



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio de la vía retrógrada mediante el uso de reporteros transcripcionales en la levadura  
*Saccharomyces cerevisiae*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
Kevin López del Carpio Juárez

TUTOR PRINCIPAL  
Dr. Roberto Coria Ortega  
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dra. Xóchitl Pérez Martínez  
[Instituto de Fisiología Celular](#)  
Dr. Ismael Bustos Jaimes  
[Facultad de Medicina](#)

Ciudad de México. agosto, 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

CGEP/PMDCB/656/2020  
Asunto: jurado de examen

**López del Carpio Juárez Kevin**  
**Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas**  
**Presente**

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 09 de marzo del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Estudio de la vía retrógrada mediante el uso de reporteros transcripcionales en la levadura Saccharomyces cerevisiae**", dirigida por el/la Dr(a). **Coria Ortega Roberto**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	González Manjarrez María Alicia
VOCAL	Sánchez Puig Nuria Victoria
VOCAL	González Halphen Diego
VOCAL	González Pedrajo Bertha María Josefina
SECRETARIO	Coello Coutiño Martha Patricia

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 09 de marzo de 2020



**Dra. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ**  
**COORDINADORA**

**López del Carpio Juárez Kevin**  
**Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas**  
**Presente**

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 24 de agosto del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Maestro EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Estudio de la vía retrógrada mediante el uso de reporteros transcripcionales en la levadura Saccharomyces cerevisiae**", dirigida por el/la Dr(a). **Coria Ortega Roberto**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente integrante en sustitución de la **Dra. Sánchez Puig Nuria Victoria**.

Vocal: **Funes Argüello María Soledad**

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 24 de agosto de 2020



**Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez**  
**Coordinadora**

**Esta tesis se realizó en el Departamento de Genética Molecular del  
Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de  
México, en el laboratorio del Dr. Roberto Coria Ortega**

# Agradecimientos

Al Dr. Roberto Coria Ortega por todo el tiempo, paciencia, y conocimiento que me dedicó, por su gran calidad de persona y como investigador, sus enseñanzas no solo me hicieron aprender algo que no sabía, hicieron de mí alguien que no existía. Su excelencia profesional es inmensurable, por todos los consejos y valores que me proporcionó, es un orgullo tenerlo como director de tesis, mentor y amigo.

A la Dra. Laura Kawasaki Watanabe por la robustez en su asesoría técnica, por todos los consejos y paciencia. Por motivarme a cumplir mis metas y hacer del laboratorio un lugar tan agradable.

A la Dra. Xóchitl Pérez Martínez miembro de mi comité tutor por comprometerse tanto con mi formación y crecimiento académico, por sus sugerencias, recomendaciones, por el tiempo dedicado a la revisión del protocolo de tesis y por sus excelentes aportaciones que enriquecieron mi proyecto

Al Dr. Ismael Bustos Jaimes, miembros de mi comité tutor por sus aportaciones en mi protocolo de tesis

A la M. en C. Diana María García Chávez por todos los conocimientos que me proporcionó, su colaboración en cada parte fue muy importante, parte de esta tesis fue gracias a ella.

A la Dra. Laura Ongay Larios, a la Lic. Guadalupe Códiz y a la M. en C. Minerva Trejo, miembros de la Unidad de Biología Molecular, por todo el apoyo otorgado, desde consejos experimentales hasta enseñanzas teóricas.

Al Dr. Gabriel del Río Guerra y a la Dra. Teresa Lara Ortiz por proporcionar cepas mutantes que se usaron en este trabajo.

Al Dr. Antonio Peña Díaz, a la Dra. Martha Calahorra y a la M. en C. Norma Sánchez por el apoyo de equipo que sirvió para hacer experimentos de este trabajo.

A la Dr. María Soledad Funes Argüello por proporcionar uno de los plásmidos usados en este trabajo y por las sugerencias en la revisión de tesis.

A los miembros del Taller de Mantenimiento por el apoyo a lo largo de este trabajo.

A los miembros del jurado de examen por sus aportaciones y sugerencias en el proyecto.

## Contenido

<b>I.-Introducción.....</b>	<b>10</b>
• 1.1 Aspectos generales de las proteínas y su plegamiento.....	10
• 1.2 El proteoma mitocondrial: importación y plegamiento .....	10
• 1.3 Importancia de la mitocondria .....	11
• 1.4 La vía UPR mitocondrial.....	12
• 1.4.1 UPRmt en nematodos.....	12
• 1.4.2 UPRmt en mamíferos .....	13
• 1.5 Factores que desencadenan la UPRmt .....	15
<b>II.-Antecedentes.....</b>	<b>17</b>
• 2.1 Comunicación entre la mitocondria y el núcleo en estrés mitocondrial en la levadura <i>S. cerevisiae</i> .....	17
• 2.2 Respuesta retrógrada en la levadura <i>S. cerevisiae</i> .....	17
<b>III.-Justificación .....</b>	<b>19</b>
<b>IV.-Pregunta de investigación .....</b>	<b>20</b>
<b>V.-Hipótesis .....</b>	<b>20</b>
<b>VI.-Objetivos .....</b>	<b>20</b>
• 6.1 Objetivo general .....	20
• 6.2 Objetivos específicos .....	21
<b>VII.- Metodología .....</b>	<b>21</b>
• 7.1 Cepas y plásmidos .....	21
• 7.2 Condiciones de cultivos.....	22
• 7.3 Análisis de crecimiento .....	22
• 7.4 Análisis de dinámica mitocondrial.....	23
• 7.5 Análisis <i>in silico</i> .....	23
• 7.6 Transformación de bacterias.....	23
• 7.7 Transformación de levaduras.....	24
• 7.8 Análisis de expresión.....	24
<b>VIII.-Resultados .....</b>	<b>25</b>
• Análisis de los promotores en los genes de interés .....	25



- El gen *YTA12* contribuye al crecimiento celular en condiciones de estrés ocasionado por cloranfenicol (*chl*) ..... 26
- Efecto del estrés causado por el cloranfenicol (*chl*) en la morfología mitocondrial. .... 29
- El *chl* afecta la expresión de los genes *CCP1*, *HSP10* y *YTA12*. .... 31
- La expresión del gen *YTA12* es dependiente de la vía retrógrada en condiciones de estrés mitocondrial inducido por cloranfenicol (*chl*), mientras que la expresión de *CCP1* se regula negativamente. .... 34

**IX.- Discusión ..... 38**

**XI.-Conclusiones ..... 40**

**XII.-Perspectivas ..... 41**

**XIII.-Bibliografía ..... 41**

**Anexo 1..... 46**

**Anexo 2..... 47**

## Resumen

Las proteínas son moléculas que tienen diversas funciones en la célula. Sin embargo, antes de que una proteína sea funcional debe plegarse. El plegamiento de las proteínas es asistido por chaperonas y chaperoninas, las cuales son moléculas muy importantes en la homeostasis proteica mitocondrial. Cuando el número de proteínas desplegadas en la mitocondria es más grande que la capacidad por plegarlas, se acumulan generando estrés. Para resolver el estrés por acumulación de proteínas desplegadas en la mitocondria de metazoarios, se activa la vía UPR (Unfolded Protein Response). La UPRmt desencadena una respuesta transcripcional específica en el núcleo y la inhibición de la síntesis de proteínas en ribosomas citosólicos. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* no se ha descrito una vía UPRmt y se desconoce como la mitocondria resuelve el estrés por proteínas acumuladas en su matriz. Los resultados de este trabajo en la levadura *S. cerevisiae*, sugieren la activación transcripcional de *YTA12*, el cual codifica para el ortólogo de la vía UPRmt de nematodos Spg7, el cual se activa por cloranfenicol (*chl*), un inhibidor de la traducción mitocondrial que causa estrés mitocondrial. Además, en este trabajo se encontró que la activación transcripcional de *YTA12* durante el estrés mitocondrial inducido por *chl* depende de la vía retrógrada. Esta vía consiste en una comunicación entre la mitocondria y el núcleo cuando hay una disminución en la cantidad de ADNmt o una interferencia con su metabolismo, la cual desencadena una respuesta transcripcional para producir los metabolitos necesarios. Este es el primer reporte en el que un ortólogo de un elemento de respuesta de la vía UPRmt en nematodos, se relaciona con componentes de la vía retrógrada para generar una respuesta transcripcional durante el estrés mitocondrial en *S. cerevisiae*.

**Palabras clave:** Estrés mitocondrial, UPRmt, respuesta retrógrada, *Saccharomyces cerevisiae*, cloranfenicol, proteínas desplegadas, proteínas acumuladas

# **I.-Introducción**

- **1.1 Aspectos generales de las proteínas y su plegamiento**

Las proteínas son moléculas compuestas por aminoácidos que por su composición y orden determinan la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria, así como el efecto hidrofóbico e interacciones de largo alcance que definen su plegamiento (Karplus 1997). Para que una proteína adopte su estructura funcional llamada forma “nativa”, debe plegarse adecuadamente (Karplus 1997; Branden y Tooze 1999).

El plegamiento de algunas proteínas empieza en el túnel de salida del ribosoma (Hardesty y Kramer 2001). Sin embargo, el plegamiento final es asistido por chaperonas y chaperoninas (Gething y Sambrook 1992). Las chaperonas se unen a la superficie hidrofóbica de las proteínas, protegiéndolas del efecto hidrofóbico y propiciando un plegamiento adecuado que depende de su estructura primaria. Las interacciones entre las chaperonas y las proteínas que están en proceso de plegarse tienen un tiempo de asociación efímero y cuando las chaperonas se despegan de la superficie hidrofóbica, las proteínas quedan en un estado de plegamiento intermediario. Nuevas chaperonas actúan en ciclos repetidos sobre los intermediarios de plegamiento hasta que se alcanza el estado final (Hartl y Hayer-Hartl 2002; Saibil 2013).

- **1.2 El proteoma mitocondrial: importación y plegamiento**

El proteoma mitocondrial está constituido por más de 1300 proteínas codificadas tanto en genes mitocondriales como en genes nucleares. Menos de 20 proteínas están codificadas en el genoma mitocondrial y son subunidades que dan origen a los complejos de la cadena respiratoria y de la FoF1-ATP sintetasa. Las proteínas que están codificadas en el genoma mitocondrial presentan un alto grado

de hidrofobicidad, por lo que el túnel de salida de los ribosomas mitocondriales está adaptado estructuralmente para su plegamiento adecuado (Greber y Ban 2016)

Gran parte del mantenimiento de la mitocondria se lleva a cabo por proteínas codificadas en genes nucleares y constituyen aproximadamente el 99% del proteoma mitocondrial. En consecuencia, hay un constante flujo de proteínas extramitocondriales que necesitan ser ensambladas y maduras adentro de la mitocondria (Nelson y Cox 2014). Cuando las chaperonas detectan en el túnel de salida de los ribosomas citosólicos una secuencia de importación mitocondrial (MTS), transportan al complejo ternario formado por el ribosoma, el ARNm y el péptido naciente, hasta la translocasa de la membrana externa mitocondrial (TOM). De esta manera la importación mitocondrial ocurre de forma acoplada a la traducción citoplásmica (Hardesty y Kramer 2001; Yogev *et al.*, 2007).

Una vez dentro de la mitocondria, los péptidos importados son asediados por una variedad de chaperonas y chaperoninas, las cuales inducen un ensamblaje y plegamiento apropiado, protegiéndolos del efecto hidrofóbico y otros factores (Hartl y Hayer-Hartl 2002, Saibil 2013).

A pesar de que este proceso está fuertemente regulado, cuando las chaperonas se saturan, la capacidad de ensamblaje y plegamiento proteico mitocondrial se ve atenuado, desencadenando que algunas proteínas no alcancen su estado nativo induciendo estrés y disfunción mitocondrial (Jia *et al.*, 2011).

- **1.3 Importancia de la mitocondria**

La mitocondria es uno de los organelos más importantes en la célula, ya que aquí ocurre la respiración y se produce, mediante la fosforilación oxidativa, gran parte de la energía que necesita la célula. Además, se llevan a cabo varios procesos esenciales en el metabolismo, tales como el ciclo de Krebs y la  $\beta$ -oxidación, entre otros. Estos procesos requieren de enzimas eficaces con un funcionamiento adecuado, por lo que una alteración en el proteoma mitocondrial es muy dañina para la célula (Nelson y Cox 2014).

En casos de estrés generado por la acumulación de agregados proteicos, hay un proceso llamado Respuesta a las Proteínas Desplegadas o vía UPR (del inglés, Unfolded Protein Response). Este

proceso es una vía de señalización que comunica a la mitocondria y al núcleo (Jovaisaite *et al.*, 2014; Runkel *et al.*, 2013; Benedetti *et al.*, 2006; Yoshida *et al.*, 2000; Haynes *et al.*, 2013).

- **1.4 La vía UPR mitocondrial**

La vía UPR es un sistema de control de calidad dentro de la mitocondria. En términos generales, cuando las proteínas mitocondriales no alcanzan su conformación nativa, se acumulan en la matriz y en el espacio intermembranal. Esto activa una respuesta transcripcional de genes nucleares que codifican para chaperonas y proteasas mitocondriales (Zhao *et al.*, 2002; Benedetti *et al.*, 2006), con el objetivo de aumentar la capacidad de plegamiento y de degradación de péptidos que no se plegaron adecuadamente.

