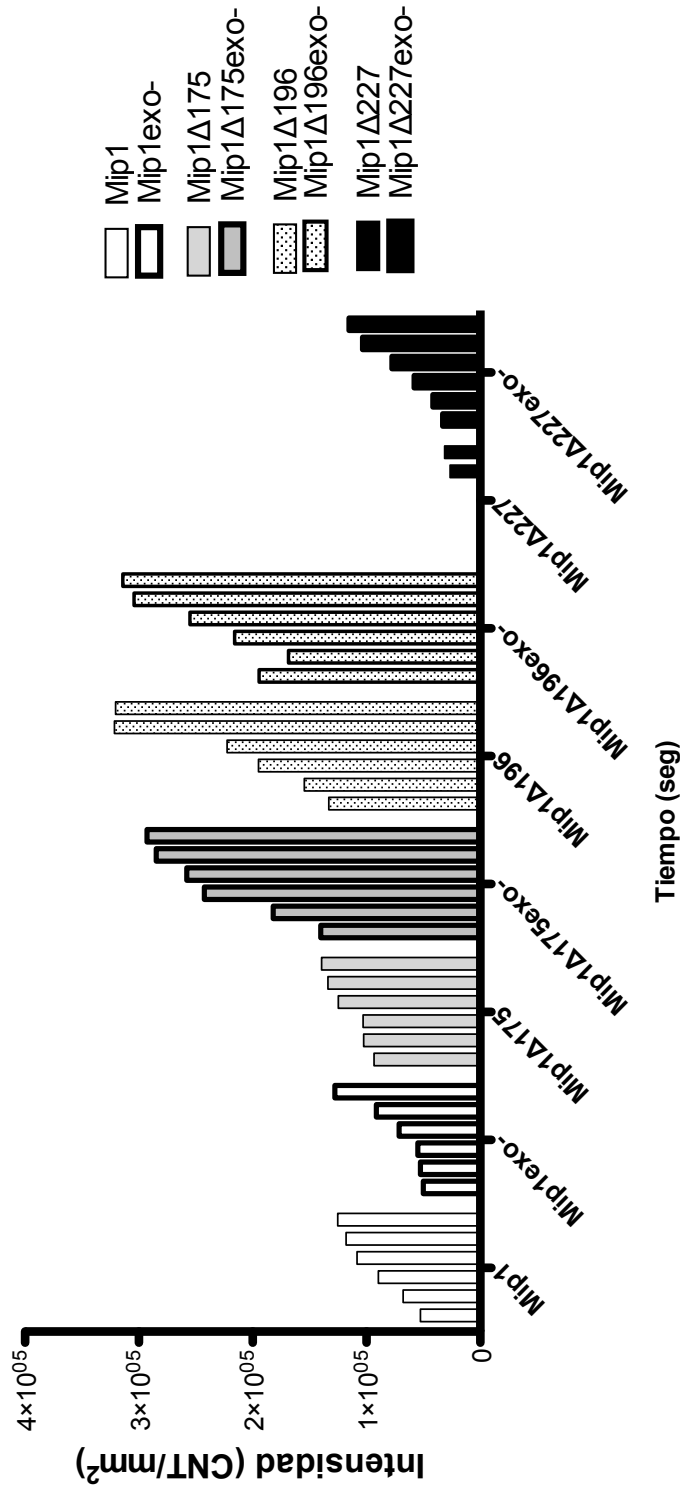
La eficiencia de Mip1 $\Delta$ 196 fue 25% mayor que la de Mip1 $\Delta$ 175 (Figura 22), en la banda del producto final de 45 nt desde los 15 seg en ambas versiones (carriles 29-42). Aunque Mip1 $\Delta$ 196 es capaz de completar la polimerización, se detiene después de la incorporación de 1, 2, 3, 4 y 5 nt. Por lo que se infiere que el desplazamiento, resulta más complicado por la formación de fragmentos de paro de 25 -30 nt. En contraste la actividad de exonucleasa no parece afectar la formación de estos productos (Figura 21, carriles 15-42).

Por último, Mip1 $\Delta$ 227 (Figura 21, carriles 43-49) muestra 80% (Figura 22) menos cantidad de producto de 45 nt en comparación con la versión sin exonucleasa, y sintetiza mayor concentración de producto de 45 nt (Figura 21, carriles 50-56). Aunque la síntesis fue disminuida en comparación con Mip1, en este caso la incorporación parece ser continua y sin fragmentos incompletos a diferencia de la versión Mip1 $\Delta$ 227 exo-.



**Figura 21. Efecto del extremo C-terminal de Mip1 sobre la capacidad de desplazamiento de hebra**

Gel de poliacrilamida desnaturalizante al 16%. Se muestra la importancia de la actividad de exonucleasa para el desplazamiento de hebra en Mip1. En la parte superior derecha se observa el esquema del sustrato utilizado para el desplazamiento de hebra con espacio de 1 nt mediante la extensión de un iniciador de 24 nt marcado con [<sup>32</sup>P]--ATP hibridado a un sustrato de 45 nt y otro de 20 nt. La reacción se llevó de acuerdo a las condiciones descritas en Material y Métodos, se inició con la adición de MgCl<sub>2</sub> y dNTP's y se detuvo a los 0, 15, 30, 60, 120, 240 y 480 seg. Se utilizaron versiones de Mip1 (carriles 1-14), Mip1Δ175 (carriles 15-28), Mip1Δ196 (carriles 29-42) y Mip1Δ227 (carriles 43-56) En todos los casos se observó la formación de producto por lo que se considera que la pérdida del C-terminal o la actividad de exonucleasa no afecta el desplazamiento de hebra.



**Figura 22. Cuantificación de la eficiencia en el desplazamiento de hebra por Mip1 y versiones truncas**

Representación gráfica de los productos obtenidos observados en la figura 16, En la versión completa se pudo observar tanto en la polimerasa con o sin exonucleasa que es posible obtener el producto de 45 nt. Mip1Δ175 es capaz de desplazar la hebra pero el producto obtenido se ve incrementado en un 30% cuando se trata de Mip1Δ175exo-. Mip1Δ196 y Mip1Δ196exo- incrementan la formación del producto hasta tres veces en comparación con Mip1. Mip1Δ227 logra polimerizar pero hasta los 4 min y la actividad esta disminuida 4 veces en comparación con Mip1 y Mip1Δ227exo- es capaz de formar el producto pero en un mayor tiempo, alcanza el nivel que Mip1.

#### **7.8.4 El C-terminal de Mip1 regula su capacidad de unión al ADN**

Con la finalidad de evaluar si el extremo carboxilo de Mip1 se ve involucrado en la afinidad de unión a ADN y con esto explicar el incremento en la capacidad de síntesis con las versiones truncas (Mip1 $\Delta$ 175 y Mip1 $\Delta$ 196), se determinaron las constantes de unión de cada una de ellas.

El sustrato para la unión a ADN fue el mismo que se usó para determinar la actividad (Anexo I), con un iniciador de 24 nt marcado con fluoresceína en el extremo 5' hibridado a un templado de 45 nt. La concentración del sustrato 1 nM se mantuvo constante y las versiones de Mip1 en concentraciones crecientes (0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 nM). De manera independiente en otro ensayo se añadió ddGTP, que permitiría la incorporación de este nucleótido y a la polimerasa detenerse en este punto para aumentar la estabilización del complejo.

**Tabla 5.- Afinidad de Mip1 por ADN de doble cadena**

Complejo	Mip1-ADN		Mip1 $\Delta$ 175-ADN		Mip1 $\Delta$ 196-ADN		Mip1 $\Delta$ 227-ADN	
	-	+	-	+	-	+	-	+
<b>Kd</b>	41.89 $\pm$ 9.3	13.17 $\pm$ 4.6	23 $\pm$ 0.39	6.2 $\pm$ 0.7	43.78 $\pm$ 13.5	6.19 $\pm$ 0.6	127 $\pm$ 0.37	18.77 $\pm$ 3.9

La delección de 175 a.a. en el carboxilo terminal de Mip1 incrementa la afinidad al ADN y el complejo Mip-ADN es más estable en presencia de un nucleótido.

La pérdida de 175 aminoácidos en el C-terminal de Mip1 incrementa la afinidad por el ADN disminuyendo el valor de Kd de 41.8 nM para la versión silvestre a 23 nM para Mip1 $\Delta$ 175, de igual manera ocurrió en presencia de ddGTP (Kd 13 a 6.2 respectivamente). Mip $\Delta$ 196 tiene mayor afinidad al adicionar ddGTP con una Kd de 43.7 a 6.19 nM y Mip $\Delta$ 227 a.a. pasa de 127 nM a 18 nM (Tabla 5).



El extremo C-terminal hasta cierta longitud regula la capacidad de unión de Mip1 por el ADN. Así, la afinidad de la versión Mip1 $\Delta$ 175 (Kd 23 nM) podría relacionarse con mayor eficiencia en la formación del producto de 45 nt, en comparación a Mip1 (Kd 41.8 nM). Sin embargo, Mip1 $\Delta$ 196 tiene un valor de Kd (43.78 nM) similar al de Mip1 que en presencia de ddGTP disminuye 7.5 veces (Kd de 6 nM). Esto muestra que en presencia del nucleótido es más estable que Mip1 en las mismas condiciones (Kd 13 nM) y podría provocar el aumento en la síntesis que obtuvimos en los ensayos de actividad. Por su parte, Mip1 $\Delta$ 227 presenta una menor afinidad (Kd 127 nM) y disminuye 8 veces en presencia de ddGTP (Kd 18 nM).

Estos datos muestran que el extremo C-terminal está relacionado con la unión de Mip1 al ADN y que la incorporación de nucleótidos incrementa la estabilidad del complejo formado.

## 7.9 Evaluación de la importancia del extremo C-terminal de Rim1 en la replicación

### 7.9.1 Diseño de las versiones de Rim1 truncas en el extremo carboxilo terminal

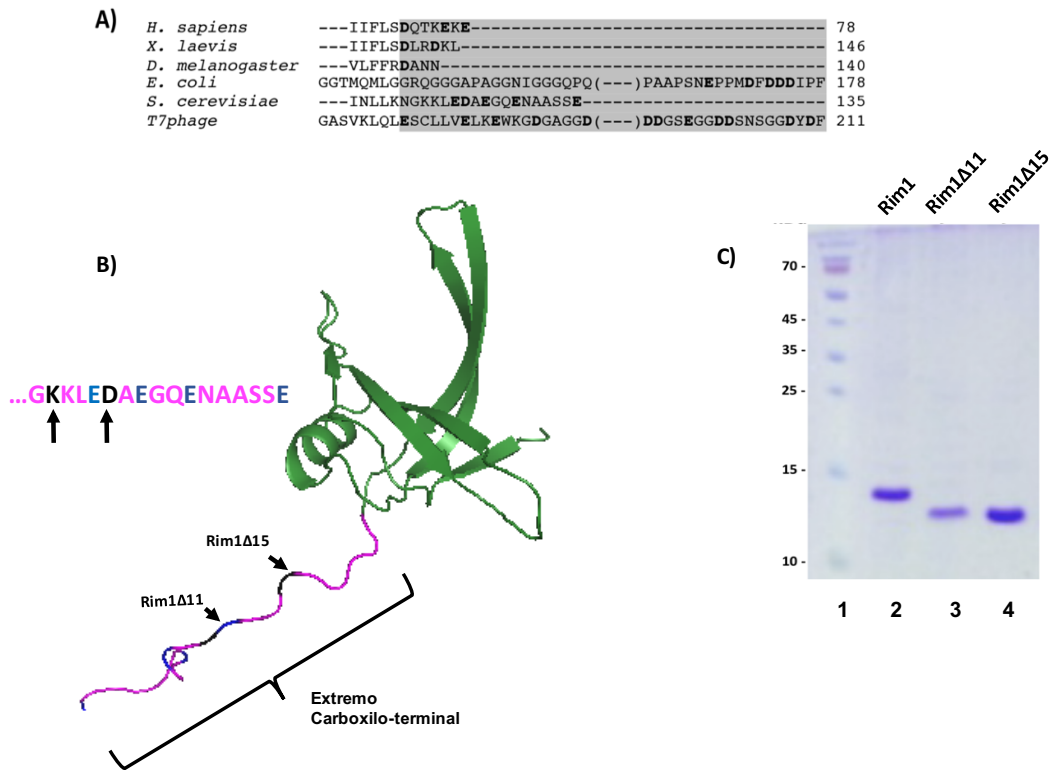
Dentro de los elementos que participan en la replicación, se encuentra la proteína de unión a ADN de cadena sencilla que en modelos descritos previamente se sabe que estimulan la actividad de ADN polimerasas, helicasas y primasas (Fargeet al., 2008; Ghosh et al., 2010), por la capacidad que tienen para evitar la formación de estructuras secundarias del ADN de cadena sencilla y de esta manera permitir el paso de las enzimas sobre el templado ( Marintcheva et al., 2008).

Las proteínas de unión a ADN de cadena sencilla del bacteriófago T7 y de *E. coli* tienen un carboxilo terminal con residuos acídicos (Furukohriet al., 2012; Heet al., 2003). El extremo carboxilo es requerido para la regulación de la unión a ADN de cadena sencilla y por tanto modifica la actividad de otras proteínas del replisoma (Farr et al., 2004; Li y Williams, 1997).

Dadas las semejanzas de otros elementos del replisoma mitocondrial de *S. cerevisiae* con los del bacteriófago T7, la proteína de unión a ADN de cadena sencilla de la mitocondria de *S. cerevisiae* (Rim1) podría funcionar con el mismo modelo predicho para el bacteriófago T7 (Ghosh et al., 2010; He et al., 2003). En estudios previos ya se determino que estimula a una helicasa de reparación (Pif1) mediante interacción física a través del extremo carboxilo terminal (Ramanagoudr-Bhojappa et al., 2013; Zybailov et al., 2015).

Considerando esto como premisa, se hizo un alineamiento utilizando clustal X, para comparar la secuencia de Rim1 con otras SSB's como se muestra en la figura 18, panel A. De esta manera se determino que el extremo C-terminal de Rim1 tiene 5 aminoácidos ácidos indicados en negritas (4 ácidos glutámicos y 1 ácido aspártico).

En la Figura 23, panel B se muestran los aminoácidos que se mutaron por codones de paro en un modelo estructural de Rim1 obtenido por homología por el Dr. Luis Briebe. Las versiones de Rim1 perdieron 11 y 15 a.a. del carboxilo terminal respectivamente. Las proteínas fueron purificadas de la misma manera que la versión silvestre (13 kDa), permitiendo un rendimiento aproximado de 0.5 mg/ml en cada caso (Figura 23, panel C).



**Figura 23 Versiones de Rim1 deletadas en el C-terminal**

**A)** Alineamiento del extremo carboxilo terminal de proteínas de unión a ADN de cadena sencilla (SSB) de *H.sapiens* (NP003134), *Xenopus laevis* (NP\_001095241), *Drosophila melanogaster* (AAF16936), *Escherichia coli* (YP\_859663), *Saccharomyces cerevisiae* (AAB22978) y del bacteriófago T7 (YP338102). La zona resaltada en gris muestra las regiones correspondientes al C-terminal y las letras en negritas representan los residuos ácidos. **B)** Modelo de Rim1 obtenido por homología, en magenta se muestra el extremo carboxilo terminal, los residuos ácidos en azul y en negro se indican las posiciones de la delección. **C)** Gel SDS-PAGE al 17% muestra las proteínas purificadas de las versiones de Rim1. Las proteínas se purificaron mediante afinidad a níquel y por intercambio iónico, para posteriormente ser almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . El procedimiento que se siguió es el que se ha descrito en la sección de material y métodos, a  $4^{\circ}\text{C}$ . Carril1: marcador de peso molecular, carril 2: Rim1 (13 kDa), carril 3: Rim1 $\Delta$ 11 (11.7 kDa) y carril 4: Rim1 $\Delta$ 15 (11.3 kDa).

### **7.9.2 El extremo C-terminal de Rim1 modula la capacidad de unión a ADN**

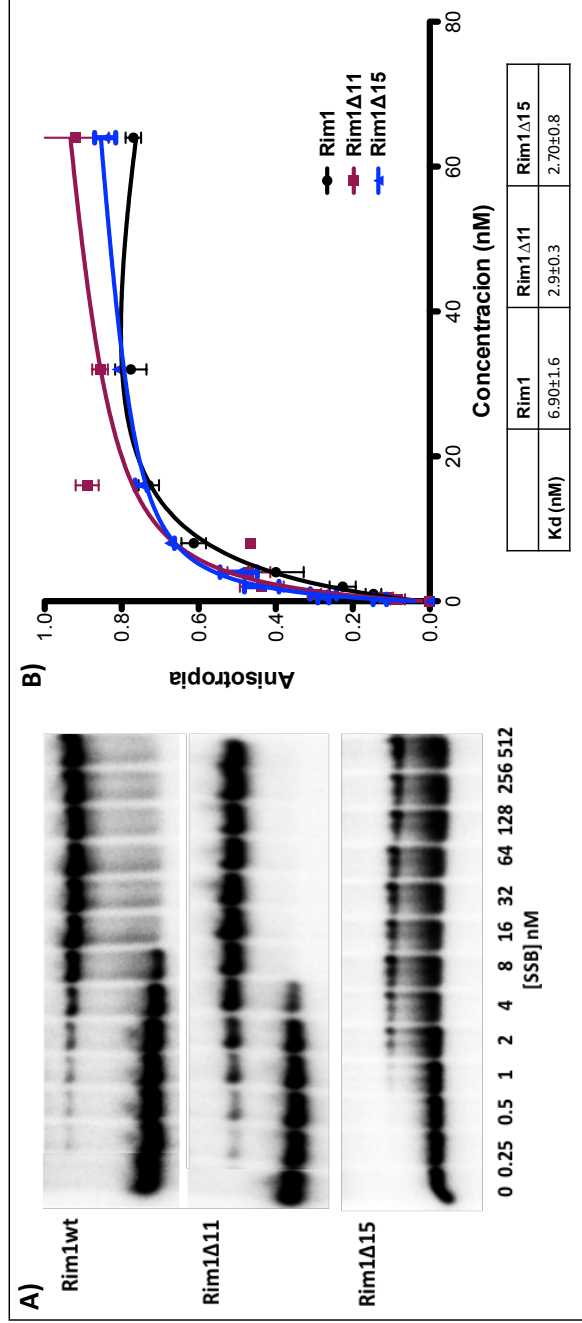
Para medir la unión de Rim1 al ADN, se utilizaron dos oligonucleótidos dT uno de 45 nt (Figura 24) y otro de 70 nt (Figura 25) marcados con  $\gamma$ -[P<sup>32</sup>]-ATP o con un fluoróforo como se describe en la Sección de Material y Métodos. El sustrato se utilizó a una concentración constante, las versiones Rim1, Rim1 $\Delta$ 11 y Rim1 $\Delta$ 15 a concentraciones crecientes como se indica en las figuras. El ensayo se llevó a cabo a 30 °C por 10 min y se observó la formación del complejo mediante un ensayo de retardo (Figura 24).

