



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Caracterización de la función del factor Tef4p en la mitocondria de la levadura**

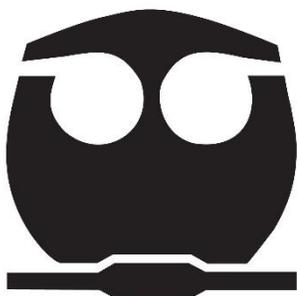
**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA:**

**VALERIA VANIA PLUMA ORTIZ**



Ciudad de México, 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

- PRESIDENTE:**       **Profesor:** Dra. Marisol López López
- VOCAL:**               **Profesor:** Dra. Sobeida Sánchez Nieto
- SECRETARIO:**       **Profesor:** Dra. Xochitl Pérez Martínez
- 1er. SUPLENTE:**   **Profesor:** Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova
- 2° SUPLENTE:**       **Profesor:** Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Instituto de Fisiología Celular

## **ASESOR DEL TEMA:**

Doctora Xochitl Pérez Martínez

## **SUSTENTANTE (S):**

Valeria Vania Pluma Ortiz

## **AGRADECIMIENTOS**

Esta tesis fue hecha en el laboratorio 204 oriente del Departamento de Genética y Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Doctora Xochitl Pérez Martínez.

Se agradece al Dr. Leonardo Peraza Reyes y al Dr. Roberto Coria Ortega por su asesoría técnica.

Se agradece a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Molecular

Se agradece especialmente la ayuda técnica brindada por la Dra. Yolanda Camacho Villasana.

Este trabajo fue apoyado por los financiamientos:

- CONACyT: 284514
- PAPIITT (UNAM): IN202720

Durante la realización de este trabajo recibí la beca de titulación por parte de:

- PAPIIT (UNAM): IN202720

A mi padres, Claudia y Aarón, por su apoyo y cariño incondicional.

Los amo.

# Contenido

Abreviaturas .....	7
Introducción.....	9
La mitocondria .....	9
<i>S. cerevisiae</i> como modelo de estudio .....	10
Genoma mitocondrial de <i>S. cerevisiae</i> .....	10
Síntesis de proteínas mitocondriales en levadura.....	11
Importación de proteínas mitocondriales .....	12
Justificación.....	15
Hipótesis .....	18
Objetivos.....	19
Objetivos particulares.....	19
Materiales y métodos.....	19
Lista de cepas utilizadas en este estudio.....	19
Medios de cultivo.....	20
Primers utilizados en este estudio.....	21
Plásmidos utilizados en este estudio.....	23
Extracción de DNA total de levadura.....	23
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	24
Purificación de productos de PCR.....	24
Purificación de plásmidos .....	24
Verificación de la mutante $\Delta tef4$ .....	24
Diluciones seriadas 1:10 .....	25

Transformación integrativa de levadura .....	26
Transformación de células competentes por choque térmico.....	27
Digestión .....	27
Ligación .....	27
Microscopía de epifluorescencia .....	28
Resultados.....	29
Comprobación de la mutante comercial $\Delta tef4$ .....	29
La delección del gen <i>TEF4</i> no afecta la función mitocondrial .....	31
La mutante $\Delta tef4$ no parece tener el mismo papel regulador de eIF4G1 en la síntesis de Cox1. ....	34
La mutante $\Delta tef4$ afecta a la red mitocondrial.....	37
Diseño de un plásmido con el gen <i>TEF4</i> etiquetado con la proteína FLAG .....	40
Discusión .....	44
Conclusiones.....	51
Perspectivas .....	52
Apéndice.....	53
I. Secuencia del plásmido pRS303N con el inserto <i>TEF4</i> -FLAG en la cepa 273-10b de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	53
Bibliografía.....	59

## Abreviaturas

<b>3' UTR</b>	Región 3' no traducida del mRNA
<b>5' UTR</b>	Región 5' no traducida del mRNA
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>DO<sub>600nm</sub></b>	Densidad óptica a 600 nm
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ER</b>	Retículo endoplásmico ( <i>Endoplasmic Reticulum</i> )
<b>ERMES</b>	complejo de estructura de encuentro entre el retículo endoplasmático y mitocondria (ERMES por sus siglas en inglés)
<b>mtDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
<b>nt</b>	Nucleótido
<b>IM</b>	Membrana interna mitocondrial ( <i>inner membrane</i> )
<b>IMS</b>	Espacio intermembranal ( <i>intermembrane space</i> )
<b>LSU</b>	Subunidad grande del ribosoma ( <i>large subunit</i> )
<b>OM</b>	Membrana externa mitocondrial ( <i>outer membrane</i> )
<b>O/N</b>	Toda la noche ( <i>over night</i> )
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PEG</b>	Polietilen glicol
<b>RBP</b>	Proteína de unión a RNA ( <i>RNA binding protein</i> )
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>rRNA</b>	Ácido ribonucleico ribosomal
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>tRNA</b>	Ácido ribonucleico de transferencia
<b>SAM</b>	Maquinaria de clasificación y ensamblaje ( <i>Sorting and Assembly Machinery</i> )
<b>SSU</b>	Subunidad pequeña del ribosoma ( <i>Small Subunit</i> )
<b>TOM</b>	Complejo de la traslocasa externa mitocondrial ( <i>Translocase of the Outer Membrane</i> )

**WT**

Cepa silvestre (*Wild Type*)

# Introducción

## La mitocondria

La mitocondria es un organelo remanente de la endosimbiosis de una  $\alpha$ -proteobacteria (1), cuyo genoma se ha perdido o se ha transferido al núcleo parcialmente, además de contener su propia maquinaria genética. La mitocondria está compuesta por una doble membrana, la membrana interna mitocondrial (IM) y la membrana externa mitocondrial (OM). El espacio entre la IM y OM se conoce como el espacio intermembranal (IMS), mientras que al espacio acuoso rodeado por la IM se denomina matriz mitocondrial. Es en la IM, donde se encuentran los complejos respiratorios necesarios para llevar a cabo la producción de energía en forma de adenosín trifosfato (ATP) mediante un proceso denominado fosforilación oxidativa (2). En un inicio se pensaba que este organelo era casi independiente de la célula y que su única función era proveer de energía a la célula (3). Esta perspectiva ha cambiado, pues se ha descubierto que tiene una amplia comunicación con el resto de la célula. La mitocondria no sólo se especializa en diversas rutas metabólicas como el ciclo de Krebs, la  $\beta$ -oxidación y en la biosíntesis del grupo hemo y fosfolípidos; también participa en numerosas rutas metabólicas como en procesos de señalización y muerte celular programada (4). Por otra parte, se ha visto que la mitocondria forma sitios de contacto con diferentes organelos, uno de ellos es el complejo de estructura de encuentro entre el retículo endoplasmático y la mitocondria (ERMES, por sus siglas en inglés), el cual está involucrado en diversas funciones como herencia y movilidad mitocondrial, homeostasis lipídica e iónica e importación de proteínas, entre otras (5).

Al contrario de lo que se pensaba, la mitocondria no es un organelo aislado, ya que forma una red mitocondrial cuya morfología está regulada por eventos de motilidad, fusión y fisión (4). Estos eventos son importantes ya que ayudan a que haya una correcta segregación del DNA mitocondrial (mtDNA) y, por lo tanto, una correcta biogénesis mitocondrial (6).

## ***S. cerevisiae* como modelo de estudio**

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es uno de los eucariontes más utilizados como modelo de estudio. El cultivo de *S. cerevisiae* ofrece ventajas sobre otros modelos ya que su cultivo es económico al ser su tiempo de duplicación corto, por lo que se obtiene fácilmente biomasa para realizar diversos experimentos. Al ser una levadura anaerobia facultativa tiene la capacidad de generar energía mediante la fermentación de diversas fuentes de carbono, además de contar con un genoma mitocondrial y obtener energía mediante la fosforilación oxidativa. Lo anterior repercute en que pocos genes mitocondriales son esenciales para la supervivencia de la levadura, con lo cual es posible realizar mutaciones *knock-out*, y así poder estudiar diversos genes mitocondriales (7). Además, únicamente en *S. cerevisiae*, es posible modificar el DNA mitocondrial de una forma muy controlada con técnicas basadas en recombinación homóloga (8).

Por otra parte, se estima que un porcentaje mayor al 31% de genes humanos asociados a enfermedades tienen un homólogo en *S. cerevisiae* (9), lo que hace que esta levadura sea un modelo de estudio representativo y extrapolable a otros organismos eucariontes.

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

El genoma de *S. cerevisiae* codifica RNA's mensajeros (mRNA's) únicamente para ocho proteínas, de las cuales, siete corresponden a subunidades de la cadena de transporte de energía y fosforilación oxidativa (Cox1, Cox2 y Cox3, pertenecientes al complejo IV; Cytb, perteneciente al complejo III; Atp6, Atp8 y Atp 9, pertenecientes al complejo V), y una corresponde a una proteína ribosomal de la subunidad pequeña del ribosoma (Var1). Lo anterior indica que *S. cerevisiae* requiere de toda una maquinaria para la expresión de genes mitocondriales que han ido co-evolucionando junto al genoma mitocondrial. Es por esto que el genoma de *S. cerevisiae*, además, codifica el set completo de RNA's de transferencia (tRNA), dos RNA's ribosomales (rRNA) y la subunidad 9S RNA de la RNAasa P (10, 11) (Figura 1)

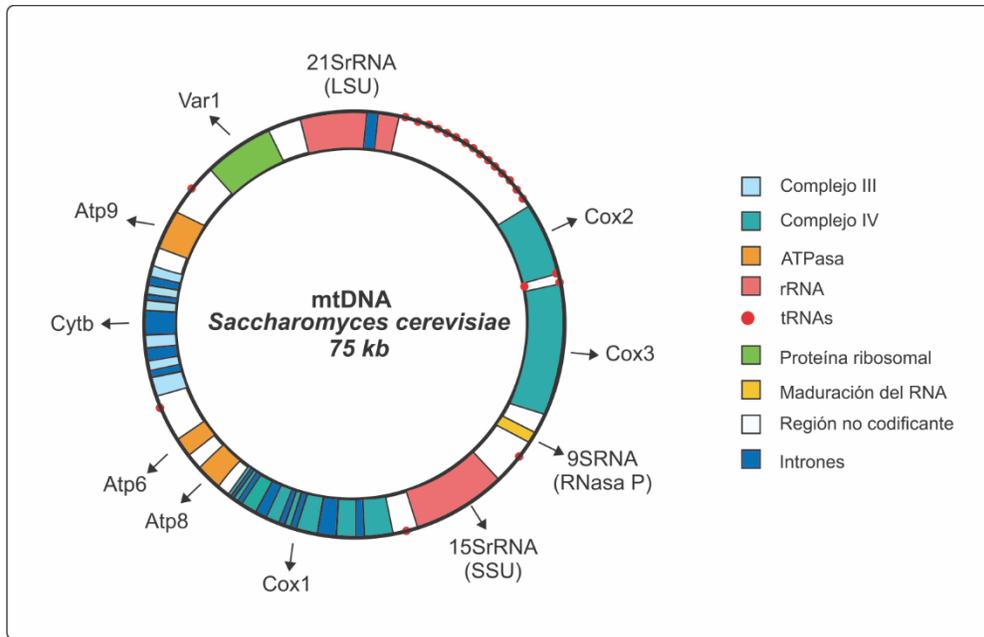


Figura 1. Esquema del genoma mitocondrial en levadura. Modificada de (11)

## Síntesis de proteínas mitocondriales en levadura

Debido al origen endosimbionte de la mitocondria, la traducción en el organelo tiene similitudes al sistema bacteriano, y presenta diferencias importantes con la maquinaria de traducción citosólica. La síntesis de proteínas mitocondrial se da en 3 pasos (11, 12):

- 1) La iniciación comienza con los factores de iniciación: Ifm1, que contiene actividad GTPasa y Aim23. Aim23 disocia al ribosoma en dos subunidades, la grande (LSU) y la pequeña (SSU). Mientras que Ifm1 forma un complejo con la formil metionina-tRNA para facilitar la unión con la SSU, el codón de inicio es reconocido en el sitio P de la SSU. Cuando esto pasa las subunidades se reasocian, se hidroliza el GTP unido a If2mt y se separan los factores de iniciación.
- 2) La elongación consiste en ciclos que constan de 3 pasos:
  - a. Ubicación del nuevo aminoacil tRNA en el sitio A del ribosoma.

- b. Formación del enlace peptídico mediante la enzima peptidil transferasa, presente en la subunidad grande del ribosoma.
- c. Translocación del peptidil-tRNA al sitio P.

La entrada de los nuevos aa-tRNA requiere que estén asociados al factor de elongación Tuf1, el cual une a GTP y tiene actividad GTPasa. El complejo se une al sitio A, si la unión es afín con el ribosoma, ocurren cambios conformacionales que activan la GTPasa, liberando el factor de elongación del aa-tRNA. Después, la enzima peptidiltransferasa cataliza la formación de un enlace peptídico. Por último, el factor Mef1 es el responsable de desplazar en una unidad de codón, para que el sitio A quede libre y se pueda seguir traduciendo.

3) La terminación inicia cuando se encuentra un codón de paro: UAA, UAG, AGA/AGG. Tiene un factor de liberación: *release factor* (RF1) en levadura, llamado Mrf1.

Por último, al liberar el polipéptido naciente, el mitoribosoma se convierte en un sustrato para el factor de reciclaje Rrf1 y Mef2, el cual separa al ribosoma en subunidades individuales para que puedan reentrar al ciclo de traducción. (11, 12)

## **Importación de proteínas mitocondriales**

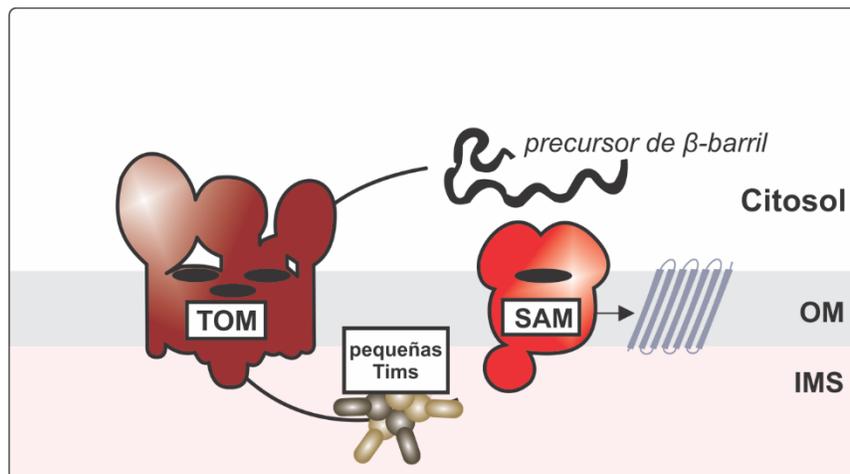
Como se explicó anteriormente, el genoma mitocondrial únicamente codifica para ocho proteínas, sin embargo, los proteomas mitocondriales (13–15) (Flores Mireles, et al., sin publicar) muestran un aproximado de mil proteínas localizadas en mitocondria. Esto implica que la mayoría de las proteínas sean importadas desde el citosol.

La expresión de los genes nucleares que codifican a las proteínas mitocondriales comienza con la transcripción de los RNA's mensajeros (mRNA). La síntesis de estas proteínas puede ocurrir, ya sea en polisomas "atados" a la mitocondria o en "polisomas libres" (2).

Se sabe que la proteína periférica de la OM, Puf3p, es una proteína de unión a RNA (RBP) que se asocia a regiones 3'UTR de los mRNA mediante un dominio homólogo pumilio, uniéndose mayormente a transcritos de genes mitocondriales (16). En condiciones

fermentativas, Puf3p al unirse a la región 3'UTR, promueve la deasilación de la cola del mRNA con lo que se evita la síntesis de estos transcritos (17–19). Mientras que en condiciones respiratorias se asocia a los polisomas y estimula la traducción de ciertos mRNA's al co-localizarlos cerca de la mitocondria gracias a la asociación antes descrita (20, 21). Se cree que este mecanismo es compartido y no excluyente por la subunidad Tom 20 del complejo de la traslocasa externa mitocondrial (TOM por sus siglas en inglés) (22).

Luego de ser traducidas, las proteínas mitocondriales son guiadas por chaperonas citosólicas al complejo TOM –también pueden ser co-traducidas e importadas a TOM–. Se importan mediante el canal de TOM al IMS. Una vez en el espacio intermembrana, dependiendo del tipo de proteína importada, estas son procesadas de diferente manera. En particular, los precursores de las proteínas  $\beta$ -barril, son asistidas por las pequeñas chaperonas Tims hacia la maquinaria de clasificación y ensamblaje (SAM por sus siglas en inglés). El complejo SAM ayuda en el plegamiento y la integración de las proteínas  $\beta$ -barril a la OM (5, 23) (Figura 2).