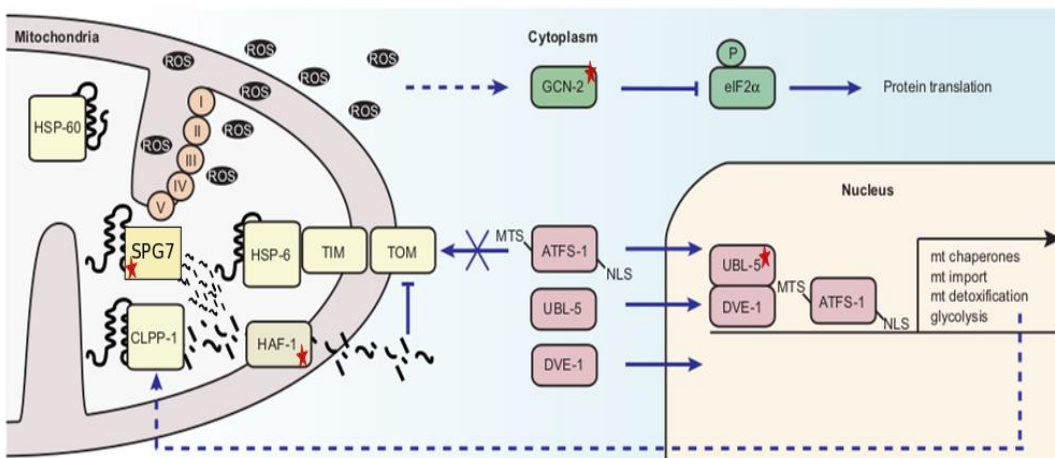
Además, se ha descrito que la vía UPRmt se acopla a otro sistema de control de calidad que remueve proteínas mitocondriales acumuladas en el citosol a través de la proteosoma 26S (Zhao *et al.*, 2002). Este proceso es esencial para mantener la homeostasis celular y estudios recientes sobre longevidad sugieren que la UPRmt puede prevenir el deterioro funcional asociado al envejecimiento y a sus enfermedades relacionadas (Houtkooper *et al.*, 2013). Hasta ahora la UPRmt se ha caracterizado en mamíferos y nematodos, pero no en la levadura.

- **1.4.1 UPRmt en nematodos**

En *C. elegans* la vía UPRmt se origina en la matriz mitocondrial, cuando las proteínas con un plegamiento erróneo se acumulan y sobrecargan la capacidad de las chaperonas. En consecuencia, las proteínas acumuladas se proteolizan en péptidos cortos de 6 a 30 aminoácidos de longitud mediante la acción de las proteasas Clpp-1 y Spg7. Los péptidos pequeños resultantes son transportados por Haf-1, el cual está embebido en la membrana interna y acarrea a estos péptidos desde la matriz mitocondrial al espacio intermembranal para que puedan difundir hacia el citoplasma. Los péptidos transportados al

citoplasma de esta forma afectan la importación a la mitocondria de nuevas proteínas (Jovaisaite *et al.*, 2014; Runkel *et al.*, 2013; Benedetti *et al.*, 2006), incluyendo a Atfs-1 que en condiciones normales entra a la matriz mitocondrial porque contiene una secuencia de localización mitocondrial (MTS) y allí es degradada por la proteasa Lon. Sin embargo, durante la UPRmt la importación interrumpida de Atfs-1 propicia su acumulación en el citoplasma (Jovaisaite *et al.*, 2014; Runkel *et al.*, 2013; Benedetti *et al.*, 2006), con lo que eventualmente se transporta al núcleo mediante su secuencia de localización nuclear (NLS). En el núcleo, Atfs-1 coopera con un complejo formado por Ubl-5 y Dve-1, para que éste se asocie al promotor del gen de la chaperona mitocondrial *HSP-60* y a promotores de los genes *SPG7* y *CLPP-1* con lo que se activa su transcripción (Jovaisaite *et al.*, 2014; Runkel *et al.*, 2013; Benedetti *et al.*, 2006).

De manera alternativa y paralela a las actividades de Atfs-1, Gcn-2, una cinasa dependiente de especies reactivas de oxígeno (ROS) que se generan en mitocondrias disfuncionales, fosforila al factor eIF2- $\alpha$ , el cual participa en el inicio de la traducción. La forma fosforilada de este factor no es activa, por lo que se inhibe la traducción citoplásmica de proteínas y con esto se reduce la carga en las chaperonas mitocondriales (Jovaisaite *et al.*, 2014; Runkel *et al.*, 2013;) (Figura 1).



**Figura 1.** La vía UPRmt en *C. elegans* está mediada por Atfs-1, la cual en estrés mitocondrial por proteínas desplegadas activa chaperonas y genes de respuesta. Alternativamente a Atfs-1, Gcn-2 se activa por la acumulación de ROS e inactiva la traducción citosólica para aliviar la carga proteica, mediante la fosforilación del factor eIF2. (Jovaisaite *et al.*, 2014; Runkel *et al.*, 2013; Benedetti *et al.*, 2006).

- **1.4.2 UPRmt en mamíferos**

En mamíferos, la vía UPR<sub>mt</sub> ocurre tanto en la matriz mitocondrial como en el espacio intermembranal, y se les conoce como la vía activa y la vía de protección, respectivamente (Yoshida *et al.*, 2000; Jovaisaite *et al.*, 2014; Haynes *et al.*, 2013). En la vía activa se ha observado que varios componentes de la vía de *C. elegans* están conservados, incluyendo a las chaperonas mitocondriales y Clpp-1 (Zhao *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2000; Jovaisaite *et al.*, 2014).

Una vez que se detecta el estrés mitocondrial por proteínas acumuladas, las cinasas Jnk2 y Pkr fosforilan al factor de transcripción c-Jun en los residuos Ser63 y Ser73, esta activación hace que el factor de transcripción se una al sitio AP-1 en el promotor de los genes *CHOP* y *C/EBPβ*, los cuales codifican factores de transcripción que se unen a sitios en promotores de genes que son elementos de respuesta de UPR<sub>mt</sub>. (Zhao *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2000; Jovaisaite *et al.*, 2014). Por su parte la cinasa Pkr fosforila a eIf2α, lo que inhibe la traducción de proteínas en citoplasma y por tanto induce una reducción en la sobrecarga de las chaperonas mitocondriales (Zhao *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2000; Jovaisaite *et al.*, 2014).

En la vía de protección, las proteínas acumuladas en el citoplasma son detectadas y se degradan por el proteosoma 26S, pero si alguna proteína desplegada aún ingresa al espacio intermembranal, es eliminada por la proteasa Htra2. Cuando la proteasa Htra2 se sobrecarga por el exceso de agregados proteicos en el espacio intermembranal, se afecta a la cadena respiratoria, lo que conduce a una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Además, una gran parte de los ROS producidos no pueden ser degradados debido a la reducida importación de proteínas a la mitocondria (Zhao *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2000; Jovaisaite *et al.*, 2014). La proteína cinasa Akt es sensible a las ROS producidas en el espacio intermembranal, lo que induce su fosforilación y esto propicia la activación del receptor de estrógeno α (ERα) (Zhao *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2000; Jovaisaite *et al.*, 2014). ERα por su parte, puede aumentar la actividad del proteosoma o aumentar el control de calidad en el espacio intermembranal al amplificar los niveles de expresión del gen *HTRA2*. Además, la activación de ERα aumenta la transcripción del factor respiratorio nuclear 1 (NRF1), que protege las mitocondrias y previene la pérdida del potencial de membrana mitocondrial mediante la activación transcripcional de genes nucleares necesarios para la respiración, la transcripción y replicación de ADN mitocondrial (Zhao *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2000; Jovaisaite *et al.*, 2014) (Figura 2).

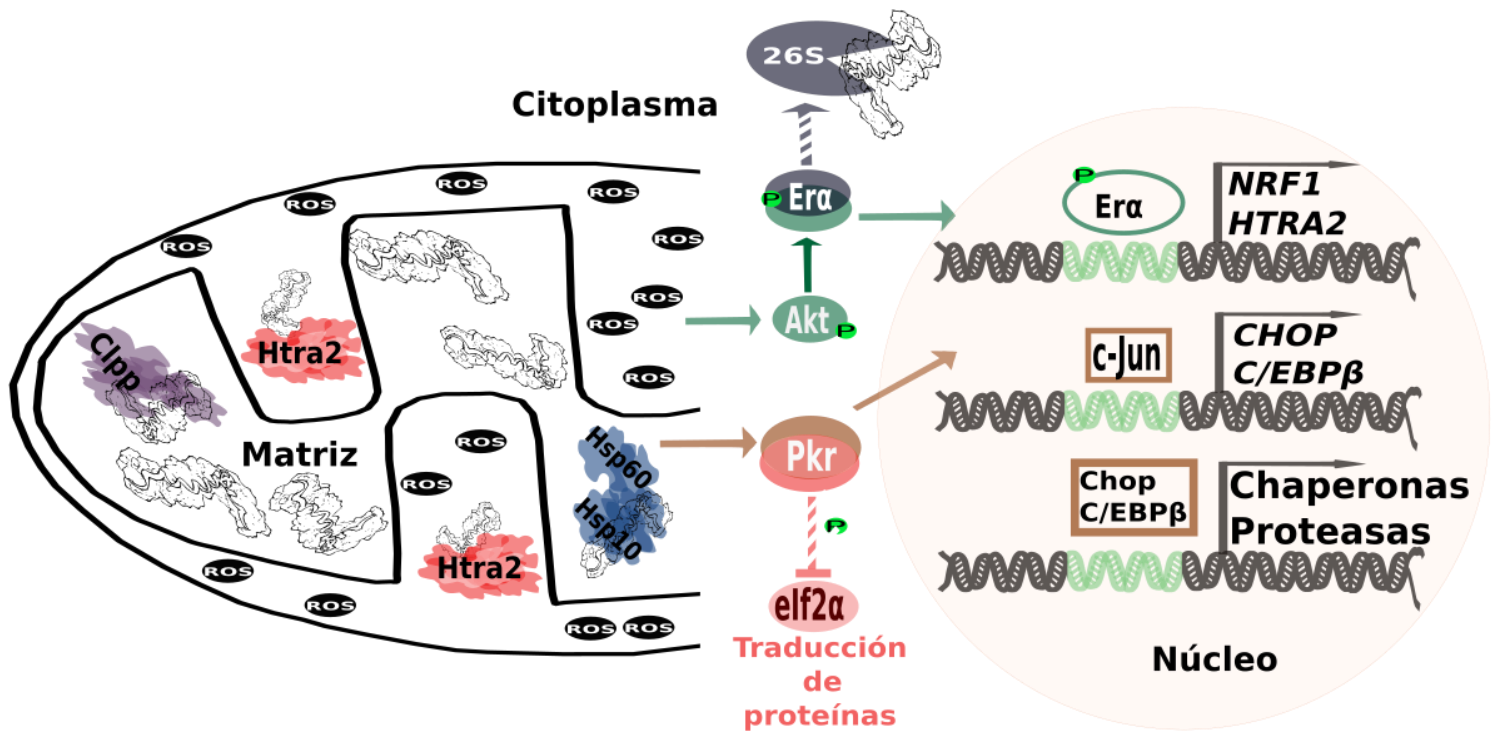
- **1.5 Factores que desencadenan la UPRmt**

Uno de los principales factores que desencadenan la UPRmt es la descompensación entre las proteínas codificadas en el ADN mitocondrial y en el ADN nuclear. Las proteínas que llevan a cabo la fosforilación oxidativa se componen de subunidades de origen nuclear y mitocondrial, las cuales tienen un equilibrio estequiométrico; cuando este equilibrio se pierde, se acumulan subunidades huérfanas en la mitocondria. Existen diversos factores que desencadenan esta descompensación como pueden ser mutaciones puntuales, la inhibición de la transcripción del ADNmt, la deficiencia de actividad de proteosoma 26S y la alteración de la maquinaria de traducción mitocondrial, entre otros (Houtkooper *et al.*, 2013).

La doxiciclina y el cloranfenicol (*chl*) inhiben la síntesis de proteínas en ribosomas mitocondriales, debido a que impiden la formación del complejo ribosoma-ARNt, el cual afecta a la elongación del péptido nascente, lo que induce una disminución en la respiración y una activación de la UPRmt en *C. elegans* (Houtkooper *et al.*, 2013).

En patologías como la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (Ferri *et al.*, 2006) y como la ataxia de Friedrich (Correia *et al.*, 2008), se ha visto que existe daño mitocondrial, lo que desencadena la formación de agregados proteicos en la matriz mitocondrial, los cuales en etapas iniciales pueden activar la UPRmt.





**Figura 2.** La señalización UPRmt en mamíferos esta mediada por Jkn2 y Pkr que fosforilan a c-Jun para que active la transcripción de *CHOP* y *C/EBPβ*, que a su vez promueven la transcripción de chaperonas y proteasas mitocondriales. Además, Pkr inhibe la traducción de proteínas citosólicas. En una vía alternativa en el espacio intermembranal, Akt, promueve la activación del proteosoma 26S en el citosol y la activación transcripcional del gen *HTRA2* (el cual codifica una proteasa del espacio intermembranal mitocondrial) y del gen *NRF1* (el cual codifica un factor de transcripción clave en la replicación y transcripción del ADN mitocondrial) (Jovaisaite *et al.*, 2014).