Todas las versiones de Rim1 se enlazaron al ADN, donde la Kd de Rim1 fue de 7.3 nM y de Rim1 $\Delta$ 11 fue de 2.3 nM. Sin embargo Rim1 $\Delta$ 15 con el sustrato de 45 nt sólo es capaz de unirse a una porción de ADN, aún con la mayor concentración probada (Figura 24A).

Además se complementó con la determinación de afinidad mediante el cambio de anisotropía (Figura 24B). Al utilizar el sustrato de 45 nt, la menor afinidad fue con Rim 1 (Kd 6.90 $\pm$ 1.6), la eliminación de residuos en Rim1 $\Delta$ 11 incremento al doble la afinidad (Kd 2.30 $\pm$ 0.3) y cuando se utilizó la versión más pequeña Rim1 $\Delta$ 15 no se ve un efecto más drástico (Kd 2.70 $\pm$ 0.8).

En ambos ensayos los resultados fueron similares, sin embargo, es importante mencionar que el ensayo de retardo permite observar que Rim1 $\Delta$ 15 solamente forma complejo con el 30% del sustrato y podría deberse a la longitud del ADN como se ha reportado anteriormente (Ramanagoudr-Bhojappa et al., 2013).

Por lo tanto decidimos utilizar un oligonucleótido dT, de 70 nt y observar si las proteínas eran capaz de formar complejos de la misma manera que con el de 45 nt (Figura 25).

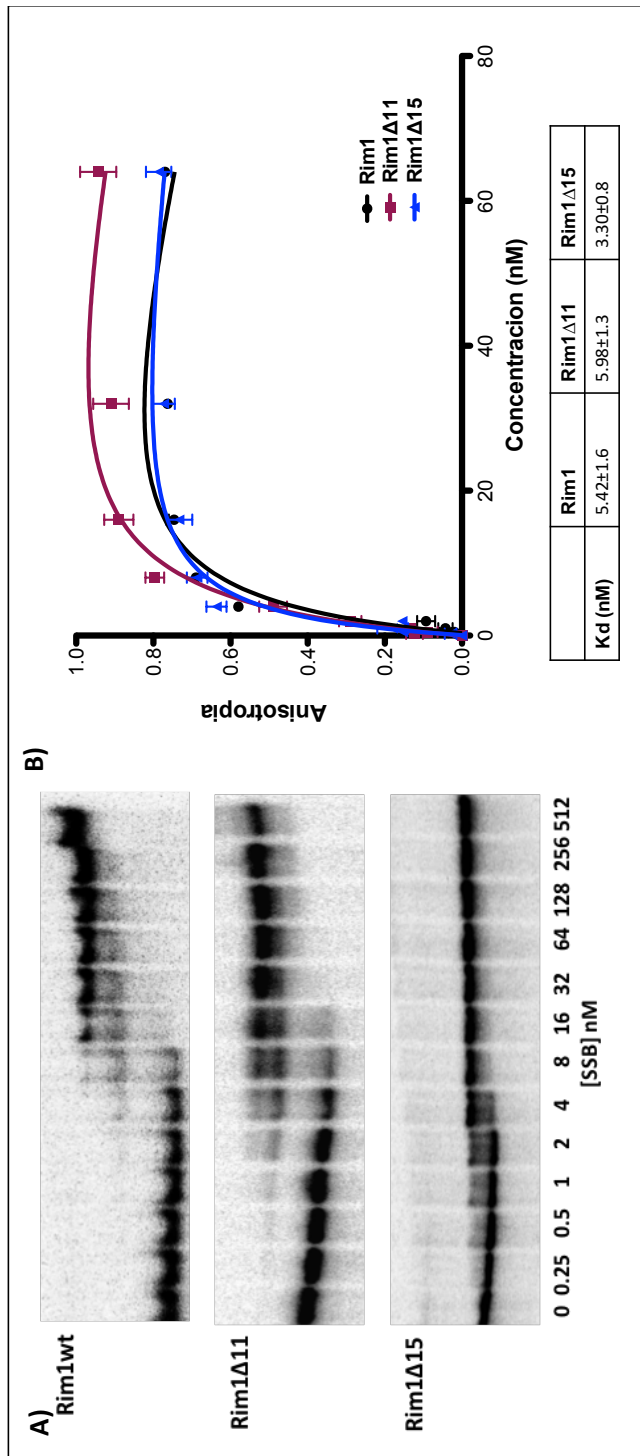


**Figura 24. El extremo C-terminal de Rim1 interfiere en la capacidad de unión a ADN de cadena sencilla de 45 nt**

**A)** Gel de poliacrilamida nativo al 10%, que muestra la unión de Rim1 y las versiones truncadas en el C-terminal mediante un ensayo de retardo que se llevó a cabo de acuerdo a las condiciones indicadas en la sección de material y métodos. **B)** Gráfico representativo de la unión por parte de cada una de las versiones de Rim1 utilizadas en el ensayo de anisotropía. Los valores de Kd fueron obtenidas mediante el programa GraphPad Prism 2004 y se presentan en la tabla debajo de la gráfica. Por lo tanto, la eliminación progresiva de residuos en el C-terminal disminuye el valor de Kd desde 6.9 nM para Rim1 a 2.9 nM para Rim1 $\Delta$ 11, lo que demuestra que el extremo C-terminal de Rim1 regula la unión y su pérdida incrementa la afinidad. Rim1 $\Delta$ 15 solamente utiliza el 30% del sustrato de acuerdo a la cuantificación por intensidad de banda utilizando el programa Quant TL, y mediante anisotropía se determinó una Kd de 2.7 nM similar a la delección de 11 residuos.

La afinidad utilizando el sustrato dT70 en el ensayo de retardo y de anisotropía fue menor al utilizar Rim1 con una  $K_d$  de 5.4 nM similar a la de Rim1 $\Delta$ 11 con una  $K_d$  de 5.9 nM. La eliminación de 15 residuos en la versión Rim1 $\Delta$ 15 incrementa su afinidad casi 2 veces con una  $K_d$  de 3.3 nM en comparación a Rim1.

Además es importante mencionar que en presencia de Rim1 y Rim1 $\Delta$ 11, el ensayo de retardo nos permite observar la formación de dos tipos de complejos de diferente tamaño, lo cual se puede relacionar con la forma de enlazarse de estas proteínas relacionada con la porción del extremo C-terminal disponible (Antonyet al., 2013; Kozlov y Lohman, 2012).



**Figura 25. El extremo C-terminal de Rim1 regula la capacidad de unión a ADN de cadena sencilla de 70 nt**

**A)** Gel de poliacrilamida nativo al 10%, que muestra la unión de Rim1 y las versiones truncadas en el C-terminal mediante un ensayo de retardo que se llevó a cabo de acuerdo a las condiciones indicadas en la Sección de Material y Métodos. **B)** Gráfica representativa de la unión por parte de cada una de las versiones de Rim1 utilizadas. Los valores de Kd fueron obtenidas mediante el programa GraphPad Prism 2004 y se muestran en la tabla debajo de la gráfica. Por lo tanto, Rim1 y Rim1 $\Delta$ 11 forman dos complejos de diferente peso de acuerdo al ensayo de retardo, siendo Rim1 $\Delta$ 15 la proteína con mayor afinidad al ADN. Por lo tanto, hay una regulación de la capacidad de unión al ADN por el C-terminal de Rim1.



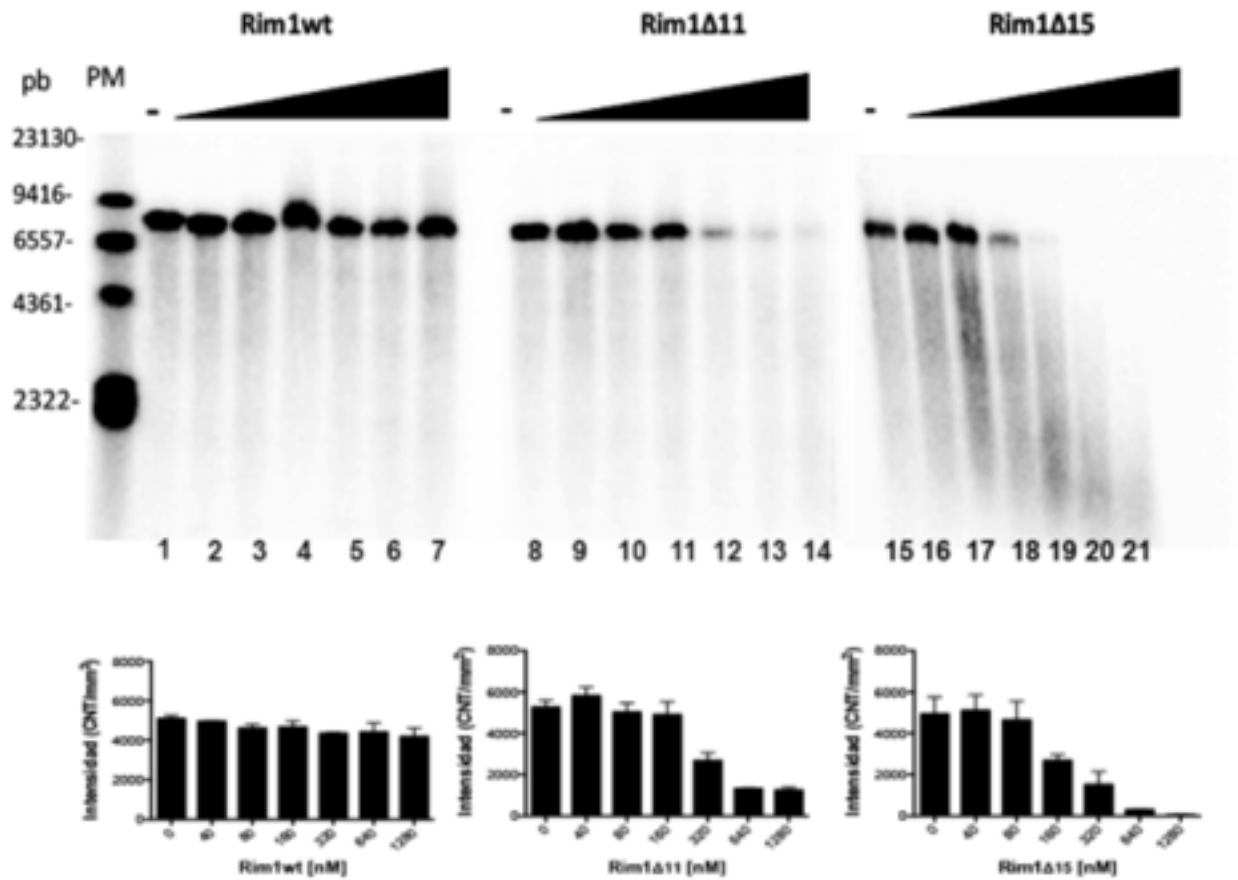
### **7.9.3 Rim1 regula la síntesis de Mip1 mediante el C-terminal.**

El incremento en la afinidad por ADN de Rim1 al truncar el C-terminal, sugiere que el mecanismo de regulación de Rim1 podría ser similar al modelo propuesto para la T7SSB, mediante interacciones electrostáticas con el ADN y otras proteínas (Ghosh et al., 2010; He et al., 2003). De acuerdo a esta información dispusimos evaluar el efecto de estas mutantes sobre la actividad de Mip1.

El ensayo se realizó utilizando como sustrato ADN de cadena sencilla M13mp18 (7,249 nt) hibridado a un iniciador de 24 nt marcado con  $\gamma$ -[P<sup>32</sup>]-ATP hibridado a mantenido a una concentración constante para ser extendido por Mip1 en presencia de concentraciones crecientes de Rim1 (0, 40, 80, 160, 320, 640, 1280 nM).

Los productos de la síntesis de ADN por Mip1 se observaron en un gel de agarosa alcalino y se cuantificó la intensidad de las bandas de tres experimentos independientes utilizando el software de ImageQuant TL en la Figura 26 se muestra debajo del gel la gráfica que indica los valores obtenidos.

La actividad de Mip1 en presencia o ausencia de Rim1 fue similar (Figura 26, carriles 1 al 7). Rim $\Delta$ 11 tiene un efecto negativo sobre la capacidad de polimerización de Mip1, a partir de una concentración de 320 nM disminuye 50% y con 640 nM un 60% del producto (Figura 26, carriles 13-14). Rim1 $\Delta$ 15 provoca la inhibición de la actividad de Mip1 de manera más drástica que Rim1 $\Delta$ 11 (Figura 26, carriles 15 al 21), desde una concentración de 160 nM causa una pérdida del 50% de la síntesis, con 320 nM un 60% y con 640 nM sólo se observan productos >2300 pb (Figura 26, carriles 18, 19 y 20 respectivamente).



**Figura 26. Efecto del extremo C-terminal de Rim1 sobre la actividad de Mip1**

Gel de agarosa alcalino al 0.6%. El ensayo se llevó a cabo bajo las condiciones mencionadas en la Sección de Material y Métodos, en la cual se utilizó como templado ADN de cadena sencilla M13mp18 hibridado a un iniciador de 24 nt marcado con  $\gamma$ -[P<sup>32</sup>]-ATP a una concentración de 4 nM y concentraciones crecientes 0, 40, 80, 160, 320, 640 y 1280 nM de Rim1 (carriles 1-7), Rim $\Delta$ 11 (carriles 8-14) y Rim $\Delta$ 15 (carriles 15-21). La intensidad del producto obtenido fue cuantificado utilizando el programa ImageQuant TL y se representó mediante gráficas al pie del gel. La pérdida del extremo C-terminal de Rim1 afecta la procesividad de Mip1, disminuyendo hasta en un 65% con 640 nM de Rim $\Delta$ 11 y en un 98% al utilizar la versión Rim $\Delta$ 15 a 640 nM.

Dadas los resultados obtenidos, se puede pensar que el papel del carboxilo terminal de Rim1, se relaciona con la afinidad al ADN y que al ser mayor no permite el paso de Mip1 por su unión a la cadena ADN sin permitir que la síntesis de fragmentos de mayor (<2000 pb). Sin embargo, se podría relacionar con la interacción directa entre Mip1-Rim1 como ocurre en las SSBs del bacteriófago T7, de *E. coli* y de mitocondria humana (He et al., 2003; Miralles Fuste et al., 2014; Savvides et al., 2004)

## **VIII. DISCUSIÓN**

La mitocondria es un organelo con un genoma propio que requiere de un conjunto de proteínas para su replicación, a las que se les denomina replisoma. Las polimerasas involucradas en la replicación y transcripción mitocondrial poseen semejanzas con las de los bacteriófagos de la familia T (T3 y T7) (Cermakian et al., 1996; Shutt y Gray, 2006a).

Además de las polimerasas se requieren otras proteínas para la replicación. De acuerdo al replisoma más pequeño que se ha descrito (bacteriófago T7), así como el de la mitocondria humana, los componentes mínimos necesarios son: Una primasa, una helicasa, una ADN polimerasa y una proteína de unión a ADN de cadena sencilla (Korhonen et al., 2004; Masker y Richardson, 1976; Richardson et al., 1979). En otros sistemas adicionalmente se requiere de complejos proteícos para la estabilización de las proteínas con el ADN (Benkovic et al., 2001; Shereda et al., 2008).

Los estudios sobre la replicación y transcripción mitocondrial de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* solamente se han encontrado cuatro proteínas: una ADN polimerasa (Mip1) (Foury, 1989; Viikov et al., 2011), una proteína de unión a ADN de cadena sencilla (Rim1) (Van Dyck et al., 1992), una ARN polimerasa (Rpo41) y el factor de transcripción (Mtf1) (Greenleaf et al., 1986; Tanget et al., 2009; Yang et al., 2015). Sin embargo, al comparar estas proteínas con las de los replisomas, las encargadas de la actividad de primasa y de helicasa están ausentes. Siendo esto el preámbulo para la primera parte de este trabajo que se trata de dilucidar si dentro de los componentes conocidos se encuentra una proteína que se encargue del inicio de la replicación.

Se sabe que en la mitocondria de humano la proteína encargada de la síntesis de iniciadores es la ARN polimerasa y de acuerdo a las semejanzas entre los sistemas se ha considerado que en la levadura el comportamiento podría ser similar (Schinkel y Tabak, 1989).

## 8.1 Rpo41 sintetiza iniciadores de ARN que pueden ser extendidos y degradados por Mip1

Los resultados mostraron que Mip1 es capaz de extender y degradar oligonucleótidos de ADN y ARN. Sin embargo la eficiencia para la incorporación de dNTP's a un iniciador de ARN fue menor que con el de ADN. Esto es un comportamiento similar al de la ADN polimerasa  $\gamma$  mitocondrial de humano (POLG), que disminuye la síntesis de ADN 3 a 4 veces cuando se trata de un iniciador de ARN por la capacidad de discriminar entre dNTPs y rNTP's (Kasiviswanathan y Copeland, 2011).

La actividad de exonucleasa presenta un patrón distributivo en la generación de los productos de degradación sobre ADN como se ha descrito anteriormente (Viikov et al., 2012). Mientras que la hidrólisis de ADN es casi completa hasta un producto de 2 nt, cuando el sustrato es ARN el producto de menor tamaño fue de 14 nt. Estos resultados son congruentes con la baja eficiencia en la degradación de ARN característica de las ADN polimerasas de la familia A, familia a la que pertenece Mip1 (Linet al., 2001) y que permite mantener fragmentos con la longitud necesaria para ser utilizados como iniciadores.