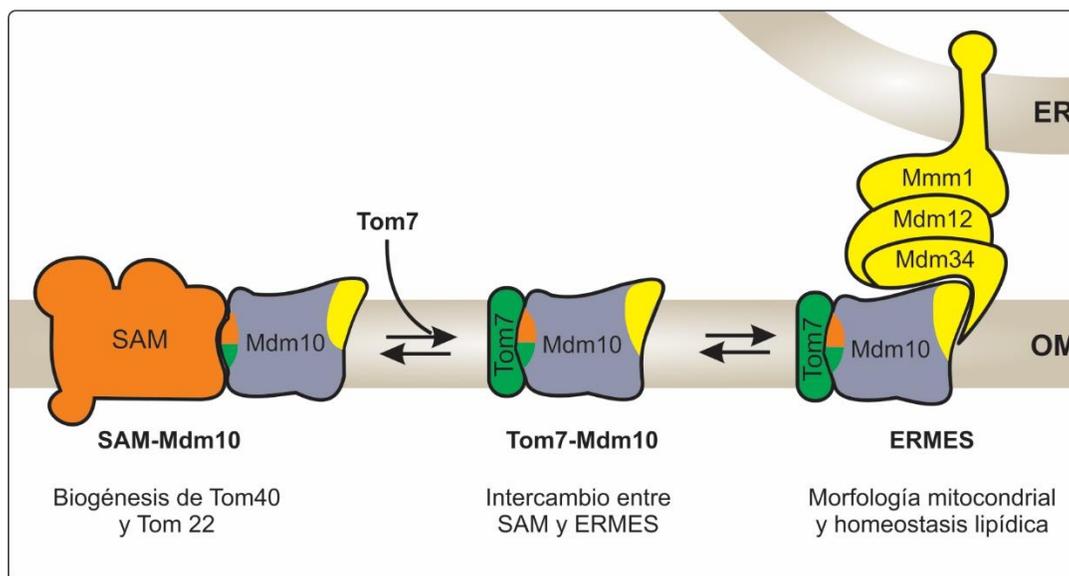


**Figura 2. Importación de proteínas  $\beta$ -barril.** Los precursores de las proteínas  $\beta$ -barril son ingresadas por chaperonas citosólicas a través del canal de la traslocasa externa mitocondrial (TOM), para después ser transportadas por las pequeñas proteínas Tims hacia la maquinaria de clasificación y ensamblaje (SAM), donde el precursor será plegado e insertado a la membrana externa mitocondrial (OM). Modificada de (23)

El complejo ERMES consta de cuatro subunidades: Mmm1, proteína anclada al retículo endoplásmico (ER), Mdm12 y Mdm34, proteínas periféricas de membrana y Mdm10, proteína integral de la OM.

Se sabe que el complejo SAM comparte con el complejo ERMES a la proteína Mdm10p. La proteína Mdm10p se intercambia entre el complejo SAM y el complejo ERMES (Figura 3), dependiendo del nivel de la subunidad Tom7p del complejo TOM. Al incrementar el nivel de la proteína Tom7, esta se une a Mdm10, liberándola de SAM y uniéndose al complejo ERMES (24).

Mdm10 al estar unida al complejo ERMES favorece el buen funcionamiento del complejo – homeostasis lipídica, morfología mitocondrial–. Mientras que Mdm10 al estar unida al complejo SAM, favorece la biogénesis de las proteínas β-barril, Tom22 y Tom40 (24).



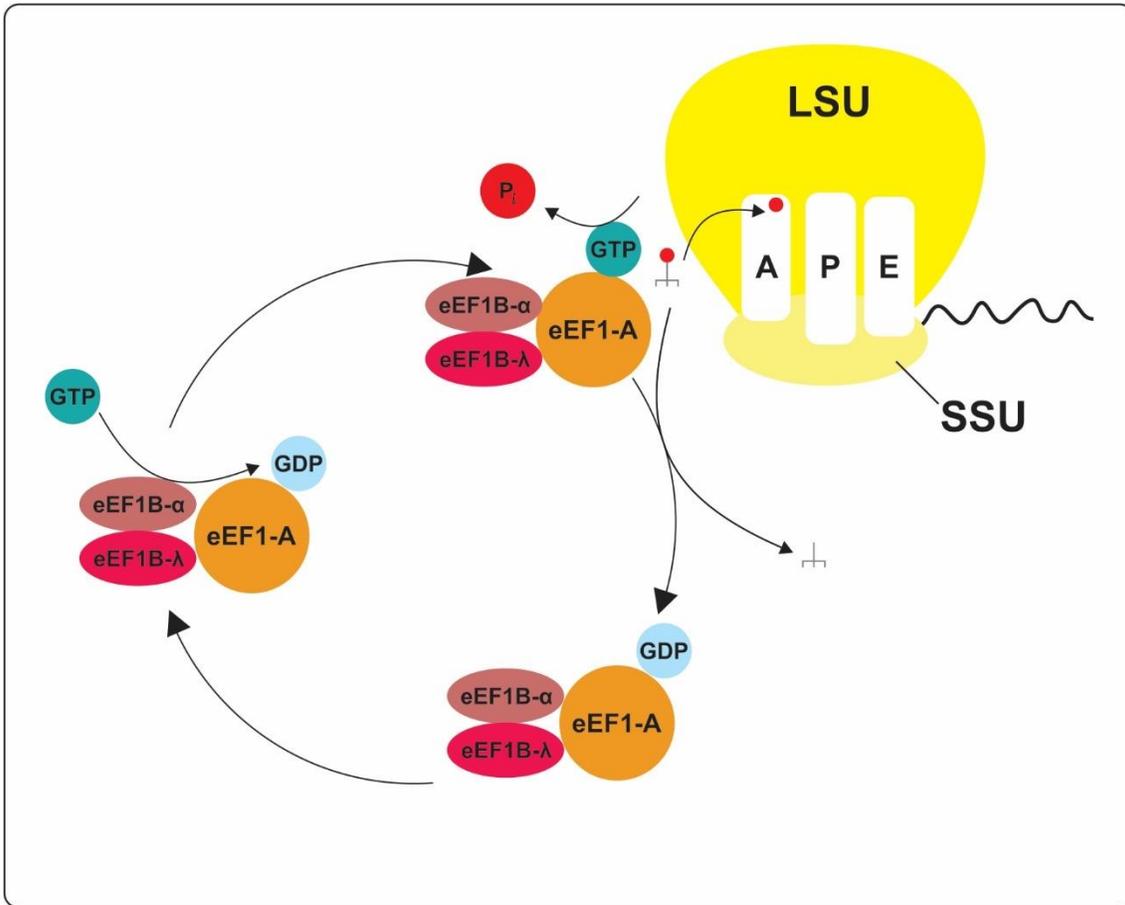
**Figura 3. Modelo de la dinámica de la proteína Mdm10p entre el complejo SAM y el complejo ERMES.** Mdm10p interactúa con el complejo SAM y ERMES mediante las superficies opuestas de su dominio β-barril. Mdm10p es una proteína integral de membrana que funciona de anclaje al complejo ERMES y que es requerida por este para mantener tanto la morfología mitocondrial como la homeostasis lipídica. La unión de Mdm10p con Sam promueve la biogénesis del complejo TOM. Dado a que el sitio de unión Mdm10p con Tom7p y SAM son cercanos, cuando Tom7p se une a Mdm10, la unión entre Mdm10p y SAM se rompe. Lo anterior promueve la unión de Mdm10p al complejo ERMES. OM: membrana externa mitocondrial ER: retículo endoplásmico. Modificado de (24)

## Justificación

Con el fin de ampliar el estudio de la mitocondria y su relación con el resto de la célula, se han hecho múltiples proteomas en *S. cerevisiae* (13–15) (Flores Mireles, et al., sin publicar), entre ellos el realizado por Reinders. En este proteoma, se encontró un 25% de proteínas de función desconocida, entre ellas proteínas originalmente descritas como citosólicas. Tal es el caso de factores de traducción citosólica. Lo anterior resulta interesante ya que, cuando existe un cambio en la fuente de carbono, de un medio fermentable a uno respiratorio, el incremento en los mRNA's de las subunidades de la cadena de transporte de electrones, codificadas en el núcleo, incrementa con mayor rapidez que las codificadas en el genoma mitocondrial (25). Además, se ha observado que la traducción mitocondrial no se encuentra regulada por la fuente de carbono en la que se incuba la célula, sino por la traducción citosólica, ya que la traducción mitocondrial es inhibida si la importación de proteínas mitocondriales sintetizadas en el citosol es bloqueada (25). Si es inhibida la traducción citosólica, la traducción de los mensajeros mitocondriales se ve afectada, dando como resultado un incremento en la síntesis de algunos mensajeros mitocondriales, mientras que en otros su traducción disminuye. Este patrón, dado por la inhibición de la traducción citosólica, se mantiene sin importar si la fuente de carbono es fermentable o respiratoria (25). Lo anterior sugiere que, la expresión de los genes codificados en el núcleo coordina la traducción mitocondrial de una forma unidireccional.

En el grupo de trabajo se ha observado que el factor de traducción citosólico, eIF4G1 (codificado por el gen *TIF4631*), puede regular la síntesis de Cox1, proteína que se sintetiza dentro de la mitocondria (García-Cordero, et al., sin publicar). eIF4G1 es una proteína que aparece en proteomas mitocondriales, sugiriendo que su función en este organelo podría correlacionar con su asociación a la mitocondria. Por lo anterior, quisimos averiguar si existían otros factores de traducción citosólica que se asociaran físicamente a la mitocondria y que, al igual que eIF4G1, pudieran estar involucrados en la traducción mitocondrial. Es por ello que, revisando los proteomas mitocondriales encontramos a los factores de traducción citosólica eIF5A y eEF1By (13–15) (Flores Mireles, et al., sin publicar), siendo este último el objeto de estudio de esta tesis.

eEF1B $\gamma$  (codificada por el gen *TEF4* en levadura) es parte del complejo de elongación eEF1B. Aunque la traducción citosólica difiere en gran medida de la mitocondrial, la elongación es la etapa que se encuentra más conservada entre ambas (12). En la elongación citosólica participa el complejo factor de elongación 1 (eEF1). En *S. cerevisiae*, el complejo consta de dos unidades: el factor de elongación 1A (eEF1A) y el factor de elongación 1B (eEF1B) el cual en *S. cerevisiae* se subdivide en las subunidades beta y gamma. La subunidad eEF1A, cuando está unida a GTP, se asocia y entrega tRNAs al sitio A del ribosoma. Si la unión codón-anticodón es correcta, ocurre un cambio conformacional en el ribosoma y esto da paso a la hidrólisis del GTP, por lo que se libera eEF1A-GDP (Figura 4) (26). Se sabe que el dominio carboxilo terminal de la subunidad eEF1B $\alpha$  está involucrada en la unión eEF1A-GTP y su actividad de intercambio de nucleótidos (27). Por otra parte, el dominio amino terminal de eEF1B $\alpha$  se une fuertemente a la interfase de la proteína estructural eEF1B $\gamma$ . Dado que la delección de eEF1B $\gamma$ , en comparación con la delección de eEF1A y eEF1 $\alpha$  no es letal, se cree que esta subunidad tiene una función únicamente estructural (26, 28).



**Figura 4 Primer paso de la elongación: complejo eEF1.** El complejo de elongación eucariótico consta de dos subunidades, la eEF1-A y eEF1-B (eEF1B- $\alpha$  y eEF1B- $\gamma$ ). La subunidad eEF1-A se asocia y entrega tRNA's (círculo rojo) al sitio A del ribosoma. Cuando la asociación entre codón y anti-codón es correcta ocurre un cambio conformacional en el ribosoma, lo que da paso a la hidrólisis del GTP a GDP, dando como resultado un fosfato inorgánico (Pi). El complejo eEF1B, en específico la subunidad eEF1B- $\alpha$  intercambia GTP por GDP.

Se han encontrado funciones no canónicas de la proteína eEF1B $\gamma$  en ortólogos. Tal es el caso de su asociación en células humanas a regiones no codificantes en el extremo 3'UTR del RNA mensajero de distintos genes asociados a ciclo celular como Che-1 y p53 en células HeLa (29). También se une a genes estructurales como el de la vimentina (*Vim*) en fibroblastos humanos (30), y se ha observado asociada a regiones promotoras de los genes *Vim*, *Che-1* y *Tp53* (29). La sobreexpresión de la proteína eEF1B $\gamma$  en células humanas da como resultado severos tumores (31–33).

Por otra parte, la delección del gen *TEF4* en levadura aumenta la resistencia al estrés oxidativo en la cepa (28), lo que sugiere que la proteína Tef4p juega un papel en el metabolismo del estrés oxidativo.

Además, eEF1By se ha encontrado asociada a distintas proteínas de la membrana externa mitocondrial como: el complejo SAM (34), cuya función es ensamblar proteínas beta plegadas en la membrana externa, Puf3 (35), proteína que se une a la región 3'UTR de RNA mensajeros ayudando así a su traducción e importación a mitocondria, y Mdm10 (36), proteína perteneciente al complejo ERMES y SAM. Mediante un experimento de doble híbrido, eEF1By se detectó asociada al factor de elongación EF-Tu –ortólogo del complejo eEF1 en mitocondria– (28). Por último, es importante destacar que el gen que codifica para la proteína eEF1By (de ahora en adelante Tef4p), *TEF4*, tiene una isoforma denominada *TEF3* (37). Sin embargo, esta no se ha encontrado en el proteoma mitocondrial. Por todo lo anterior, y dado que Tef4 se localiza en proteomas mitocondriales (13–15) (Flores Mireles, et al., sin publicar), es probable que Tef4p tenga una función en la mitocondria. Una primera opción podría ser que Tef4p, regula a la traducción mitocondrial como lo hace el factor de traducción citosólica, eIF4G1. Esto además, podría apoyarse por la observación de que la traducción citosólica regula a la mitocondrial (25). Alternativamente, Tef4p podría tener otra función en la mitocondria dado que en otros modelos se ha observado que presenta funciones diferentes a la traducción y a que Tef4p interacciona con proteínas de la maquinaria de importación de proteínas mitocondriales, de biogénesis como Puf3p y de interacción con otros complejos enzimáticos como ERMES.

## **Hipótesis**

Al ser Tef4p un factor de elongación citosólica y haberse encontrado en el proteoma mitocondrial, es probable que Tef4p tenga una función en la mitocondria, posiblemente en

la traducción de proteínas mitocondriales sintetizadas en citosol, ya sea directamente en la traducción de estas o en su importación a la mitocondria.

## Objetivos

El objetivo general es estudiar la función de Tef4 en la mitocondria, ya sea como un regulador de la traducción mitocondrial o en otra vía mitocondrial.

### Objetivos particulares

- Verificar la correcta delección del gen *TEF4* en la cepa comercial de *S. cerevisiae* BY4742.
- Eliminar el gen *TEF4* en la cepa silvestre de *S. cerevisiae*, sustituyéndolo con el casete KANMX4.
- Investigar si el gen *TEF4* participa en la regulación de la síntesis de proteínas mitocondrial como lo hace eIF4G1. Para ello, eliminar *TEF4* en las cepas XPM78 y XPM76 de *S. cerevisiae*, sustituyéndolo con el casete KANMX4.
- Observar el fenotipo en distintos medios respiratorios y fermentativos, así como su sensibilidad a la temperatura.
- Clonar una construcción en que Tef4 se fusione con el epítoto FLAG.
- Etiquetar a la mitocondria con la proteína verde fluorescente GFP.
- Observar mediante el microscopio de fluorescencia la morfología de la red mitocondrial.

## Materiales y métodos

### Lista de cepas utilizadas en este estudio

Nombre	Genotipo nuclear (mitocondrial)	Referencia
--------	---------------------------------	------------

		YKO	Matx	Strain
<b>BY4742</b>	<i>Mat α, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, BY4742(ρ<sup>+</sup>)</i>	Collection		–
		Glycerol	Stocks	
		(Open Biosystem)		
<b>NB40-36A</b>	<i>Mat α, arg8::hisG, ura4-52, leu2-3,112, D273-10B (ρ<sup>+</sup>)</i>	(38)		
<b>VP1, VP2</b>	<i>Mat α, arg8::hisG, ura4-52, leu2-3,112, tef4-delta ::KanMX4, D273-10B (ρ<sup>+</sup>)</i>			Este estudio
<b>XPM78</b>	<i>Mat α, Mat α, arg8::hisG, ura4-52, leu2-3,112, D273-10B (COX1(1-512) :: ARG8m)</i>	(38)		
<b>XPM76</b>	<i>Mat α, Mat α, arg8::hisG, ura4-52, leu2-3,112, mss51-delta :: LEU2, D273-10B (COX1(1-512) :: ARG8m)</i>	(38)		
<b>VP3</b>	<i>Mat α, Mat α, arg8::hisG, ura4-52, leu2-3,112, tef4-delta :: KanMX4, D273-10B (COX1(1-512) :: ARG8m)</i>			Este estudio
<b>VP4</b>	<i>Mat α, Mat α, arg8::hisG, ura4-52, leu2-3,112, mss51-delta :: LEU2, tef4-delta :: KanMX4, D273-10B (COX1(1-512) :: ARG8m)</i>			Este estudio

Tabla 1. Lista de cepas utilizadas en este estudio.