## II.-Antecedentes

- **2.1 Comunicación entre la mitocondria y el núcleo en estrés mitocondrial en la levadura *S. cerevisiae***

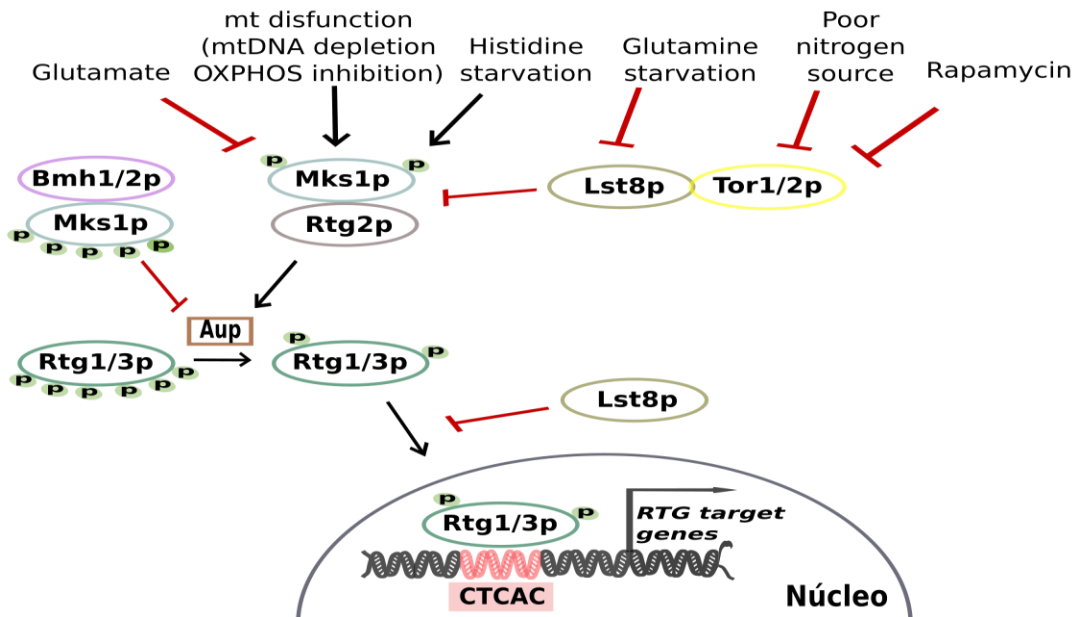
En la levadura *S. cerevisiae* se desconoce cómo la mitocondria responde a estrés por proteínas mal plegadas dentro de la matriz mitocondrial. Recientemente se han descrito diversas vías que responden al estrés por la disminución de la importación mitocondrial, la cual atenúa la traducción citosólica reprogramando los patrones de expresión genética (Boos *et al.*, 2019; Avendaño-Monsalve *et al.*, 2020). Para compensar este desequilibrio estequiométrico en la mitocondria, entre las proteínas codificadas del ADN mitocondrial y en el ADN nuclear y estabilizar la homeostasis proteica mitocondrial se activan programas de adaptación transcripcional, en los cuales se incrementa la actividad del proteosoma, a través de la regulación positiva y negativa de activadores transcripcionales como Hsf1, Rpn4, HAP y Pdr3 (Wang and Chen, 2015; Wrobel *et al.*, 2015; Boos *et al.*, 2019; Matsumoto *et al.*, 2019). Sin embargo, hasta ahora este tipo de estudios no han permitido identificar una UPR mitocondrial. Lo más cercano a una UPRmt es la llamada respuesta retrógrada, ya que, en ésta, como en la UPRmt, existe una comunicación con el núcleo cuando hay disfunción en el interior de la mitocondria, generada por condiciones de estrés. Lo que se sabe hasta ahora es que la respuesta retrógrada se activa cuando hay una disminución en la cantidad de ADNmt o una interferencia con su metabolismo y cuando hay una inhibición de la fosforilación oxidativa (Sekito *et al.*, 2000) (Figura 3).

- **2.2 Respuesta retrógrada en la levadura *S. cerevisiae***

La respuesta retrógrada en levaduras es controlada por las proteínas Bmh1p, Bmh2p, Rtg1p, Rtg2p, Rtg3p y Aup1 (Liu *et al.*, 2003; Sekito *et al.*, 2000; Haynes *et al.*, 2013; Jovaisaite *et al.*, 2014) (Figura 3). En condiciones normales (cuando el sistema esta silenciado), la proteína Mks1p se encuentra

hiperfosforilada, lo que hace que su extremo amino se una al dímero Bmh1p-Bmh2p. En condiciones de estrés mitocondrial (cuando el sistema está activo) Mks1p está hipofosforilada y por medio de su extremo carboxilo terminal se une a Rtg2p, lo cual propicia la hipofosforilación de Rtg1p-Rtg3p mediada por Aup1.

Rtg3p es una proteína con una secuencia de localización nuclear. Sin embargo, en condiciones normales forma un dímero con Rtg1p en el citoplasma. La localización citoplasmática del dímero Rtg1p-Rtg3p es dependiente de su estado de fosforilación. En condiciones de disfunción mitocondrial, el dímero hipofosforilado se transporta al núcleo y activa genes que tienen sitios de unión CTCAC conocidos como “cajas r”. Un gen que está muy caracterizado y que se regula de esta manera es *CIT2*, el cual tiene dos cajas R en su promotor. Esta vía además es regulada negativamente por Lst8p de manera dependiente e independiente de Tor1 y Tor2 (Liu *et al.*, 2003; Sekito *et al.*, 2000; Haynes *et al.*, 2013; Jovaisaite *et al.*, 2014) (Figura 3).



**Figura 3. Respuesta retrógrada.** Mks1p regula positiva o negativamente a Aup1 afectando el estado de fosforilación del dímero Rtg1p-Rtg3p. En disfunción mitocondrial Rtg1p-Rtg3p está hipofosforilado y activa genes nucleares de respuesta al estrés mitocondrial. Liu *et al.*, 2003; Sekito *et al.*, 2000; Haynes *et al.*, 2013; Jovaisaite *et al.*, 2014)

### III.-Justificación

Debido a que se desconoce si existe una vía UPRmt en la levadura *S. cerevisiae* y que la vía retrógrada está poco caracterizada, en este trabajo se propone estudiar genes nucleares que codifican para proteínas mitocondriales, algunos de los cuales en *C. elegans* y en mamíferos responden a la UPRmt. Decidimos usar *chl*, un inductor de estrés mitocondrial, el cual inhibe la síntesis de proteínas en ribosomas mitocondriales, debido a que impide la formación del complejo ribosoma-ARNt, y esto afecta a la elongación del péptido nascente, lo que induce una disminución en la respiración y una activación de la UPRmt en *C. elegans*. Sin embargo, en la levadura *S. cerevisiae* no se sabe si hay UPRmt y se desconoce si este tipo de estrés por *chl* genera una UPRmt. Por lo tanto, en este trabajo, más que referirnos a UPRmt en levaduras, incluimos el término "estrés mitocondrial" a los efectos del tratamiento con cloranfenicol, suponiendo que esto genera defectos en el plegamiento y en el procesamiento de proteínas mitocondriales. La detección de genes nucleares que respondan a condiciones de estrés mitocondrial inducido por *chl* nos ayudará en primer lugar a discernir si su expresión se comporta de la misma manera que sus ortólogos en la vía UPRmt en *C. elegans* y en segundo lugar a caracterizar si en esta condición su expresión depende de la vía retrógrada en la levadura *S. cerevisiae*. En la Tabla 1 se enlistan los genes que se estudiaron en este trabajo y las proteínas que codifican.

**Tabla 1. Ortólogos de vía UPRmt y genes relacionados funcionalmente**

Genes en <i>S. cerevisiae</i>	Función mitocondrial de la proteína que codifica	cita
<i>HUB1</i>	Activador Transcripcional nuclear (Ortólogo de <i>UBL5</i> en <i>C. elegans</i> )	Benedetti <i>et al.</i> , 2006
<i>MDL1</i>	Transportador de péptidos de la matriz al citoplasma (Ortólogo de <i>Haf1</i> en <i>C. elegans</i> )	Young <i>et al.</i> , 2001
<i>GCN2</i>	Cinasa que fosforila a <i>elf2<math>\alpha</math></i>	Kubota <i>et al.</i> , 2001
<i>NMA11</i>	Proteasa y chaperona del espacio intermembranal (ortólogo de <i>Htra2</i> en mamíferos)	Padmanabhan <i>et al.</i> , 2009
<i>HSP10</i>	Chaperonina de matriz	Höhfeld y Hartl 1994
<i>CCP1</i>	Oxidoreductasa que degrada hidropéroxidos con mayor afinidad al H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Charizanis <i>et al.</i> , 1999
<i>SUE1</i>	Proteasa que degrada formas inestables de citocromo c	Wei y Sherman 2004
<i>YTA12</i>	Proteasa m-AAA (Ortólogo de <i>SPG7</i> en <i>C. elegans</i> )	Arlt <i>et al.</i> , 1996

## **IV.-Pregunta de investigación**

¿La transcripción de los genes *CCP1*, *SUE1*, *HSP10*, *GCN-2*, *HUB1*, *MDL1*, *YTA12* y *NMA111* se regula por la vía retrógrada en condiciones estrés mitocondrial inducido por *chl* en la levadura *S. cerevisiae*?

## **V.-Hipótesis**

La expresión de los genes *CCP1*, *SUE1*, *HSP10*, *GCN-2*, *HUB1*, *MDL1*, *YTA12* y *MA111* aumentará en condiciones de estrés mitocondrial inducido por *chl* y se verá afectada en mutantes de la vía retrógrada.

## **VI.-Objetivos**

- **6.1 Objetivo general**

Determinar la actividad transcripcional de los genes *CCP1*, *SUE1*, *HSP10*, *GCN-2*, *HUB1*, *MDL1*, *YTA12* y *NMA111* en mutantes de *S. cerevisiae* de la vía retrógrada cuando exista estrés mitocondrial inducido por *chl*.

- **6.2 Objetivos específicos**

1.- Evaluar el fenotipo de las mutantes de los genes de interés en presencia de estrés mitocondrial inducido por *chl*.

2.- Determinar la actividad transcripcional de estos genes en condiciones de estrés mitocondrial inducido por *chl*.

3.- Evaluar la expresión de estos genes en mutantes de la vía retrógrada en presencia y ausencia de estrés mitocondrial inducido por *chl*.

## **VII.- Metodología**

- **7.1 Cepas y plásmidos**

Para todos los experimentos del trabajo se emplearon levaduras de la especie *S. cerevisiae* de la cepa BY4742. Las mutantes utilizadas en este trabajo están enlistadas en el anexo 1.

Todos los plásmidos utilizados en este trabajo se enlistan en el anexo 2.

Para amplificar los plásmidos se usaron bacterias de la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli*, y para clonar los promotores se usó el plásmido pGEM®-T Easy.

- **7.2 Condiciones de cultivos**

Las bacterias se crecieron a 37° C en medio LB (1% triptona, 0.5% extracto de levadura y 0.5% NaCl) con 100 µg/ml de ampicilina para la selección de los plásmidos. Las levaduras se cultivaron a 30°C en medio completo YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona y 2% glucosa).

Para la selección de cepas transformadas se usó medio mínimo sintético SD (0.69% base nitrogenada sin aminoácidos y con sulfato de amonio, 2% glucosa y 20 µg/ml de cada aminoácido necesario para el crecimiento y selección de los plásmidos). Además de usar medio completo, algunas cepas se cultivaron en medios respiratorios YPG (1% extracto de levadura, 2% peptona y 2% glicerol) y YPLAC (1% extracto de levadura, 1% peptona, 0.12% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.0235% lactato al 85%).

El *chl* se estandarizo en cuanto a tiempo y concentración a través del fenotipo (datos no mostrados) se usó la dosis en la cual aún había crecimiento de las células.

- **7.3 Análisis de crecimiento**

El crecimiento se determinó de una manera cualitativa mediante el crecimiento de las cepas en medio sólido y de forma cuantitativa determinando la densidad óptica mediante un espectrofotómetro de placas. Para el crecimiento en medio sólido, las cepas crecieron durante toda la noche en YPD líquido con 4mg/ml de *chl* en cajas de Petri con YPD y 1mg/ml de *chl*. La determinación del crecimiento en el espectrofotómetro de placas se hizo a 30°C en YPD líquido con 4 mg/ml de *chl* y durante 24 horas, iniciando con una densidad óptica de 0.2.

- **7.4 Análisis de dinámica mitocondrial**

Las cepas en este análisis crecieron en YPD líquido y se utilizaron en el momento que llegaron a su fase estacionaria, sin *chl* durante 10 horas y con 4mg/ml de *chl* durante 15 horas. Para visualizar la dinámica mitocondrial se usó un marcador que tiñe de color verde fluorescente a las mitocondrias llamado pVT100U-mtGFP, el cual tiene el promotor de la alcohol deshidrogenasa1 fusionado a una secuencia que codifica el péptido señal de importación de la subunidad 9 de la Fo ATP sintetasa de *Neurospora crassa* a la mitocondria (Westermann y Neupert 2000) y al gen de la proteína GFP. La morfología mitocondrial se observó por microscopia de epifluorescencia.

- **7.5 Análisis *in silico***

La búsqueda de genes ortólogos se hizo utilizando la base de datos Alliance of Genome Resources <https://www.alliancegenome.org/>, la cual mediante un gran número de algoritmos identifica genes en diferentes organismos que tienen un ancestro común y descienden de un gen ancestral idéntico, descartando similitud por duplicación genética. Los resultados de la base de datos Alliance of Genome Resources se corroboraron con un PSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST).

El análisis de promotores se hizo mediante la base de datos Yeastract <http://www.yeastract.com/>, en la cual se buscaron probables sitios de unión de factores de transcripción en los promotores de interés.

- **7.6 Transformación de bacterias**

Las bacterias competentes se incubaron con 100 ng de plásmido durante 30 min en hielo. Después se les dio un choque térmico a 42°C durante 45 segundos. Se les agregó 1 ml de LB y se incubaron a 37°C



durante 1 hora con agitación. Finalmente, las células se plaquearon en LB complementado con 100µg/ml de ampicilina.

- **7.7 Transformación de levaduras**

Las levaduras se cultivaron en YPD líquido hasta su fase estacionaria, después se tomaron alícuotas hasta ajustar 25ml en una densidad óptica de 0.3 (OD<sub>600</sub>) y se dejó creciendo a 30°C hasta llegar a una DO<sub>600</sub> de 0.6. Las células se centrifugaron y se lavaron con agua. Se les adicionó 0.1M de TE pH 7.5 y 0.1M de acetato de litio (pH 7.5). De esta mezcla se tomó una alícuota a la que se le agregaron 10 ng de plásmido (Anexo 2), 50 µg de ADN de esperma de salmón, 40% de polietilenglicol, 0.1M TE (pH 7.5), 0.1M acetato de litio (pH 7.5). La mezcla se incubó durante 30 minutos a 30°C. Posteriormente se agregó 40µl de DMSO y se incubó a 42°C por 15 minutos. Finalmente, las células se plaquearon en SD con los aminoácidos requeridos de acuerdo con el plásmido utilizado en cada transformación.