Al evaluar la capacidad de Rpo41 para la síntesis de iniciadores que fueran extendidos por Mip1, los resultados mostraron que sintetiza fragmentos pequeños de ARN (25 a 100 nt ) utilizando ADN de cadena sencilla (M13mp18) y son utilizados por Mip1 para la síntesis de ADN. Este comportamiento es distinto al sistema del bacteriófago T7 donde el inicio de la replicación no depende de la formación de un híbrido ARN-ADN, sino de que la T7 ADN polimerasa desplace a la T7 ARN polimerasa para utilizar el transcrito (Fuller y Richardson, 1985). Pero es similar a lo que ocurre en la mitocondria humana, donde el híbrido se requiere para el inicio de la replicación (Xu y Clayton, 1996). Además, concuerda con la propuesta que establece a la replicación mitocondrial de *S. cerevisiae* como un proceso bidireccional dependiente de iniciadores de ARN y semejante a la mitocondria humana (Baldacci et al., 1984)

Por otro lado, en este trabajo se demostró que Rpo41 también sintetiza fragmentos de ARN sobre sustratos de doble cadena pero que es indispensable la presencia de Mtf1 para la apertura del promotor exceptuando cuando se trata de templados superenrollados. Esto concuerda con lo que se ha descrito previamente en los sustratos que no requieren la apertura de la doble cadena.

## **8.2 La síntesis de iniciadores y su longitud depende de la secuencia templado**

Además, encontramos que Rpo41 forma mayor cantidad de transcritos con las secuencias promotoras probadas (*14S* y *COXII*) que con los orígenes de replicación (*ori1*, *ori2*, *ori3* y *ori5*). Esta evidencia muestra que las secuencias que se encuentran en el genoma mitocondrial pueden ser utilizadas como sitio de inicio como se había propuesto en el modelo replicación bidireccional de la levadura (Baldacci et al., 1984). Sin embargo, al observar que existían diferencias en la formación del producto del ADN de acuerdo al templado utilizado, la pregunta consistía en conocer ahora la importancia de estas secuencias en la formación de los transcritos.

Los resultados mostraron que la secuencia afecta la formación de producto por la Rpo41, entre *ori1*, *ori2* y *14S* el producto de 8 nt presentó la misma intensidad lo cual se relaciona con el hecho de que las tres secuencias comparten son idénticas en los primeros 8 nt. Entre *ori3* y *ori5* se obtuvo el mismo patrón de transcripción, solamente productos abortivos de 4 nt y un producto final de 66-67 nt.

La formación de transcritos concuerda con el hecho de que la secuencia promotora es rica en contenido A+T y las secuencias *oris* tienen una zona abundante de G+C sugiriendo la formación de una estructura tipo G-cuadrúplex en los orígenes de replicación. Esto las hace candidatas para considerarse como sitios de inicio para la replicación similar al genoma mitocondrial de humano, donde la presencia de este tipo de secuencias son necesarias para la formación de iniciadores y la terminación de la transcripción por la POLRMT por el G-cuadrúplex (Wanrooijet al., 2010). Sugiriendo que la secuencia templado es un sistema que regula la síntesis de fragmentos pequeños para ser utilizados como iniciadores.

Por otro lado, no es clara la diferencia en la cantidad de producto obtenido pero es importante mencionar que los dos orígenes de replicación utilizados tienen orientaciones opuestas en el genoma mitocondrial (de Zamaroczy et al., 1984) y que esto se considera una posible causa para la diferencia en la eficiencia para formar un producto (Baldacci et al., 1984).

Después de evaluar la importancia de la secuencia, determinamos la relevancia de la longitud de los fragmentos de ARN para ser extendidos por Mip1 utilizando secuencias de orígenes de replicación (*ori1* y *ori5*). La formación de transcrito dependiendo de la secuencia fue de 11 nt y 29 nt respectivamente para poder ser extendidos por Mip1. Esta es la primera vez que se ha descrito a *ori1* como un sitio para la formación de un híbrido ARN-ADN, a diferencia de *ori5* considerada una secuencia similar a los orígenes de replicación de mitocondrial humana por cumplir con la presencia de una secuencia rica en G+C y capaz de mantener un híbrido (Xu y Clayton, 1995, 1996). Sugiriendo que son suficientes ARN's cortos como iniciadores, lo cual podemos relacionar con los resultados que obtuvimos acerca de la capacidad deficiente de Mip1 para degradar el ARN, permitiendo mantener fragmentos mayores a 10 nt.

### **8.3 Mtf1 no se requiere para el uso de iniciadores por Mip1**

Se sabe que Mtf1 forma parte fundamental del complejo para la apertura de la secuencia promotora de ADN de doble cadena pero dispensable si se trata de un sustrato tipo burbuja o superenrollado (Matsunaga y Jaehning, 2004). Tomando en cuenta estas características, nos dimos a la tarea de determinar si la presencia de Mtf1 era necesaria para que Mip1 utilizará los iniciadores.

Decidimos utilizar Rpo41 $\Delta$ HNG, una mutante de Rpo41 incapaz de abrir el promotor y por tanto de formar transcritos en ausencia de Mtf1 (Velazquez et al., 2012), para determinar el papel que tiene el factor de transcripción en el complejo. Cuando el complejo carecía de Mtf1, la polimerasa Mip1 fue capaz de extender los iniciadores solamente en los templados de tipo burbuja. Estos resultados muestran que Mtf1 es necesario en un templado dúplex para que Rpo41 forme los iniciadores, pero es incapaz de restituir la actividad en la mutante.

Por tanto, la síntesis de ADN por Mip1, es dependiente de la actividad transcripcional de Rpo41 para la formación de iniciadores de ARN, pero independiente de la presencia de Mtf1. Mostrando una diferencia con el comportamiento de la ARN polimerasa mitocondrial humana, que en el proceso replicativo no quiere de su factor de transcripción, pero si de una helicasa replicativa (Korhonen et al., 2004).

Para evaluar el requerimiento de los elementos mínimos utilizamos un sustrato superenrollado con las secuencias correspondientes a promotores y orígenes de replicación, en presencia de las proteínas del replisoma. Los resultados mostraron que se requiere por lo menos de Mip1 y Rpo41 para la síntesis del ADN siendo Mtf1 dispensable al utilizar un templado superenrollado. Esta información concuerda con lo que se ha descrito en la síntesis de transcritos por Rpo41 y la ARN polimerasa del bacteriófago T7 (Brieba y Sousa, 2001; Velazquez et al., 2012).

Al evaluar la síntesis utilizando como templado el plásmido con las secuencias promotoras para *COX I*, *COX II*, *14S*, *RNasa P* y ARNt, la síntesis solamente necesitó de dos elementos, pero el producto fue menor que el obtenido en *ori1*, excepto con *14S* y *ARNt<sup>Ala</sup>*.

Por lo que se demostró que la síntesis de iniciadores y actividad de Mip1, precinden de una secuencia específica como origen de replicación, de igual manera como se ha observado en mutantes *petite [rho<sup>-</sup>]* donde se mantienen secuencias que no son orígenes de replicación (Fangman et al., 1990; Lorimer et al., 1995). Además, cabe mencionar que Mip1 presentó capacidad de desplazamiento de hebra al formar productos de aproximadamente 20 kb, siendo esta una característica que se ha descrito para la polimerasa (Viikov et al., 2011).

En conclusión para la replicación de un templado de doble cadena superenrollado o de tipo burbuja se requiere del complejo Rpo41-Mip1, Mtf1 es dispensable y Rim1 no muestra mayor relevancia en la formación del replisoma *in vitro*.



## **8.4 Rim1 incrementa la extensión de iniciadores por Mip1 y regula la síntesis de ADN mediante el C-terminal**

Dentro de los elementos involucrados en la replicación, están las enzimas de unión a ADN de cadena sencilla, que en modelos como el bacteriófago T7 (T7SSB) y mitocondria de humano (HmtSSB) tienen la capacidad de estimular la síntesis del ADN (Kaguni y Oliveira, 2015; Kim y Richardson, 1994). Por lo que decidimos evaluar la importancia de Rim1 en el sistema mitocondrial de *S. cerevisiae*.

Interesantemente la síntesis de iniciadores sobre ADN de cadena sencilla por Rpo41 es inhibida en presencia de Rim1, lo que indica una posible competencia por los sitios de unión al templado entre Rpo41 y Rim1. Este hecho concuerda con lo que se ha descrito para la ARN polimerasa mitocondrial humana y la del bacteriófago T7 (POLRMT o T7RNAP), donde la HsmtSSB ocasiona que la síntesis de iniciadores sea menor al disminuir la cantidad de sustrato accesible (Wanrooij et al., 2008). En contraste, Rim1 es capaz de estimular la extensión de los iniciadores por Mip1 hasta ~6.5 veces pero afecta la síntesis a concentraciones mayores de 2  $\mu$ M. Estos resultados son similares con lo que se ha descrito para T7SSB y HmtSSB capaces de incrementar el uso de iniciadores por T7ADNpol y POLG respectivamente (Myers y Romano, 1988; Wanrooij et al., 2008).

Se ha descrito en otros sistemas que la causa de incremento en la síntesis de ADN es a través de la interacción entre T7SSB y T7ADNpol (Ghosh et al., 2010; Ghosh et al., 2009), lo que es una posibilidad para nuestro sistema, pero para lo que se requiere estudios más detallados para relacionar el efecto con una interacción electrostática entre el C-terminal de Rim1 con la polimerasa, de igual manera que ocurre en el sistema del bacteriófago T7 durante la formación del complejo de polimerización T7SSB-T7ADNpol (Ghosh et al., 2010).

## **8.5 El C-terminal de Mip1 es necesario para la actividad de polimerasa**

Por otro lado, en la POLG (ADN polimerasa mitocondrial de humano) la actividad de exonucleasa se considera de importancia para la formación de extremos que se puedan ligar durante la replicación y la pérdida de esta actividad incrementa la actividad de

desplazamiento de hebra, lo que ocasiona daño en el tipo de cadena disponible para la ligación (Macao et al., 2015).

Al tomar en cuenta las características del desplazamiento de hebra y actividad de exonucleasa de proteínas similares a Mip1, consideramos evaluar la importancia del carboxilo terminal en la capacidad de polimerización. La pérdida de 175 y 196 a.a. en el C-terminal incrementaron la cantidad de producto obtenido en comparación con Mip1 y no se ve afectada por la pérdida de capacidad exonucleasa. Esto podría relacionarse con el hecho de que la extensión C-terminal se considera necesaria para la regulación entre polimerasa y exonucleasa, ya que la eliminación de los residuos también causa la disminución en la actividad de exonucleasa. Con estos resultados podemos observar que quizá la pérdida de actividad debe a la interacción entre el dominio carboxilo terminal y la actividad de polimerasa y no por el desarreglo del dominio de polimerización ya que no se ven afectados residuos cercanos al dominio. Esto solo puede ser inferido, ya que hasta el momento los modelos estructurales sólo se han hecho por homología y se requieren de una evaluación más fina en la que se involucre la determinación de una interacción entre las proteínas.

Posteriormente se decidió evaluar si la actividad de exonucleasa en Mip1 presentaba una relevancia en el desplazamiento de hebra, similar a lo que ocurre en POLG (Macao et al., 2015). En el ensayo todas las versiones de Mip1 probadas fueron capaces de desplazar la hebra, aunque con diferencia en la eficiencia para la formación de producto similar a lo observado antes donde Mip1 $\Delta$ 175 y Mip1 $\Delta$ 196 presentaron ~10% y ~50% más producto respectivamente en comparación que la Mip1 sin importar la capacidad de exonucleasa. contrario a lo que se ha descrito para POLG, donde al eliminar la actividad de exonucleasa la capacidad de desplazamiento se modifica (Macao et al., 2015).

Estos resultados concuerdan con lo que se ha descrito en ensayos *in vivo*, donde la deleción de 175 y 196 a.a. no afectan la integridad del ADN mitocondrial, sin embargo cuando se elimina por completo los 279 a.a. del extremo carboxilo terminal de Mip1 provoca un fenotipo *petite* (Young et al., 2006). Por lo tanto, es importante mencionar que este mecanismo por el cual el carboxilo terminal afecta a la actividad de la Mip1 puede deberse a que la afinidad por el ADN y la forma en la que se establecen los complejos se ve modificada.

Se observó que la Kd de Mip1 sobre un sustrato de doble cadena fue de aproximadamente el doble en comparación con las mutantes Mip1 $\Delta$ 175 y muy similar a la Mip1 $\Delta$ 196. Sin embargo, cuando el complejo se adiciona con nucleótido la afinidad de Mip1 $\Delta$ 175 y Mip1 $\Delta$ 196 son similares y mayores que Mip1. Estos resultados muestran que la afinidad al ADN podría interferir con el incremento en la síntesis en presencia de las mutantes que se observó previamente, permitiendo la formación de un complejo más estable. De acuerdo a estudios previos en otros modelos este arreglo más fuerte podría causar que posterior a la incorporación del nucleótido el paso continuo se vea afectado y que el desplazamiento de hebra también se detenga causando la incorporación pausada de nucleótidos, mostrando productos menores al producto final. Dado que esta forma de interactuar con el templado podría estar dificultando el paso y la habilidad para abrir la cadena doble (Antony et al., 2013; Burke et al., 1980).

El mecanismo a través de este fragmento sólo se han investigado en la levadura, ya que el extremo carboxilo terminal únicamente se ha descrito en hongos (Young et al., 2006), aunque una extensión de 67 a.a. se encuentra en la ADN polimerasa del bacteriófago T5, donde se encarga de la procesividad.

## **8.6 El C-terminal de Rim1 regula la actividad de Mip1**

Como se mencionó antes, no se sabe con exactitud el mecanismo mediante el cual Rim1 podría estar involucrada en la regulación de síntesis y uso de iniciadores en el replisoma. Por lo tanto, considerando el modelo que mantiene la SSB del bacteriófago T7 y de *Drosophila*, mediante la interacción a través de su extremo carboxilo terminal (Ghosh et al., 2010; Oliveira y Kaguni, 2010).

Para esta determinación obtuvimos dos mutantes de Rim1 eliminando 11 (Rim1 $\Delta$ 11) y 15 (Rim1 $\Delta$ 15) aminoácidos en el carboxilo terminal, que conduce a la pérdida de 3 y 4 residuos ácidos respectivamente que podrían interaccionar con el sitio de unión a ADN de la propia proteína, de tal manera que dejaría el sitio libre para la unión al sustrato.

Al determinar la afinidad por el ADN con todas las versiones, la capacidad de unión fue dependiente de la longitud del sustrato, ya que cuando el ADN utilizado fue de 45 nt, tanto Rim1 como Rim1 $\Delta$ 11 mantienen una afinidad muy similar e incluso Rim1 $\Delta$ 15 parece ser menos afin a esta unión. Pero cuando se trata de un sustrato de 70 nt, Rim1 y Rim1 $\Delta$ 11 forman dos complejos de diferente tamaño y con Rim1 $\Delta$ 15 sólo se forma un tipo. Además la afinidad se incrementa cuando se han eliminado 15 a.a.. Estos resultados son comparables con lo que se ha observado en el caso de SSB de *E. coli*, que forma un homotetrámero con diferentes formas de unión al ADN, de acuerdo a la extensión del sustrato (Lohman y Bujalowski, 1988, 1994). La formación de diferentes complejos dependen del papel del C-terminal en la formación de la interface con otras proteínas, a través de los residuos hidrofóbicos y acídicos (Antonyet al., 2012; Shereda et al., 2008), siendo esto probable para Rim1.

Debido a este comportamiento, se pensó que de igual manera el dominio C-terminal de Rim1 podría estar regulando la actividad de Mip1, como T7SSB lo hace con la T7ADN polimerasa (He et al., 2003). Para esto evaluamos la síntesis de ADN por Mip1 en presencia de Rim1, Rim1 $\Delta$ 11 y Rim1 $\Delta$ 15.

Los resultados mostraron que Rim1 no afecta la síntesis pero que la delección de 11 o 15 a.a. (Rim1 $\Delta$ 11 y Rim1 $\Delta$ 15 respectivamente) a concentraciones elevadas disminuye el tamaño del producto. El efecto sobre la actividad de Mip1 se puede relacionar con la elevada afinidad de las versiones truncadas de Rim1 por el ADN, que evita el paso por parte de la polimerasa al tener el sustrato a su paso totalmente cubierto por Rim1.

Otra posibilidad para explicar el efecto sobre Mip1 sería, que Rim1 es capaz de interaccionar con la ADN polimerasa mediante el extremo carboxilo de cada uno de los monómeros en la unión río abajo de la polimerasa para la estabilización del complejo, como se ha descrito en *E. coli*, donde estos extremos se consideran importantes para la coordinación de la replicación y reparación del ADN (Antony et al., 2013). De manera similar el C-terminal de la SSB del bacteriófago T4 estabiliza la unión de las proteínas del replisoma con el ADN (Burke et al., 1980), mediante una unión cooperativa al ADN fungiendo como un regulador del sistema replicativo (Burke et al., 1980).

## **9. CONCLUSIONES**

Este trabajo demostró que Mip1 es capaz de extender y degradar iniciadores de ARN y ADN con una eficiencia diferencial dependiente de la naturaleza del sustrato. La formación de producto fue menor con un híbrido ARN-ADN, donde la degradación del iniciador se ve limitada hasta una longitud de 14 nt, mostrando que la replicación en la mitocondria de *S. cerevisiae* puede comenzar con la síntesis de fragmentos de ARN como iniciadores para la síntesis de ADN.

Rpo41 se encarga de la actividad de primasa al sintetizar fragmentos pequeños de ARN que son extendidos por Mip1 en presencia de dNTP's. Sin embargo, la formación de transcritos con secuencias correspondientes a orígenes de replicación es menor que con secuencias promotoras, posiblemente por la presencia de regiones ricas en G-C causante de la formación de estructura G-quadruplex reconocida como señal de terminación para Rpo41.

Sin embargo, aunque el contenido de la secuencia es importante ya que condiciona la longitud del iniciador para Mip1, es de gran importancia considerar que el sistema es capaz de utilizar secuencias correspondientes a orígenes de replicación y a secuencias promotoras de genes codificantes para aminoácidos, para garantizar el mantenimiento del ADN mitocondrial mediante un genoma mínimo, como se ha observado en levaduras con fenotipo petite [*rho*<sup>-</sup>].

Determinamos que para la formación del replisoma *in vitro* se requiere de Mip1 y Rpo41, pero la presencia de Mtf1 es necesaria para la apertura de un sustrato de doble cadena y es dispensable en sustratos superenrollados. Aunque Rim1 no es indispensable funciona como un elemento regulador en la síntesis y extensión de los iniciadores por Rpo41 y Mip1 respectivamente.