## Medios de cultivo

Medio	Composición para 1L de medio	
<b>YPD</b>	Extracto de levadura	10 g
	Peptona	20 g
	Dextrosa	20 g
<b>YPEG</b>	Extracto de levadura	10 g
	Peptona	20 g
	Dextrosa	20 g
	Glicerol	30 mL
	Etanol	30 mL

<b>YPLac</b>	Extracto de levadura	10 g
	Peptona	10 g
	Sulfato de amonio	1.2 g
	Fosfato dipotásico	1 g
	Ácido láctico	23.5 mL
	NaOH	Ajustar pH 5.5
<b>SOC</b>	Triptona	20 g
	Extrato de levadura	5 g
	NaCl	0.5 g
	Dextrosa	3.6 g
<b>LB con ampicilina</b>	Extracto de levadura	5 g
	Triptona	10 g
	NaCl	10 g
	Ampicilina	100 mg
<b>Medio "Drop-out"</b>	Base nitrogenada sin aminoácidos	6.7 g
	Glucosa o galactosa	20 g
	Medio Drop-out	Ver indicaciones del producto

**Tabla 2. Medios de cultivo utilizados en este estudio.** A los medios sólidos se les agrega 20g de agar. Todos los medios se esterilizan en autoclave durante 20 minutos a 120°C.

## Oligonucleótidos utilizados en este estudio

<b>Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia (5' a 3')</b>	<b>Localización aproximada</b>
<b>TEF4-F1</b>	GTACACGAACTCATTACACACCTTTGCCT	300 nt río arriba de la región UTR
<b>TEF4-R1</b>	TTCGCTATTGTTGCAAAAGTACAATGG	300 nt río abajo de la región UTR

<b>KanB</b>	CTGCAGCGAGGAGCCGTAAT	250 nt río abajo del extremo 5' del casete <i>KanMX4</i>
<b>KanC</b>	TGATTTTGATGACGAGCGTAAT	586 nt río arriba del extremo 3' del casete <i>KanMX4</i>
<b>TIF4631 Fw</b>	CTGTTGTGCAACGGATGGATGGTAGATGG	191 nt río arriba de del codón de inicio AUG
<b>TIF4631 Rv3</b>	CCATTAAATGCATCAAACCTGTTTATAGC	251 nt río abajo del codón de paro

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en la verificación de mutantes.

<b>Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia (5' a 3')</b>
<b>TEF4-F1</b>	GTACACGAACTCATTACACACCTTGCCT
<b>TEF4-R1</b>	TTCGCTATTGTTGCAAAAGTACAATGG
<b>TEF4FLAG-F1</b>	<b>GATTATAAAGATGATGACGATAAA</b> TAACTCTCAATAACTCTTCTTCCA TATTTTC
<b>TEF4FLAG-R1</b>	<b>TCGTCATCATCTTTATAATC</b> TTTCAAACCTTACCGTCAACAATTTCC
<b>TEF4-F3</b>	<u>CCTTAATTAAC</u> CGTCTCAGTCCTCACTTGTTATTCATCTCTTGG
<b>TEF4-R2</b>	<b>GCGGGATCCT</b> TCGCTATTGTTGCAAAAGTACAATGG

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en PCR de fusión. En negritas secuencia FLAG.

<b>Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia (5' a 3')</b>
<b>pRS303N-F1</b>	GAGCTGCGCACGTCAAGACTGTCA AG
<b>TEF4-F4</b>	GATCTCCAAGAACTACG CTT CTG AAG C
<b>TEF4-R3</b>	CGTGGAGGGTAATTCTGCTAGCCTCT
<b>pRS303N-R1</b>	CAACCGAACATGTAAGTAGAGAA

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en secuenciación.

## Plásmidos utilizados en este estudio

Plásmido	Referencia
pRS303N	(39)
pVT100U-mtGFP	(40)

Tabla 6. Plásmidos utilizados en este estudio.

## Extracción de DNA total de levadura

1. Se realizó un precultivo con 3-4 colonias de levadura en 2 mL de medio YPD. Incubar a 30 °C O/N.
2. Se centrifugó 1 mL del precultivo a 14000 rpm/min.
3. Se decantó y resuspendió con 500 µL con agua estéril.
4. Se centrifugó a 14000 rpm/min.
5. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón con 300 µL de amortiguador de lisis.
6. Se agregaron 300 µL de fenol-cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1)
7. Se agitó en vórtex durante 5 min.
8. Se centrifugó a 14000 rpm/5 min.
9. Se traspasaron 300 µL de fase acuosa a un tubo nuevo.
10. Se agregaron 900 µL de etanol y 30 µL de acetato de sodio 3 M, pH 5.3.
11. Se incubó durante 20 minutos a -20 °C.
12. Se centrifugó a 14000 rpm/10 min, a 4 °C.
13. Se decantó el sobrenadante y se lavó con 750 µL de etanol al 70 %.
14. Centrifugar a 14000 rpm/5 min, a 4 °C.
15. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar el botón durante 10 min. El tubo quedó libre de etanol.
16. Se resuspendió el botón con 50 µL de agua libre de nucleasas (Gibco).
17. El tubo se guardó a -20 °C.

### **Amortiguador de lisis**

Triton 100-X: 2 %

SDS 1 %

NaCl: 100 mM

Tris-HCl, pH 8.0: 10 mM

EDTA-Na, pH 8.0: 1 mM

### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó con la enzima Taq DNA Polimerasa recombinante de Thermo Scientific. La reacción se realizó siguiendo el protocolo del fabricante con las temperaturas de 95 °C para la desnaturalización, 50 °C para el alineamiento y 72 °C para la elongación. Se utilizaron los oligonucleótidos de la Tabla 3.

### **Purificación de productos de PCR**

Los productos de PCR se purificaron del gel de agarosa al 1 % con el kit QIAquick Gel Extraction Kit, siguiendo las indicaciones del producto.

El PCR de fusión se realizó utilizando la enzima Platinum® Taq DNA Polymerase, High Fidelity, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las temperaturas utilizadas fueron de 94 °C para la desnaturalización, 55 °C para el alineamiento y 68 °C para la elongación. Se utilizaron los oligonucleótidos de la Tabla 4.

### **Purificación de plásmidos**

Los plásmidos se purificaron mediante el kit de QIAGEN para purificación de DNA plasmídico, siguiendo las indicaciones del producto.

### **Verificación de la mutante *Δtef4***

Con el fin de verificar la correcta delección del gen *TEF4* en una cepa comercial de fondo genético BY4742. Se realizó un PCR con los pares de oligonucleótidos TEF4-F1/KanB y

KanC/TEF4-R1 (Figura 5). Los oligonucleótidos KanB y KanC se utilizan con el objetivo de conocer si el casete KanMX4 se encuentra eliminando al gen, en este caso TEF4. La secuencia KanB es homóloga a la cadena no codificante del casete KanMX4, 250 pb río abajo del extremo 5' del casete. Mientras que KanC es homóloga a la cadena codificante del casete KanMX4, 587 pb río arriba del extremo 3'.



**Figura 5** Esquema de verificación de la mutante  $\Delta te f 4$  con los oligonucleótidos TEF4-F1/KanB y KanC/TEF4-R1. La secuencia KanB es homóloga a la cadena no codificante del casete KanMX4, 250 pb río abajo del extremo 5' del casete. Mientras que KanC es homóloga a la cadena codificante del casete KanMX4, 587 pb río arriba del extremo 3' del casete.

## **Crecimiento de levadura en medios sólidos mediante diluciones seriadas 1:10**

1. Se cultivaron las cepas de interés en 2 mL de YPD a 30 °C O/N
2. Al día siguiente se pesaron microtubos de volumen 1.5 mL con una balanza analítica. Se registraron los pesos de cada tubo.
3. Se centrifugó 1 mL de cada cultivo en los microtubos previamente pesados a 14000 rpm/1 min. Eliminar sobrenadante.
4. Se pesaron los tubos con el precipitado de células y se estimó el peso del mismo.
5. Se diluyeron las muestras con agua estéril a una concentración de 0.02 g/mL.
6. Se colocaron, en una caja estéril con 96 pozos, 136  $\mu$ L de agua estéril con una pipeta multicanal hasta la columna número 6 comenzando con la columna 2 (A2, A3, A4... B2, B3, etc)
7. En la columna 1 (A1, B1, C1...), se agregaron 150  $\mu$ L de la solución de cultivo.

8. Con una pipeta multicanal de 15  $\mu$ L, se tomó este volumen de la columna 1 de cada fila y se transfirió a la siguiente columna (se homogeneizó en cada paso). Se repitió este paso hasta que se llegó a la columna 6.
9. Se esterilizó el replicador sumergiéndolo en una caja Petri con etanol. Se puso en contacto con la flama y se dejó enfriar por unos segundos.
10. Se sumergió el replicador en los pozos que contienen las diluciones.
11. Se imprimó el replicador en los medios correspondientes.

## **Transformación integrativa de levadura**

1. Se cultivaron las cepas de interés en 2 mL de YPD O/N para obtener un cultivo saturado.
2. Se diluyó el cultivo anterior en 10 mL de YPD y se incubaron por 2 h a 30 °C para obtener una  $DO_{600\text{ nm}}$  menor a 1.
3. Se centrifugó a 14000 rpm/1 min, 750  $\mu$ L y 1000  $\mu$ L del cultivo anterior con el fin de obtener dos condiciones. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el botón celular con 500  $\mu$ L de agua estéril. Se eliminó nuevamente el sobrenadante.
4. Se mezcló el precipitado de las células con 52.5  $\mu$ L de mezcla de transformación (n+1)
5. Se añadió el DNA de interés (5  $\mu$ g)
6. Se incubó por 30 min a 30 °C. Se agitó cada 10 min en agitador vórtex.
7. Se incubó por 15 min a 42°C. Se agitó cada 10 min en agitador vórtex.
8. Se centrifugó a 14000 rpm/1 min y se aspiró la mezcla de reacción.
9. Se recuperaron las células en 1 mL de medio YPD y se incubaron por 2 h a 30 °C.
10. Se centrifugó a 14000 rpm/1 min y se plaqueó el botón celular en el medio de selección correspondiente.

Nota: Para la transformación con plásmido, se incubó por 30 min a 42 °C. Se agitó en vórtex cada 10 min. Se plaqueó directamente junto con la mezcla de reacción en el medio de selección.

### **Mezcla de reacción**

- 40  $\mu\text{L}$  de PEG 50 %
- 5  $\mu\text{L}$  de DTT 1 M
- 5  $\mu\text{L}$  Acetato de litio 2 M
- 2.5  $\mu\text{L}$  DNA de esperma de salmón 10 mg/mL (hervir 10 min y enfriar en hielo)

### **Transformación de células competentes por choque térmico**

1. Se descongeló un tubo de células *E. coli* competentes en hielo. Se añadió 1  $\mu\text{L}$  de plásmido y se incubó por 30 min en hielo.
2. Se realizó un choque térmico a 42 °C en un termo-block por 2 min.
3. Se regresó el tubo al hielo y se agregaron 900  $\mu\text{L}$  de SOC. Se incubó el tubo 1 h a 37 °C con agitación constante.
4. Se plaquearon 50  $\mu\text{L}$  y 100  $\mu\text{L}$  en medio LB con ampicilina. Se incubó a 37°C O/N

### **Digestión**

Las reacciones de digestión se realizaron con las enzimas de restricción *BamHI* y *PacI* Time Saver™ de la marca New England BioLabs, siguiendo las indicaciones del fabricante. Para la clonación se utilizó un volumen de mezcla total de 50  $\mu\text{L}$  (5  $\mu\text{L}$  de plásmido). Para la prueba diagnóstica se utilizó un volumen de mezcla total de 20  $\mu\text{L}$  (3  $\mu\text{L}$  de plásmido).

### **Ligación**

Las reacciones de ligación se realizaron con la enzima DNA ligasa de la marca Promega. La reacción se incubó a 4 °C durante toda la noche. Para la reacción de ligación se utilizó un volumen de mezcla total de 10  $\mu\text{L}$

### **Electroforesis**

Para la electroforesis se realizó un gel de agarosa al 1 %. El corrimiento electroforético se realizó a 100 V, 200 mA con una duración entre 40 y 60 min.

## **Microscopía de epifluorescencia**

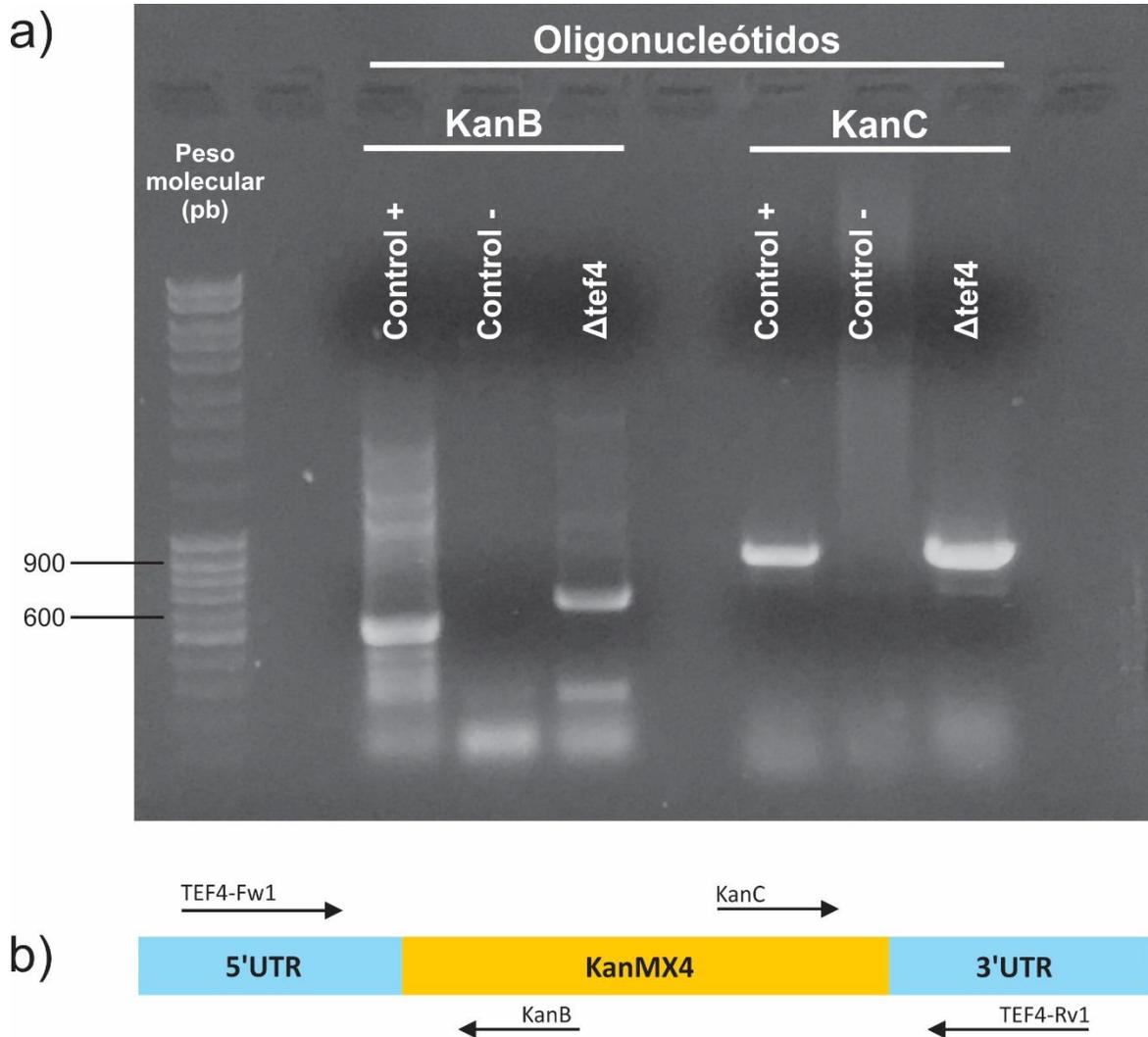
Las células transformantes se incubaron en medio “*Drop-out*” -URA con glucosa o galactosa, hasta que se alcanzó un crecimiento exponencial, (aprox.  $DO_{600\text{ nm}} = 0.5$  ). Posteriormente, las células se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4 % en PBS (41) durante 15 min en la oscuridad. Después se realizaron 3 lavados con PBS. Por último, se procedió a observar a las levaduras con un microscopio de epifluorescencia marca Olympus BX51 (IFC-UNAM) (42).