- **7.8 Análisis de expresión**

Cada promotor analizado en este estudio se amplificó a partir de ADN genómico de la cepa BY4742 y los productos de PCR se ligaron en el plásmido pGEM®-T Easy (Anexo 2). Los plásmidos recombinantes se secuenciaron con los desoxiligonucleótidos T7 y SP6. Posteriormente a la verificación por secuenciación, cada promotor se subclonó en el plásmido YEp351-GFP (Anexo 2). Así, la expresión de GFP representa la actividad transcripcional de cada promotor. De esta manera, se analizó la fluorescencia de GFP por microscopia y citometría de flujo.

## VIII.-Resultados

- **Análisis de los promotores en los genes de interés**

En este trabajo se eligieron genes que por su función o por su ortología pudieran responder a estrés mitocondrial inducido por *chl*, el cual como ya mencionamos inhibe la síntesis de proteínas en ribosomas mitocondriales, debido a que impide la formación del complejo ribosoma-ARNt y de esta manera afecta a la elongación del péptido naciente, lo que induce una disminución en la respiración y una activación de la UPRmt en *C. elegans*.

El primer acercamiento a estos genes fue a través de un análisis bioinformático para saber qué factores de transcripción repercuten en algún cambio en su expresión. Para esto se hizo una búsqueda de los sitios de unión a factores de transcripción más importantes en los promotores de cada gen (Tabla 2).

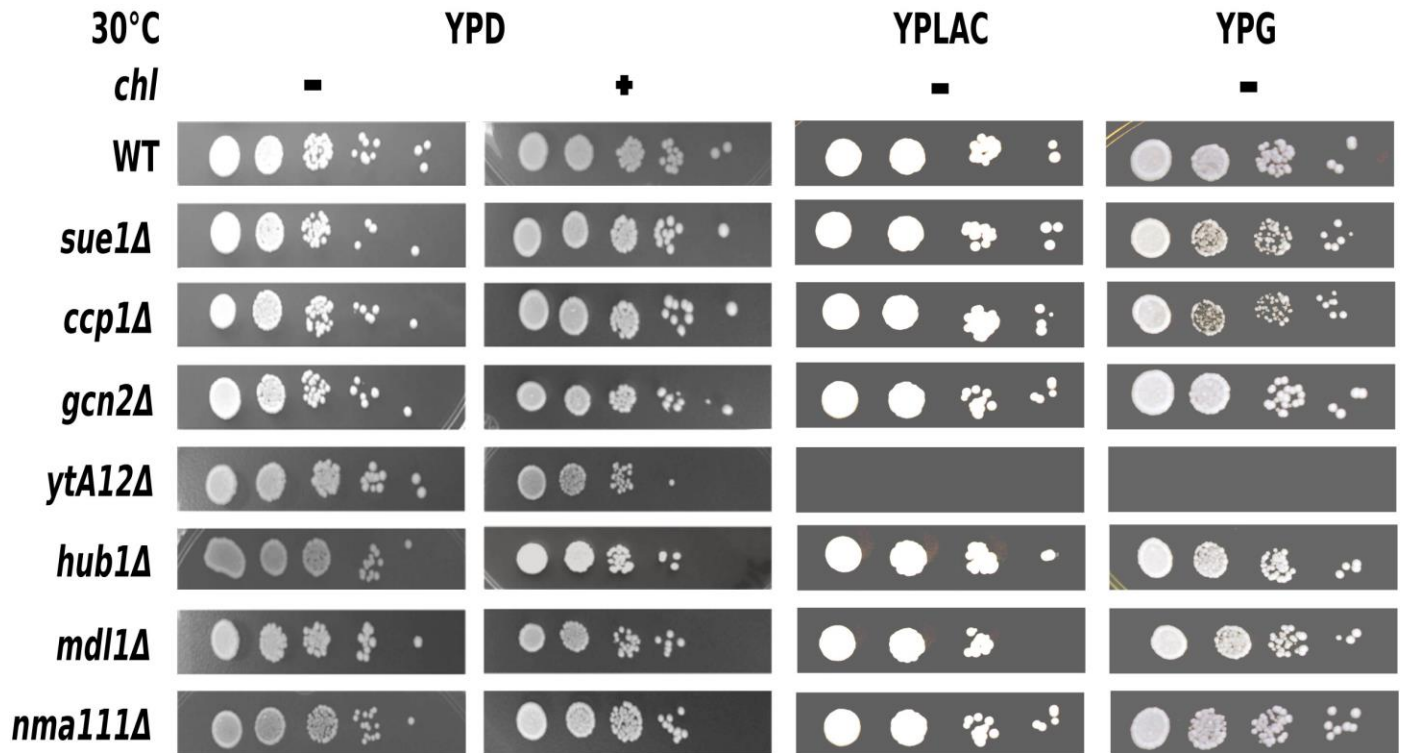
Una vez hecho el análisis se procedió a hacer ensayos de fenotipo en condiciones de estrés mitocondrial inducido por *chl*

**Tabla 2. Sitios de unión a factores de transcripción en ortólogos de UPRmt**

TF	Función	CCPI	SUE1	HSP10	YTA12	HUB1	NMAIII	MDLI	GCN2
Rtg1-Rtg3	Respuesta retrógrada		2 sitios		4 sitios		3 sitios	1 sitio	2 sitios
Skn7-Stb5	Respuesta a estrés oxidativo	15 sitios	1 sitio	2 sitios	9 sitios	1 sitio			9 sitios
Mns2-4	Respuesta a inanición	5 sitios	2 sitios	1 sitio	3 sitios	4 sitios			2 sitios
Haa1	Respuesta a estrés de membrana	2 sitios	1 sitio	1 sitio	1 sitio				
Rpn4	Activación del proteosoma				1 sitio	1 sitio			

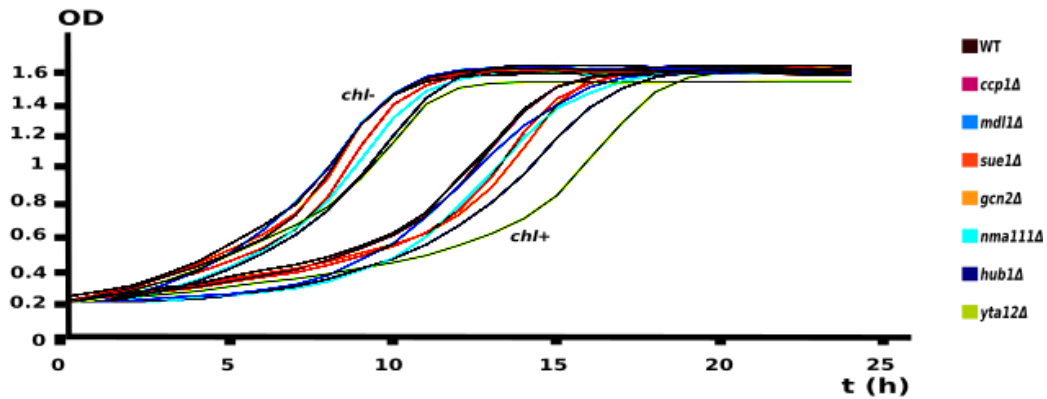
- **El gen *YTA12* contribuye al crecimiento celular en condiciones de estrés ocasionado por cloranfenicol (*chl*)**

Con el objetivo de determinar si las proteínas codificadas por los genes que están regulados por los promotores seleccionados participan en la respuesta a estrés mitocondrial inducido por *chl*, medimos los efectos de este antibiótico en el crecimiento de mutantes de cada uno de los genes. En la figura 4, se puede observar que todas las mutantes crecen adecuadamente en condiciones sin estrés (*-chl*), sin embargo, en presencia de *chl*, la cepa *mdl1Δ* muestra una disminución moderada en su crecimiento, esto concuerda cuando se usa el medio respiratorio YPLAC, mientras que en la cepa *yta12Δ* el efecto del *chl* es más marcado y en medios respiratorios el crecimiento es nulo. El resto de las mutantes analizadas crecen a un nivel parecido al de la cepa silvestre. Cuando se determinan los efectos del *chl* en el crecimiento de las mutantes mediante un ensayo cuantitativo, se encontró que solamente la cepa *yta12Δ* muestra una sensibilidad moderada y ya no se aprecia el efecto en la cepa *mdl1Δ* (Figura 5). La sensibilidad de la cepa *yta12Δ* es más notoria en la gráfica de las regresiones lineales donde claramente se observa que la pendiente de la curva de la cepa *yta12Δ* es menor que el de la cepa silvestre y también es menor al de las otras mutantes. Esto se confirma cuando se grafican los valores de las pendientes normalizadas contra la cepa silvestre en cada condición (Figura 5C). En este caso, la disminución del crecimiento de la cepa *yta12Δ* en presencia de *chl* es de un 40% con respecto a la cepa silvestre. Las otras mutantes no muestran diferencias significativas con respecto a la cepa silvestre.

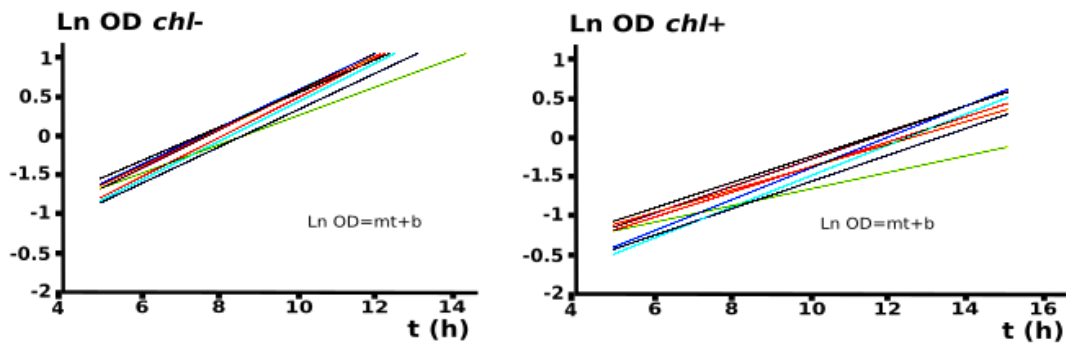


**Figura 4. El crecimiento de la cepa *ytA12Δ* está disminuido en medio solido con 1mg/ml de *chl*.** Las células crecieron previamente en medio completo liquido YPD complementado con 4mg/ml de *chl* y las diluciones se hicieron en medio completo solido YPD complementado con 1mg/ml de *chl*. El tratamiento con *chl* en cada figura se representa como *chl+*. Las células crecieron previamente en medio completo liquido YPD y las diluciones se hicieron en medio YPD, YPG y YPLAC.

A



B



C

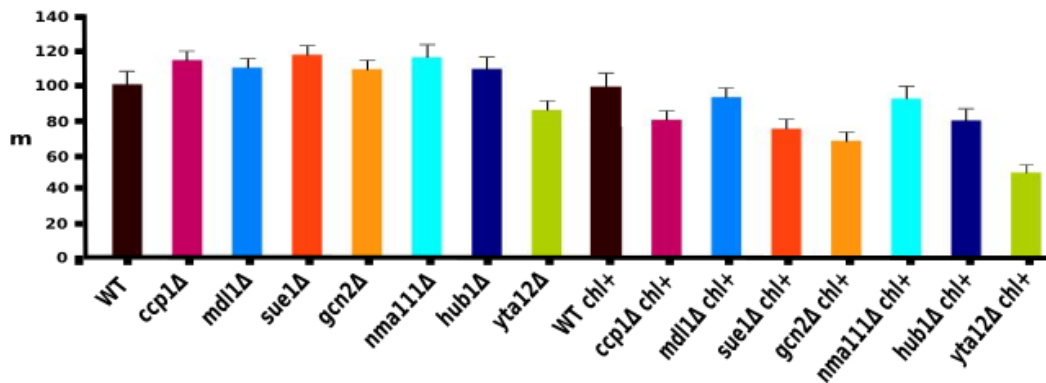


Figura 5. El crecimiento de la cepa *yta12Δ* está atenuado en presencia de *chl*.

A. cuantificación de crecimiento de cepas en el espectrofotómetro de placas con y sin cloranfenicol. B. Ajuste de rectas a la fase exponencial del panel a mediante el logaritmo natural de OD. C. Comparación de las pendientes de cada recta del panel b normalizadas en relación con la cepa WT *chl-*. OD=Densidad óptica, Ln OD= logaritmo natural de densidad óptica, *chl-*= tratamiento sin cloranfenicol, *chl+*= tratamiento con cloranfenicol, t= tiempo en horas, m=pendiente, b=intersección del eje X y Y.

- **Efecto del estrés causado por el cloranfenicol (*chl*) en la morfología mitocondrial.**

Como ya se mencionó, el *chl* afecta la síntesis de las proteínas mitocondriales, lo que puede tener efectos en la morfología y dinámica mitocondrial. Estos efectos pueden ser diferentes en las diferentes mutantes. Las mitocondrias pueden presentarse en 4 diferentes morfotipos: fragmentado, intermedio, linear y filamentoso (Figura 6). Se marcaron las mitocondrias con GFP fusionado a la secuencia de importación mitocondrial de la subunidad 9 de la Fo ATP sintetasa y se determinó la morfología por medio de microscopía de epifluorescencia. En el caso de la cepa silvestre, predominó la morfología fragmentada en condiciones normales y esta no varió en presencia de *chl*. Todas las mutantes, excepto la cepa *yta12Δ*, mostraron una morfología similar a la silvestre en ambas condiciones, excepto que las cepas *sue1Δ*, *hub1Δ*, y *nma111Δ*, ocasionalmente mostraron una morfología intermedia en presencia de *chl*. El cambio más drástico de morfología se presentó en la cepa *yta12Δ*, la cual mostró un fenotipo filamentoso en presencia de *chl*. Esto coincide con la deficiencia de crecimiento de esta cepa en un medio con glicerol, lo que indica una deficiencia respiratoria severa.