Determinamos que el C-terminal de Mip1 regula la actividad de polimerasa y exonucleasa y que la actividad de degradación no se relaciona con la capacidad de desplazamiento de hebra. Rim1 es un componente que funciona como regulador en la síntesis de ADN a través de los residuos del C-terminal.

Nuestros resultados soportan el modelo de la replicación mitocondrial en *S. cerevisiae* dependiente de iniciadores de ARN, y con la participación de un complejo mínimo formado por Mip1 y Rpo41, en presencia de factores que regulan la síntesis de ADN (Mtf1 y Rim1).

## **10. PERSPECTIVAS**

- - Demostrar la importancia del C-terminal de Rim1 en la formación del complejo Mip1-Rim1.
- - Evaluar el efecto de la pérdida del extremo C-terminal en la síntesis de ADN mitocondrial *in vivo*.
- - Determinar si la presencia de Rim1 afecta el desplazamiento de hebra y la actividad de exonucleasa.
- - Definir si el dominio C-terminal de Mip1 regula la síntesis de ADN por interacción con el dominio N-terminal
- Explorar el modelo de recombinación para la replicación.

## 11. Anexo I.

### Oligonucleóidos para utilizados para amplificar el gen *RIM1*

Nombre	Secuencia
Rim1 Cterm ( <i>Bam</i> HI)	5'-GGA TCG GAT CCT TAT TCT GAA GAA GCA GCA TTT TC-3'
SSB Nterm ( <i>Nde</i> I)	5'-GGA ACC TGC ATA TGT TTT TAC GTA CTC AAG CTC-3'

### Oligonucleótidos utilizados para versiones deletadas en el C-terminal de Rim1

Nombre del oligo	Secuencia	Delección (a.a.)
UP-D125STOP	5'-gaagaatgggagattagaa <b>TaA</b> gctgaggccaagaaaatgct gct-3'	11
DOWN-D125STOP	5'-agcagcattttcttggccctcagct <b>tta</b> tcttaatttctccattcttc-3'	
UP-K121STOP	5'-gacattaatttattgaagaatggg <b>TAg</b> aaattagaagatgctgagggcc-3'	13
DOWN-K121STOP	5'-ggccctcagcatcttctaattg <b>TA</b> ccattctcaataaattaatgct-3'	

\*Los nucleótidos en negritas indican el codón de paro



## Oligonucleótidos utilizados como sustrato de secuencias de orígenes de replicación

Nombre	Secuencia
ORI1UP	5'CTT GGA ATT CTA TAA ATA TAT AAG TAA TAA ATT AAG TTT TAT AGG GGG AGG GGG TGG GTG AGG ATC CCT TG3'
ORI1LP	5'CAA GGG ATC CTC ACC CAC CCC CTC CCC CTA TAA AAC TTA ATT TAT TAC TTA TAT ATT TAT AGA ATT CCA AG3'
ORI2LW	5'CAA GGG ATC CCA CCC ACC CCC TCC CCC TAT AAA ACT TAA TTT ATT ACT TAT ATA TTT ACA GAAA TTC CAA G3'
ORI2 UP	5'CTT GGA ATT CTG TAA ATA TAT AAG TAA TAA ATT AAG TTT TAT AGG GGG AGG GGG TGG GTG GGA TCC CTT G3'
ORI3 UP	5'CTT GGA ATT CTC TGG ATA TAT AAG TAA TAG GGG GAG GGG GTG GGT GAT TAG AAA CTA GAA TGG ATC CCT TG3'
ORI3 LP	5'CAA GGG ATC CAT TCT AGT TTC TAA TCA CCC ACC CCC TCC CCC TAT TAC TTA TAT ATC CAG AGA ATT CGA AC3'
ORI5 LW	5'CAA GGG ATC CAT TCT GGT TAT TAT CAC CCA CCC CCT CCC CCT ATT ACT TAT ATT TTA AAT GAA TTC CAA G3'
ORI5 UP	5'CTT GGA ATT CAT TTA AAA TAT AAG TAA TAG GGG GAG GGG GTG GGT GAT AAT AAC CAG AAT GGA TCC CTT3'

## Oligonucleótidos purificados por PAGE utilizados para el sustrato duplex y de tipo burbuja

Nombre	Secuencia
14ST	5'CATT TATT TATT AT TATATAAGT <b>A</b> ATAAAGAATAGTTTTATATACTAATAATAATATATG3'
14SNT	5'CATATATTATTATTAGTATATAAACTATTCTTTAT <b>I</b> ACTTATATAATAATAAATAAATGAATT3'
14S Burbuja NT	5'AATTCATT TATT TATT ATATATGCAGCTTAAAGAATAGTTTTATATACTAATAATAATATAG3'



## Gráficos del ensayo de unión de Mip1 a ADN mediante anisotropía

Complejo	ddGTP		
<b>Mip1 +ADN</b>	-	$41.89 \pm 9.3$	
	+	$13.17 \pm 4.6$	
<b>Mip1<math>\Delta</math>175 +ADN</b>	-	$23 \pm 0.39$	
	+	$6.2 \pm 0.7$	
<b>Mip1<math>\Delta</math>196 +ADN</b>	-	$43.78 \pm 13.5$	
	+	$6.19 \pm 0.6$	
<b>Mip1<math>\Delta</math>227 +ADN</b>	-	$127 \pm 0.37$	
	+	$18.77 \pm 3.9$	

## **12. Referencias.**

1. Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R., Young, I.G., 1981. *Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature* 290, 457-465.
2. Andersson, S.G., Karlberg, O., Canback, B., Kurland, C.G., 2003. *On the origin of mitochondria: a genomics perspective. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 358, 165-177; discussion 177-169.
3. Antony, E., Kozlov, A.G., Nguyen, B., Lohman, T.M., 2012. *Plasmodium falciparum SSB tetramer binds single-stranded DNA only in a fully wrapped mode. Journal of molecular biology* 420, 284-295.
4. Antony, E., Weiland, E., Yuan, Q., Manhart, C.M., Nguyen, B., Kozlov, A.G., McHenry, C.S., Lohman, T.M., 2013. *Multiple C-terminal tails within a single E. coli SSB homotetramer coordinate DNA replication and repair. Journal of molecular biology* 425, 4802-4819.
5. Baldacci, G., Cherif-Zahar, B., Bernardi, G., 1984. *The initiation of DNA replication in the mitochondrial genome of yeast. The EMBO journal* 3, 2115-2120.
6. Bebenek, K., Kunkel, T.A., 2004. *Functions of DNA polymerases. Advances in protein chemistry* 69, 137-165.
7. Benkovic, S.J., Valentine, A.M., Salinas, F., 2001. *Replisome-mediated DNA replication. Annual review of biochemistry* 70, 181-208.
8. Bernardi, G., 2005. *Lessons from a small, dispensable genome: the mitochondrial genome of yeast. Gene* 354, 189-200.
9. Biswas, T.K., 1999. *Nucleotide sequences surrounding the nonanucleotide promoter motif influence the activity of yeast mitochondrial promoter. Biochemistry* 38, 9693-9703.
10. Bolender, N., Sickmann, A., Wagner, R., Meisinger, C., Pfanner, N., 2008. *Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins. EMBO reports* 9, 42-49.
11. Briebe, L.G., Gopal, V., Sousa, R., 2001. *Scanning mutagenesis reveals roles for helix n of the bacteriophage T7 RNA polymerase thumb subdomain in transcription complex stability, pausing, and termination. The Journal of biological chemistry* 276, 10306-10313.
12. Briebe, L.G., Sousa, R., 2001. *The T7 RNA polymerase intercalating hairpin is important for promoter opening during initiation but not for RNA displacement or transcription bubble stability during elongation. Biochemistry* 40, 3882-3890.
13. Burke, R.L., Alberts, B.M., Hosoda, J., 1980. *Proteolytic removal of the COOH terminus of the T4 gene 32 helix-destabilizing protein alters the T4 in vitro replication complex. The Journal of biological chemistry* 255, 11484-11493.

14. Cadman, C.J., McGlynn, P., 2004. PriA helicase and SSB interact physically and functionally. *Nucleic acids research* 32, 6378-6387.
15. Capson, T.L., Peliska, J.A., Kaboord, B.F., Frey, M.W., Lively, C., Dahlberg, M., Benkovic, S.J., 1992. Kinetic characterization of the polymerase and exonuclease activities of the gene 43 protein of bacteriophage T4. *Biochemistry* 31, 10984-10994.
16. Carrodeguas, J.A., Bogenhagen, D.F., 2000. Protein sequences conserved in prokaryotic aminoacyl-tRNA synthetases are important for the activity of the processivity factor of human mitochondrial DNA polymerase. *Nucleic acids research* 28, 1237-1244.
17. Carrodeguas, J.A., Kobayashi, R., Lim, S.E., Copeland, W.C., Bogenhagen, D.F., 1999. The accessory subunit of *Xenopus laevis* mitochondrial DNA polymerase gamma increases processivity of the catalytic subunit of human DNA polymerase gamma and is related to class II aminoacyl-tRNA synthetases. *Molecular and cellular biology* 19, 4039-4046.
18. Carrodeguas, J.A., Yun, S., Shadel, G.S., Clayton, D.A., Bogenhagen, D.F., 1996. Functional conservation of yeast mtTFB despite extensive sequence divergence. *Gene expression* 6, 219-230.
19. Cermakian, N., Ikeda, T.M., Cedergren, R., Gray, M.W., 1996. Sequences homologous to yeast mitochondrial and bacteriophage T3 and T7 RNA polymerases are widespread throughout the eukaryotic lineage. *Nucleic acids research* 24, 648-654.
20. Chang, D.D., Clayton, D.A., 1985. Priming of human mitochondrial DNA replication occurs at the light-strand promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 351-355.
21. Chang, D.D., Hauswirth, W.W., Clayton, D.A., 1985. Replication priming and transcription initiate from precisely the same site in mouse mitochondrial DNA. *The EMBO journal* 4, 1559-1567.
22. Chen, X.J., Butow, R.A., 2005. The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nature reviews. Genetics* 6, 815-825.
23. Clayton, D.A., 1991. Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Annual review of cell biology* 7, 453-478.
24. de Zamaroczy, M., Bernardi, G., 1986. The primary structure of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*--a review. *Gene* 47, 155-177.
25. de Zamaroczy, M., Faugeron-Fonty, G., Baldacci, G., Goursot, R., Bernardi, G., 1984. The ori sequences of the mitochondrial genome of a wild-type yeast strain: number, location, orientation and structure. *Gene* 32, 439-457.
26. Delagoutte, E., von Hippel, P.H., 2001. Molecular mechanisms of the functional coupling of the helicase (gp41) and polymerase (gp43) of bacteriophage T4 within the DNA replication fork. *Biochemistry* 40, 4459-4477.
27. Dunn, J.J., Studier, F.W., 1983. Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements. *Journal of molecular biology* 166, 477-535.

28. Elo, A., 2003. Nuclear Genes That Encode Mitochondrial Proteins for DNA and RNA Metabolism Are Clustered in the Arabidopsis Genome. *The Plant Cell Online* 15, 1619-1631.
29. Engler, M.J., Richardson, C.C., 1983. Bacteriophage T7 DNA replication. Synthesis of lagging strands in a reconstituted system using purified proteins. *The Journal of biological chemistry* 258, 11197-11205.
30. Falkenberg, M., Larsson, N.G., Gustafsson, C.M., 2007. DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annual review of biochemistry* 76, 679-699.
31. Fangman, W.L., Henly, J.W., Brewer, B.J., 1990. RPO41-independent maintenance of [rho-] mitochondrial DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 10, 10-15.
32. Farge, G., Holmlund, T., Khvorostova, J., Rofougaran, R., Hofer, A., Falkenberg, M., 2008. The N-terminal domain of TWINKLE contributes to single-stranded DNA binding and DNA helicase activities. *Nucleic acids research* 36, 393-403.
33. Farr, C.L., Matsushima, Y., Lagina, A.T., 3rd, Luo, N., Kaguni, L.S., 2004. Physiological and biochemical defects in functional interactions of mitochondrial DNA polymerase and DNA-binding mutants of single-stranded DNA-binding protein. *The Journal of biological chemistry* 279, 17047-17053.
34. Farr, C.L., Wang, Y., Kaguni, L.S., 1999. Functional interactions of mitochondrial DNA polymerase and single-stranded DNA-binding protein. Template-primer DNA binding and initiation and elongation of DNA strand synthesis. *The Journal of biological chemistry* 274, 14779-14785.
35. Filee, J., Forterre, P., Sen-Lin, T., Laurent, J., 2002. Evolution of DNA polymerase families: evidences for multiple gene exchange between cellular and viral proteins. *Journal of molecular evolution* 54, 763-773.
36. Foury, F., 1989. Cloning and sequencing of the nuclear gene MIP1 encoding the catalytic subunit of the yeast mitochondrial DNA polymerase. *The Journal of biological chemistry* 264, 20552-20560.
37. Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N., Purnelle, B., 1998. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters* 440, 325-331.
38. Fuller, C.W., Richardson, C.C., 1985. Initiation of DNA replication at the primary origin of bacteriophage T7 by purified proteins. Initiation of bidirectional synthesis. *The Journal of biological chemistry* 260, 3197-3206.
39. Furukohri, A., Nishikawa, Y., Akiyama, M.T., Maki, H., 2012. Interaction between *Escherichia coli* DNA polymerase IV and single-stranded DNA-binding protein is required for DNA synthesis on SSB-coated DNA. *Nucleic acids research* 40, 6039-6048.
40. Fuste, J.M., Wanrooij, S., Jemt, E., Granycome, C.E., Cluett, T.J., Shi, Y., Atanassova, N., Holt, I.J., Gustafsson, C.M., Falkenberg, M., 2010. Mitochondrial RNA polymerase is needed for activation of the origin of light-strand DNA replication. *Molecular cell* 37, 67-78.
41. Georgescu, R.E., Kurth, I., O'Donnell, M.E., 2012. Single-molecule studies reveal the function of a third polymerase in the replisome. *Nature structural & molecular biology* 19, 113-116.

42. Georgescu, R.E., Yao, N., Indiani, C., Yurieva, O., O'Donnell, M.E., 2014. Replisome mechanics: lagging strand events that influence speed and processivity. *Nucleic acids research* 42, 6497-6510.
43. Ghosh, S., Hamdan, S.M., Richardson, C.C., 2010. Two modes of interaction of the single-stranded DNA-binding protein of bacteriophage T7 with the DNA polymerase-thioredoxin complex. *The Journal of biological chemistry* 285, 18103-18112.
44. Ghosh, S., Marintcheva, B., Takahashi, M., Richardson, C.C., 2009. C-terminal phenylalanine of bacteriophage T7 single-stranded DNA-binding protein is essential for strand displacement synthesis by T7 DNA polymerase at a nick in DNA. *The Journal of biological chemistry* 284, 30339-30349.
45. Gray, M.W., 1999. Mitochondrial Evolution. *Science* 283, 1476-1481.
46. Greenleaf, A.L., Kelly, J.L., Lehman, I.R., 1986. Yeast RPO41 gene product is required for transcription and maintenance of the mitochondrial genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 3391-3394.
47. Hamdan, S.M., Richardson, C.C., 2009. Motors, switches, and contacts in the replisome. *Annual review of biochemistry* 78, 205-243.
48. Hatefi, Y., 1985. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annual review of biochemistry* 54, 1015-1069.
49. He, Q., Shumate, C.K., White, M.A., Molineux, I.J., Yin, Y.W., 2013. Exonuclease of human DNA polymerase gamma disengages its strand displacement function. *Mitochondrion* 13, 592-601.
50. He, Z.G., Rezende, L.F., Willcox, S., Griffith, J.D., Richardson, C.C., 2003. The carboxyl-terminal domain of bacteriophage T7 single-stranded DNA-binding protein modulates DNA binding and interaction with T7 DNA polymerase. *The Journal of biological chemistry* 278, 29538-29545.
51. Hollis, T., Stattel, J.M., Walther, D.S., Richardson, C.C., Ellenberger, T., 2001. Structure of the gene 2.5 protein, a single-stranded DNA binding protein encoded by bacteriophage T7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 9557-9562.
52. Huber, H.E., Tabor, S., Richardson, C.C., 1987. *Escherichia coli* thioredoxin stabilizes complexes of bacteriophage T7 DNA polymerase and primed templates. *The Journal of biological chemistry* 262, 16224-16232.
53. Ishmael, F.T., Trakselis, M.A., Benkovic, S.J., 2003. Protein-protein interactions in the bacteriophage T4 replisome. The leading strand holoenzyme is physically linked to the lagging strand holoenzyme and the primosome. *The Journal of biological chemistry* 278, 3145-3152.
54. Kaguni, L.S., Oliveira, M.T., 2015. Structure, function and evolution of the animal mitochondrial replicative DNA helicase. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 1-12.
55. Kasiviswanathan, R., Copeland, W.C., 2011. Ribonucleotide discrimination and reverse transcription by the human mitochondrial DNA polymerase. *The Journal of biological chemistry* 286, 31490-31500.