## Resultados

### Comprobación de la mutante comercial $\Delta tef4$

Con el fin de estudiar la función de Tef4p en la mitocondria, lo primero que se necesitaba era generar un casete con el cual poder eliminar al gen *TEF4* de la cepa WT utilizada en el laboratorio. Para ello, la bióloga María Teresa Lara Ortiz (técnica del laboratorio dirigido por el doctor Gabriel del Río, IFC UNAM), nos facilitó la cepa  $\Delta tef4$  de la colección comercial. En esta colección cada gen de la levadura se interrumpe por un casete de resistencia al antibiótico G418, KANMX4, y el fondo genético de la colección es BY4742 (43). Con el fin de comprobar la correcta delección del gen *TEF4* de la cepa de la colección comercial, se realizó un PCR. La muestra se analizó en una electroforesis en gel de agarosa con los oligonucleótidos TEF4-F1/KanB y KanC/TEF4-R1 (Figura 6). Se utilizó como control positivo a la cepa YC196, la cual tiene eliminado al gen *TIF4631* sustituido con el casete KanMX4; esta cepa se amplificó con los oligonucleótidos TIF4631Fw8/KanB y KanC/TIF4631Rv3. El control negativo fue la cepa WT (NB40-36A) que no contiene el casete KANMX4 en su genoma.

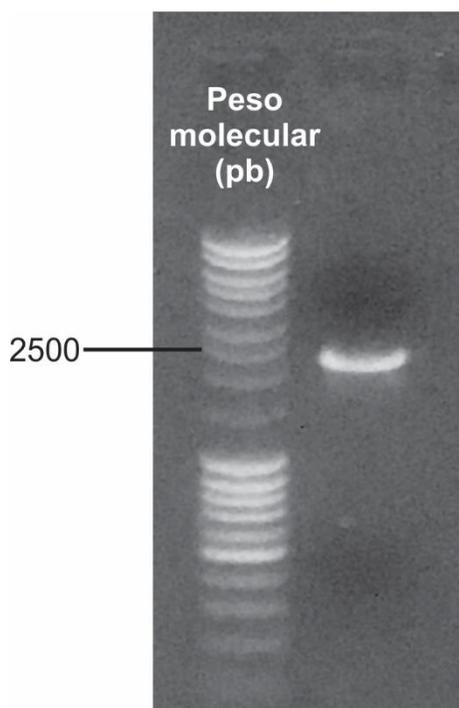
El peso esperado de los productos amplificados fue de 640 pb para los oligonucleótidos TEF4-F1/KanB y 858 pb para el par KanC/TEF4-R1. El control positivo amplificó usando ambos pares de oligonucleótidos, como se esperaba, debido a que tiene el casete KanMX4 en lugar del gen *TIF4631*. El control negativo no amplificó debido a que tiene el gen *TEF4* silvestre. Con lo que se comprobó la correcta delección del gen *TEF4* en la cepa comercial con fondo genético BY4742.



**Figura 6. Comprobación de la eliminación del gen TEF4 en la cepa WT (BY4742).** Se realizó una reacción de PCR con los pares de oligonucleótidos TEF4-Fw1/KanB y KanC/TEF4-Rv1. a) La muestra se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 %. Como control positivo se utilizó a la cepa YC196 ( $\Delta$ tef4::KanMX4). Como control negativo se utilizó a la cepa WT(NB40-36a). b) Esquema de verificación de la mutante  $\Delta$ tef4 con los oligonucleótidos TEF4-F1/KanB y KanC/TEF4-R1. La secuencia KanB es homóloga a la cadena no codificante del casete KanMX4, 250 pb río abajo del extremo 5' del casete. Mientras que KanC es homóloga a la cadena codificante del casete KanMX4, 587 pb río arriba del extremo 3' del casete.

## La eliminación del gen *TEF4* no afecta la respiración

Con el fin de comparar el efecto de la mutante nula  $\Delta tef4$  en diferentes fondos genéticos, se generó una mutante nula  $\Delta tef4$  en la cepa NB40-36A. Utilizando los oligonucleótidos TEF4F1/R1 y la cepa  $\Delta tef4::KanMX4$  de la colección comercial, se amplificó el casete KanMX4 mediante una reacción de PCR. El producto de la reacción se corrió en un gel de agarosa mediante una electroforesis y se purificó con el kit QIAquick Gel Extraction (Figura 7).

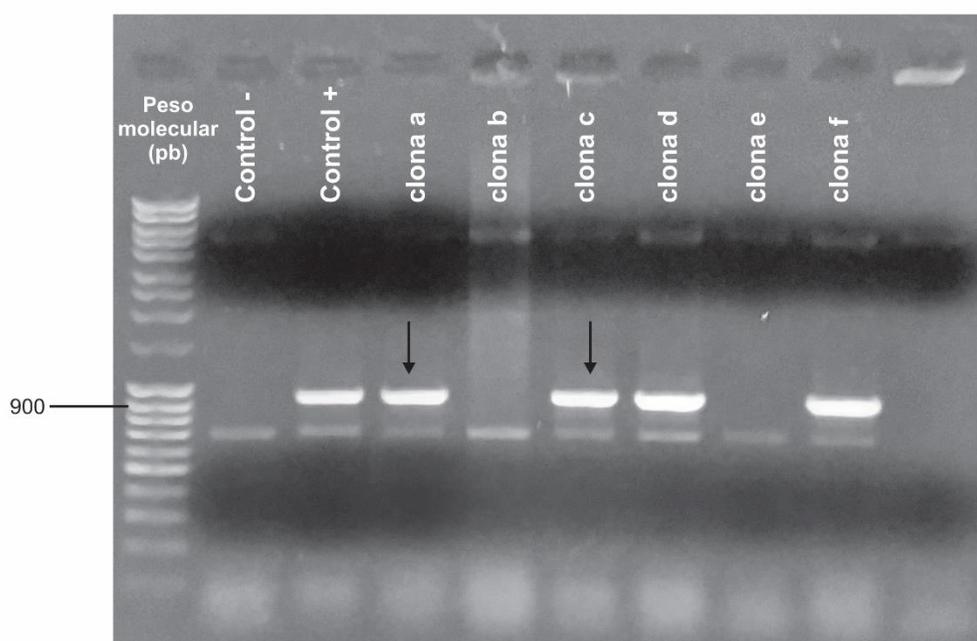


**Figura 7. Casete de KanMX4 purificado.** Se realizó un análisis por electroforesis en gel de agarosa para comprobar la correcta purificación del casete kanmx4 (3 $\mu$ l) obtenido de la purificación del gel agarosa. Peso molecular esperado: 2166 pb aprox.

Después se transformó la cepa WT integrando el casete purificado. El producto de la transformación integrativa se plaqueó en un medio con glucosa y geneticina (150 mg/L). Las colonias obtenidas se purificaron en un medio con glucosa y geneticina (200 mg/L). Para

comprobar la correcta inserción del casete KanMX4 se realizó un PCR con los oligonucleótidos KanC y TEF4-R1. Por último, se realizó un análisis por electroforesis en gel de agarosa para revelar los productos de PCR. Se usó como control negativo a la cepa WT y como control positivo a la cepa mutante  $\Delta tef4$  de la colección comercial. El peso esperado para el producto amplificado usando el par de oligonucleótidos KanC/TEF4-R1 era de 858pb, por lo que se concluye que la transformación integrativa del casete KanMX4 fue exitosa (Figura 8).

Las clonas A y C se seleccionaron para realizar los siguientes experimentos, y se les designó el nombre de VP1 y VP2 (Figura 8)



**Figura 8. Verificación de la transformación integrativa de la cepa NB4036-A con el casete KanMX4, sustituyendo al gen *TEF4*.** Se extrajo DNA de las clonas obtenidas mediante la transformación integrativa. Con el fin de verificar la correcta inserción del casete KanMX4, se realizó un PCR con los oligonucleótidos KanC/TEF4-R1. Por último, se corrió una electroforesis en gel de agarosa para visualizar el producto de la reacción de PCR. Las clonas analizadas se enumeraron de la A a la G. Las flechas indican las clonas utilizadas en este estudio. Como control negativo, se utilizó a la cepa WT(NB4036-a), mientras que el control positivo fue la cepa comercial  $\Delta tef4::KanMX4$ . Peso molecular esperado: 858pb.

Con el objetivo de encontrar un fenotipo en las mutantes nulas  $\Delta tef4$  se realizaron diluciones seriadas (Figura 9) con las cepas WT y las mutantes  $\Delta tef4$  cambiando las variables

temperatura y fuente de carbono. Las cepas de laboratorio BY4742 y D273-10b, se decidieron estudiar, ya que se ha visto que la función de las proteínas puede variar dependiendo de los polimorfismos de cada cepa (44). Como medio fermentativo se utilizó glucosa, mientras que los medios respiratorios, los cuales requieren del uso del mtDNA, utilizados fueron lactato y etanol-glicerol; las temperaturas utilizadas fueron la de crecimiento óptimo, 30°C, y temperaturas que se consideran condiciones de estrés, 25°C y 37°C.

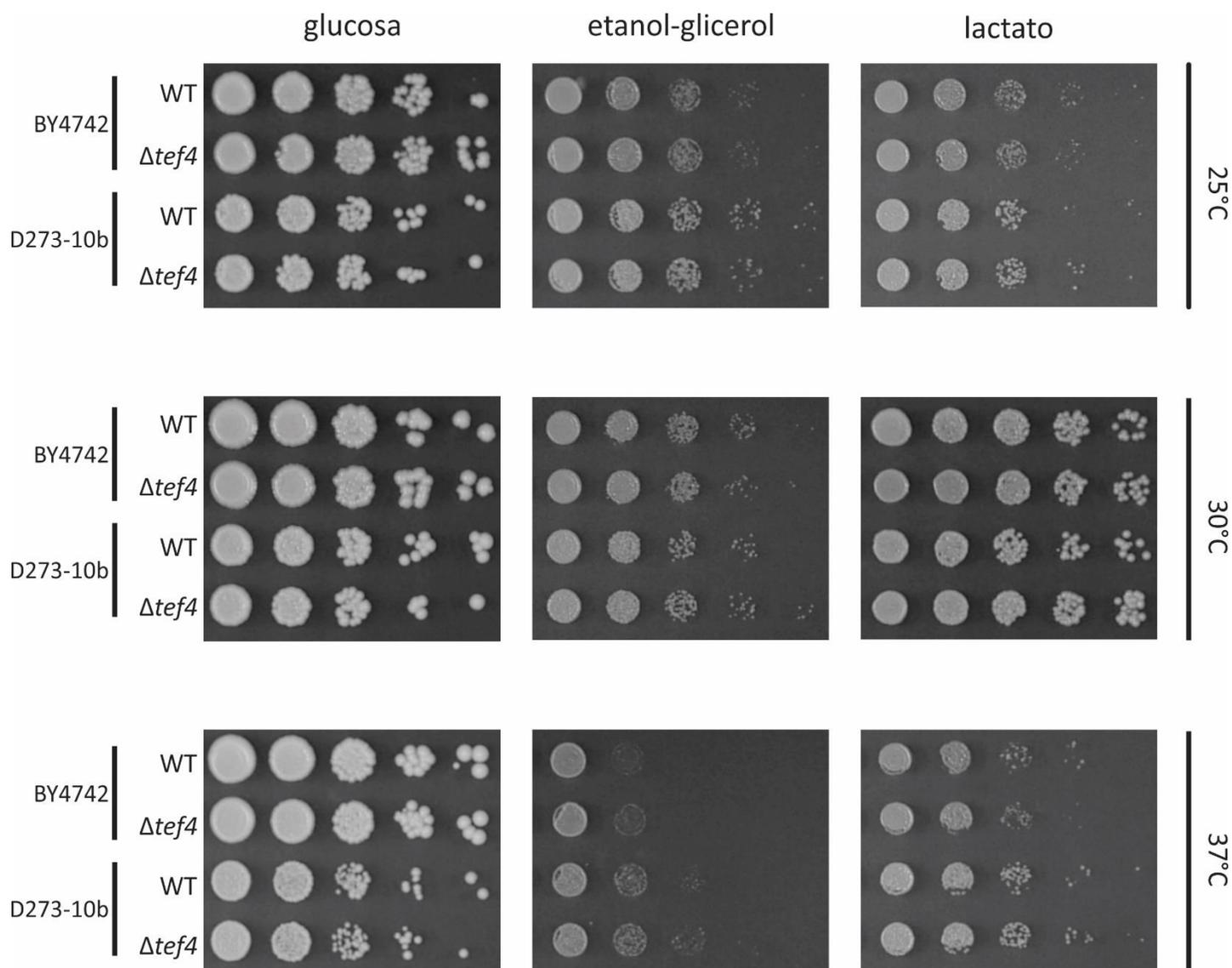


Figura 9. La delección del gen TEF4 no afecta la función mitocondrial ni global de la levadura. Diluciones seriadas 1:10 de las cepas BY4742 y D273-10b (WT y  $\Delta$ tef4) en los medios glucosa, etanol-glicerol y lactato; a

diferentes temperaturas: 25°C, 30°C y 37°C. Las diluciones seriadas se hicieron por triplicado. Fotos del tercer día de crecimiento.

No se observaron fenotipos distintos entre las dos cepas de laboratorio (Figura 9), la NB4036-a y la BY4742 en ninguna de las variables probadas (temperatura y medio de cultivo). Tampoco se observaron fenotipos distintos entre las cepas WT y sus mutantes  $\Delta tef4$  en ninguna de las variables probadas (temperatura y medio de cultivo). Esto nos indica que, al menos en las condiciones estudiadas, la delección del gen *TEF4* no afecta la función respiratoria mitocondrial evaluado por el crecimiento en lactato y glicerol; tampoco parece afectar la función global de la levadura (evaluado por su crecimiento en glucosa).

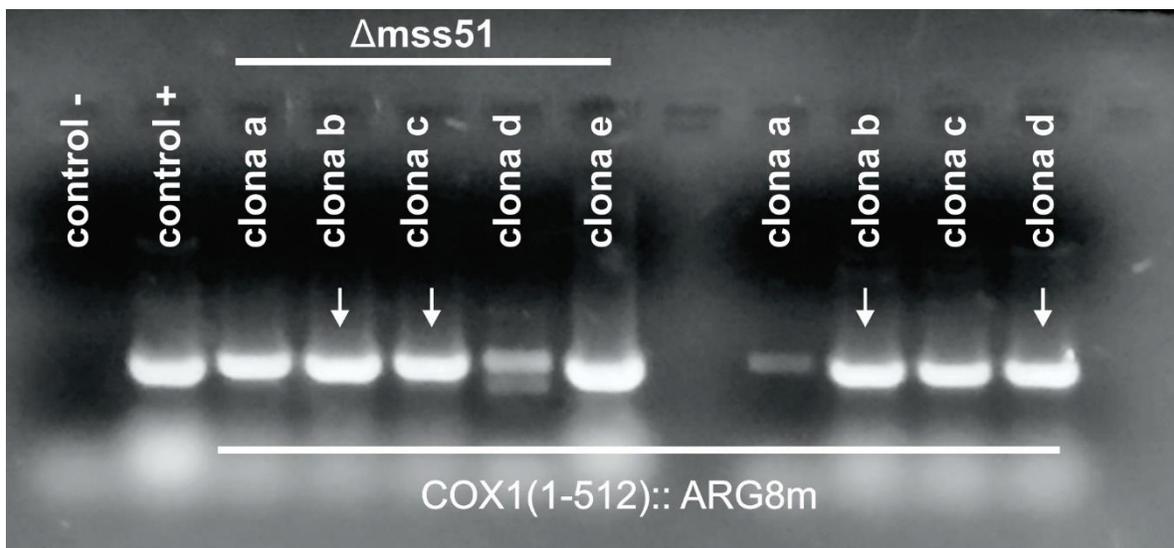
### **La proteína Tef4p no parece tener el mismo papel regulador de eIF4G1 en la síntesis de Cox1.**

La proteína Cox1p pertenece al complejo citocromo c oxidasa, componente de la cadena respiratoria, y se encuentra codificada en el genoma mitocondrial. Uno de los activadores traduccionales del mRNA de *COX1* es la proteína Mss51p. Además de actuar como activador traduccional, la proteína Mss51p también interactúa con el péptido nascente de Cox1p, ayudando a completar la traducción. (38, 45). Se ha demostrado que si se coloca al gen reportero mitocondrial *ARG8m* fusionado a *COX1* en el genoma mitocondrial, la traducción de esta construcción depende de Mss51p, de tal forma que en mutantes  $\Delta mss51$  la cepa no sintetiza Arg8p y no puede crecer en un medio sin arginina (38). En el laboratorio se encontró que, si se elimina al factor de inicio de la traducción citosólico eIF4G1, entonces la mutante puede nuevamente sintetizar Arg8p aunque no esté presente Mss51p. Esto indica que eIF4G1 es un regulador de la síntesis de Cox1 mitocondrial (García Cordero, et al., sin publicar).