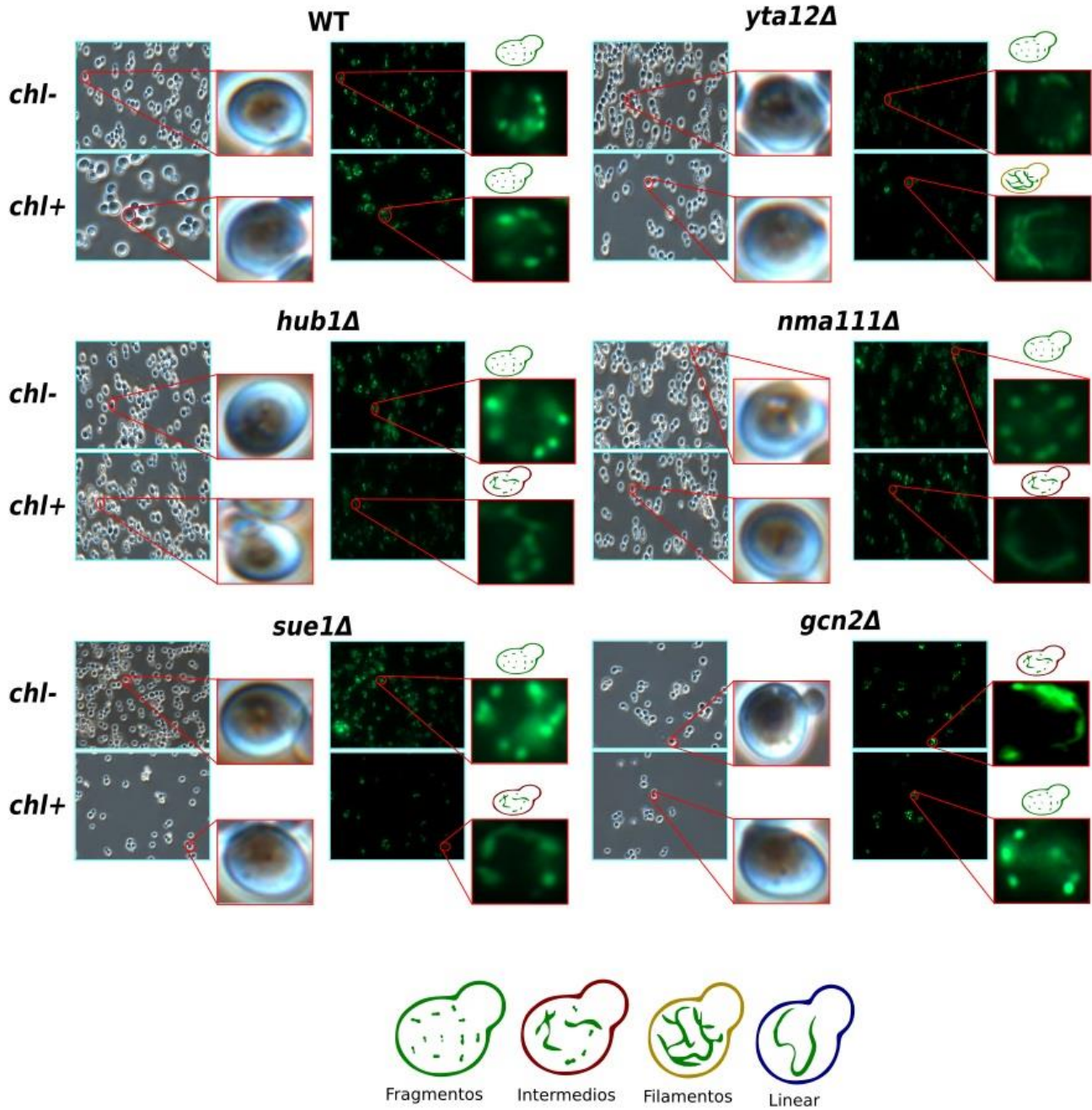


Figura 6. El *chl* afecta la morfología mitocondrial de las cepas *sue1Δ*, *gcn2Δ*, *hub1Δ*, *nma111Δ* y *yta12Δ*. Las células que crecieron en presencia de 4mg/ml de *chl* en cultivos líquidos. Las fotografías representan las morfologías predominantes y la ampliación de una sola célula. *chl*<sup>-</sup>= tratamiento sin cloranfenicol, *chl*<sup>+</sup>= tratamiento con cloranfenicol.

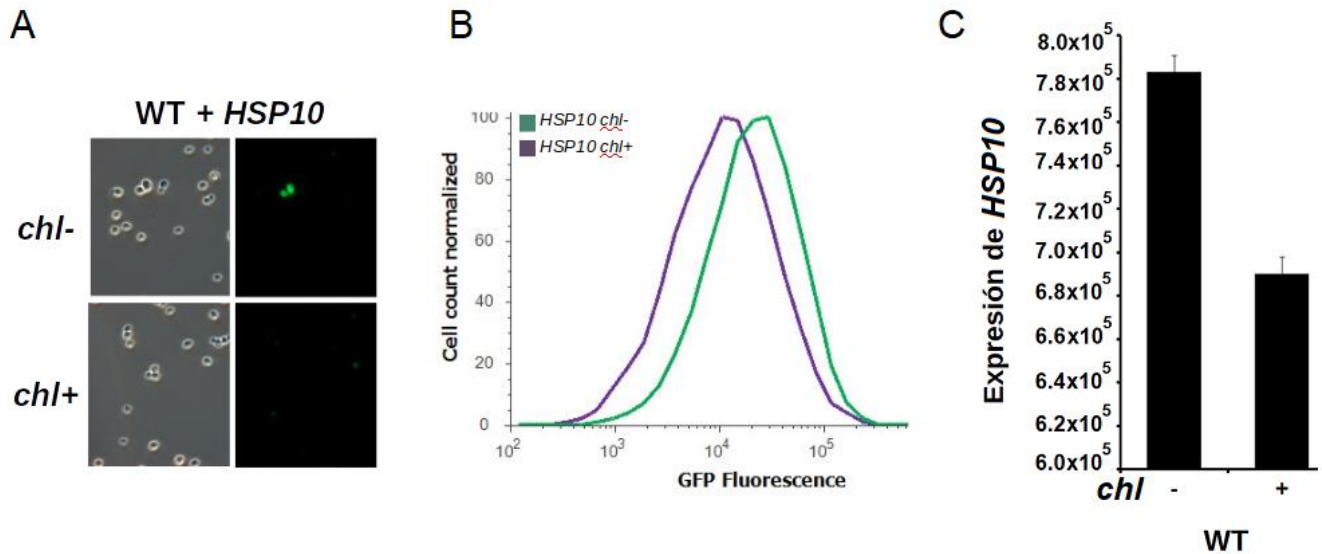
- **El *chl* afecta la expresión de los genes *CCPI*, *HSP10* y *YTA12*.**

En experimentos preliminares se observó que los mayores efectos de un tratamiento con *chl* se dan en la expresión de los genes *CCPI*, *HSP10* y *YTA12*, mientras que no se detectaron efectos significativos en la expresión de *SUE1*, *GCN-2*, *HUB1* y *MDL1*, por lo que solo se mostrará el análisis de la expresión de los tres primeros. El gen *CCPI* codifica para una proteína mitocondrial encargada de la degradación de especies reactivas de oxígeno y juega un papel clave en la respuesta al estrés oxidativo. El gen *HSP10* codifica para una co-chaperonina de la matriz mitocondrial, involucrada en el plegamiento de las proteínas mitocondriales y el gen *YTA12* codifica para un componente del complejo de proteasas m-AAA de la membrana interna mitocondrial, el cual se encarga de degradar proteínas mal plegadas y también se requiere para el ensamblaje correcto de los complejos enzimáticos mitocondriales. Como puede verse, estas proteínas tienen un papel muy importante en el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial.

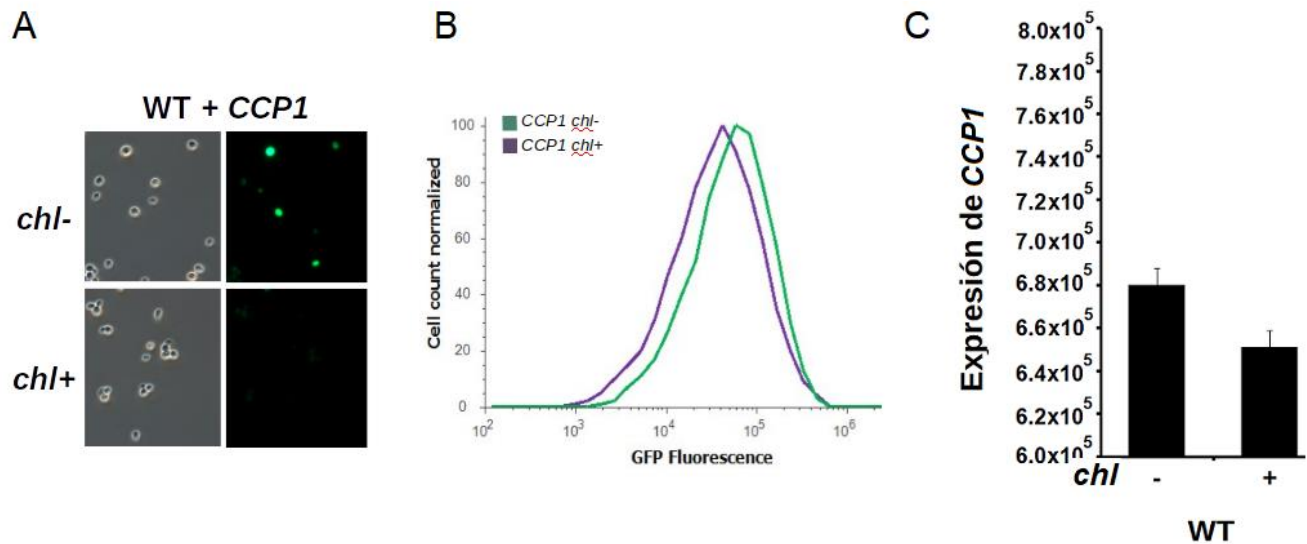
Los promotores de los genes *CCPI*, *HSP10* y *YTA12* se fusionaron al gen que codifica para la GFP y se clonaron en un plásmido multicopia, de tal manera que la transcripción se detectó tanto por microscopía de epifluorescencia como por citometría de flujo.

Células silvestres transformadas con los reporteros de *HSP10* y *CCPI* se comportaron de manera similar, es decir, se observó una expresión basal en condiciones normales, la cual disminuyó en presencia de *chl* (Figuras 7 y 8). En ambos casos y en condiciones normales, se observaron células fluorescentes, la cual es apenas perceptible después de un tratamiento con *chl* (Figuras 7A y 8A). La disminución de la transcripción de *HSP10* es de aproximadamente un 50% con *chl*, mientras que la de *CCPI* es de un 40% (Figuras 7C y 8C). Estas observaciones sugieren que durante un estrés mitocondrial inducido con *chl* se genera una señal aún no caracterizada, ya sea parte de un proceso transcripcional o traduccional, que se detecta a nivel de los promotores de *HSP10* y *CCPI* generando una disminución de su expresión.



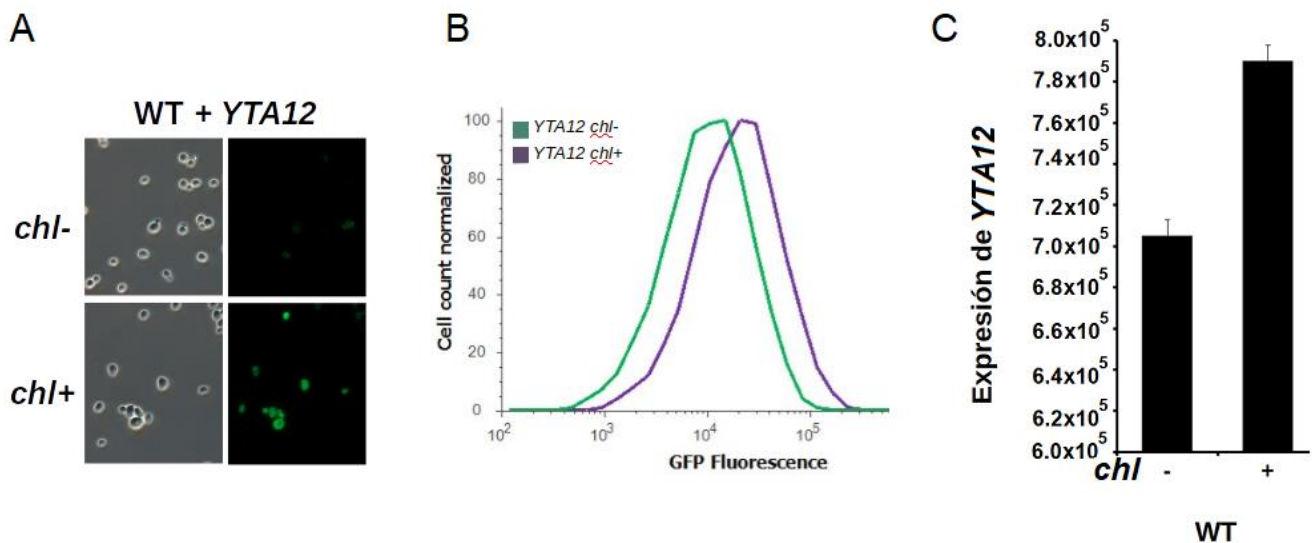


**Figura 7. La expresión de *HSP10* disminuye en tratamiento de cloranfenicol.** Células de la cepa BY4742 transformadas con el gen *HSP10* unida a GFP en tratamientos con cloranfenicol. A) Expresión de *HSP10* con y sin cloranfenicol observado por microscopía de epifluorescencia. B y C) Expresión de *HSP10* con y sin cloranfenicol visualizado a través de citometría de flujo.