56. Kelman, Z., Yuzhakov, A., Andjelkovic, J., O'Donnell, M., 1998. Devoted to the lagging strand-the subunit of DNA polymerase III holoenzyme contacts SSB to promote processive elongation and sliding clamp assembly. *The EMBO journal* 17, 2436-2449.
57. Kim, Y.T., Richardson, C.C., 1993. Bacteriophage T7 gene 2.5 protein: an essential protein for DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 10173-10177.
58. Kim, Y.T., Richardson, C.C., 1994. Acidic carboxyl-terminal domain of gene 2.5 protein of bacteriophage T7 is essential for protein-protein interactions. *The Journal of biological chemistry* 269, 5270-5278.
59. Korhonen, J.A., Pham, X.H., Pellegrini, M., Falkenberg, M., 2004. Reconstitution of a minimal mtDNA replisome in vitro. *The EMBO journal* 23, 2423-2429.
60. Kozlov, A.G., Jezewska, M.J., Bujalowski, W., Lohman, T.M., 2010. Binding specificity of *Escherichia coli* single-stranded DNA binding protein for the chi subunit of DNA pol III holoenzyme and PriA helicase. *Biochemistry* 49, 3555-3566.
61. Kozlov, A.G., Lohman, T.M., 2012. SSB binding to ssDNA using isothermal titration calorimetry. *Methods in molecular biology* 922, 37-54.
62. Krassa, K.B., Green, L.S., Gold, L., 1991. Protein-protein interactions with the acidic COOH terminus of the single-stranded DNA-binding protein of the bacteriophage T4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 4010-4014.
63. Kusakabe, T., Richardson, C.C., 1996. The Role of the Zinc Motif in Sequence Recognition by DNA Primases. *Journal of Biological Chemistry* 271, 19563-19570.
64. Lang, B.F., Burger, G., O'Kelly, C.J., Cedergren, R., Golding, G.B., Lemieux, C., Sankoff, D., Turmel, M., Gray, M.W., 1997. An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature* 387, 493-497.
65. Lechner, R.L., Engler, M.J., Richardson, C.C., 1983. Characterization of strand displacement synthesis catalyzed by bacteriophage T7 DNA polymerase. *The Journal of biological chemistry* 258, 11174-11184.
66. Lee, S.J., Richardson, C.C., 2011. Choreography of bacteriophage T7 DNA replication. *Current opinion in chemical biology* 15, 580-586.
67. Li, K., Williams, R.S., 1997. Tetramerization and Single-stranded DNA Binding Properties of Native and Mutated Forms of Murine Mitochondrial Single-stranded DNA-binding Proteins. *Journal of Biological Chemistry* 272, 8686-8694.
68. Lin, T.C., Wang, C.X., Joyce, C.M., Konigsberg, W.H., 2001. 3'-5' Exonucleolytic activity of DNA polymerases: structural features that allow kinetic discrimination between ribo- and deoxyribonucleotide residues. *Biochemistry* 40, 8749-8755.
69. Ling, F., Hori, A., Shibata, T., 2007. DNA recombination-initiation plays a role in the extremely biased inheritance of yeast [*rho*-] mitochondrial DNA that contains the replication origin *ori5*. *Molecular and cellular biology* 27, 1133-1145.



70. Lohman, T.M., Bujalowski, W., 1988. Negative cooperativity within individual tetramers of *Escherichia coli* single strand binding protein is responsible for the transition between the (SSB)<sub>35</sub> and (SSB)<sub>56</sub> DNA binding modes. *Biochemistry* 27, 2260-2265.
71. Lohman, T.M., Bujalowski, W., 1994. Effects of base composition on the negative cooperativity and binding mode transitions of *Escherichia coli* SSB-single-stranded DNA complexes. *Biochemistry* 33, 6167-6176.
72. Lohman, T.M., Overman, L.B., 1985. Two binding modes in *Escherichia coli* single strand binding protein-single stranded DNA complexes. Modulation by NaCl concentration. *The Journal of biological chemistry* 260, 3594-3603.
73. Lorimer, H.E., Brewer, B.J., Fangman, W.L., 1995. A test of the transcription model for biased inheritance of yeast mitochondrial DNA. *Molecular and cellular biology* 15, 4803-4809.
74. Lu, D., Keck, J.L., 2008. Structural basis of *Escherichia coli* single-stranded DNA-binding protein stimulation of exonuclease I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 9169-9174.
75. Macao, B., Uhler, J.P., Siibak, T., Zhu, X., Shi, Y., Sheng, W., Olsson, M., Stewart, J.B., Gustafsson, C.M., Falkenberg, M., 2015. The exonuclease activity of DNA polymerase gamma is required for ligation during mitochondrial DNA replication. *Nature communications* 6, 7303.
76. Maki, S., Kornberg, A., 1988. DNA polymerase III holoenzyme of *Escherichia coli*. III. Distinctive processive polymerases reconstituted from purified subunits. *The Journal of biological chemistry* 263, 6561-6569.
77. Margulis, L., 1971. Symbiosis and evolution. *Scientific American* 225, 48-57.
78. Margulis, L., Chapman, M., Guerrero, R., Hall, J., 2006. The last eukaryotic common ancestor (LECA): acquisition of cytoskeletal motility from aerotolerant spirochetes in the Proterozoic Eon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 13080-13085.
79. Marintcheva, B., Marintchev, A., Wagner, G., Richardson, C.C., 2008. Acidic C-terminal tail of the ssDNA-binding protein of bacteriophage T7 and ssDNA compete for the same binding surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 1855-1860.
80. Masker, W.E., Richardson, C.C., 1976. Bacteriophage T7 deoxyribonucleic acid replication in vitro VI. Synthesis of biologically active T7 DNA. *Journal of molecular biology* 100, 557-567.
81. Masters, B.S., Stohl, L.L., Clayton, D.A., 1987. Yeast mitochondrial RNA polymerase is homologous to those encoded by bacteriophages T3 and T7. *Cell* 51, 89-99.
82. Matsunaga, M., Jaehning, J.A., 2004. Intrinsic promoter recognition by a "core" RNA polymerase. *The Journal of biological chemistry* 279, 44239-44242.
83. McKinney, E.A., Oliveira, M.T., 2013. Replicating animal mitochondrial DNA. *Genetics and molecular biology* 36, 308-315.

84. Miller, E.S., Heidelberg, J.F., Eisen, J.A., Nelson, W.C., Durkin, A.S., Ciecko, A., Feldblyum, T.V., White, O., Paulsen, I.T., Nierman, W.C., Lee, J., Szczypinski, B., Fraser, C.M., 2003. Complete genome sequence of the broad-host-range vibriophage KVP40: comparative genomics of a T4-related bacteriophage. *Journal of bacteriology* 185, 5220-5233.
85. Miralles Fuste, J., Shi, Y., Wanrooij, S., Zhu, X., Jemt, E., Persson, O., Sabouri, N., Gustafsson, C.M., Falkenberg, M., 2014. In vivo occupancy of mitochondrial single-stranded DNA binding protein supports the strand displacement mode of DNA replication. *PLoS genetics* 10, e1004832.
86. Modrich, P., Richardson, C.C., 1975a. Bacteriophage T7 Deoxyribonucleic acid replication in vitro. A protein of *Escherichia coli* required for bacteriophage T7 DNA polymerase activity. *The Journal of biological chemistry* 250, 5508-5514.
87. Modrich, P., Richardson, C.C., 1975b. Bacteriophage T7 deoxyribonucleic acid replication invitro. Bacteriophage T7 DNA polymerase: an an emzyme composed of phage- and host-specific subunits. *The Journal of biological chemistry* 250, 5515-5522.
88. Myers, T.W., Romano, L.J., 1988. Mechanism of stimulation of T7 DNA polymerase by *Escherichia coli* single-stranded DNA binding protein (SSB). *The Journal of biological chemistry* 263, 17006-17015.
89. Nakai, H., Richardson, C.C., 1988. The effect of the T7 and *Escherichia coli* DNA-binding proteins at the replication fork of bacteriophage T7. *The Journal of biological chemistry* 263, 9831-9839.
90. Oliveira, M.T., Kaguni, L.S., 2010. Functional roles of the N- and C-terminal regions of the human mitochondrial single-stranded DNA-binding protein. *PloS one* 5, e15379.
91. Pagliarini, D.J., Calvo, S.E., Chang, B., Sheth, S.A., Vafai, S.B., Ong, S.E., Walford, G.A., Sugiana, C., Boneh, A., Chen, W.K., Hill, D.E., Vidal, M., Evans, J.G., Thorburn, D.R., Carr, S.A., Mootha, V.K., 2008. A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell* 134, 112-123.
92. Paratkar, S., Patel, S.S., 2010. Mitochondrial transcription factor Mtf1 traps the unwound non-template strand to facilitate open complex formation. *The Journal of biological chemistry* 285, 3949-3956.
93. Perumal, S.K., Yue, H., Hu, Z., Spiering, M.M., Benkovic, S.J., 2010. Single-molecule studies of DNA replisome function. *Biochimica et biophysica acta* 1804, 1094-1112.
94. Ramanagoudr-Bhojappa, R., Blair, L.P., Tackett, A.J., Raney, K.D., 2013. Physical and functional interaction between yeast Pif1 helicase and Rim1 single-stranded DNA binding protein. *Nucleic acids research* 41, 1029-1046.
95. Richardson, C.C., Romano, L.J., Kolodner, R., LeClerc, J.E., Tamanoi, F., Engler, M.J., Dean, F.B., Richardson, D.S., 1979. Replication of bacteriophage T7 DNA by purified proteins. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 43 Pt 1, 427-440.
96. Ringel, R., Sologub, M., Morozov, Y.I., Litonin, D., Cramer, P., Temiakov, D., 2011. Structure of human mitochondrial RNA polymerase. *Nature* 478, 269-273.

97. Salinas, F., Benkovic, S.J., 2000. Characterization of bacteriophage T4-coordinated leading- and lagging-strand synthesis on a minicircle substrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 7196-7201.
98. Sambrook, J.a.D.W.R., 2006. *The condensed protocols from Molecular cloning: a laboratory manual.*, Cold Spring Harbor, N. Y.
99. Sandigursky, M., Mendez, F., Bases, R.E., Matsumoto, T., Franklin, W.A., 1996. Protein-protein interactions between the *Escherichia coli* single-stranded DNA-binding protein and exonuclease I. *Radiation research* 145, 619-623.
100. Savkina, M., Temiakov, D., McAllister, W.T., Anikin, M., 2010. Multiple functions of yeast mitochondrial transcription factor Mtf1p during initiation. *The Journal of biological chemistry* 285, 3957-3964.
101. Savvides, S.N., Raghunathan, S., Futterer, K., Kozlov, A.G., Lohman, T.M., Waksman, G., 2004. The C-terminal domain of full-length *E. coli* SSB is disordered even when bound to DNA. *Protein science : a publication of the Protein Society* 13, 1942-1947.
102. Schinkel, A.H., Tabak, H.F., 1989. Mitochondrial RNA polymerase: dual role in transcription and replication. *Trends in genetics : TIG* 5, 149-154.
103. Sedman, T., Joers, P., Kuusk, S., Sedman, J., 2005. Helicase Hmi1 stimulates the synthesis of concatemeric mitochondrial DNA molecules in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics* 47, 213-222.
104. Shereda, R.D., Bernstein, D.A., Keck, J.L., 2007. A central role for SSB in *Escherichia coli* RecQ DNA helicase function. *The Journal of biological chemistry* 282, 19247-19258.
105. Shereda, R.D., Kozlov, A.G., Lohman, T.M., Cox, M.M., Keck, J.L., 2008. SSB as an organizer/mobilizer of genome maintenance complexes. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 43, 289-318.
106. Shutt, T.E., Gray, M.W., 2006a. Bacteriophage origins of mitochondrial replication and transcription proteins. *Trends in genetics : TIG* 22, 90-95.
107. Shutt, T.E., Gray, M.W., 2006b. Twinkle, the mitochondrial replicative DNA helicase, is widespread in the eukaryotic radiation and may also be the mitochondrial DNA primase in most eukaryotes. *Journal of molecular evolution* 62, 588-599.
108. Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H.E., Schonfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., Rehling, P., Pfanner, N., Meisinger, C., 2003. The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 13207-13212.
109. Studier, F.W., 1969. The genetics and physiology of bacteriophage T7. *Virology* 39, 562-574.
110. Sun, W., Godson, G.N., 1998. Structure of the *Escherichia coli* primase/single-strand DNA-binding protein/phage G4oric complex required for primer RNA synthesis. *Journal of molecular biology* 276, 689-703.

111. Tabor, S., Huber, H.E., Richardson, C.C., 1987. *Escherichia coli* thioredoxin confers processivity on the DNA polymerase activity of the gene 5 protein of bacteriophage T7. *The Journal of biological chemistry* 262, 16212-16223.
112. Tang, G.Q., Paratkar, S., Patel, S.S., 2009. Fluorescence mapping of the open complex of yeast mitochondrial RNA polymerase. *The Journal of biological chemistry* 284, 5514-5522.
113. Temiakov, D., Montesana, P.E., Ma, K., Mustaev, A., Borukhov, S., McAllister, W.T., 2000. The specificity loop of T7 RNA polymerase interacts first with the promoter and then with the elongating transcript, suggesting a mechanism for promoter clearance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 14109-14114.
114. Tougu, K., Marians, K.J., 1996. The interaction between helicase and primase sets the replication fork clock. *The Journal of biological chemistry* 271, 21398-21405.
115. Van Dyck, E., Foury, F., Stillman, B., Brill, S.J., 1992. A single-stranded DNA binding protein required for mitochondrial DNA replication in *S. cerevisiae* is homologous to *E. coli* SSB. *The EMBO journal* 11, 3421-3430.
116. Velazquez, G., 2013. *Estudios Estructura-Función de la RNA Polimerasa Mitocondrial de Saccharomyces cerevisiae*, *Bioquímica Estructural. CINVESTAV*, p. 166.
117. Velazquez, G., Guo, Q., Wang, L., Brieba, L.G., Sousa, R., 2012. Conservation of promoter melting mechanisms in divergent regions of the single-subunit RNA polymerases. *Biochemistry* 51, 3901-3910.
118. Velazquez, G., Sousa, R., Brieba, L.G., 2015. The thumb subdomain of yeast mitochondrial RNA polymerase is involved in processivity, transcript fidelity and mitochondrial transcription factor binding. *RNA biology* 12, 514-524.
119. Viikov, K., Jasnovidova, O., Tamm, T., Sedman, J., 2012. C-terminal extension of the yeast mitochondrial DNA polymerase determines the balance between synthesis and degradation. *PLoS one* 7, e33482.
120. Viikov, K., Valjamae, P., Sedman, J., 2011. Yeast mitochondrial DNA polymerase is a highly processive single-subunit enzyme. *Mitochondrion* 11, 119-126.
121. Wang, Y., Shadel, G.S., 1999. Stability of the mitochondrial genome requires an amino-terminal domain of yeast mitochondrial RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 8046-8051.
122. Wanrooij, P.H., Uhler, J.P., Simonsson, T., Falkenberg, M., Gustafsson, C.M., 2010. G-quadruplex structures in RNA stimulate mitochondrial transcription termination and primer formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 16072-16077.
123. Wanrooij, S., Fuste, J.M., Farge, G., Shi, Y., Gustafsson, C.M., Falkenberg, M., 2008. Human mitochondrial RNA polymerase primes lagging-strand DNA synthesis in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 11122-11127.

124. Witte, G., Urbanke, C., Curth, U., 2003. DNA polymerase III chi subunit ties single-stranded DNA binding protein to the bacterial replication machinery. *Nucleic acids research* 31, 4434-4440.
125. Xu, B., Clayton, D.A., 1995. A persistent RNA-DNA hybrid is formed during transcription at a phylogenetically conserved mitochondrial DNA sequence. *Molecular and cellular biology* 15, 580-589.
126. Xu, B., Clayton, D.A., 1996. RNA-DNA hybrid formation at the human mitochondrial heavy-strand origin ceases at replication start sites: an implication for RNA-DNA hybrids serving as primers. *The EMBO journal* 15, 3135-3143.
127. Yang, X., Chang, H.R., Yin, Y.W., 2015. Yeast Mitochondrial Transcription Factor Mtf1 Determines the Precision of Promoter-Directed Initiation of RNA Polymerase Rpo41. *PloS one* 10, e0136879.
128. Young, M.J., Humble, M.M., DeBalsi, K.L., Sun, K.Y., Copeland, W.C., 2015. POLG2 disease variants: analyses reveal a dominant negative heterodimer, altered mitochondrial localization and impaired respiratory capacity. *Human molecular genetics* 24, 5184-5197.
129. Young, M.J., Theriault, S.S., Li, M., Court, D.A., 2006. The carboxyl-terminal extension on fungal mitochondrial DNA polymerases: identification of a critical region of the enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23, 101-116.
130. Zybailov, B., Gokulan, K., Wiese, J., Ramanagoudr-Bhojappa, R., Byrd, A.K., Glazko, G., Jaiswal, M., Mackintosh, S., Varughese, K.I., Raney, K.D., 2015. Analysis of Protein-protein Interaction Interface between Yeast Mitochondrial Proteins Rim1 and Pif1 Using Chemical Cross-linking Mass Spectrometry. *Journal of proteomics & bioinformatics* 8, 243-252.

**ARTÍCULO DERIVADO DE ESTA TESIS**



## Yeast mitochondrial RNA polymerase primes mitochondrial DNA polymerase at origins of replication and promoter sequences



Eugenia Sanchez-Sandoval, Corina Diaz-Quezada, Gilberto Velazquez, Luis F. Arroyo-Navarro, Norineli Almanza-Martinez, Carlos H. Trasviña-Arenas, Luis G. Brieba \*

Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Apartado Postal 629, CP 36500 Irapuato, Guanajuato, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 12 February 2015

Received in revised form 22 June 2015

Accepted 23 June 2015

Available online 13 July 2015

#### Keywords:

Replication

Yeast mitochondria

In vitro

RPO41

### ABSTRACT

Three proteins phylogenetically grouped with proteins from the T7 replisome localize to yeast mitochondria: DNA polymerase  $\gamma$  (Mip1), mitochondrial RNA polymerase (Rpo41), and a single-stranded binding protein (Rim1). Human and T7 bacteriophage RNA polymerases synthesize primers for their corresponding DNA polymerases. In contrast, DNA replication in yeast mitochondria is explained by two models: a transcription-dependent model in which Rpo41 primes Mip1 and a model in which double stranded breaks create free 3' OHs that are extended by Mip1. Herein we found that Rpo41 transcribes RNAs that can be extended by Mip1 on single and double-stranded DNA. In contrast to human mitochondrial RNA polymerase, which primes DNA polymerase  $\gamma$  using transcripts from the light-strand and heavy-strand origins of replication, Rpo41 primes Mip1 at replication origins and promoter sequences in vitro. Our results suggest that in *ori1*, short transcripts serve as primers, whereas in *ori5* an RNA transcript longer than 29 nucleotides is used as primer.

© 2015 Elsevier B.V. and Mitochondria Research Society. All rights reserved.

### 1. Introduction

Proteins involved in mitochondrial DNA (mtDNA) replication and transcription share a common evolutionary origin with proteins from T-odd replisomes (Shutt and Gray, 2006a). In bacteriophage T7, a DNA polymerase, a helicase–primase, an RNA polymerase, and a single-stranded DNA binding protein are sufficient for leading and lagging strand DNA synthesis (Fuller and Richardson, 1985a,b; Hamdan and Richardson, 2009; Lee and Richardson, 2011). In mitochondria, a helicase–primase derived from T-odd replisomes is absent or lacks primase activity, suggesting alternative scenarios for priming mitochondrial DNA (Diray-Arce et al., 2013; Matsushima and Kaguni, 2009; Shutt and Gray, 2006b).