Debido a este antecedente, surgió la duda de si Tef4p pudiera tener el mismo efecto que eIF4G1 en la regulación de la síntesis de Cox1p mitocondrial, ya que ambas proteínas son

factores de traducción citosólica y están presentes en los proteomas mitocondriales (13–15) (Flores Mireles, et al., sin publicar).

Ya que es probable que la proteína Tef4p ayude a la traducción de proteínas mitocondriales sintetizadas en citosol, ya sea directamente en la traducción de estas o en su importación a mitocondria, se generó una mutante nula  $\Delta tef4$  en una cepa que contenía el gen reportero  $COX1(1-512)::ARG8m$  (XPM78) y también en su mutante  $\Delta mss51$  (XPM76). La transformación de las células se llevó a cabo de igual forma que en la sección anterior (Figura 10). Esto se realizó con el fin de saber si la eliminación del gen  $TEF4$  podía revertir el fenotipo de la mutante  $\Delta mss51$ , igual que lo hace la mutante  $\Delta tif4631$ .

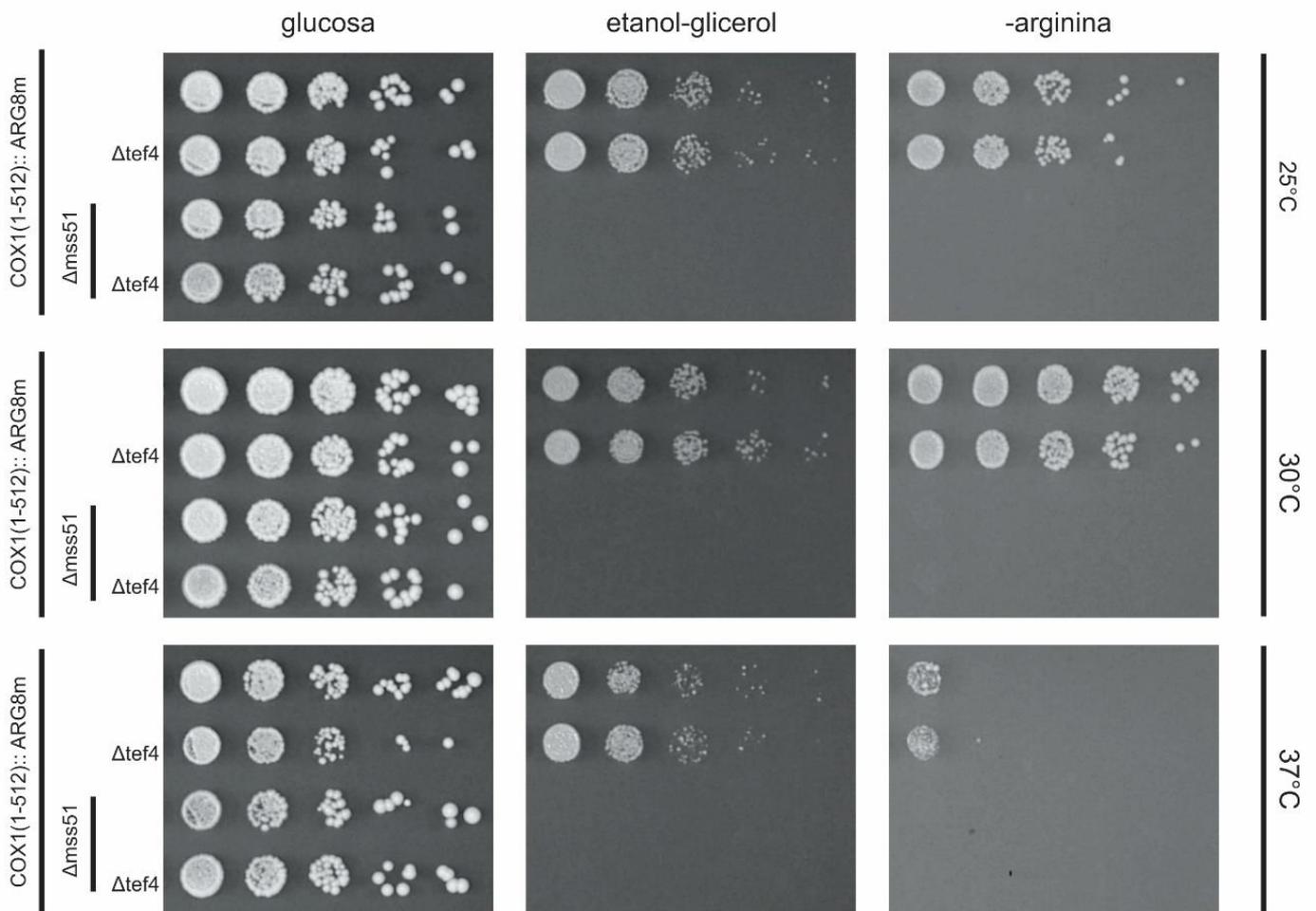


**Figura 10. Transformación integrativa de levaduras en las cepas  $COX1(1-512)::ARG8m$ , XPM78 (WT) y su mutante  $\Delta mss51$  XPM76.** Se transformaron las cepas antes mencionadas con el casete KanMX4. Para comprobar la correcta delección del gen  $TEF4$  se realizó un PCR con los oligonucleótidos KanC/TEF4-R1. Se corrió una electroforesis en un gel de agarosa al 1% con el fin de verificar los productos de PCR. Como control negativo se utilizó a la cepa NB4036-a la cual tiene el gen  $TEF4$  silvestre, y como control positivo a la cepa comercial  $\Delta tef4$ . Se seleccionaron las clonas b y c de la mutante  $\Delta mss51$  y se les designó con el nombre VP4. Las clonas seleccionadas de las cepa WT ( $COX1(1-512)::ARG8m$ ) fueron las b y d, y se les designó el nombre de VP3.

Se realizaron diluciones seriadas (Figura 11) en tres distintas fuentes de carbono: glucosa (fermentativo), etanol-glicerol (respiratorio) y glucosa sin arginina (- arginina) a tres

diferentes temperaturas: 25 °C, 30 °C y 37 °C. El medio sin arginina se utiliza debido a que la secuencia del gen *COX1* está fusionada con el gen reportero *ARG8<sup>m</sup>*, por lo que, si Cox1p no se sintetiza, el gen reportero no se puede expresar y por ende no puede crecer en un medio sin arginina (38).

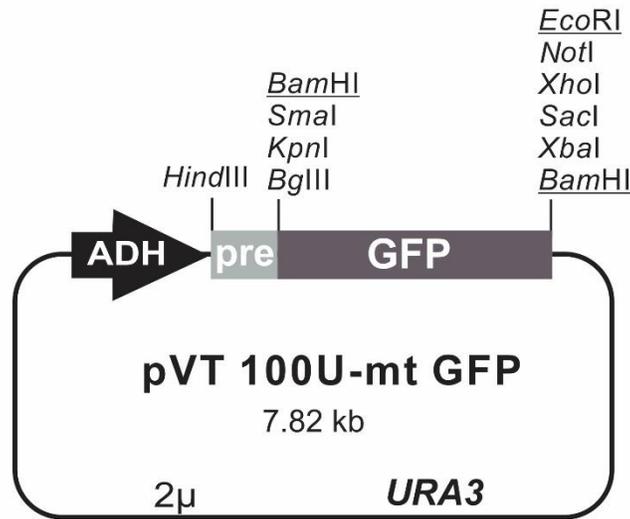
Como se esperaba, la mutante  $\Delta mss51$  no creció en el medio sin arginina debido a que *COX1(1-512)::ARG8<sup>m</sup>* no se traduce y por ende no respira, por lo que tampoco creció en el medio respiratorio etanol-glicerol (Figura 11). Por otra parte, la doble mutante  $\Delta mss51/\Delta tif4631$  sí es capaz de crecer en un medio sin arginina (García-Cordero et al., sin publicar), lo que indica que la mutación supresora  $\Delta tif4631$  es una mutación supresora del fenotipo debido a la mutación  $\Delta mss51$  (Figura 11). Sin embargo, la doble mutante  $\Delta mss51/\Delta tif4631$ , no restaura el crecimiento en el medio respiratorio (etanol-glicerol) (Figura 11), lo que indica que la mutación supresora  $\Delta tif4631$ , no participa en la regulación del ensamblaje de Cox1p, función que sí cumple Mss51p además de regular la traducción de Cox1p. En contraste, la doble mutante  $\Delta mss51/\Delta tef4$ , al igual que la mutante  $\Delta mss51$ , no creció en un medio sin arginina en ninguna de las tres temperaturas probadas (Figura 11). Estos resultados indican que la delección de la proteína Tef4p no tiene el mismo papel que el factor de inicio eIF4G1 en la regulación de la síntesis de Cox1p.



**Figura 11** La eliminación del gen *TEF4* no reconstituye la función de la proteína *Mss51p*. Diluciones seriadas 1:10 de las cepas COX1(1-512)::ARG8m, XPM78 (WT y  $\Delta$ *tef4*) y su mutante  $\Delta$ *mss51* XPM76 (WT y  $\Delta$ *tef4*) en los medios glucosa, etanol-glicerol y medio glucosa sin arginina; a diferentes temperaturas: 25°C, 30°C y 37°C. Las diluciones seriadas se hicieron por triplicado. Fotos del tercer día de crecimiento.

## La mutante $\Delta$ *tef4* afecta a la red mitocondrial

Pisani en 2016 reportó que el ortólogo de la proteína Tef4p en humano, al expresarse en células HeLa, y después de silenciarse mediante un *small interfering RNA* (siRNA) específico para Tef4p, mostró una afectación en la red mitocondrial. Por lo anterior, se decidió analizar si en las mutantes  $\Delta$ *tef4*, generadas en este estudio, se veía algún efecto en la morfología de la red mitocondrial. Para ello se transformaron a las cepas WT(D273-10b) y

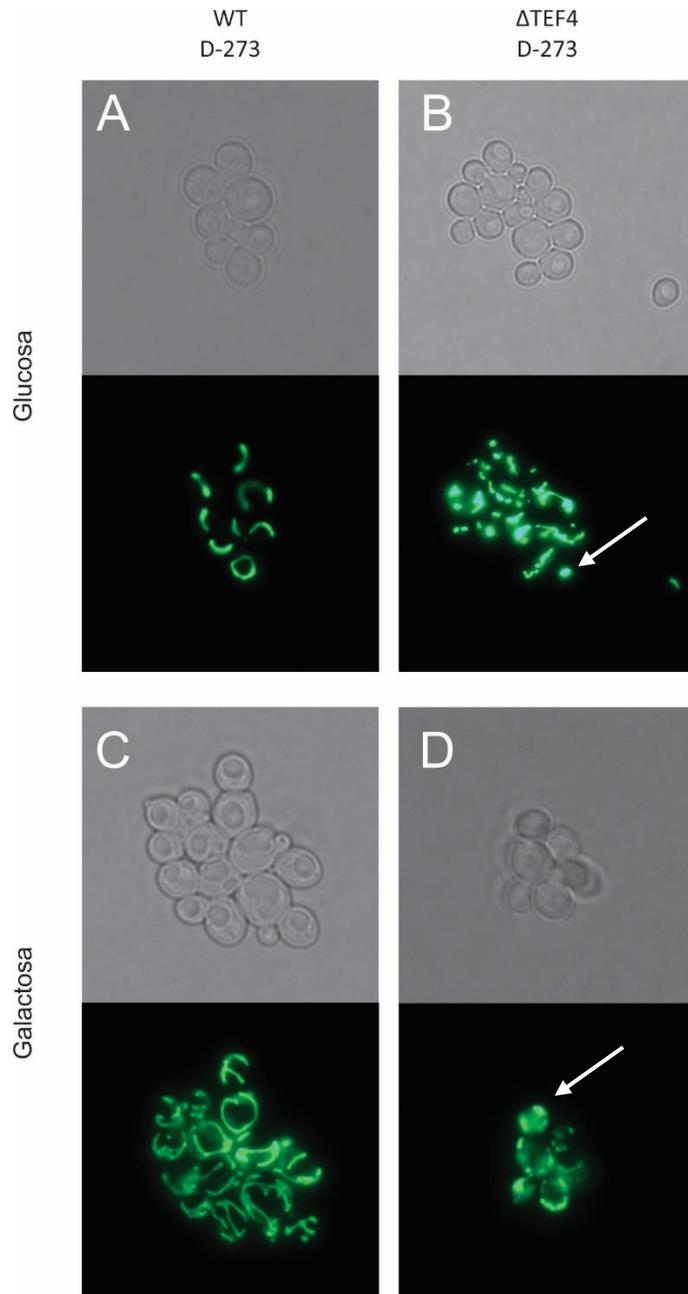


**Figura 12. Representación del plásmido pVT100U-mtGFP.** El plásmido incluye al marcador auxotrófico URA3. El promotor constitutivo del alcohol deshidrogenasa (ADH) se indica con una flecha negra. La presecuencia mitocondrial está indicada como “pre”. Además, se indican los sitios de corte de las enzimas de restricción. (Westermann et al., 2000)

*Δtef4* con el plásmido pVT100UV-mt GFP (Figura 12). El plásmido tiene un promotor constitutivo de alcohol deshidrogenasa y como presecuencia mitocondrial tiene a los 69 aminoácidos de la subunidad 9 de la F0-ATPasa de *Neurospora crassa*, lo que hace que la proteína verde fluorescente, GFP, se dirija a la mitocondria (mtGFP) (40).

Las células de ambas cepas expresando a mtGFP, se dejaron crecer hasta llegar a la fase exponencial en dos medios con distintas fuentes de carbono fermentables: glucosa, carbohidrato que reprime la expresión de genes mitocondriales (46) y, galactosa, carbohidrato que no reprime los genes mitocondriales. Las células se observaron en el microscopio de epifluorescencia. En un medio con galactosa las redes mitocondriales de la cepa WT son más abundantes y ramificadas que en un medio con glucosa (Figura 13 A y C). Por otra parte, en ambas fuentes de carbono, se observa que al eliminar el gen *TEF4*, la red mitocondrial se ve más fragmentada que en su contraparte WT (Figura 13 B y D). En estas imágenes se observan estructuras mitocondriales pequeñas y redondas (Figura 13-B) lo que

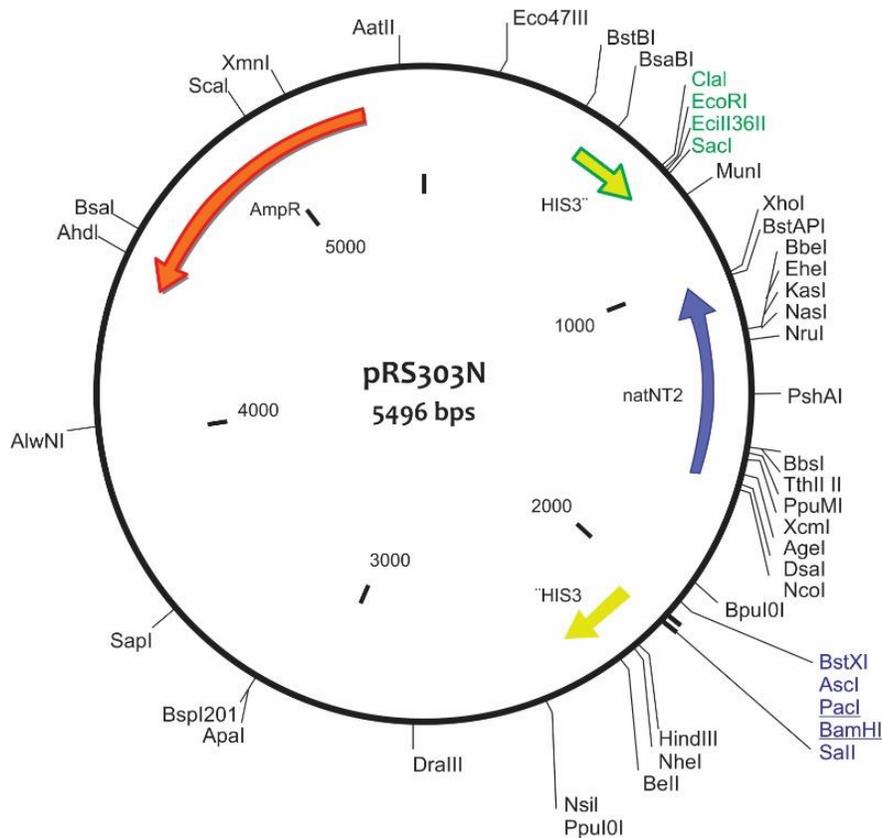
indica daño en las redes mitocondriales. Lo anterior sugiere que la proteína Tef4p presenta alguna función en la regulación de la fusión y fisión mitocondriales.