**Figura 8. La expresión de *CCP1* disminuye en tratamiento de cloranfenicol.** Células de la cepa BY4742 transformadas con el gen *CCP1* unido a GFP en tratamientos con cloranfenicol. A) Expresión de *CCP1* con y sin cloranfenicol observado por microscopía de epifluorescencia. B y C) Expresión de *CCP1* con y sin cloranfenicol visualizado a través de citometría de flujo.

En cambio, el gen *YTA12* tiene un comportamiento diferente a los dos anteriores, un caso contrario a la del gen *HSP10*; mientras que en condiciones normales su expresión está reducida (Figura 9), el tratamiento con *chl* induce una sobreexpresión significativa. Al microscopio se observa que la mayoría de las células emiten una señal de GFP mucho mayor en presencia de *chl* que en su ausencia (Figura 9a), y este aumento es de aproximadamente 2 veces con respecto a la expresión basal. Estos datos sugieren que *YTA12* es un gen que responde positivamente al estrés mitocondrial impuesto por el *chl*. Esto coincide con su participación en los procesos de proteólisis de proteínas mitocondriales mal plegadas sugerido por (Schnall *et al.*, 1994; Jovaisaite *et al.*, 2014; Runkel *et al.*, 2013; Benedetti *et al.*, 2006)

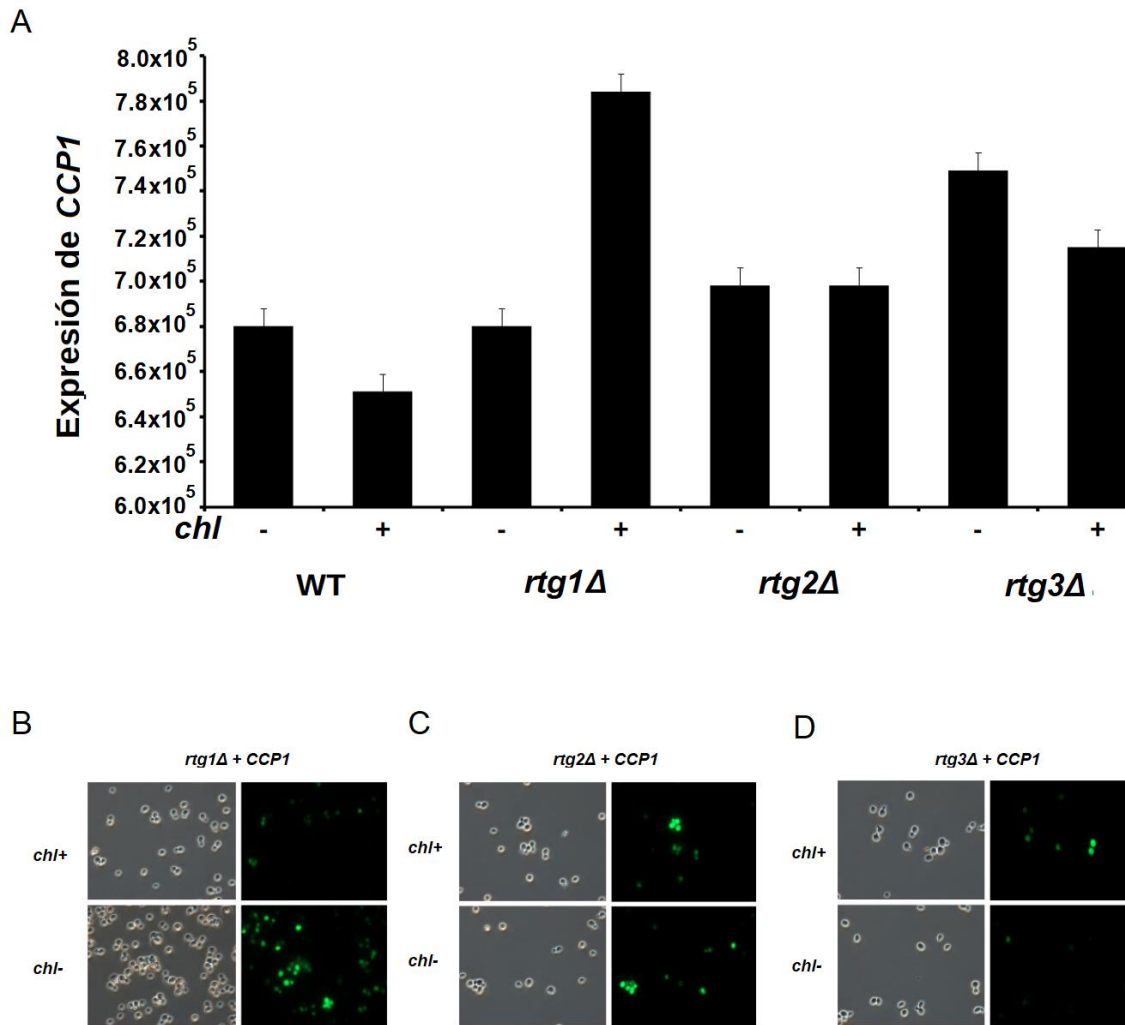


**Figura 9. La expresión de *YTA12* aumenta en tratamiento de cloranfenicol.** Células de la cepa BY4742 transformadas con el gen *YTA12* unido a GFP en tratamientos con cloranfenicol. A) Expresión de *YTA12* con y sin cloranfenicol observado por microscopía de epifluorescencia. B y C) Expresión de *YTA12* con y sin cloranfenicol visualizado a través de citometría de flujo.

- **La expresión del gen *YTA12* es dependiente de la vía retrógrada en condiciones de estrés mitocondrial inducido por cloranfenicol (*chl*), mientras que la expresión de *CCP1* se regula negativamente.**

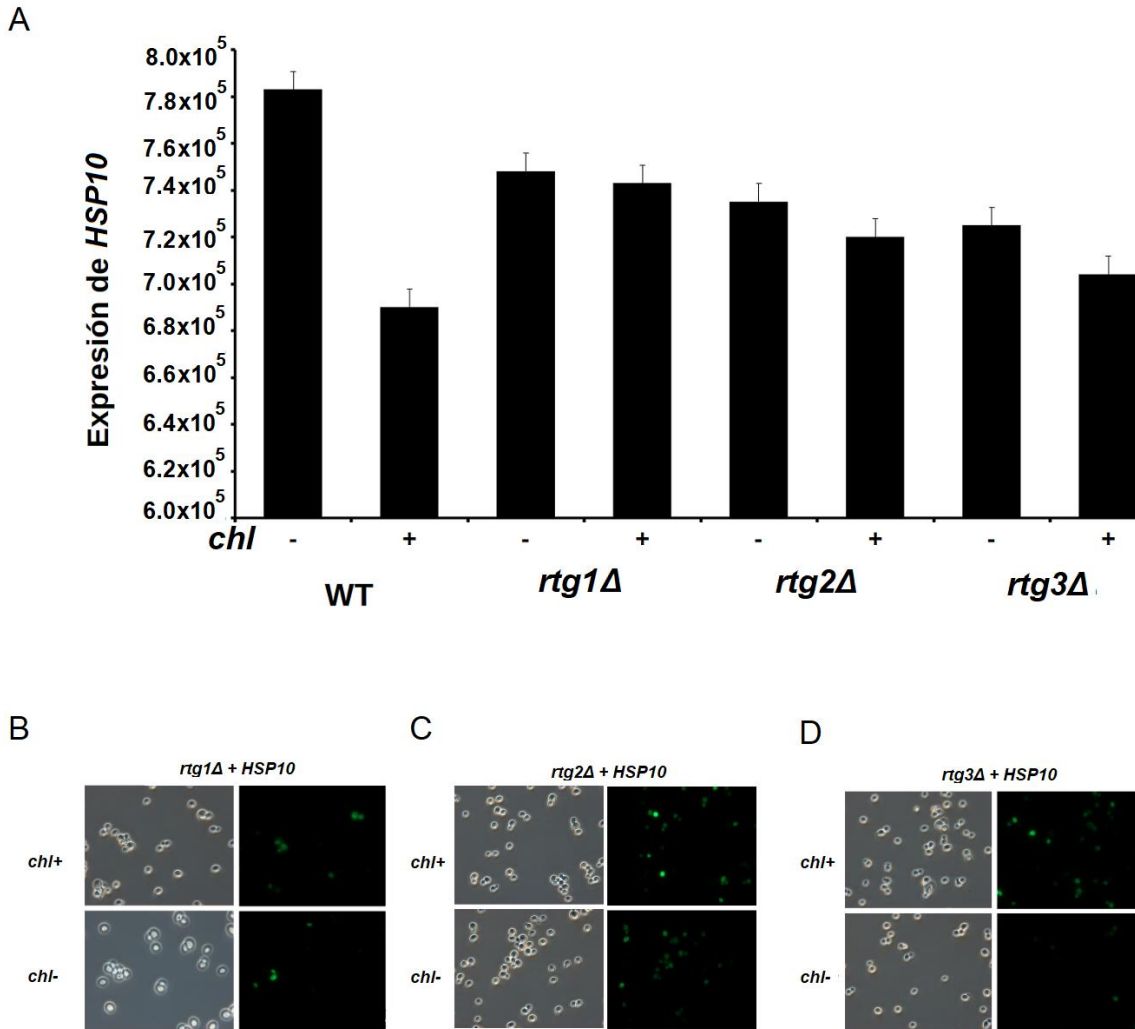
Debido a que la única vía de comunicación entre mitocondria y núcleo que se conoce en levaduras es la respuesta retrógrada, nos interesó saber si la expresión de los genes *CCP1*, *HSP10* y *YTA12* se ve afectada en mutantes de la respuesta retrógrada en condiciones de estrés mitocondrial inducido por el *chl*. Esto se hizo midiendo la fluorescencia de los reporteros de GFP tanto por microscopía de epifluorescencia como por citometría. Los reporteros se expresaron en la cepa silvestre y en mutantes sencillas *rtg1*, *rtg2* y *rtg3*.

Como se mostró anteriormente, la expresión de *CCP1* disminuye cuando la cepa silvestre se trata con *chl*, lo cual sugiere un mecanismo de represión en condiciones de estrés. La eliminación de la vía retrógrada a nivel de *Rtg2* y *Rtg3* (pero no de *Rtg1*) induce un aumento en la expresión de *CCP1* en condiciones normales (Figura 10), sin embargo, en condiciones de estrés inducido con *chl*, la expresión aumenta significativamente en la cepa *rtg1* $\Delta$ , pero no en las cepas *rtg2* $\Delta$  y *rtg3* $\Delta$  (Figura 10 a y b). Estas observaciones sugieren que la expresión del gen *CCP1* está sujeta a una moderada regulación negativa dependiente de la vía retrógrada y que en condiciones de estrés mitocondrial inducido por el *chl* la represión se acentúa y es dependiente principalmente de *Rtg1*.



**Figura 10. La expresión de *CCP1* aumenta en la cepa *rtg1Δ* en tratamiento con cloranfenicol.** A) Expresión de *CCP1* con y sin cloranfenicol en las mutantes *rtg1Δ*, *rtg2Δ* y *rtg3Δ* observado por citometría de flujo. B) Expresión de *CCP1* con y sin cloranfenicol en la mutante *rtg1Δ* visualizado a través de microscopia de epifluorescencia. C) Expresión de *CCP1* con y sin cloranfenicol en la mutante *rtg2Δ* visualizado a través de microscopia de epifluorescencia. D) Expresión de *CCP1* con y sin cloranfenicol en la mutante *rtg3Δ* visualizado a través de microscopia de epifluorescencia