Three mitochondrial proteins phylogenetically related to the T7 replisome have been extensively studied in yeast: 1) Mip1 is a processive mitochondrial DNA polymerase with strand displacement and 3'–5' exonuclease or DNA editing activities (Fouy, 1989; Viikov et al., 2011, 2012), 2) Rim1 is a tetrameric single-stranded DNA binding protein (Van Dyck et al., 1992), and 3) Rpo41 is the mitochondrial RNA polymerase (mtRNAP) that selectively transcribes at a nanonucleotide conserved promoter sequence (Biswas and Getz, 1986; Greenleaf et al., 1986; Matsunaga and Jaehning, 2004). Rpo41 requires the interaction of a mitochondrial transcription factor (Mtf1) for promoter recognition and opening (Paratkar and Patel, 2010).

Human mtRNAP primes mitochondrial DNA polymerase (mtDNAP) at the light-strand (OriL) and heavy-strand origins (OriH) of DNA replication (Fuste et al., 2010; Lee and Clayton, 1998; Wanrooij et al., 2008; Xu and Clayton, 1996). Yeast mtDNA harbors four origins of replication also called *ori* or *rep* elements (*ori1*, *ori2*, *ori3*, and *ori5*) that are transcriptionally active (Baldacci and Bernardi, 1982; Biswas, 1999; de Zamaroczy et al., 1984; Turk et al., 2013). *Ori* or *rep* elements are similar in sequence to the vertebrate OriH of replication (Baldacci and Bernardi, 1982; Baldacci et al., 1984) suggesting that the mechanism for mitochondrial replication could be conserved between yeast and humans.

Two models for mitochondrial DNA replication are postulated to occur in *Saccharomyces cerevisiae*: 1) the RNAP priming or transcription-dependent mtDNA replication model in which Rpo41 primes at origins of replication (Baldacci et al., 1984; Bernardi, 2005; Graves et al., 1998; Van Dyck and Clayton, 1998). In the RNAP priming model, an RNA transcribed at *oris* is used as primer for Mip1 (Graves et al., 1998; Xu and Clayton, 1995), 2) the double-strand breakage or recombination-mediated initiation model in which DNA replication is initiated by a double strand breakage at *ori5* by DNA glycosylase Ntg1. This double-stranded break generates the 3' OHs necessary for DNA replication mediated by DNA recombination (Hori et al., 2009; Ling et al., 2007, 2013). The double-strand breakage model postulates that DNA replication involves the formation of concatemers that are amplified by rolling-circle replication (Ling et al., 2007).

The recombination-mediated initiation model is supported by the finding that [rho<sup>-</sup>] mitochondrial genomes are maintained in the

\* Corresponding author.

E-mail address: [lgbrieba@langebio.cinvestav.mx](mailto:lgbrieba@langebio.cinvestav.mx) (L.G. Brieba).

absence of *oris* or Rpo41 (Fangman et al., 1989, 1990; Lorimer et al., 1995). The transcription-dependent priming model is supported by the finding of Rpo41 mutants able to transcribe but unable to support mitochondrial DNA replication and the formation of a persistent RNA:DNA hybrids at *oris* that can be extended by Mip1 (Wang and Shadel, 1999; Xu and Clayton, 1995).

Albeit the transcription-dependent mtDNA replication mechanism in yeast is controversial, only few studies have addressed the role of Rpo41 in priming mtDNA (Graves et al., 1998; Xu and Clayton, 1995). Herein, we report that Rpo41 efficiently synthesizes primers that are used for primer extension by Mip1 at promoter sequences and *oris*.

## 2. Material and methods

### 2.1. Synthetic and plasmid promoters

Oligonucleotides containing the –20 to +40 nucleotide sequence corresponding to the template and non-template strands of *14S*, *COX I*, *COX II*, and *RPM1* genes, mitochondrial tRNAs and *oris* were synthesized accordingly to their reported sequence (Biswas, 1999). These oligonucleotides contained additional flanking *Eco* RI and *Bam* HI restriction sites. To construct the double-stranded promoters, the template and non-template strands oligonucleotides were purified by PAGE and annealed at 95 °C in 20 mM Tris–HCl pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA. The double-stranded synthetic promoters were directionally subcloned into pUC19. The *oris* and promoter sequences are present in Table S1.

### 2.2. Recombinant proteins

#### 2.2.1. Mip1

The amino acid sequence of Mip1 without its mitochondrial targeting sequence was codon optimized and subcloned into a modified pET19 expression vector (courtesy of Dr. Tom Ellenberger). The recombinant protein was purified as previously described, with minimal modifications (Viikov et al., 2011). Briefly, Mip1 was expressed in an *Escherichia coli* Arctic Express BL-21 (DE3) strain at 10 °C for 18 h. One liter of cell culture was harvested and resuspended in 30 ml of lysis buffer (25 mM HEPES pH 7.5, 500 mM NaCl, 10% glycerol, 5 mM imidazole, 1 mM TCEP) supplemented with 0.5 mg/ml lysozyme, and incubated at 4 °C for 30 min. Cells were lysed using two cycles of freeze–thawing. The lysate was centrifuged at 12,000 rpm for 45 min at 4 °C. The cell-free extract was purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) using a 1 ml pre-packed column. The clarified lysate was loaded onto the IMAC column and the column was extensively washed with 100 ml of lysis buffer using an imidazole gradient (from 10 to 150 mM). Mip1 was eluted with 3 ml of lysis buffer supplemented with 500 mM imidazole and dialyzed in 25 mM Hepes pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 10% glycerol. The dialyzed protein was loaded onto a heparin column equilibrated with dialysis buffer and washed with 100 volumes of a NaCl gradient (from 20 to 300 mM). Mip1 was eluted with 2 ml of dialysis buffer supplemented with 500 mM NaCl. The eluted protein was dialyzed in 25 mM HEPES pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% glycerol, and stored at –20 °C. Rim1: The gene encoding Rim1 without its mitochondrial targeting sequence was PCR-amplified from yeast cDNA and cloned into *Nde* I and *Bam* HI restriction sites of a modified pET19 vector. Rim1 was purified via IMAC and ion exchange as previously described (Ramanagoudr-Bhojappa et al., 2013; Van Dyck et al., 1992). Rpo41 and Mtf1: Rpo41 and Mtf1, were purified using IMAC and ionic exchange chromatography as previously described. Rpo41 and Mtf1 were subcloned in a modified pET19 vector using the DNA corresponding to their full-length amino acid sequence of 341 and 1351 amino acids respectively (Jang and Jaehning, 1991; Matsunaga et al., 2004; Velazquez et al., 2012). The  $\Delta$  hairpin Rpo41 mutant that eliminates residues 641 to 643 of the intercalating  $\beta$ -hairpin was purified using the same protocol of the wild-type Rpo41 (Velazquez et al., 2012).

Histidine tags were cleaved using PreScission Protease. The histidine tags were removed by gel filtration through a Superdex S200 column. Protein purity was verified on SDS-PAGE stained with Coomassie Brilliant Blue R-250.

### 2.3. Transcription reactions on double-stranded promoters

Transcription reactions were carried out in transcription buffer (20 mM Tris–HCl pH 8, 5 mM DTT, 50 mM NaCl, 100  $\mu$ g/ml BSA, 4 mM  $MgCl_2$ ), supplemented with 150  $\mu$ M ATP, 150  $\mu$ M CTP, 150  $\mu$ M GTP, 150  $\mu$ M UTP, and 2  $\mu$ Ci/ $\mu$ l [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-ATP (3000 Ci/mmol). Synthetic promoters were present at 5  $\mu$ M, Rpo41 at 1  $\mu$ M, and Mtf1 at 3  $\mu$ M. Reactions were run at 30 °C for 20 min and stopped by adding an equal volume of stop buffer (98% formamide, 10 mM EDTA pH 8, 0.025% bromophenol blue). The reactions were resolved by denaturing polyacrylamide gel as indicated in the figure legends.

### 2.4. Primers extension on DNA:DNA and RNA:DNA templates

A DNA oligonucleotide of 45 nts was hybridized to a complementary DNA or RNA oligonucleotide of 24 nts. These 24 nts primers were previously [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP labeled. Primer extension reactions were incubated at 30 °C in reaction buffer (20 mM Tris pH 8.0, 10 mM DTT, 40 mM KCl, 2 mM  $MgCl_2$ , 0.5 mg/ml BSA, plus 250  $\mu$ M of each dNTPs). Reactions were resolved by denaturing polyacrylamide gel and analyzed by phosphorimager on a Molecular Dynamics PhosphorImager.

### 2.5. DNA synthesis on dsDNA

#### 2.5.1. DNA synthesis on short dsDNA fragments

Reactions mixtures were incubated on DNA polymerase reaction buffer containing 150  $\mu$ M NTPs, 250  $\mu$ M dATP, 250  $\mu$ M dTTP, 250  $\mu$ M dCTP, 10  $\mu$ M dGTP, and 2  $\mu$ Ci [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dGTP (3000 Ci/mmol). Templates were present at 1  $\mu$ M, Mip1 at 0.3 nM, Rpo41 at 1  $\mu$ M, and Mtf1 at 3  $\mu$ M. The reactions were incubated at 30 °C and resolved as mentioned above.

#### 2.5.2. DNA synthesis on pUC19 promoters

DNA synthesis on pUC19 promoters was assayed as mentioned above but with plasmid templates at 1 nM. The DNA products were labeled with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dGTP and separated by electrophoresis on 0.8% native agarose gel run at 3 V/cm and observed by phosphorimager.

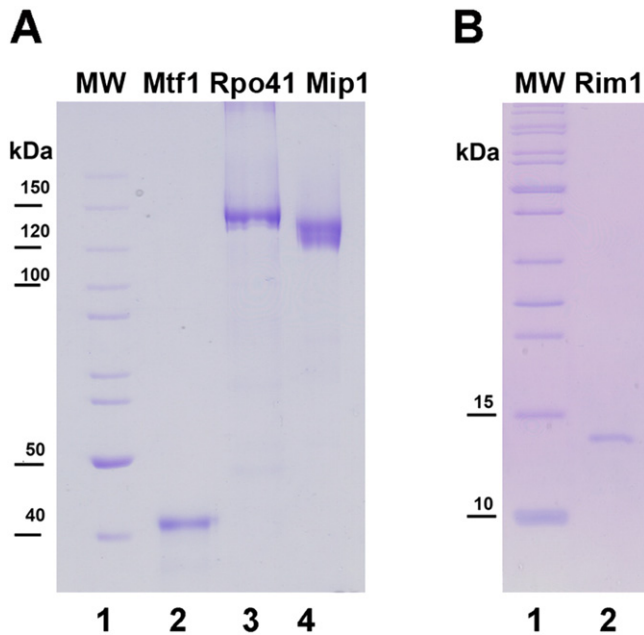
### 2.6. RNA-primed DNA synthesis on ssDNA

RNA synthesis on ssDNA was carried out in reaction mixtures containing M13mp18 ssDNA (New England Biolabs) at 0.1  $\mu$ M, Rpo41 at 1  $\mu$ M, and Mtf1 at 3  $\mu$ M and increasing amounts of Rim1 (0.3, 0.6, 1.2, and 2.4  $\mu$ M), 150  $\mu$ M NTPs, and 2  $\mu$ Ci of [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-ATP. Reactions were incubated at 30 °C for 20 min and stopped as described before. Products were separated by electrophoresis on a 6% denaturing polyacrylamide gel. RNA-primed DNA synthesis contained 100 nM Mip1, 250  $\mu$ M dATP, 250  $\mu$ M dTTP, 250  $\mu$ M dCTP, 10  $\mu$ M dGTP, and 2  $\mu$ Ci [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dGTP. The products were separated by electrophoresis on an alkaline agarose gel (1%) run at 1.5 V/cm, and dried using a vacuum for approximately 6 h. Both gels were detected by autoradiography.

### 2.7. DNA synthesis on duplex and pre-melted promoter

Reactions were carried out in transcription buffer (20 mM Tris–HCl pH 8, 5 mM DTT, 50 mM NaCl, 100  $\mu$ g/ml BSA, 4 mM  $MgCl_2$ ) supplemented with 150  $\mu$ M ATP, 150  $\mu$ M CTP, 150  $\mu$ M GTP, 150  $\mu$ M UTP, and 2  $\mu$ Ci [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dGTP (3000 Ci/mmol). Synthetic duplex or pre-melted (14S) promoters were present at 1  $\mu$ M. Mip1, Rpo41 (wild-type and  $\Delta$  hairpin Rpo41 mutant), and Mtf1 (when indicated) were present at 1 nM, 1  $\mu$ M and 3  $\mu$ M respectively. Reactions were run at 30 °C for





**Fig. 1.** Heterologous purification of Mip1, Rpo41, Mtf1, and Rim1. A) 8% SDS-PAGE gel showing purified Mtf1, Rpo41, and Mip1 as protein bands with molecular weights of 47, 153, and 141 kDa, respectively. B) 15% SDS-PAGE gel showing purified Rim1 as a 13 kDa protein. All proteins were purified using three chromatographic steps (IMAC, ion exchange, and gel filtration). After histidine tag cleavage the heterologous proteins contain an extra Gly-Pro-His sequence before the initial methionine of mitochondrial targeting sequence. Both gels are stained with Coomassie Brilliant Blue.

20 min and stopped by adding an equal volume of stop buffer (98% formamide, 10 mM EDTA pH 8, 0.025% bromophenol blue). The reactions were resolved by 16% denaturing polyacrylamide gel.

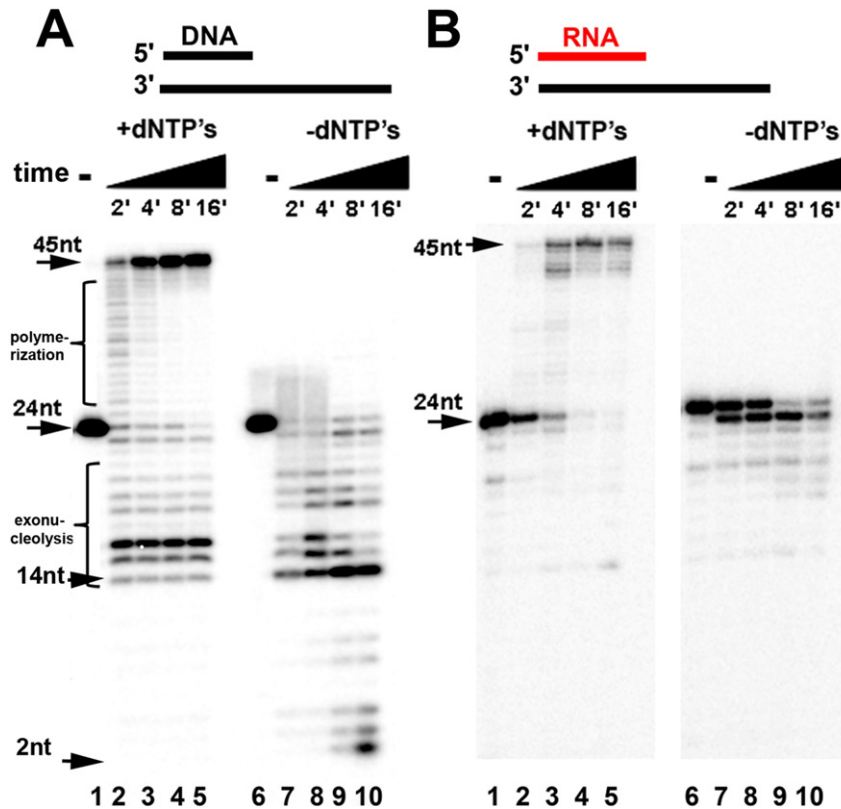
### 2.8. DNA synthesis stopped by ddNTP

Reactions using dideoxynucleotides were carried in described in Section 2.5. A specific dNTP is replaced by its corresponding ddNTP. Reactions were run and resolved by denaturing polyacrylamide gel.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Heterologous purification of Mip1, Rpo41, Mtf1 and Rim1

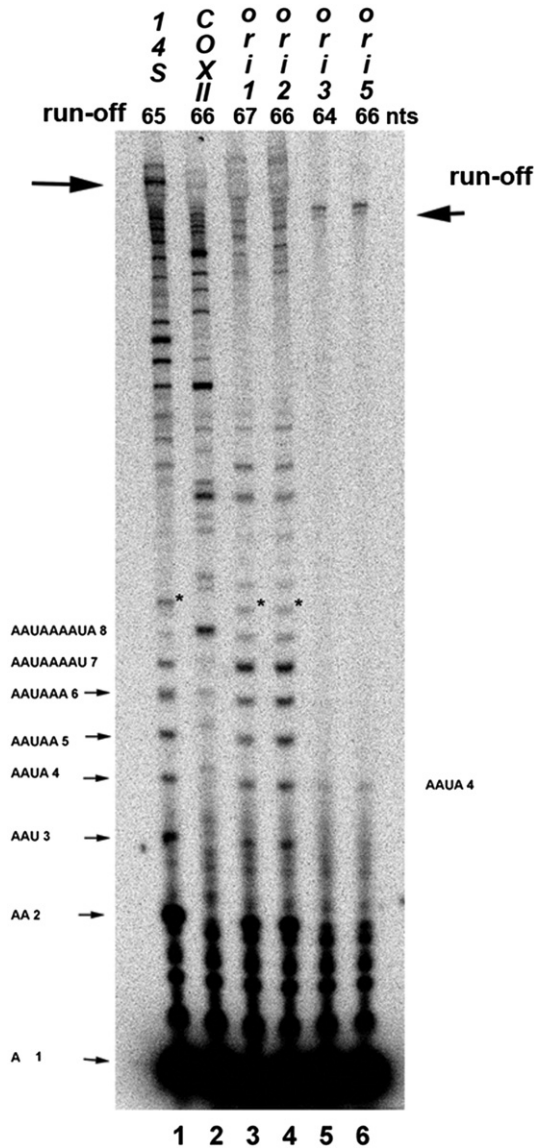
To facilitate the purification of yeast DNA mitochondrial proteins, we subcloned MIP1, RPO41, MTF1, and RIM1 genes into a modified pET19 vector that contains an N-terminal histidine tag and a PreScission Protease recognition site before their mitochondrial targeting sequence. To avoid possible interference of the histidine tag on enzyme activity, histidine tags were removed and the recombinant proteins were ~90 to 95% pure as assessed by densitometry by SDS-PAGE analysis (Majorek et al., 2014) (Fig. 1A and B). All proteins eluted in a single peak at the expected retention time in a S200 gel filtration column (data not shown). The latter indicates that the heterologously expressed proteins are likely monodisperse. The average yield of the purified proteins was approximately 2, 5, 2, and 6 mg per liter of bacterial culture for Mip1, Rim1, Rpo41, and Mtf1 respectively.