**Figura 13.** Imágenes representativas de células de levadura en fase exponencial con la expresión constitutiva del plásmido pVT100U-mtGFP expresando a la proteína mtGFP. Se utilizaron dos fuentes de carbono distintas: glucosa (A-B) y galactosa (C-D). En las cepas silvestres (WT; A y C) se observan mitocondrias tubulares y alargadas, mientras que en las cepas *tef4Δ* se observan redes mitocondriales fragmentadas. La flecha blanca indica estructuras mitocondriales pequeñas y redondas.

## Diseño de un plásmido que exprese a Tef4p etiquetado con el epítipo de FLAG

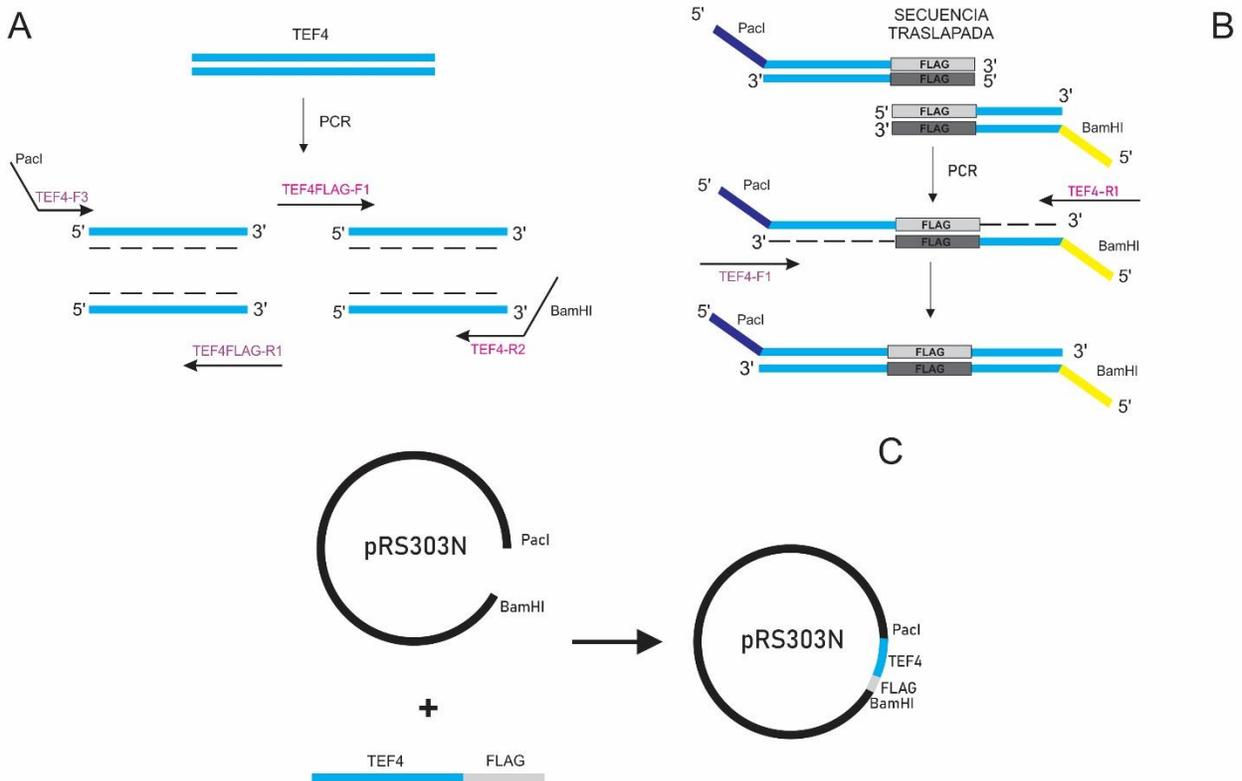
Se ha visto que la proteína Tef4p es parte de los proteomas mitocondriales (13–15) (Flores Mireles, et al., sin publicar). Con el fin de comprobar que Tef4p forma parte de la mitocondria y conocer su localización en el organelo, se generó una construcción en que la proteína Tef4p se fusiona en su extremo carboxilo terminal con un epítipo de FLAG. Lo anterior con el objetivo de poder detectar a Tef4p mediante ensayos de *Western blot* usando anticuerpos comerciales monoclonales.



**Figura 14. Plásmido pRS303N.** Este plásmido tiene la particularidad de reemplazar el marcador auxótrofo, HIS3, con un marcador antibiótico nanNT2 (nurotricina). El plásmido puede integrarse en forma circular o de forma linealizada. Los sitios de restricción mostrados en el mapa son únicos en el vector. Los únicos sitios de restricción en los que se puede introducir el DNA foráneo son los mostrados en azul. Los sitios de restricción PacI y BamHI utilizados en este estudio se muestran subrayados. Modificado de (39)

La secuencia de FLAG codifica para un péptido de 8 aminoácidos de secuencia AspTyrLysAspAspAspLys. Este péptido es muy hidrofílico y por ende muy fácil de identificar con un anticuerpo, además de que adopta una conformación tridimensional altamente expuesta al plegarse (47)

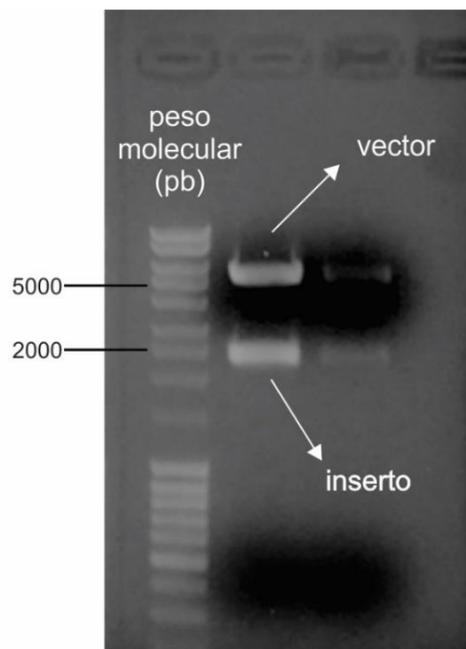
El plásmido utilizado recibe el nombre de pRS303N (Figura 14) (39). Este plásmido puede integrarse en el DNA nuclear. Esto último es viable, ya que el plásmido tiene la particularidad de reemplazar el marcador auxótrofo, HIS3, con un marcador de resistencia al antibiótico nanNT2 (nurotricina), lo cual facilita la selección de las levaduras al ser transformadas.



**Figura 15 Esquema de una PCR de fusión.** A) Con el DNA de la secuencia TEF4 se realizaron dos reacciones de PCR. La primera con los oligonucleótidos TEF4-F3/TEF4FLAG-R1 y la segunda reacción con los oligonucleótidos TEF4FLAG-F1/TEF4-R2. B) De estas dos reacciones se obtuvieron dos secuencias que se traslapan en la región FLAG. Se realizó una tercera reacción con ambas secuencias, utilizando a los oligonucleótidos TEF4-F3/TEF4-R2. De esta última reacción se obtuvo un inserto de DNA con la secuencia TEF4-FLAG y los sitios de restricción BamHI y PaclI. C) Por último se digirió tanto el plásmido como el inserto de DNA y se ligaron.

Se diseñaron oligonucleótidos (Tabla 4) para efectuar una PCR de fusión (Figura 15) (48). Los oligonucleótidos, además de introducir la secuencia FLAG, también se diseñaron con las secuencias de los sitios de corte de las enzimas de restricción *BamHI* y *PacI*. Esto con el objetivo de introducir el inserto al plásmido pRS303N (39). El producto del PCR de fusión se purificó con el kit QIAquick Gel Extraction. Después, se digirió al igual que el plásmido pRS303N con las enzimas de restricción *BamHI* y *PacI*. Se realizó una reacción de ligación entre el inserto (producto del PCR de fusión) y el vector (plásmido pRS303N). El producto obtenido se usó para transformar células competentes, *E. coli* DH5 $\alpha$ , mediante choque térmico. Las células se recuperaron en medio LB + ampicilina (100 mg/L).

Las células recuperadas se seleccionaron y se purificó el plásmido mediante el kit QIAquick Plasmid Extraction y se digirieron con las enzimas de restricción antes mencionadas. Se verificó la correcta obtención del plásmido mediante una electroforesis en gel de agarosa, donde el peso molecular esperado era de 5696 pb para el vector y 2465 pb para el inserto (Figura 16).



**Figura 16. Digestión del vector pRS303N con el inserto tef4-FLAG.** Las células competentes transformadas por choque eléctrico se purificaron. Después se digirió el plásmido con las enzimas de restricción *PacI* y *BamHI*. Para visualizar el producto de la reacción de digestión, se realizó una electroforesis en gel de agarosa. El peso molecular el peso molecular esperado era de 5496pb para el vector y 2465pb para el inserto.

Por último, se diseñaron oligonucleótidos (Tabla 5) para el inserto, regiones río arriba del sitio de restricción *BamHI* y regiones río abajo de *PacI* en el vector y, se mandó a secuenciar con el objetivo de verificar la correcta construcción del inserto. La secuenciación se realizó con éxito y no se encontraron mutaciones que pudieran afectar el fenotipo de las células (Apéndice I).

Debido a la emergencia sanitaria presente en el último año, ya no se pudieron realizar los experimentos planeados para los que se diseñó el plásmido anteriormente presentado, sin embargo, se planean realizar en un futuro próximo.

## Discusión

La mitocondria es un organelo que participa en numerosas rutas metabólicas de la célula. Es por lo que, al contrario de lo que se pensaba, este organelo mantiene una amplia comunicación con el resto de la célula. Se sabe que la traducción de las proteínas mitocondriales está regulada por la traducción citosólica (25). Además de los activadores traduccionales que actúan en la matriz mitocondrial, se ha observado que existen factores de traducción citosólica que de igual manera regulan la traducción de las proteínas sintetizadas en la mitocondria (García-Cordero, et al., sin publicar). Con el fin de conocer más sobre la influencia que las proteínas involucradas en la traducción citosólica ejercen sobre la función mitocondrial, se decidió investigar al factor citosólico de elongación, Tef4p, el cual se ha visto asociado a la mitocondria (13–15) (Flores Mireles, et al., sin publicar).

Se observó que, tanto la cepa silvestre como la mutante  $\Delta tef4$  crecieron por igual en medios sólidos fermentativos (glucosa) y respiratorios (lactosa y etanol-glicerol) a distintas temperaturas (25 °C, 30 °C y 37 °C). Lo anterior indica que la mutante no presenta defecto en cuanto a su capacidad respiratoria, de lo cual se puede interpretar que la cadena respiratoria funciona de manera correcta, así como la traducción mitocondrial, ya que varias de las subunidades de la cadena respiratoria se sintetizan dentro de la mitocondria debido a que están codificadas en el mtDNA. Lo anterior parece estar respaldado por los ensayos de traducción *in vivo* incorporando [<sup>35</sup>S]metionina hechos por Olarewaju (28), en los cuales, la mutante  $\Delta tef4$  no presenta una disminución estadísticamente significativa en la síntesis total de proteína. Sin embargo, cabe la posibilidad de que haya diferencias en el consumo de oxígeno entre la cepa WT y la mutante nula  $\Delta tef4$ , que no son perceptibles en un experimento macroscópico como el de crecimiento en diluciones seriadas, por lo que sería conveniente cuantificar el consumo de oxígeno en un oxímetro y compararlo entre la cepa WT y la mutante nula  $\Delta tef4$ . Por otra parte, es probable que, aunque no hay diferencias significativas en la síntesis total de proteínas entre la cepa WT y la mutante nula, es posible que existan etapas de la traducción en donde esta se vea afectada debido a la mutación, por lo que sería necesario analizar el perfil ribosomal (49) de las cepas WT y  $\Delta tef4$ , para así comparar la eficiencia de la traducción (50).

Existe el antecedente de que el factor de traducción citosólico eIF4G1, probablemente regule la síntesis de la proteína Cox1p. Ya que la mutante supresora de eIF4G1 revierte el fenotipo de la mutante nula  $\Delta mss51$ , la cual no traduce a la proteína Cox1p y por lo tanto no respira. Debido a lo anterior, se decidió experimentar con la proteína Tef4p, la cual también es un factor de traducción citosólico, con el objetivo de averiguar si esta proteína tiene un papel regulador similar que el de eIF4G1 sobre la traducción de Cox1p. Para esto se utilizó un gen reportero mitocondrial sintético,  $ARG8^m$ , el cual está fusionado con la secuencia de la proteína Cox1p. El gen  $ARG8^m$ , al contrario de la mutante supresora eIF4G1, no se expresó en la mutante nula  $\Delta tef4$  y por ende tampoco restauró la función respiratoria. Por lo que la proteína Tef4p no parece estar involucrada en el inicio de la traducción mitocondrial de Cox1p. Sin embargo, con los resultados obtenidos no es posible descartar que la proteína Tef4p regule la síntesis de cualquiera de las otras siete proteínas codificadas en el mtDNA.

Debido a que no se encontró un fenotipo en medios respiratorios al deletar al gen  $TEF4$ , se decidió buscar un fenotipo en la morfología mitocondrial. Nuestros resultados indican que la eliminación del gen  $TEF4$  causa una mayor fragmentación en la red mitocondrial a diferencia de la cepa silvestre. Este fenómeno se observa tanto en medio con glucosa y con galactosa como fuentes de carbono fermentables.

Se sabe que el rol fundamental de la fusión es la mezcla complementaria de material genético defectuoso mediante la redistribución de DNA, mRNA y proteínas mitocondriales (51). Además se ha visto que la pérdida de este mecanismo desemboca en la pérdida del genoma mitocondrial (51) y en la fragmentación de la red mitocondrial (52).

Por otra parte, la fisión es un mecanismo en el cual la red mitocondrial se divide durante la división celular con el objetivo de repartir a la célula hija el mismo cociente mitocondrial que el de la célula madre (6). Sin embargo, se ha visto que la fisión no es absolutamente necesaria para la repartición del mtDNA, ya que la mutante nula de la proteína Dnm1p (complejo homomultimérico que constriñe a la red mitocondrial para separarla), aunque afecta la red mitocondrial dando un fenotipo hiperfusionado, aún es capaz de heredar DNA

mitocondrial en levadura. Por lo que se ha propuesto que un mecanismo independiente a la fisión es mediado por la proteína actina (6)

Por otra parte, se sabe que la fisión ayuda en el control de calidad mitocondrial. La fisión al separar las redes mitocondriales da como resultado mitocondrias individuales. Si alguna mitocondria presenta un defecto, como un potencial de membrana bajo o daño por estrés oxidativo, el paso subsecuente es la eliminación de esta mediante el mecanismo de mitofagia (53). También se ha visto que la fisión está implicada en la regulación de la apoptosis (53).

Después de la fisión mitocondrial (o del mecanismo dependiente de actina), el mtDNA se hereda durante la división celular. Uno de los mecanismos mediante el cual se reparte el DNA mitocondrial de forma anterógrada (de la célula madre a la célula hija), es el mediado por el complejo ARP2/3. Este complejo ayuda a la nucleación (inicio de la polimerización de la actina) de la actina, con el fin de formar filamentos de actina que crean fuerzas transitorias, las cuales mueven a la red mitocondrial (54, 55).

La función de la proteína periférica mitocondrial, Puf3p, es la de localizar RNA's mensajeros en la membrana externa mitocondrial para su traducción, mediante un sitio de unión al extremo 3'UTR del mRNA en condiciones respiratorias. Además, en ciertas condiciones desestabiliza los mRNA's, mediante la desanilación de estos (2). Recientemente, se ha demostrado que, Puf3p, es una proteína clave en el reclutamiento del complejo ARP2/3. Se tiene la hipótesis de que Puf3p sirve como un adaptador entre el complejo ARP2/3 y el complejo de ERMES (20), complejo cuya función es unir a la mitocondria con el retículo endoplásmico, también responsable de la unión entre la mitocondria y los cables de actina para el movimiento anterógrado y retrógrado durante la división celular (20).