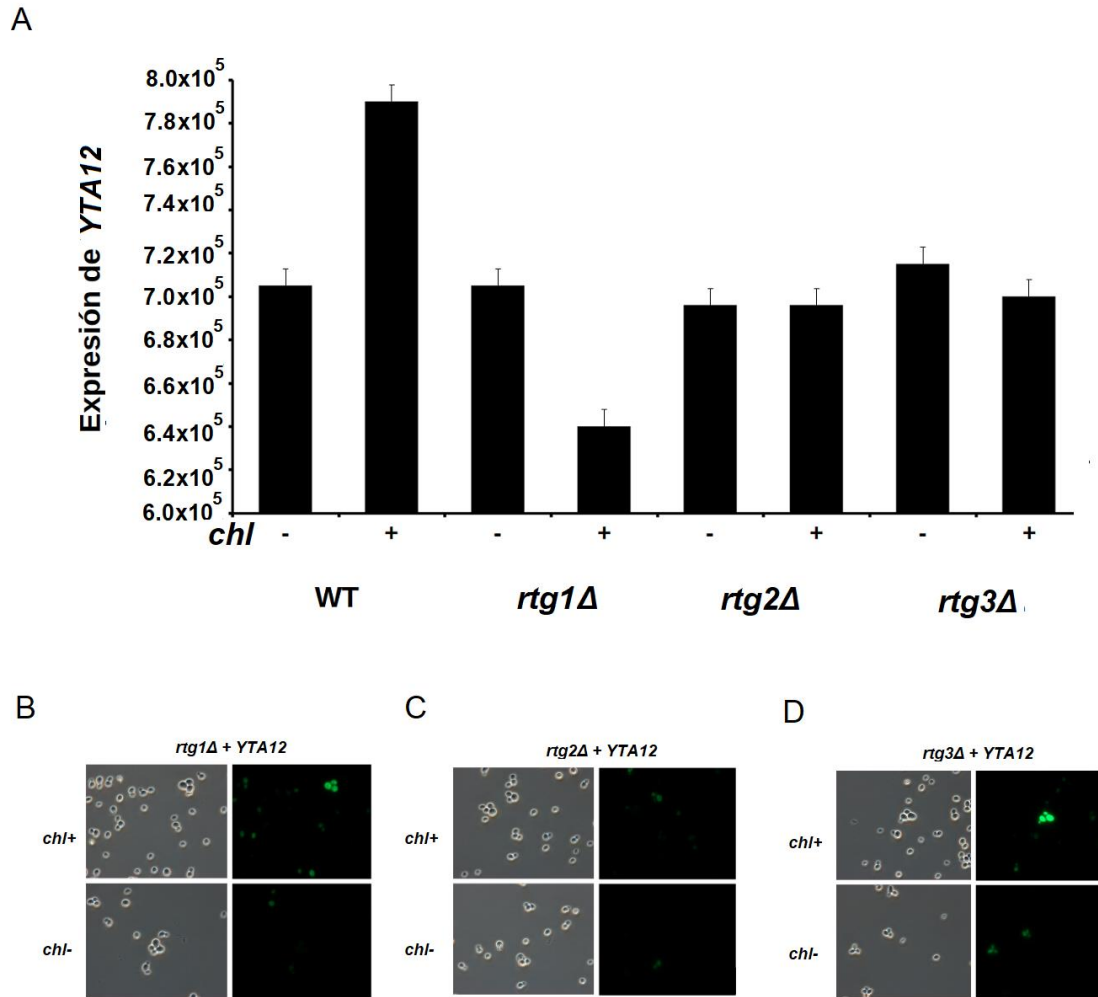
La expresión de *HSP10* se ve disminuida en las mutantes de la vía retrógrada en comparación con la WT, pero en la condición de la WT *chl+*, se ven marginalmente aumentadas. Sin embargo, entre las mutantes de la vía retrógrada no se observan diferencias significativas entre la condición *chl-* y *chl+* (Figura 11). Esto sugiere que la vía retrógrada no controla significativamente la expresión de *HSP10* en condiciones de *chl+*.



**Figura 11. La expresión de *HSP10* disminuye en cepas mutantes de la vía retrógrada.** A) Expresión de *HSP10* con y sin cloranfenicol en las mutantes *rtg1Δ*, *rtg2Δ* y *rtg3Δ* observado por citometría de flujo. B) Expresión de *HSP10* con y sin cloranfenicol en la mutante *rtg1Δ* visualizado a través de microscopia de epifluorescencia. C) Expresión de *HSP10* con y sin cloranfenicol en la mutante *rtg2Δ* visualizado a través de microscopia de epifluorescencia. D) Expresión de *HSP10* con y sin cloranfenicol en la mutante *rtg3Δ* visualizado a través de microscopia de epifluorescencia

La expresión de *YTA12* en cambio está fuertemente controlada por la vía retrógrada en presencia de *chl*. Esto puede observarse porque el efecto inductor mostrado anteriormente por el *chl* en la expresión de *YTA12* (Figura 9) desaparece en las cepas *rtg1Δ*, *rtg2Δ* y *rtg3Δ*. Esta disminución es significativa en las tres mutantes, pero es mucho más severa en la cepa *rtg1Δ* (Figura 12).

En todos los casos, los cambios en la expresión medidos por citometría se corresponden adecuadamente con las observaciones al microscopio de epifluorescencia.



**Figura 12. La expresión de *YTA12* disminuye en cepas mutantes de la vía retrógrada en tratamiento con cloranfenicol.** A) Expresión de *YTA12* con y sin cloranfenicol en las mutantes *rtg1Δ*, *rtg2Δ* y *rtg3Δ* observado por citometría de flujo. B) Expresión de *YTA12* con y sin cloranfenicol en la mutante *rtg1Δ* visualizado a través de microscopia de epifluorescencia. C) Expresión de *YTA12* con y sin chl en la mutante *rtg2Δ* visualizado a través de microscopia de epifluorescencia. D) Expresión de *YTA12* con y sin cloranfenicol en la mutante *rtg3Δ* visualizado a través de microscopia de epifluorescencia

## IX.- Discusión

El *chl* es un antibiótico que inhibe la síntesis de proteínas en la mitocondria. Uno de los efectos primarios de esta inhibición es la acumulación de subunidades huérfanas que provienen del citoplasma y que no pueden formar complejos por la falta de las subunidades mitocondriales. Esto genera problemas de ensamblaje y de plegamiento. En metazoarios, éste fenómeno genera una respuesta celular conocida como UPRmt. Esta es una vía muy bien caracterizada en nematodos y en mamíferos (Zhao *et al.*, 2002; Benedetti *et al.*, 2006; Runkel *et al.*, 2013) que básicamente consiste en la activación de chaperonas y proteasas que degradan los péptidos acumulados en la mitocondria, y los cuales son exportados al citoplasma donde activan una respuesta que llega al núcleo y que incluye la disminución de la transcripción de genes de proteínas de metabolismo mitocondrial y el aumento de la transcripción de genes requeridos para aliviar el estrés mitocondrial (Zhao *et al.*, 2002; Benedetti *et al.*, 2006; Runkel *et al.*, 2013).

En este trabajo generamos estrés mitocondrial en la levadura mediante tratamientos con *chl* con el objetivo de identificar genes nucleares que respondieran a este estrés y tratar también de identificar la ruta por la que se da la comunicación mitocondria-núcleo.

Con base en la estructura de los promotores y a la función que desempeñan las proteínas codificadas por estos genes, seleccionamos tres genes que codifican para proteínas mitocondriales como posibles reporteros de estrés mitocondrial inducido por el *chl*: *CCP1*, *HSP10* y *YTA12*

En el caso de *CCP1* y *HSP10*, su transcripción disminuye en condiciones de estrés por el tratamiento con *chl*. Esta observación es un tanto sorprendente, ya que dado su importante papel en la homeostasis mitocondrial se esperaba que se regularan positivamente en respuesta al estrés mitocondrial inducido por el *chl*. Cabe recordar que *CCP1* codifica para una proteína que degrada especies reactivas de oxígeno y juega un importante papel en estrés oxidativo. Se ha demostrado que las ROS aumentan cuando existe disfunción mitocondrial por la acumulación de proteínas en la mitocondria (Runkel *et al.*, 2013; Jovaisaite *et al.*, 2014; Benedetti *et al.*, 2006) por lo que era de esperarse una mayor actividad de este enzima en respuesta al *chl*, el cual de manera indirecta propicia la acumulación de subunidades huérfanas mitocondriales. Por su parte, *HSP10* codifica para una chaperona de matriz involucrada en los procesos de plegamiento, por lo que también se requeriría una mayor actividad durante el estrés mitocondrial inducido por el *chl*. El hecho de que la transcripción de estos genes baje en respuesta al *chl* no implica necesariamente una disminución en la actividad de las proteínas, por lo que es de

suponerse que la disminución en su tasa transcripcional ocurra en paralelo a la disminución de una gran cantidad de transcritos nucleares con el objetivo de aliviar la carga en los procesos de transporte y plegamiento mitocondriales (Boos *et al.*,2019). Esto se desprende también del hecho de que la obstrucción en la importación de proteínas mitocondriales sintetizadas en el citoplasma induce una disminución en su transcripción (Boos *et al.*, 2019). El hecho de que tanto *CCP1* como *HSP10* bajen su transcripción en condiciones de estrés mitocondrial inducido por el *chl*, puede implicar también que estas proteínas no son importantes durante el estrés y que no se requieren para recuperar la homeostasis mitocondrial, lo que se apoyaría en la observación de que estos genes no son esenciales para el crecimiento en medios con *chl*, ni en medios respiratorios, este supuesto coincide con el trabajo de Boos y colaboradores (Boos *et al.*,2019).

A diferencia del comportamiento de *CCP1* y *HSP10*, la expresión de *YTA12* aumenta en condiciones de estrés inducido con *chl*. Esta observación concuerda con el hecho de que la expresión de *SPG7* (el ortólogo de *YTA12* en *C. elegans*) aumenta en condiciones de estrés mitocondrial y responde a la activación de la UPRmt en esta especie (Benedetti, et al. 2006). El aumento de la expresión de *YTA12* sugiere que éste es un gen importante durante el estrés mitocondrial inducido por el *chl* y esta hipótesis se basa en dos observaciones importantes de este trabajo: una es que la cepa *yta12Δ* muestra sensibilidad al *chl* y la otra es que es un gen esencial para el crecimiento en medios respiratorios. Una observación adicional y que no es menos importante que las anteriores, es que la cepa *yta12Δ* muestra mitocondrias filamentosas en condiciones de estrés inducido con *chl*. Esto sugiere que en ausencia de Yta12 las mitocondrias se fusionan y forman filamentos para maximizar la formación de los complejos de la fosforilación oxidativa con el objetivo de mantener una producción mínima de energía durante el estrés (Youle y Blik, 2012). Yta12 es una proteasa de tipo m-AAA que se localiza en la mitocondria y que funciona no solo como proteasa sino también como chaperona, lo cual implica que es esencial en los procesos de recuperación de la homeostasis mitocondrial, por lo que su sobreexpresión durante un estrés no es sorprendente.

Hasta ahora, la respuesta retrógrada es la única vía descrita en *S. cerevisiae* que participa en la comunicación mitocondria-núcleo (Sekito et al, 2000); Rtg1, Rtg2 y Rtg3 son constituyentes importantes de esta vía. Rtg1 y Rtg3 forman un complejo que se une a promotores de los genes de respuesta a estrés mitocondrial y regulan su transcripción. En este trabajo evaluamos la dependencia de la transcripción de los genes *CCP1*, *HSP10* y *YTA12* de la vía retrógrada en condiciones de estrés inducido con *chl*. De los tres genes estudiados, el que menos depende de los componentes de la vía



retrógrada es *HSP10*. Debido a que en las mutantes *rtg*, no se observa ningún cambio en su expresión, tanto en condiciones basales como en presencia de *chl*, de tal manera que el reflejo de la interrupción de la vía retrógrada no se da en condiciones de estrés mitocondrial. Esto sugiere que hay otro sistema implicado en la represión de la transcripción de *HSP10* durante el estrés. En el caso de *CCP1*, la vía retrógrada juega un papel importante en su regulación. En condiciones basales Rtg3 parece reprimir su expresión, ya que en la cepa *rtg3Δ*, la transcripción aumenta significativamente. En condiciones de estrés en cambio, Rtg1 reprime severamente la expresión de *CCP1*, ya que en la cepa *rtg1Δ*, la transcripción aumenta significativamente. Esta observación concuerda con los genes *PUT1* y *YLR346C* cuya expresión también se reprime por Rtg1 (Charles *et al.*, 2001).

Finalmente, la expresión de *YTA12* en condiciones de estrés es completamente dependiente de la vía retrógrada. En las mutantes carentes de Rtg1, Rtg2 o Rtg3, se observó expresión basal en condiciones normales, pero la inducción que se produce en presencia de *chl* ya no ocurre y el mayor efecto se ve en la mutante de Rtg1. Esto implica que *YTA12* es un gen que responde positivamente a las condiciones de estrés mitocondrial inducido por el *chl* y que es un gen de respuesta retrógrada. La fuerte dependencia en Rtg1 puede deberse a que este factor es esencial en la regulación de genes de respuesta retrógrada esto es similar a la dependencia que tienen los genes *CIT2*, *IDH2* y *YOR135C* (Charles *et al.*, 2001), mientras que Rtg3 puede tener un papel independiente (Rothermel *et al.*, 1995; Rothermel *et al.*, 1997; Charles *et al.*, 2001)

## **XI.-Conclusiones**

Yta12 es importante para la respuesta a estrés inducido con *chl*, es esencial para el crecimiento en medios respiratorios, su expresión se induce en condiciones de estrés mitocondrial y depende positivamente de la vía retrógrada.

Hsp10 y Ccp1 son dispensables para la respuesta a *chl*, no se requieren para sostener el crecimiento en medios respiratorios y su transcripción se reprime en condiciones de estrés mitocondrial. La vía retrógrada reprime la expresión del gen *CCP1* en condiciones de estrés.