**Fig. 2.** Mip1 extends from RNA:DNA hybrids and displays non-processive 5'-3' exonucleolytic activity. A) 16% denaturing polyacrylamide gel showing the polymerization and 5'-3' exonucleolytic activity of Mip1 on a DNA:DNA substrate measured by a time-course reaction. The double-stranded DNA substrate was assembled by annealing a 5'- $\gamma$ - $^{32}$ P labeled DNA of 24 nts (lane 1) to a complementary template of 45 nts. DNA substrate was present at 1 nM and Mip1 at 0.3 nM. To measure the polymerization activity, reactions were incubated with 250  $\mu$ M of each dNTP (lanes 2 to 5) and to drive the reaction to the 5'-3' exonucleolytic activity the dNTPs were absent (lanes 7 to 10). Reactions were initiated by addition of 2 mM  $MgCl_2$  and incubated at 30 °C. Samples were taken at 2, 4, 8, and 16 min and stopped with equal volumes of 50 mM EDTA and 90% formamide. The length of the exonucleolytic and polymerization products are indicated by arrows. B) 16% denaturing polyacrylamide gel showing the polymerization and 5'-3' exonucleolytic activity of Mip1 on a RNA:DNA substrate. The experiment was performed using identical conditions as above.

### 3.2. Mip1 replicates from an RNA:DNA primer–template and displays moderate 3′–5′ exonuclease activity

The transcription-dependent mtDNA replication mechanism depends on the ability of Mip1 to extend from an RNA:DNA duplex without degrading the RNA primer by its intrinsic 3′–5′ exonuclease activity. Therefore, we evaluated Mip1 mediated DNA primer extension using an RNA primer or a DNA primer hybridized to a DNA oligonucleotide and high concentrations of dNTPs. Using a time-course reaction, we found that after 4 min of incubation ~90% of the DNA primer is extended to a product of 45 nts, whereas ~60% of the RNA primer is extended to the full-length product (Fig. 2A and B, lanes 2 to 5). Thus, Mip1 is able to use an RNA:DNA hybrid as substrate, albeit DNA synthesis is less efficient using an RNA:DNA primer–template with respect to a DNA:DNA primer–template (Fig. 2A and B, lanes 2 to 5). This differential in efficiency is similar to the efficiency of human DNA polymerase  $\gamma$



**Fig. 3.** Transcription reaction at *oris* in comparison to *14S* and *COX II* promoters. 25% denaturing polyacrylamide gel showing the transcript patterns produced by Rpo4-Mtf1 on *oris*, *14S*, and *COX II* promoters. Rpo41 and Mtf1 were present at 1  $\mu$ M and 3  $\mu$ M respectively. pUC19 cloned promoters were digested with *Hind III* and added to the reaction mixture to a final concentration of 1  $\mu$ M. The digested plasmids were designed to produce run-off transcripts between 64 and 67 nts. Abortive transcripts are indicated with numbers. The expected length of each run-off product is indicated by an arrow. Transcription reactions were run at 30  $^{\circ}$ C for 20 min and stopped by adding an equal volume of stop buffer.

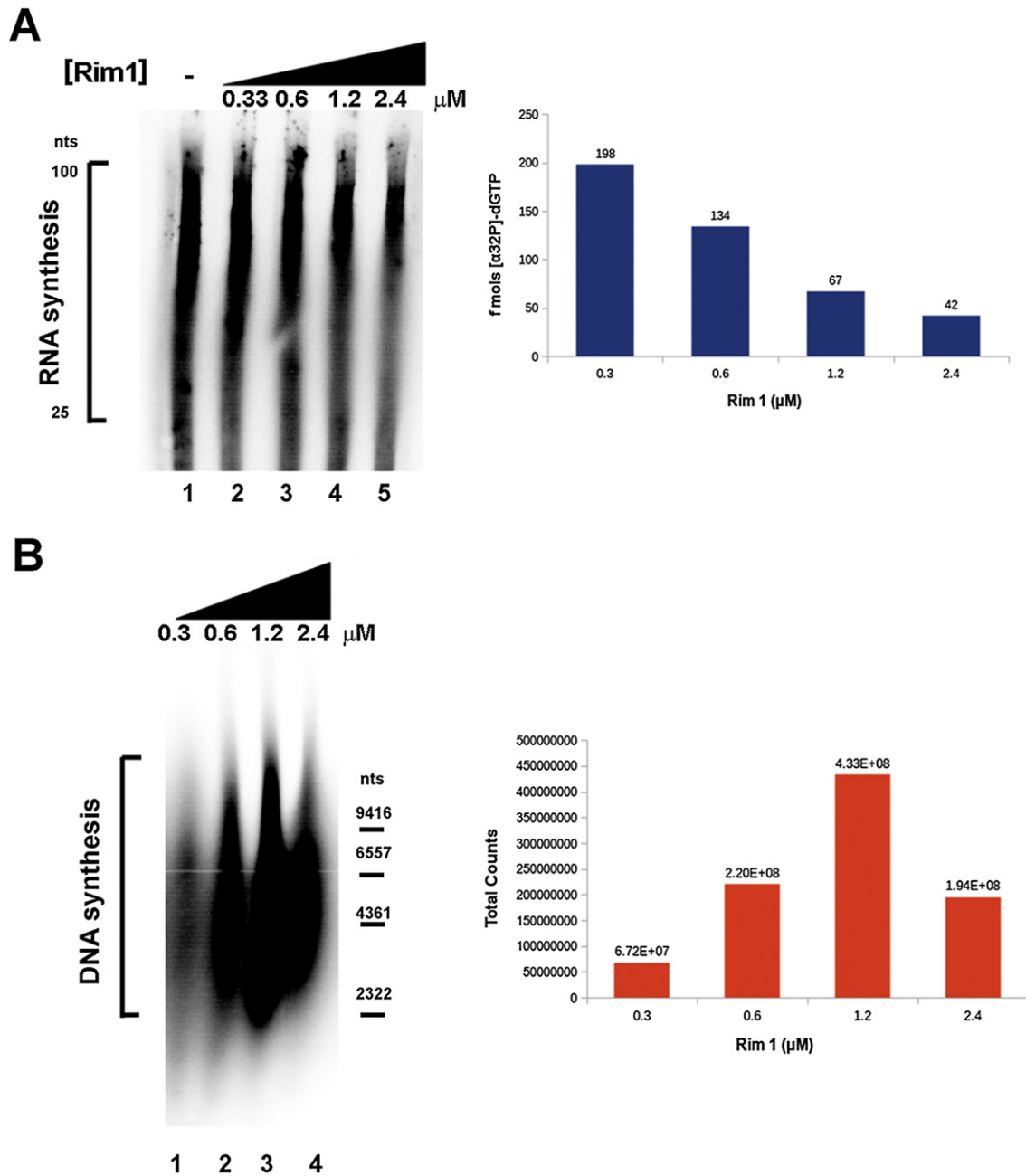
(POLG) extending from a 3′ rNTP primer (Valentine et al., 2001). The transcription-dependent mtDNA replication mechanism requires that the 3′–5′ exonuclease activity of Mip1 does not degrade the transcribed RNA primer to a length at which it cannot be extended. DNA synthesis by Mip1 displays a balance between its 3′–5′ exonuclease and 5′–3′ polymerase activities. In the presence of high concentrations of dNTPs, Mip1 performs coupled DNA polymerization and 3′–5′ exonucleolysis (Viikov et al., 2012). In the presence of dNTPs, one fraction of the DNA primer is degraded to 14 nts and other fraction of the primer is extended to 45 nts; however, the RNA primer is degraded with lower efficiency (Fig. 2A and B, lanes 2 to 5). Structural modeling and site-directed mutagenesis studies indicate that family A DNA polymerases are deficient in 3′–5′ exonucleolysis of RNA primers because of a steric clash of the 2′-OH and conserved amino acids in the exonuclease domain (Lin et al., 2001). As previously reported (Viikov et al., 2011, 2012), the 3′–5′ exonuclease activity of Mip1 is distributive as a series of short intermediates from 23 to 2 nts are present during the time-course of the reaction. Accordingly to the differential in catalytic activity of Mip1 using an RNA or a DNA substrate, in the absence of dNTPs Mip1 degrades the DNA primers to a final product of 2 nts, whereas the RNA primer is degraded to 14 nts (Fig. 2A and B, lanes 6 to 10). The exonuclease–polymerase balance is an intrinsic propriety of each DNA polymerase. For instance, the 3′–5′ exonuclease activity of T7 DNA polymerase (T7DNAP) is several fold higher than the exonuclease activity of *E. coli* DNA polymerase I (Tabor and Richardson, 1987). As yeast mitochondria does not contain a primase, we decided to compare the 3′–5′ exonuclease activities of Mip1 and T7DNAP in a DNA primer–template with 10 fold lower concentration of a DNA:DNA primer–template than in the previous experiment (Fig. 1S, lanes 2–5). Under these conditions a balance between the polymerization and exonuclease activities of Mip1 was observed. The distributive 3′–5′ exonuclease activity of Mip1 contrast to the processive exonucleolytic degradation of T7DNAP in which in the presence of high concentrations of dNTPs, the DNA:DNA primer–template is extended to 45 nts and no intermediate products are observed during the processive degradation of the primer from 24 nts to 2 nts (Fig. 1S, lanes 1–8). The processive exonuclease activity of T7DNAP is exemplified in a reaction without dNTPs, in which after 2 min all the DNA substrate is degraded to 2 nts (Fig. 1S, lanes 9–12). The distributive 3′–5′ exonuclease activity of Mip1 indicates that a transcribed RNA primer could be used as a primer for Mip1-mediated DNA synthesis without being completely degraded.

### 3.3. *Oris* are active promoters with reduced transcription efficiency

Yeast mitochondrial DNA promoters consist of a conserved nonanucleotide sequence (5′-TATAAGTAA [+2]). This sequence is present in 14 active promoter sequences, four origins of replications, and several inactive promoters (Biswas, 1999; Biswas and Getz, 1986; Marczyński et al., 1989). *Oris* are transcriptionally active (Graves et al., 1998; Xu and Clayton, 1995), however their transcription efficiency has not been evaluated to date. To measure the transcription efficiency of *oris*, we compared their transcription patterns to the well-studied transcription patterns of *14S* and *COX II* promoters. *Oris*, *14S*, and *COX II* nucleotide sequences from the –20 to the +40 position (+1 indicated the first transcribed ribonucleotide) were cloned into pUC19 and used as templates (Table 1S). Transcription at *14S* and *COX II* promoters displays a well studied abortive transcription pattern from 2 to 10 nts (Matsunaga and Jaehning, 2004; Paratkar et al., 2011; Velazquez et al., 2012) and a run-off transcript of 65 and 66 nts respectively (Fig. 3, lanes 1 and 2). *ori1*, *ori2*, and *14S* promoters share their first eight transcribed ribonucleotides (Table 1S) and the abortive transcription pattern among these promoters present products with similar intensity (from 2 to 8 nts); however, the final run-off product (67 and 66 nts) of *ori1* and *ori2* is 4.3 times less abundant in comparison to the *14S* run-off product (Fig. 3, lanes 1, 3, and 4). The nucleotide sequences of *ori3* and *ori5* are identical for their first 23 transcribed nucleotides (5′-AATAGG







**Fig. 7.** Increasing concentrations of Rim1 decreased Rpo41 RNA synthesis at single-stranded templates but stimulated Mip1 priming. A) RNA synthesis on M13mp18 single-stranded DNA using increasing concentrations of Rim1 (from 0 to 2.4  $\mu\text{M}$ ) and a fixed concentration of Rpo41. RNA synthesis was labeled by [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-ATP incorporation and the reaction products were separated by electrophoresis on a 10% denaturing polyacrylamide gel. B) RNA-primed DNA synthesis on M13mp18 in the presence of Mip1 and increasing concentrations of Rpo41 (from 0.3 to 2.4  $\mu\text{M}$ ). Reactions were labeled by [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dGTP incorporation, run on a 1% denaturing agarose gel and resolved by phosphorimager.

and the incorporated ddCTP occurs at position +40 that corresponds to the second dCTP present in the nucleotide sequence (Fig. 5B, lanes 1 to 5). The presence of a weak DNA band using ddGTP may indicate that misincorporation of a non chain-terminating deoxynucleotide by Mip1. The ddNTP incorporation results suggest that in *ori1*, short transcribed RNAs serve as primers, whereas in the case of *ori5* a long RNA transcript of more than 29 nts is used as primer.

### 3.6. Mtf1 is not required for primer utilization by Mip1

Rpo41 depends on Mtf1 for promoter opening on double-stranded DNA, but Mtf1 is dispensable for Rpo41 transcription on bubble or

partial single-stranded promoters (Matsunaga and Jaehning, 2004). Mtf1 interacts with Rpo41 during abortive transcription and is released once Rpo41 initiates processive transcription (Mangus et al., 1994). In order to understand whether Mtf1 is needed for primer utilization, we performed a Mip1-mediated DNA amplification experiment with Rpo41 in the presence and absence of Mtf1. We used an Rpo41 mutant deficient in promoter opening (Rpo41  $\Delta$  hairpin) to further validate if Mip1-mediated DNA amplification is linked to the transcribed RNA primers. Rpo41  $\Delta$  hairpin mutant deletes 3 amino acids of the  $\beta$ -intercalating hairpin (641 to 643). Rpo41  $\Delta$  hairpin mutant is deficient in promoter opening and unable to transcribe on double-stranded promoters, but displays wild-type activity on synthetic pre-melted bubble

and partially single-stranded promoters (Velazquez et al., 2012). In experiments lacking Mtf1, DNA amplification by Mip1 is observed only in bubble promoters, result of Rpo41 transcription without the involvement of Mtf1 (Fig. 6, lanes 1 to 4). The absence of DNA amplification products using an Rpo41 mutant deficient in promoter opening and therefore deficient in generating RNA transcripts corroborated that DNA amplification is dependent on the transcriptional activity of Rpo41 (Fig. 6, lanes 3 and 7). As expected in the presence of Mtf1, DNA incorporation was observed in double-stranded and bubble promoters (Fig. 6, lanes 5 to 8).

### 3.7. Rim1 increases Rpo41 priming utilization by Mip1

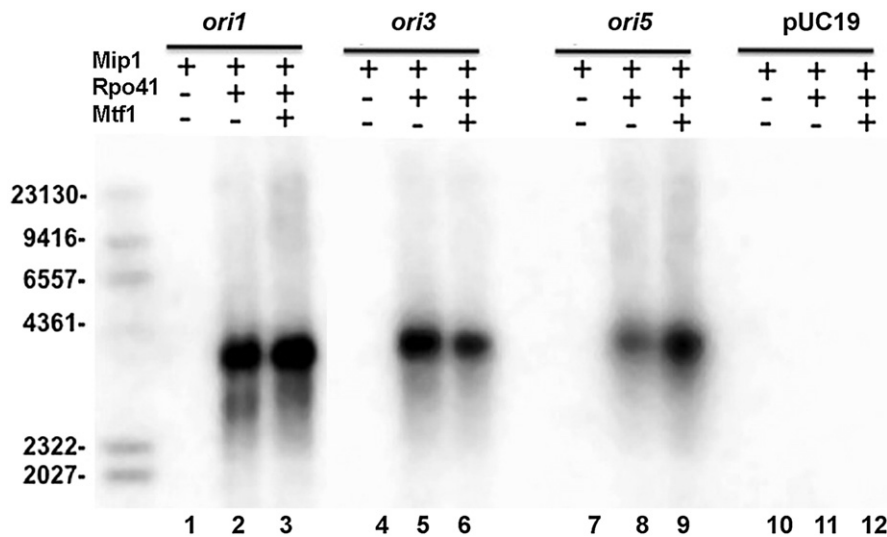
Rim1 is involved in coating single-stranded DNA to avoid DNA damage (Van Dyck et al., 1992). Single-stranded binding proteins stimulate DNA replication in T7 bacteriophage and human mitochondria (Kim and Richardson, 1994; Wanrooij et al., 2008). Thus, we were curious to investigate if Rim1 would modulate Rpo41 activity and DNA synthesis by Mip1. RNA primer synthesis on a single-stranded M13 template is inhibited as the concentration of Rim1 increases (Fig. 7A, lanes 1 to 5). This inhibition is dependent on the concentration of Rim1 and indicates a competition for the single-stranded DNA substrate between Rpo41 and Rim1. At a Rim1 concentration of 2.4  $\mu$ M RNA synthesis on single-stranded DNA is reduced by ~5-fold. Our results agree with similar experiments in which increasing concentrations of hmtSSSB decrease the synthesis of RNA primers by POLRMT and T7RNAP indicating that coating of ssM13 by single-stranded binding proteins decrease the amount of accessible substrate (Wanrooij et al., 2008). In contrast, increasing amounts of Rim1 stimulated DNA amplification by Mip1 reaching the maximal stimulation of ~6.5-fold at a concentration of 1.2  $\mu$ M. This stimulation decreases at 2.4  $\mu$ M (Fig. 7B, lanes 1 to 4). In human mitochondrial and T7 replisome the presence of hmtSSB increases the use of the transcribed primers by POLG (Wanrooij et al., 2008). The reason for the stimulation of Mip1 by Rim1 could be related to an increase in processivity and strand displacement as is the case for the protein–protein interactions of gene 2.5 and T7 DNA polymerase (Ghosh et al., 2009, 2010). The reason for the decrease in stimulation of the activity by increasing amounts of Rim1 resembles the inhibitory effect of gene 2.5 in mutants of T7 DNA polymerase (Ghosh et al., 2010).