Con lo anterior, y sumado a que Tef4p y Puf3p interaccionan de forma física (35), es posible que Tef4p ayude al reclutamiento del complejo ARP2/3 en sinergia con Puf3p (Figura 17) Este reclutamiento implica que el complejo ERMES pueda unirse a los cables de actina y así promover un movimiento anterógrado el cual promueve la herencia mitocondrial. Se sabe que las mutantes  $\Delta puf3$  presentan un fenotipo fragmentado y agregado en la red

mitocondrial (20), similar al observado en este trabajo en las mutantes *Δtef4*. Esta hipótesis tiene soporte ya que, se ha reportado una interacción genética negativa<sup>1</sup> de Tef4p con la proteína Mdm10p, subunidad proteica perteneciente al complejo ERMES; cuya eliminación da como fenotipo una red mitocondrial afectada (en forma esférica), así como la afectación de los movimientos anterógrados y retrógrados (36, 56). Por otra parte, se ha visto que el movimiento anterógrado dado por el mecanismo del complejo ARP2/3 no es el único que cumple esta función. Además del complejo ARP2/3, el complejo ERMES y las proteínas Myo2p y Ypt11p conforman otro mecanismo involucrado en el movimiento anterógrado (6, 57). No se tiene evidencia de que los mecanismos anteriormente mencionados sean mutuamente excluyentes (6), por lo que es posible que la delección de la proteína Tef4p, aunque afecte a la red mitocondrial, no cause la pérdida total de mtDNA debido a que existe otro mecanismo capaz de heredarlo. Lo anterior se ve reflejado en que la delección del gen *TEF4*, no afecta el crecimiento de la levadura en medios respiratorios (ver resultados pág. 31), donde el mtDNA, ya que en este se codifican proteínas esenciales para la cadena de transporte de electrones.

Aunque los resultados preliminares muestren una afectación en la red mitocondrial, es necesario cuantificar en qué porcentaje la mutante *Δtef4* afecta la morfología mitocondrial en comparación con la cepa WT y si este efecto es estadísticamente significativo.

Los mRNA's de los genes *TEF1*, *TEF2* (parálogos de la proteína eEF1-A en levadura) y *TEF4* interactúan con Puf3p (35); no así la isoforma de *TEF4*, *TEF3* (también llamado *CAM1*). Esto coincide con que el gen *TEF3* no se ha visto en proteomas mitocondriales (13–15) (Flores Mireles, et al., sin publicar). Con esto en mente, es probable que exista una población del complejo de elongación eucarionte que se localice únicamente en la mitocondria. Por lo que Tef4p y Puf3p podrían regular la biogénesis mitocondrial, mediante una interacción entre ambas proteínas. Es posible que Puf3p promueva la degradación de los mRNA's de los genes *TEF1*, *TEF2* y *TEF4* en condiciones fermentativas y los localice en la periferia

---

<sup>1</sup> "Efecto en el que dos perturbaciones genéticas, al combinarse, resulta en un fenotipo más severo/penetrante de lo esperado dados los fenotipos de las perturbaciones individuales"(63)

mitocondrial para su traducción en medios respiratorios, con lo que la traducción de proteínas mitocondriales traducidas en citosol sería más eficiente (Figura 17).

Aunque la presencia de la proteína Tef4p se ha visto en múltiples proteomas (13–15) (Flores-Mireles, et al., sin publicar) es importante comprobar su veracidad mediante la técnica de Western Blot, ya que la información viene de experimentos realizados a gran escala y con una gran sensibilidad, con cual se corre el riesgo de que exista una concentración mínima de la proteína, (posiblemente resultado de una contaminación) lo cual no sería biológicamente relevante (58). Es por lo anterior que, con el fin de comprobar la localización de Tef4p en la mitocondria y su sublocalización en este organelo, se decidió construir un plásmido con la secuencia del gen *TEF4* etiquetada con FLAG. Conocer el subcompartimiento mitocondrial de Tef4p es importante debido a que dependiendo de dónde se localice (membrana externa mitocondrial, membrana interna, matriz, etc), da una pista de la función que realiza en mitocondria. Podemos especular que es posible que la proteína Tef4p sea periférica a la mitocondria, y esté asociada a la membrana externa del lado citosólico de la mitocondria. Desde ahí podría jugar un papel en la biogénesis mitocondrial. En este trabajo, se logró construir el plásmido con el inserto TEF4-FLAG de forma exitosa, sin embargo, este ya no se pudo integrar a la levadura debido a la implementación de la actual contingencia sanitaria. Lo que truncó el avance del proyecto, sin embargo, se planean realizar estos experimentos en un futuro.

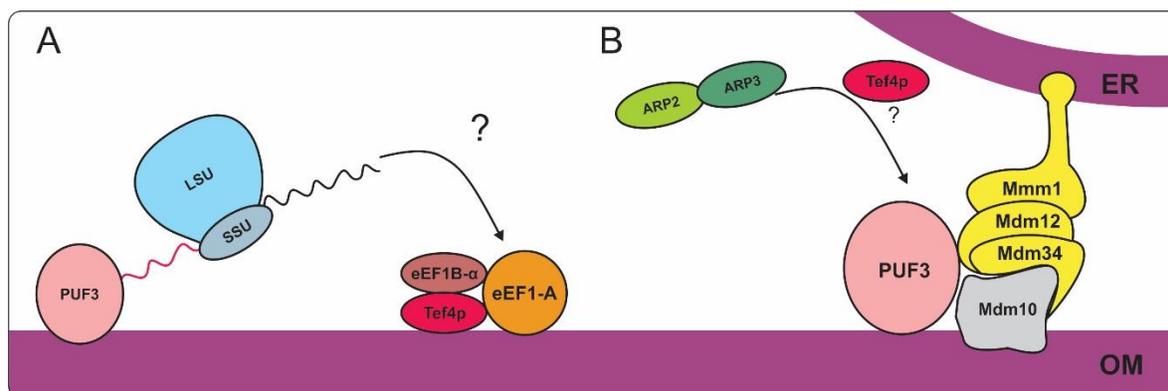


Figura 17. Modelo hipotético de la función de Tef4p en mitocondria. A) Puf3p se une al mRNA de los genes *TEF1*, *TEF2* (eEF1-A) y *TEF4* (eEF1-B $\gamma$ ), lo cual ayuda a que se traduzcan cerca de la mitocondria y se co-localicen

cerca de la membrana externa mitocondrial (OM) con el fin de que la traducción de las proteínas mitocondriales cuyos genes son expresados en el núcleo sea más eficiente. B) Es posible que Puf3p y Tef4p en sinergia por separado ayuden al reclutamiento del complejo Arp2/3. OM: membrana externa mitocondrial. ER: retículo endoplásmico.

El ortólogo de humano de Tef4p, eEF1By, se une a la región 3'UTR de diversos genes; también se ha visto que se une a la región 3'UTR de mRNA's de genes relacionados con el citoesqueleto, traducción y metabolismo mitocondrial. Lo que sugiere que, al menos en humano, eEF1By controla la expresión de genes y además localiza a los mRNA's en el sitio donde son traducidos (29, 59). Dado a que el ortólogo de Tef4p, eEF1By, parece tener una función no canónica, como proteína de unión a RNA, es posible que Tef4p tenga la misma función en levadura.

Con el fin de conocer la similitud entre la proteína Tef4p y su ortólogo en humano, se realizó un alineamiento entre las secuencias proteicas utilizando el programa Clustal Omega (60). El porcentaje de similitud entre ambas secuencias fue de 34.25 %, lo que indica una baja identidad entre secuencias. Sin embargo, a lo largo de todo el alineamiento, muchos aminoácidos están conservados (Figura 18). De acuerdo con Pisani (29), los dominios de unión a RNA, del ortólogo de Tef4p en humano, están a lo largo de toda la secuencia proteica, la cual consta de 437 aminoácidos. Debido a lo anterior, no se puede concluir mediante la alineación de ambas secuencias si Tef4p es capaz de unirse a RNA, por lo que es necesario probarlo experimentalmente.



Se sabe que la eliminación del gen *TEF4* en levadura incrementa la resistencia de la célula al estrés oxidativo, y aunque aún no se conoce cómo es que participa en esta vía, es probable que tenga un rol como sensor de estrés, ya que posee un motivo semejante a la enzima glutatión S-transferasa clase  $\theta$ , proteína involucrada en la desintoxicación de agentes xenobióticos (27, 28). Por lo que su eliminación sea un reflejo de una auto-inhibición del complejo de elongación, ya que también se ha observado que la eliminación de la subunidad eEF1B $\alpha$  aumenta la resistencia al estrés oxidativo de la cepa (28), y por lo tanto esto aumente de forma, tal vez indirecta, la respuesta al estrés oxidativo. Probablemente incrementando la traducción de genes involucrados en el estrés oxidativo, y por ende un aumento en la fisión mitocondrial. En este caso no causaría apoptosis, pero sí una respuesta más eficiente hacia el estrés oxidativo.

Aunque aún falta ahondar más en la conexión que tiene la proteína Tef4p y la mitocondria, parece ser que Tef4p modula, directa o indirectamente la morfología mitocondrial. Lo que es interesante, ya que sugiere la existencia de más proteínas consideradas únicamente citosólicas con una función mitocondrial. Estas funciones podrían depender de diversos factores ambientales (medio de cultivo, estrés oxidativo) como parece ser en este caso.

## Conclusiones

- La eliminación de la proteína Tef4p no afecta la función global en medio fermentativo rico con glucosa (YPD).
- La eliminación de la proteína Tef4p no afecta el crecimiento de la levadura en medio respiratorio rico con glicerol o con lactato de la levadura.
- La proteína Tef4p esté involucrada en mecanismos de fusión-fisión de mitocondrias ya que en mutantes  $\Delta tef4$  se observa una red mitocondrial más fragmentada que en la WT.
- Se construyó un plásmido para integrar a Tef4p-FLAG en el genoma de levadura y caracterizar así su posible localización y función mitocondrial.

## Perspectivas

- Realizar ensayos con oximetría, para comprobar cuantitativamente que la respiración no está afectada en cepas con la delección del gen *TEF4*.
- Cuantificar el número de células en que la morfología mitocondrial se ve afectada por la mutante  $\Delta tef4$  para conocer si la afectación de la red mitocondrial es estadísticamente relevante.
- Confirmar mediante ensayos de *Western blot* si Tef4p se asocia a la mitocondria.
- Realizar ensayos de extracción de proteínas mitocondriales con carbonato de sodio, con el fin de conocer la asociación membranal de Tef4p en la mitocondria.
- Sobrexpresar a la proteína Tef4p con el fin de conocer si tiene un efecto global o mitocondrial en la levadura, para conocer si tiene efecto en la biogénesis mitocondrial.
- Eliminar a la proteína Puf3p, con el fin de comprobar si la síntesis de Tef4p disminuye en un medio con glucosa. Lo que sugeriría que Puf3p regula la síntesis de Tef4p y su probable co-localización en mitocondria. Lo que explicaría la aparición de Tef4p y no de Tef3p en el proteoma mitocondrial.
- Medir la expresión de la proteína Dnm1p en una mutante nula  $\Delta tef4$ ,  $\Delta tef3$  y la doble mutante  $\Delta tef3/\Delta tef4$ .

## Apéndice

### I. Secuencia del plásmido pRS303N con el inserto *TEF4*-FLAG

El codón de inicio y el codón de paro se encuentran resaltados al igual que el intrón presente en la secuencia del gen *TEF4*. Los blancos de las enzimas de restricción, así como la secuencia que codifica para la proteína FLAG, se encuentran en minúsculas y subrayadas. Todos los sitios antes descritos se encuentran marcados con una barra, la cual señala el inicio del sitio. La región codificante muestra los aminoácidos de acuerdo con el uso de codones de *S. cerevisiae*. El extremo 5'UTR del gen *TEF4* abarca del sitio de corte de la enzima de restricción *PacI* al codón de inicio, siendo la región río arriba es secuencia del plásmido pRS303N. El extremo 3' UTR, del gen *TEF4*, abarca del codón de paro al sitio de corte de la enzima de restricción *BamHI*, siendo la región río abajo es parte de la secuencia del plásmido pRS303N.

```
TCAAAATGTATGGATGCAAATGATTATACATGGGGATGTATGGGCTAAATGTACGGGCGA < 60
      10      20      30      40      50

CAGTCACATCATGCCCCTGAGCTGCGCACGTCAAGACTGTCAAGGAGGGTATTCTGGGCC < 120
      70      80      90     100     110

TCCATGTCGCTGGCCGGGTGACCCGGCGGGGACGAGGCAAGCTAAACAGATCTGGCGCGC < 180
     130     140     150     160     170

PacI
|
CttaaattaaCGTCTCAGTCCTCACTTGTTATTTCATCTCTTGGTCATCTCATCTCTTTTAT < 240
     190     200     210     220     230

TGTACTTTTCTCTTTTCTTTACCGGAGATGAGAATAAAAAGAATTCATTTTAAAAAATTT < 300
     250     260     270     280     290
```

TCAATTTGGTGTCTGGGTGAAACTTTTTAATCGTGTAATCCCAATTAACCCTCTACTT < 360  
310 320 330 340 350

TACTTTAATTGGTACACGAACTCATTACACACCTTTGCCTCTATTGCTTGTGTCAATCGT < 420  
370 380 390 400 410

GTTGAGAGAGGAAGCCCAAAAACAAGGGAAATTAACCTCTGTAGGCAAGCCATCACATTTG < 480  
430 440 450 460 470

GCAATAGCAGCCCTCATTTAATTTAATTCGGCATGTGGCCGGCAGGGTAATGCGCTCTGC < 540  
490 500 510 520 530

TGCTGACAAAATTGAAAGAAAAATTTTTTTCATCAACAGTTTGCAATACTTTCTTTTTCA < 600  
550 560 570 580 590

TATTTAATTCATCCATTCCGTCGTTAATTTTGTTCAAAACCTGGTGTCCATCCTTAATACC < 660  
610 620 630 640 650

Codón de inicio

AACTCAATTCTTTGATTTTGGCCCTCGATAGATTCAAGATG|TCCCAAGGTACTTTTATACA < 720  
670 680 690 700 710  
M S Q G T L Y I

TTAATAGATCTCCAAGAACTACGCTTCTGAAGCTTTGATTTCTTACTTTAAACTAGATG < 780  
N R S P R N Y A S E A L I S Y F K L D V  
730 740 750 760 770

TCAAGATCGTTGATCTAGAACAATCTAGCGAGTTTGCTTCTTTGTTCCCATTGAAGCAAG < 840  
K I V D L E Q S S E F A S L F P L K Q A  
790 800 810 820 830

CCCCTGCATTTTTGGGTCCAAAGGGCTTAAAGCTAACTGAAGCTTTGGCTATCCAATTTT < 900  
P A F L G P K G L K L T E A L A I Q F Y  
850 860 870 880 890

ATTGTATGTTCCATATTTTATTTTAACTTCCACATACATTGTTTTGCGCGTTTCCCGT < 960  
L  
910 920 930 940 950

TCGTTTATTTGGCACGTCATTTTTCTTCGAAACATAATGATGAAAAAAAAATTTTATCAAA < 1020  
970 980 990 1000 1010

CAGTTATCCCTGTCTGAATGGGTAATAATAGGTAACCTCTCATATGTTGATATTTGTATT < 1080  
1030 1040 1050 1060 1070

TCGATATGTTTCTTAAAGAAAAATGAAAGTCAAAATAACAAAAAGGAAGTACAAAGCGT < 1140  
1090 1100 1110 1120 1130

GTCCTAATCCAGGAAAAAATATAAAGGATTGTTTTACTAACATTTCTTCAATTAATGGTT < 1200  
1150 1160 1170 1180 1190

GTATAACCATCGAGATGATGTATATTTAGTGGCTAATCAAGTTGCCGATGAAAAAGAAAG < 1260  
1210 1220 1230 1240 1250  
A N Q V A D E K E R

AGCTCGCTTATTAGGTTCCGACGTTATCGAAAAGTCTCAAATCCTTAGATGGGCATCTCT < 1320  
A R L L G S D V I E K S Q I L R W A S L  
1270 1280 1290 1300 1310

AGCTAATCCGATGTCATGAGCAACATTGCTCGTCCATTCCCTTTCTTTCAAAGGTTTGAT < 1380  
A N S D V M S N I A R P F L S F K G L I  
1330 1340 1350 1360 1370

TCCATAACAACAAGAAAGACGTTGATGCTTGTTTTGTTAAAATCGACAACCTAGCTGCTGT < 1440  
P Y N K K D V D A C F V K I D N L A A V  
1390 1400 1410 1420 1430

CTTCGATGCTAGATTGAGAGACTACACCTTTGTTGCTACCGAAAAACATTTCTCTAGGTGA < 1500  
F D A R L R D Y T F V A T E N I S L G D  
1450 1460 1470 1480 1490