## XII.-Perspectivas

-Determinar si existe una UPRmt en la levadura *S. cerevisiae*

Si existe una UPRmt en *S. cerevisiae*:

- Demostrar si tiene alguna relación con la respuesta retrógrada
- Analizar los componentes de esta vía
- Evaluar en qué momento se favorece la expresión del gen *YTA12*
- Determinar si la expresión de *YTA12* es dependiente del complejo Rtg1/Rtg3 en condiciones de estrés
- Evaluar los sitios de unión del complejo Rtg1/Rtg3 en el promotor de *YTA12*

## XIII.-Bibliografía

- Arlt H, Tauer H, Feldmann H, Neupert W, Langer T. 1996. The YTA10-12 complex, an AAA protease with chaperone-like activity in the inner membrane of mitochondria. *Cell*. 85(6):875-85 DOI: [10.1016/s0092-8674\(00\)81271-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81271-4)
- Avendano-Monsalve M, Ponce-Rojas J y Funes S. 2020. From cytosol to mitochondria: the beginning of a protein. *journey. Biol. Chem.* 2020; 401(6–7): 645–661 DOI: [10.1515/hsz-2020-0110](https://doi.org/10.1515/hsz-2020-0110)
- Benedetti C, Haynes M, Yang Y, Harding H, y Ron D. 2006. Ubiquitin-Like Protein 5 Positively Regulates Chaperone Gene Expression in the Mitochondrial Unfolded Protein Response. *Genetics* 174: 229–239. DOI: [10.1534/genetics.106.061580](https://doi.org/10.1534/genetics.106.061580)
- Boos F, Krämer L, Groh C, Jung F, Haberkant P, Stein F, Wollweber F, Gackstatter A, Zöller E, van der Laan M, Savitski M, Benes V y Herrmann J. 2019. Mitochondrial Protein-induced stress triggers a global adaptative transcriptional progame. *Nature cell biology*. 21:442-451. DOI: [10.1038/s41556-019-0294-5](https://doi.org/10.1038/s41556-019-0294-5)
- Brachmann B, Davies A, Cost J, Caputo E, Hieter P, Boeke J. 1998. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-

mediated gene disruption and other applications. *Yeast*. 14(2):115-32  
DOI: [10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19980130\)14:2<115::AID-YEA204>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19980130)14:2<115::AID-YEA204>3.0.CO;2-2)

- Charizanis C, Juhnke H, Krems B, Entian D. 1999. The mitochondrial cytochrome c peroxidase Ccp1 of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in conveying an oxidative stress signal to the transcription factor Pos9 (Skn7). *Mol Gen Genet*. 262(3):437-47  
DOI: [10.1007/s004380051103](https://doi.org/10.1007/s004380051103)
- Charles E, Waddle J, Hale W, Varshal V, Thornton J, Macatee T, Garner H, y Butow R. 2001. Genome-wide responses to mitochondrial dysfunction. *Molecular Biology of the Cell*. 12: 297-308. doi: [10.1091/mbc.12.2.297](https://doi.org/10.1091/mbc.12.2.297)
- Correia A, Pastore C, Adinolfi S, Pastore A, y Gomes C. 2008. Dynamics, stability and iron-binding activity of frataxin clinical mutants. *FEBS Journal*. 275: 3680–3690. DOI: [10.1111/j.1742-4658.2008.06512.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06512.x)
- Ferri A, Cozzolino M, Crosio C, Nencini M, Casciati A, Butler E, Giuseppe R, Selverstone V, y Carr I T. 2006. Familial ALS-superoxide dismutases associate with mitochondria and shift their redox potentials. *PNAS*. 103(37):13860-13865. DOI: [10.1073/pnas.0605814103](https://doi.org/10.1073/pnas.0605814103)
- Gething M, y Sambrook J. 1992. Protein folding in the cell. *Nature* 355:33–45. DOI: [10.1038/355033a0](https://doi.org/10.1038/355033a0)
- Greber B, y Ban N. 2016. Structure and Function of the Mitochondrial Ribosome. *Annual Review of Biochemistry*. 85(1): 103-132 DOI: [10.1146/annurev-biochem-060815-014343](https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014343)
- Hardesty B, y Kramer G. 2001. Folding of a nascent peptide on the ribosome. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 66:41–66. DOI: [10.1016/s0079-6603\(00\)66026-9](https://doi.org/10.1016/s0079-6603(00)66026-9)
- Hartl F, Hayer-Hartl M. 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*. 295:1852–8.  
<https://doi.org/10.1126/science.1068408>
- Haynes M, Fiorese J, y Lin Y. 2013. Evaluating and responding to mitochondrial dysfunction: the mitochondrial unfolded-protein response and beyond. *Trends in Cell Biology*. 23(7): 311-318 DOI: [10.1016/j.tcb.2013.02.002](https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.02.002)
- Höhfeld J, y Hartl F. 1994. Role of the chaperonin cofactor Hsp10 in protein folding and sorting in yeast mitochondria. *J Cell Biol*. 126(2):305-15  
DOI: [10.1083/jcb.126.2.305](https://doi.org/10.1083/jcb.126.2.305)

- Houtkooper R, Mouchiroud L, Ryu D, Moullan N, Katsyuba E, Knott G, Williams R, y Auwerx J. 2013. Mitonuclear protein imbalance as a conserved longevity mechanism. *Nature*. 497: 451-457 doi: [10.1038/nature12188](https://doi.org/10.1038/nature12188)
- Jovaisaite V, Mouchiroud L, y Auwerx J. 2014. The mitochondrial unfolded protein response, a conserved stress response pathway with implications in health and disease. *The Journal of Experimental Biology*. 217: 137-143.  
DOI: [10.1242/jeb.090738](https://doi.org/10.1242/jeb.090738)
- Karplus M. 1997. The Levinthal paradox, yesterday and today. *Fold Des*. 2:569–76.  
DOI: [10.1016/s1359-0278\(97\)00067-9](https://doi.org/10.1016/s1359-0278(97)00067-9)
- Kubota H, Ota K, Sakaki Y, Ito T. 2001. Budding yeast GCN1 binds the GI domain to activate the eIF2alpha kinase GCN2. *J Biol Chem*. 276(20):17591-6  
DOI: [10.1074/jbc.M011793200](https://doi.org/10.1074/jbc.M011793200)
- Liu Z, Sekito T, Špírek M, Thornton J, y Ronald A. 2003. Butow Retrograde Signaling Is Regulated by the Dynamic Interaction between Rtg2p and Mks1p. *Molecular Cell*, 12:401–411.  
[https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00285-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00285-5)
- Matsumoto S, Nakatsukasa K, Kakuta C, Tamura Y, Esaki M, y Endo T. (2019). Msp1 clears mistargeted proteins by facilitating their transfer from mitochondria to the ER. *Mol. Cell* 76, 191–205. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.07.006>
- Padmanabhan N, Fichtner L, Dickmanns A, Ficner R, Schulz J, Braus G. 2009. The yeast HtrA orthologue Ynm3 is a protease with chaperone activity that aids survival under heat stress. *Mol Biol Cell*. 20(1):68-77. DOI: [10.1091/mbc.e08-02-0178](https://doi.org/10.1091/mbc.e08-02-0178)
- Rothermel B, Shyjan B, Etheredge J, y Butow R. 1995. Transactivation by Rtg1p, a basic helix-loop-helix protein that functions in communication between mitochondria and the nucleus in yeast. *ASBMB*. 270(49):29476-29482. DOI: [10.1074/jbc.270.49.29476](https://doi.org/10.1074/jbc.270.49.29476)
- Rothermel B, Thornton J, y Butow R. 1997. Rtg3p, a basic helix-loop-helix protein that functions in mitochondrial-induced changes in gene expression, contains independent activation domains. *ASBMB*. 272(32):19801-19807. DOI: [10.1074/jbc.272.32.19801](https://doi.org/10.1074/jbc.272.32.19801)
- Runkel D, Liu S, Baumeister R, Schulze E. 2013. Surveillance-Activated Defenses Block the ROS-Induced Mitochondrial Unfolded Protein Response. *Plos Genetics*. 9(3):1-18  
DOI: [10.1371/journal.pgen.1003346](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003346)

- Saibil, H. 2013. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* 14, 630–642. DOI: [10.1038/nrm3658](https://doi.org/10.1038/nrm3658)
- Sekito T, Thornton J, y Ronald A. 2000. Butow Mitochondria-to-Nuclear Signaling Is Regulated by the Subcellular Localization of the Transcription Factors Rtg1p and Rtg3p. *Molecular Biology of the Cell.* 11:2103–2115. doi: [10.1091/mbc.11.6.2103](https://doi.org/10.1091/mbc.11.6.2103)
- Schnall R, Mannhaupt G, Stucka R, Tauer R, Ehle S, Schwarzlose C, Vetter I, Feldmann H. 1994. Identification of a set of yeast genes coding for a novel family of putative ATPases with high similarity to constituents of the 26S protease complex. *Yeast.* 10(9):1141-55  
DOI: [10.1002/yea.320100903](https://doi.org/10.1002/yea.320100903)
- Wang X, y Chen X. 2015. A cytosolic network suppressing mitochondria-mediated proteostatic stress and cell death. *Nature.* 524, 481–484 DOI <https://doi.org/10.1038/nature14859>
- Wei J, y Sherman F. 2004. Sue1p is required for degradation of labile forms of altered cytochromes C in yeast mitochondria. *J Biol Chem.* 279(29):30449-58  
DOI: [10.1074/jbc.M403742200](https://doi.org/10.1074/jbc.M403742200)
- Westerman B, y Neupert W. 2000. Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 16(15):1421-7. DOI: [10.1002/1097-0061\(200011\)16:15<1421::AID-YEA624>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1097-0061(200011)16:15<1421::AID-YEA624>3.0.CO;2-U)
- Wrobel L, Topf U, Bragoszewski P, Wiese S, Sztolsztener E, Oeljeklaus S, Varabyova, A, Lirski M, Chroscicki P, Mroczek, S. (2015). Mistargeted mitochondrial proteins activate a proteostatic response in the cytosol. *Nature* 524, 485–488. DOI: [10.1038/nature14951](https://doi.org/10.1038/nature14951)
- Yogev O, Karniely S, y Pines O. 2007. Translation-coupled translocation of yeast fumarase into mitochondria in vivo. *J. Biol. Chem.* 282, 29222–29229. DOI: [10.1074/jbc.M704201200](https://doi.org/10.1074/jbc.M704201200)
- Youle R, y Blik A. 2012. Mitochondrial fission, fusion and stress. *Science.* 337: 1062-1065. doi: [10.1126/science.1219855](https://doi.org/10.1126/science.1219855)
- Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T. 2000. ATF6 Activated by Proteolysis Binds in the Presence of NF-Y (CBF) Directly to the cis-Acting Element Responsible for the Mammalian Unfolded Protein Response. *MCB.* p. 6755–6767. DOI: [10.1128/mcb.20.18.6755-6767.2000](https://doi.org/10.1128/mcb.20.18.6755-6767.2000)
- Young L, Leonhard K, Tatsuta T, Trowsdale J, Langer T. 2001. Role of the ABC transporter Mdl1 in peptide export from mitochondria. *Science.* 291(5511):2135-8

DOI: [10.1126/science.1056957](https://doi.org/10.1126/science.1056957)

- Zhao Q, Wang J, Levichkin V, Stasinopoulos S, Ryan T, y Hoogenraad J. 2002. A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. *The EMBO Journal*. 21(17):4411±4419  
doi: [10.1093/emboj/cdf445](https://doi.org/10.1093/emboj/cdf445)

## **Libros**

- Nelson D, Cuchillo F, Lehninger A, y Cox M. 2014. *Lehninger: Principios de Bioquímica* (4a. ed.). Barcelona: Omega.
- Branden C, y Tooze J. *Introduction to protein structure*, 2nd ed. New York: Garland Publishing; 1999.

## Anexo 1

Todas las mutantes usadas en este trabajo fueron obtenidas de la colección comercial de mutantes del Laboratorio del Dr. Gabriel del Rio Guerra, quien amablemente donó a nuestro laboratorio.

<b>Cepas usadas en este trabajo</b>	
<b>Nombre</b>	<b>Descripción</b>
BY4742	MAT $\alpha$ ; <i>his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>lys2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>ura3<math>\Delta</math>0</i> (Brachmann <i>et al.</i> , 1998)
BY4742 <i>hub1<math>\Delta</math></i>	MAT $\alpha$ ; <i>his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>lys2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>ura3<math>\Delta</math>0</i> ; <i>hub1<math>\Delta</math></i>
BY4742 <i>yta12<math>\Delta</math></i>	MAT $\alpha$ ; <i>his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>lys2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>ura3<math>\Delta</math>0</i> ; <i>yta12<math>\Delta</math></i>
BY4742 <i>ccp1<math>\Delta</math></i>	MAT $\alpha$ ; <i>his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>lys2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>ura3<math>\Delta</math>0</i> ; <i>ccp1<math>\Delta</math></i>
BY4742 <i>sue1<math>\Delta</math></i>	MAT $\alpha$ ; <i>his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>lys2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>ura3<math>\Delta</math>0</i> ; <i>sue1<math>\Delta</math></i>
BY4742 <i>nma111<math>\Delta</math></i>	MAT $\alpha$ ; <i>his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>lys2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>ura3<math>\Delta</math>0</i> ; <i>nma111<math>\Delta</math></i>
BY4742 <i>mdl1<math>\Delta</math></i>	MAT $\alpha$ ; <i>his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>lys2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>ura3<math>\Delta</math>0</i> ; <i>mdl1<math>\Delta</math></i>
BY4742 <i>gcn2<math>\Delta</math></i>	MAT $\alpha$ ; <i>his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>lys2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>ura3<math>\Delta</math>0</i> ; <i>gcn2<math>\Delta</math></i>

## Anexo 2

Plásmidos usados en este trabajo	
Nombre	Descripción
pGEM®-T Easy (Vector vacío)	f1, Pr <sub>SP6</sub> , Pr <sub>T7</sub> , lacZ, AMP <sup>r</sup>
pGEM®-T Easy- Pr <sub>CCP1</sub>	f1, Pr <sub>SP6</sub> , Pr <sub>T7</sub> , Pr <sub>CCP1</sub> , AMP <sup>r</sup>
pGEM®-T Easy- Pr <sub>YTA12</sub>	f1, Pr <sub>SP6</sub> , Pr <sub>T7</sub> , Pr <sub>YTA12</sub> , AMP <sup>r</sup>
pGEM®-T Easy- Pr <sub>HSP10</sub>	f1, Pr <sub>SP6</sub> , Pr <sub>T7</sub> , Pr <sub>HSP10</sub> , AMP <sup>r</sup>
YEp351 (Vector vacío)	2μ, LEU2, lacZα, AMP <sup>r</sup> , GFP
YEp351- Pr <sub>HSP10</sub>	2μ, Pr <sub>HSP10</sub> , AMP <sup>r</sup> , LEU2, GFP
YEp351-Pr <sub>CCP1</sub>	2μ, Pr <sub>CCP1</sub> , AMP <sup>r</sup> , LEU2, GFP
YEp351-Pr <sub>YTA12</sub>	2μ, Pr <sub>YTA12</sub> , AMP <sup>r</sup> , LEU2, GFP
pVT100U-mtGFP	2μ, Pr <sub>ADH</sub> , URA3, GFP