### 3.8. Rpo41 primes Mip1 on *ori*s and promoter sequences

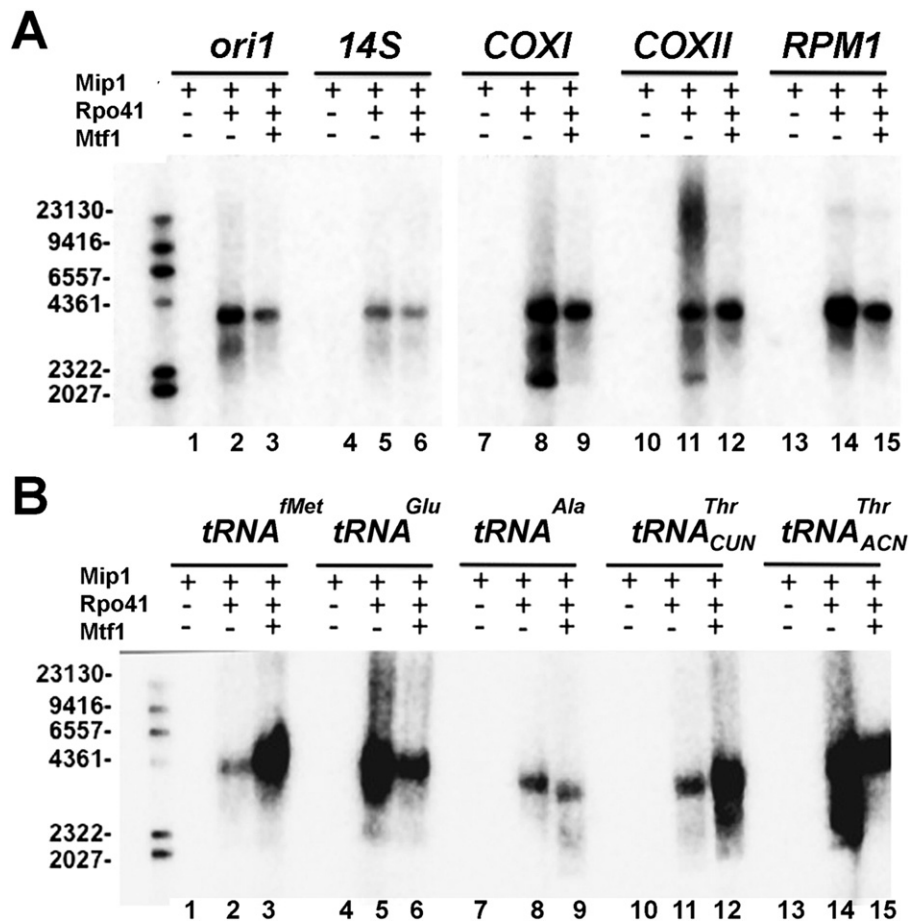
Seminal work by Xu and Clayton indicates that RNA transcripts at *ori*s prime Mip1 (Xu and Clayton, 1995). Our results suggest the possibility that transcripts synthesized at promoter sequences may also serve as primers. In light of these results, we decided to test Mip1-mediated DNA amplification at four *ori*s and nine promoter sequences. *Ori*s and promoter sequences were cloned into pUC19 to evaluate DNA amplification by radioactively labeled dGTP incorporation by Mip1. In DNA amplification reactions resolved by electrophoresis on a native agarose gel we observed the accumulation of a radioactively labeled band greater than 3 kb for reactions containing both Mip1 and Rpo41, but not if Mip1 or Rpo41 are individually present in the reaction (Fig. 8, lanes 1–9 and data not shown). The radioactively labeled DNA band migrates near the molecular weight of a pUC19 plasmid (~2.7 kb), however bands migrating at ~10 and ~20 kb are observed in an overexposed image of the agarose gel at *ori1* and *ori5* (data not shown). We observed DNA amplification even in the absence of Mtf1, as Rpo41 may synthesize primers on supercoiled templates without Mtf1. A control experiment using a pUC19 plasmid without a cloned promoter or *ori* corroborated that DNA synthesis is dependent of Rpo41 transcription (Fig. 8, lanes 10–12). When we repeated the above experiment using *COX I*, *COX II*, *14S*, *RNase P*, and several tRNA promoters, we observed DNA synthesis in the presence of Rpo41 and Mip1 in all promoters (Fig. 9). All promoters with the exception of *14S* and tRNA<sup>Ala</sup> present and increase in their DNA amplification products with respect to the *ori1* control. A DNA product band of ~20 kb was observed in reactions using *COX II* and *RNase P* promoters, possibly as a result of the strong strand displacement of Mip1 in which several rounds of DNA synthesis around the template are catalyzed (Viikov et al., 2011) (Fig. 9, lanes 11 and 14).

## 4. Conclusions

The finding that Rpo41 can use transcripts synthesized at promoter sequences to prime Mip1 explains the replication of [rho<sup>-</sup>] mtDNAs without a replication origin (Fangman et al., 1989; Lorimer et al., 1995). The mechanisms for double-stranded DNA cleavage in the doubled-stranded break model by *Ntg1* are not fully addressed (Ling et al., 2007, 2013) and this model is based on DNA replication studies



**Fig. 8.** Rpo41 primes Mip1 on cloned origins of replication. 1% Native DNA agarose gel showing radioactive [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dGTP incorporation by Mip1 on transcribed origins of replication (*ori1*, *ori3*, and *ori5*) and a control pUC19 plasmid. A DNA labeled band located between 4.3 and 2.3 kb is observed when Mip1 and Rpo41 are present in the reaction (lanes 2,3,5,6,7 and 8) but not when Mip1 (lanes 1, 4, 7) or Rpo41 (data not shown) are solely present. The DNA labeled band is not observed using a control pUC19 plasmid (lanes 10 to 12). The presence of Rim1 has a moderate effect on the intensity of the DNA band (lanes 3,6,9). The relative position of the DNA product with respect to the  $\lambda$ /Hind III molecular weight marker is indicated on the right.



**Fig. 9.** Rpo41 primes Mip1 on canonical promoters. A and B) 1% Native DNA agarose gel showing DNA amplification by Mip1 on yeast promoters. A DNA band of ~4 kb is observed when Mip1 and Rpo41 are present in the reaction using *14S*, *COXI*, *COXII*, *RNase P*, and tRNA promoters as templates. DNA amplification bands longer than 9 kbs are observed in *COXII* and *RNase P* promoters.

using mitochondrial genomes as short as 300 bp to understand the ~85 kb replication of intact yeast mitochondrial DNA. Our data indicate that Rpo41 is an active primase and supports the idea that DNA replication in yeast mitochondria occurs by a mechanism in which Rpo41 primes both DNA strands (Van Dyck and Clayton, 1998; Wang and Shadel, 1999; Xu and Clayton, 1995). In yeast mitochondria all genes, with the exception of *ytRNA<sup>Thr1</sup>*, are transcribed from the same strand and in the same direction that *ori5*, whereas *ori1*, *ori2*, and *ori3* are transcribed from the complementary strand (Foury et al., 1998).

Our results do not exclude the possibility of a replication mechanism in vivo involving a combination of the doubled-stranded break model for replicating the leading strand and Rpo41 as a primase to replicate the lagging strand (Gerhold et al., 2010).

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2015.06.004>.

## Acknowledgments

This work was supported by grants from the Howard Hughes Medical Institute (55005938) and CONACYT-Problemas Nacionales (213915) to LGB.

## References

Baldacci, G., Bernardi, G., 1982. Replication origins are associated with transcription initiation sequences in the mitochondrial genome of yeast. *EMBO J.* 1, 987–994.

- Baldacci, G., Cherif-Zahar, B., Bernardi, G., 1984. The initiation of DNA replication in the mitochondrial genome of yeast. *EMBO J.* 3, 2115–2120.
- Bernardi, G., 2005. Lessons from a small, dispensable genome: the mitochondrial genome of yeast. *Gene* 354, 189–200.
- Biswas, T.K., 1999. Nucleotide sequences surrounding the nonnucleotide promoter motif influence the activity of yeast mitochondrial promoter. *Biochemistry* 38, 9693–9703.
- Biswas, T.K., Getz, G.S., 1986. Nucleotides flanking the promoter sequence influence the transcription of the yeast mitochondrial gene coding for ATPase subunit 9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 270–274.
- de Zamaroczy, M., Faugeron-Fonty, G., Baldacci, G., Goursot, R., Bernardi, G., 1984. The *ori* sequences of the mitochondrial genome of a wild-type yeast strain: number, location, orientation and structure. *Gene* 32, 439–457.
- Debyser, Z., Tabor, S., Richardson, C.C., 1994. Coordination of leading and lagging strand DNA synthesis at the replication fork of bacteriophage T7. *Cell* 77, 157–166.
- Deshpande, A.P., Patel, S.S., 2015. Interactions of the yeast mitochondrial RNA polymerase with the +1 and +2 promoter bases dictate transcription initiation efficiency. *Nucleic Acids Res.* 42, 11721–11732.
- Diray-Arce, J., Liu, B., Cupp, J.D., Hunt, T., Nielsen, B.L., 2013. The Arabidopsis At1g30680 gene encodes a homologue to the phage T7 gp4 protein that has both DNA primase and DNA helicase activities. *BMC Plant Biol* 13, 36.
- Fangman, W.L., Henly, J.W., Churchill, G., Brewer, B.J., 1989. Stable maintenance of a 35-base-pair yeast mitochondrial genome. *Mol. Cell. Biol.* 9, 1917–1921.
- Fangman, W.L., Henly, J.W., Brewer, B.J., 1990. RPO41-independent maintenance of [*rho*<sup>-</sup>] mitochondrial DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10, 10–15.
- 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 Lett.* 440, 325–331.
- Fuller, C.W., Richardson, C.C., 1985a. Initiation of DNA replication at the primary origin of bacteriophage T7 by purified proteins. Initiation of bidirectional synthesis. *J. Biol. Chem.* 260, 3197–3206.
- Fuller, C.W., Richardson, C.C., 1985b. Initiation of DNA replication at the primary origin of bacteriophage T7 by purified proteins. Site and direction of initial DNA synthesis. *J. Biol. Chem.* 260, 3185–3196.

- Fuste, J.M., Wanrooij, S., Jemt, E., Granycome, C.E., Cluett, T.J., Shi, Y., Atanassova, N., Holt, I.J., Gustafsson, C.M., Falkenberg, M., 2010. Mitochondrial RNA polymerase is needed for activation of the origin of light-strand DNA replication. *Mol. Cell* 37, 67–78.
- Gerhold, J.M., Aun, A., Sedman, T., Joers, P., Sedman, J., 2010. Strand invasion structures in the inverted repeat of *Candida albicans* mitochondrial DNA reveal a role for homologous recombination in replication. *Mol. Cell* 39, 851–861.
- Ghosh, S., Marintcheva, B., Takahashi, M., Richardson, C.C., 2009. C-terminal phenylalanine of bacteriophage T7 single-stranded DNA-binding protein is essential for strand displacement synthesis by T7 DNA polymerase at a nick in DNA. *J. Biol. Chem.* 284, 30339–30349.
- Ghosh, S., Hamdan, S.M., Richardson, C.C., 2010. Two modes of interaction of the single-stranded DNA-binding protein of bacteriophage T7 with the DNA polymerase–thioredoxin complex. *J. Biol. Chem.* 285, 18103–18112.
- Graves, T., Dante, M., Eisenhour, L., Christianson, T.W., 1998. Precise mapping and characterization of the RNA primers of DNA replication for a yeast hypersuppressive petite by *in vitro* capping with guanylyltransferase. *Nucleic Acids Res.* 26, 1309–1316.
- Greenleaf, A.L., Kelly, J.L., Lehman, I.R., 1986. Yeast RPO41 gene product is required for transcription and maintenance of the mitochondrial genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 3391–3394.
- Hamdan, S.M., Richardson, C.C., 2009. Motors, switches, and contacts in the replisome. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 205–243.
- Hori, A., Yoshida, M., Shibata, T., Ling, F., 2009. Reactive oxygen species regulate DNA copy number in isolated yeast mitochondria by triggering recombination-mediated replication. *Nucleic Acids Res.* 37, 749–761.
- Jang, S.H., Jaehning, J.A., 1991. The yeast mitochondrial RNA polymerase specificity factor, MTF1, is similar to bacterial sigma factors. *J. Biol. Chem.* 266, 22671–22677.
- Kim, Y.T., Richardson, C.C., 1994. Acidic carboxyl-terminal domain of gene 2.5 protein of bacteriophage T7 is essential for protein–protein interactions. *J. Biol. Chem.* 269, 5270–5278.
- Lee, D.Y., Clayton, D.A., 1998. Initiation of mitochondrial DNA replication by transcription and R-loop processing. *J. Biol. Chem.* 273, 30614–30621.
- Lee, S.J., Richardson, C.C., 2011. Choreography of bacteriophage T7 DNA replication. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15, 580–586.
- Lin, T.C., Wang, C.X., Joyce, C.M., Konigsberg, W.H., 2001. 3′–5′ Exonucleolytic activity of DNA polymerases: structural features that allow kinetic discrimination between ribo- and deoxyribonucleotide residues. *Biochemistry* 40, 8749–8755.
- Ling, F., Hori, A., Shibata, T., 2007. DNA recombination–initiation plays a role in the extremely biased inheritance of yeast [rho<sup>-</sup>] mitochondrial DNA that contains the replication origin ori5. *Mol. Cell Biol.* 27, 1133–1145.
- Ling, F., Hori, A., Yoshitani, A., Niu, R., Yoshida, M., Shibata, T., 2013. Din7 and Mhr1 expression levels regulate double-strand-break-induced replication and recombination of mtDNA at ori5 in yeast. *Nucleic Acids Res.* 41, 5799–5816.
- Lorimer, H.E., Brewer, B.J., Fangman, W.L., 1995. A test of the transcription model for biased inheritance of yeast mitochondrial DNA. *Mol. Cell Biol.* 15, 4803–4809.
- Majorek, K.A., Kuhn, M.L., Chruszcz, M., Anderson, W.F., Minor, W., 2014. Double trouble–Buffer selection and His-tag presence may be responsible for nonreproducibility of biomedical experiments. *Protein Sci.* 23, 1359–1368.
- Mangus, D.A., Jang, S.H., Jaehning, J.A., 1994. Release of the yeast mitochondrial RNA polymerase specificity factor from transcription complexes. *J. Biol. Chem.* 269, 26568–26574.
- Marczynski, G.T., Schultz, P.W., Jaehning, J.A., 1989. Use of yeast nuclear DNA sequences to define the mitochondrial RNA polymerase promoter *in vitro*. *Mol. Cell Biol.* 9, 3193–3202.
- Matsunaga, M., Jaehning, J.A., 2004. Intrinsic promoter recognition by a “core” RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 279, 44239–44242.
- Matsunaga, M., Jang, S.H., Jaehning, J.A., 2004. Expression and purification of wild type and mutant forms of the yeast mitochondrial core RNA polymerase, Rpo41. *Protein Expr. Purif.* 35, 126–130.
- Matsushima, Y., Kaguni, L.S., 2009. Functional importance of the conserved N-terminal domain of the mitochondrial replicative DNA helicase. *Biochim. Biophys. Acta* 1787, 290–295.
- Paratkar, S., Patel, S.S., 2010. Mitochondrial transcription factor Mtf1 traps the unwound non-template strand to facilitate open complex formation. *J. Biol. Chem.* 285, 3949–3956.
- Paratkar, S., Deshpande, A.P., Tang, G.Q., Patel, S.S., 2011. The N-terminal domain of the yeast mitochondrial RNA polymerase regulates multiple steps of transcription. *J. Biol. Chem.* 286, 16109–16120.
- Ramanagoudr-Bhojappa, R., Chib, S., Byrd, A.K., Aarattuthodiyil, S., Pandey, M., Patel, S.S., Raney, K.D., 2013. Yeast Pif1 helicase exhibits a one-base-pair stepping mechanism for unwinding duplex DNA. *J. Biol. Chem.* 288, 16185–16195.
- Shutt, T.E., Gray, M.W., 2006a. Bacteriophage origins of mitochondrial replication and transcription proteins. *Trends Genet.* 22, 90–95.
- Shutt, T.E., Gray, M.W., 2006b. Twinkle, the mitochondrial replicative DNA helicase, is widespread in the eukaryotic radiation and may also be the mitochondrial DNA primase in most eukaryotes. *J. Mol. Evol.* 62, 588–599.
- Tabor, S., Richardson, C.C., 1987. Selective oxidation of the exonuclease domain of bacteriophage T7 DNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 262, 15330–15333.
- Turk, E.M., Das, V., Seibert, R.D., Andrusis, E.D., 2013. The mitochondrial RNA landscape of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 8, e78105.
- Valentine, A.M., Ishmael, F.T., Shier, V.K., Benkovic, S.J., 2001. A zinc ribbon protein in DNA replication: primer synthesis and macromolecular interactions by the bacteriophage T4 primase. *Biochemistry* 40, 15074–15085.
- Van Dyck, E., Clayton, D.A., 1998. Transcription-dependent DNA transactions in the mitochondrial genome of a yeast hypersuppressive petite mutant. *Mol. Cell Biol.* 18, 2976–2985.
- Van Dyck, E., Foury, F., Stillman, B., Brill, S.J., 1992. A single-stranded DNA binding protein required for mitochondrial DNA replication in *S. cerevisiae* is homologous to *E. coli* SSB. *EMBO J.* 11, 3421–3430.
- Velazquez, G., Guo, Q., Wang, L., Briebe, L.G., Sousa, R., 2012. Conservation of promoter melting mechanisms in divergent regions of the single-subunit RNA polymerases. *Biochemistry* 51, 3901–3910.
- Viikov, K., Valjamae, P., Sedman, J., 2011. Yeast mitochondrial DNA polymerase is a highly processive single-subunit enzyme. *Mitochondrion* 11, 119–126.
- Viikov, K., Jasnovidova, O., Tamm, T., Sedman, J., 2012. C-terminal extension of the yeast mitochondrial DNA polymerase determines the balance between synthesis and degradation. *PLoS One* 7, e33482.
- Wang, Y., Shadel, G.S., 1999. Stability of the mitochondrial genome requires an amino-terminal domain of yeast mitochondrial RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 8046–8051.
- Wanrooij, S., Fuste, J.M., Farge, G., Shi, Y., Gustafsson, C.M., Falkenberg, M., 2008. Human mitochondrial RNA polymerase primes lagging-strand DNA synthesis *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 11122–11127.
- Wanrooij, P.H., Uhler, J.P., Simonsson, T., Falkenberg, M., Gustafsson, C.M., 2010. G-quadruplex structures in RNA stimulate mitochondrial transcription termination and primer formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 16072–16077.
- Xu, B., Clayton, D.A., 1995. A persistent RNA–DNA hybrid is formed during transcription at a phylogenetically conserved mitochondrial DNA sequence. *Mol. Cell Biol.* 15, 580–589.
- Xu, B., Clayton, D.A., 1996. RNA–DNA hybrid formation at the human mitochondrial heavy-strand origin ceases at replication start sites: an implication for RNA–DNA hybrids serving as primers. *EMBO J.* 15, 3135–3143.