CCTTCATGCCGCTGGTTCTTGGGCTTTTGGTTTGGCCACTATTTTGGGCCCTGAATGGAG < 1560  
L H A A G S W A F G L A T I L G P E W R  
1510 1520 1530 1540 1550

AGCTAAGCATCCTCATTGATGAGATGGTTCAACACTGTTGCTGCTTCTCCAATCGTGAA < 1620  
A K H P H L M R W F N T V A A S P I V K  
1570 1580 1590 1600 1610

GACTCCATTTGCTGAAGTCAAATTGGCTGAAAAGGCTCTAACCTACACTCCACCAAAGAA < 1680  
T P F A E V K L A E K A L T Y T P P K K  
1630 1640 1650 1660 1670

GCAAAAAGGCTGAAAAGCCAAAGGCCGAAAAGTCAAAGGCTGAAAAGAAGAAGGACGAAGC < 1740  
Q K A E K P K A E K S K A E K K K D E A  
1690 1700 1710 1720 1730

TAAGCCAGCAGATGATGCTGCTCCAGCTAAAAAGCCAAAGCACCCATTGGAAGCTTTAGG < 1800  
K P A D D A A P A K K P K H P L E A L G  
1750 1760 1770 1780 1790

AAAGTCCACATTTGTCTTGGATGACTGGAAGAGAAAAGTACTCCAACGACGACACCAGACC < 1860  
K S T F V L D D W K R K Y S N D D T R P  
1810 1820 1830 1840 1850

AGTTGCTTTGCCATGGTTCTGGGAACACTACAACCCTGAAGAATACTCCATCTGGAAGGT < 1920  
V A L P W F W E H Y N P E E Y S I W K V  
1870 1880 1890 1900 1910

TGGTTACAAATACAACGACGAACCTTACCTTGACTTTCATGTCCAACAACCTGGTCGGTGG < 1980  
G Y K Y N D E L T L T F M S N N L V G G  
1930 1940 1950 1960 1970

TTTTTTCAACAGATTGTCCGCTTCTACTAAGTACATGTTTCGGTTGTTTAGTTGTCTATGG < 2040  
F F N R L S A S T K Y M F G C L V V Y G  
1990 2000 2010 2020 2030

TGAAAACAACAATAATGGTATTGTTGGTGCCGTTATGGTCAGAGGCCAAGATTTTCGCTCC < 2100  
E N N N N G I V G A V M V R G Q D F A P  
2050 2060 2070 2080 2090

AGCCTTTGATGTCGCTCCAGACTGGGAATCTTACGAATACACCAAGTTGGACCCAACCAA < 2160  
A F D V A P D W E S Y E Y T K L D P T K  
2110 2120 2130 2140 2150

GGAAGAAGACAAAGAATTTGTCAACAACATGTGGGCTTGGGATAAGCCTGTTGTTGTCAA < 2220  
E E D K E F V N N M W A W D K P V V V N  
2170 2180 2190 2200 2210

FLAG

|  
TGGCGAAGATAAGGAAATTGTTGACGGTAAGGTTTTGAAAgattataaagatgatgacga < 2280  
G E D K E I V D G K V L K D Y K D D D D  
2230 2240 2250 2260 2270

Codón de paro

|  
taaaTAATCTCAATAACTCTTCTTCCATATTTTCTTCCCAATATACATAAGAGTCAAACA < 2340  
K  
2290 2300 2310 2320 2330

AAACGAATTTTCAAAGAAAAAAGAAAAAACCCCTGAAGTCTACTTCATGATTACCCCAT < 2400  
2350 2360 2370 2380 2390

ACTTACGCGTGGTTTAATTCTATGTAACGATTAACGTCCATGTAATCATTATATATATAT < 2460  
2410 2420 2430 2440 2450

ATTGTAATAATCTCTCTAATTGAGTATCACAATCTGCTGCGGTTACTCTAACAAATATTTT < 2520  
2470 2480 2490 2500 2510

GCATAAACTTGATTCTTCTCTTCTTATTTTCATGTTTCAGTGGGGCATTTCATTGTACT < 2580  
2530 2540 2550 2560 2570

BamHI

|  
TTTGCAACAATAGCGAAggatccGTCGACCTGCAGCGTACGCAGTTGTCGAACTTGGTTT < 2640  
2590 2600 2610 2620 2630

GCAAAGGGAGAAAGTAGGAGATCTCTCTTGCAGATGATCCCGCATTTCCTTGAAAGCTT < 2700  
2650 2660 2670 2680 2690

TGCAGAGGCTAGCAGAATTACCCTCCACGTTGATTGTCTGCGAGGCAAGAATGATCATCA < 2760  
2710 2720 2730 2740 2750

CCGTAGTGAGAGTGCGTTCAAGGCTCTTGCGGTTGCC < 2797  
2770 2780 2790

## Bibliografía

1. Gray MW. 2012. Mitochondrial Evolution. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4(9):a011403–a011403
2. Fox TD. 2012. Mitochondrial Protein Synthesis, Import, and Assembly. *Genetics.* 192(4):1203–34
3. Pagliarini DJ, Rutter J. 2013. Hallmarks of a new era in mitochondrial biochemistry. *Genes Dev.* 27(24):2615–27
4. McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S. 2006. Mitochondria: More Than Just a Powerhouse. *Curr. Biol.* 16(14):551–60
5. Kundu D, Pasrija R. 2020. The ERMES (Endoplasmic Reticulum and Mitochondria Encounter Structures) mediated functions in fungi. *Mitochondrion.* 52:89–99
6. Aretz I, Jakubke C, Osman C. 2020. Power to the daughters – mitochondrial and mtDNA transmission during cell division. *Biol. Chem.* 401(5):533–46
7. Altmann K, Dürr M, Westermann B. 2007. *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism to study mitochondrial biology: general considerations and basic procedures. *Methods Mol. Biol.* 372(1):81–90
8. Bonnefoy N, Fox TD. 2007. Directed alteration of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial DNA by biolistic transformation and homologous recombination. *Methods Mol. Biol.* 372(1):153–66
9. Foury F. 1997. Human genetic diseases: A cross-talk between man and yeast. *Gene.* 195(1):1–10
10. Foury F, Roganti T, Lecrenier N, Purnelle B. 1998. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 440(3):325–31
11. Ott M, Amunts A, Brown A. 2016. Organization and Regulation of Mitochondrial Protein Synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 85(1):77–101
12. García-Guerrero AE, Zamudio-Ochoa A, Camacho-Villasana Y, García-Villegas R, Pérez-Martínez X, Reyes-Prieto A. 2016. Evolution of translation in mitochondria. En *Evolution of the Protein Synthesis Machinery and Its Regulation*, pp. 109–42. Springer International Publishing

13. Reinders J, Zahedi RP, Pfanner N, Meisinger C, Sickmann A. 2006. Toward the complete yeast mitochondrial proteome: Multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics. *J. Proteome Res.* 5(7):1543–54
14. Renvoisé M, Bonhomme L, Davanture M, Valot B, Zivy M, Lemaire C. 2014. Quantitative variations of the mitochondrial proteome and phosphoproteome during fermentative and respiratory growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Proteomics.* 106:140–50
15. Sickmann A, Reinders J, Wagner Y, Joppich C, Zahedi R, et al. 2003. The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100(23):13207–12
16. Gerber AP, Herschlag D, Brown PO. 2004. Extensive association of functionally and cytotoptically related mRNAs with Puf family RNA-binding proteins in yeast. *PLoS Biol.* 2(3):0342–54
17. Lapointe CP, Wilinski D, Saunders HAJ, Wickens M. 2015. Protein-RNA networks revealed through covalent RNA marks. *Nat. Methods.* 12(12):1163–70
18. Lee C Der, Tu BP. 2015. Glucose-Regulated Phosphorylation of the PUF Protein Puf3 Regulates the Translational Fate of Its Bound mRNAs and Association with RNA Granules. *Cell Rep.* 11(10):1638–50
19. Wang Z, Sun X, Wee J, Guo X, Gu Z. 2019. Novel insights into global translational regulation through Pumilio family RNA-binding protein Puf3p revealed by ribosomal profiling. *Curr. Genet.* 65(1):201–12
20. García-Rodríguez LJ, Gay AC, Pon LA. 2007. Puf3p, a Pumilio family RNA binding protein, localizes to mitochondria and regulates mitochondrial biogenesis and motility in budding yeast. *J. Cell Biol.* 176(2):197–207
21. Schatton D, Rugarli EI. 2018. A concert of RNA-binding proteins coordinates mitochondrial function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 53(6):652–66
22. Eliyahu E, Pnueli L, Melamed D, Scherrer T, Gerber AP, et al. 2010. Tom20 Mediates Localization of mRNAs to Mitochondria in a Translation-Dependent Manner. *Mol. Cell. Biol.* 30(1):284–94
23. Ellenrieder L, Rampelt H, Becker T. 2017. Connection of Protein Transport and Organelle Contact Sites in Mitochondria. *J. Mol. Biol.* 429(14):2148–60

24. Ellenrieder L, Opaliński Ł, Becker L, Krüger V, Mirus O, et al. 2016. Separating mitochondrial protein assembly and endoplasmic reticulum tethering by selective coupling of Mdm10. *Nat. Commun.* 7(1):13021–35
25. Couvillion MT, Soto IC, Shipkovenska G, Churchman LS. 2016. Synchronized mitochondrial and cytosolic translation programs. *Nature.* 533(7604):499–503
26. Sasikumar AN, Perez WB, Kinzy TG. 2012. The many roles of the eukaryotic elongation factor 1 complex. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* 3(4):543–55
27. Jeppesen MG, Ortiz P, Shepard W, Kinzy TG, Nyborg J, Andersen GR. 2003. The Crystal Structure of the Glutathione S-Transferase-like Domain of Elongation Factor 1B $\gamma$  from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 278(47):47190–98
28. Olarewaju O, Ortiz PA, Chowdhury WQ, Chatterjee I, Kinzy TG. 2004. The translation elongation factor eEF1B plays a role in the oxidative stress response pathway. *RNA Biol.* 1(2):89–94
29. Pisani C, Onori A, Gabanella F, Delle Monache F, Borreca A, et al. 2016. eEF1B $\gamma$  binds the Che-1 and TP53 gene promoters and their transcripts. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 35(1):146–59
30. Al-Maghrebi M, Brulé H, Padkina M, Allen C, Holmes WM, Zehner ZE. 2002. The 3' untranslated region of human vimentin mRNA interacts with protein complexes containing eEF-1 $\gamma$  and HAX-1. *Nucleic Acids Res.* 30(23):5017–28
31. Veremieva M, Kapustian L, Khoruzhenko A, Zakharychev V, Negrutskii B, El'skaya A. 2014. Independent overexpression of the subunits of translation elongation factor complex eEF1H in human lung cancer. *BMC Cancer.* 14(1):913
32. Mimori K, Mori M, Tanaka S, Akiyoshi T, Sugimachi K. 1995. The overexpression of elongation factor 1 gamma mRNA in gastric carcinoma. *Cancer.* 75(6 Suppl):1446–49
33. Lew Y, Jones D V., Mars WM, Evans D, Byrd D, Frazier ML. 1992. Expression of Elongation Factor-1 Gamma-Related Sequence in Human Pancreatic Cancer. *Pancreas.* 7(2):144–52
34. Qiu J, Wenz L-S, Zerbes RM, Oeljeklaus S, Bohnert M, et al. 2013. Coupling of Mitochondrial Import and Export Translocases by Receptor-Mediated Supercomplex Formation. *Cell.* 154(3):596–608
35. Freeberg MA, Han T, Moresco JJ, Kong A, Yang Y-C, et al. 2013. Pervasive and dynamic

- protein binding sites of the mRNA transcriptome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biol.* 14(2):R13-R 33
36. Usaj M, Tan Y, Wang W, VanderSluis B, Zou A, et al. 2017. TheCellMap.org: A web-accessible database for visualizing and mining the global yeast genetic interaction network. *G3 Genes, Genomes, Genet.* 7(5):1539–49
  37. Toss Kinzy T, Ripmaster TL, Woolford JL. 1994. Multiple genes encode the translation elongation factor EF-1 $\gamma$  in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 22(13):2703–7
  38. Perez-Martinez X, Broadley SA, Fox TD. 2003. Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. *EMBO J.* 22(21):5951–61
  39. Taxis C, Knop M. 2006. System of centromeric, episomal, and integrative vectors based on drug resistance markers for *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechniques.* 40(1):73–78
  40. Westermann B, Neupert W. 2000. Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: Convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 16(15):1421–27
  41. *Protocol for Making a 4% Formaldehyde Solution in PBS.* System, R&D. <https://www.rndsystems.com/resources/protocols/protocol-making-4-formaldehyde-solution-pbs>
  42. Okamoto K, Perlman PS, Butow RA. 2001. Chapter 16 Targeting of green fluorescent protein to mitochondria. En *Methods in Cell Biology*, ed. LA Pon, EA Schon, pp. 277–83. San Diego, California: Academic Press. First edit ed.
  43. *Saccharomyces genome deletion project.* 2007. [http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast\\_deletion\\_project/deletions3.html](http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/deletions3.html)
  44. García-Guerrero AE, Camacho-Villasana Y, Zamudio-Ochoa A, Winge DR, Pérez-Martínez X. 2018. Cbp3 and Cbp6 are dispensable for synthesis regulation of cytochrome b in yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* 293(15):5585–99
  45. Dennerlein S, Wang C, Rehling P. 2017. Plasticity of Mitochondrial Translation. *Trends Cell Biol.* 27(10):712–21
  46. Ulery TL, Jang SH, Jaehning JA. 1994. Glucose repression of yeast mitochondrial transcription: kinetics of derepression and role of nuclear genes. *Mol. Cell. Biol.* 14(2):1160–

47. Einhauer A, Jungbauer A. 2001. The FLAG<sup>TM</sup> peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 49(1–3):455–65
48. Annaluru N, Muller H, Ramalingam S, Kandavelou K, London V, et al. 2012. Assembling DNA Fragments by USER Fusion. En *Methods in Molecular Biology.* 852:77–95
49. Ingolia NT, Ghaemmaghami S, Newman JRS, Weissman JS. 2009. Genome-Wide Analysis in Vivo of Translation with Nucleotide Resolution Using Ribosome Profiling. *Science (80- ).* 324(5924):218 LP – 223
50. Esposito AM, Kinzy TG. 2014. In Vivo [35 S]-Methionine Incorporation. En *Methods in Enzymology.* 536:55–64. Elsevier Inc. 1a ed.
51. Labbé K, Murley A, Nunnari J. 2014. Determinants and Functions of Mitochondrial Behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30(1):357–91
52. Dimmer KS, Fritz S, Fuchs F, Messerschmitt M, Weinbach N, et al. 2002. Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* 13(3):847–53
53. Westermann B. 2010. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11(12):872–84
54. Boldogh IR, Yang HC, Dan Nowakowski W, Karmon SL, Hays LG, et al. 2001. Arp2/3 complex and actin dynamics are required for actin-based mitochondrial motility in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98(6):3162–67
55. Goley ED, Welch MD. 2006. The ARP2/3 complex: An actin nucleator comes of age. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7(10):713–26
56. Boldogh IR, Fehrenbacher KL, Yang H-C, Pon LA. 2005. Mitochondrial movement and inheritance in budding yeast. *Gene.* 354(1-2 SPEC. ISS.):28–36
57. Fehrenbacher KL, Yang H-C, Gay AC, Huckaba TM, Pon LA. 2004. Live Cell Imaging of Mitochondrial Movement along Actin Cables in Budding Yeast. *Curr. Biol.* 14(22):1996–2004
58. Handler DC, Pascovici D, Mirzaei M, Gupta V, Salekdeh GH, Haynes PA. 2018. The Art of Validating Quantitative Proteomics Data. *Proteomics.* 18(23):1800222–28

59. Corbi N, Batassa EM, Pisani C, Onori A, Di Certo MG, et al. 2010. The eEF1 $\gamma$  Subunit Contacts RNA Polymerase II and Binds Vimentin Promoter Region. *PLoS One*. 5(12):e14481-91
60. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, et al. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7(1):539
61. Ježek J, Cooper K, Strich R. 2018. Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Dynamics: The Yin and Yang of Mitochondrial Dysfunction and Cancer Progression. *Antioxidants*. 7(1):13
62. Cooper KF, Khakhina S, Kim SK, Strich R. 2014. Stress-Induced Nuclear-to-Cytoplasmic Translocation of Cyclin C Promotes Mitochondrial Fission in Yeast. *Dev. Cell*. 28(2):161–73
63. Hermjakob H, Montecchi-Palazzi L, Bader G, Wojcik J, Salwinski L, et al. 2004. The HUPO PSI's Molecular Interaction format—a community standard for the representation of protein interaction data. *Nat. Biotechnol.* 22(2):177–83