



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Localización mitocondrial de eIF4G y su mecanismo de acción en la síntesis de Cox1 en *Saccharomyces cerevisiae*.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
ITZEL ABIL GARCÍA CORDERO

DRA. XOCHITL PÉREZ MARTÍNEZ
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

DRA. TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA
[Facultad de Química, UNAM](#)

DR. ROBERTO CORIA ORTEGA
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

Ciudad de México. Febrero, 2024



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.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto se realizó en el laboratorio 204 oriente del departamento de genética molecular en el Instituto de Fisiología celular bajo la tutoría de la Dra. Xochitl Pérez Martínez

Se agradece a la Dra. Xochitl Pérez Martínez por permitirme formar parte de su equipo y apoyarme con sus consejos y punto de vista objetivo, además de brindarme su confianza y apoyo en momentos difíciles.

A la Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova y al Dr. Roberto Coria Ortega, miembros de mi comité tutor, por su punto de vista y consejos a este proyecto

A la Dra. Yolanda Camacho Villasana por su apoyo técnico y enseñanza y por hacer mi estancia en el laboratorio muy confortable por su gran actitud.

Al Mtro. Ulrik Hiram Pedroza Dávila por apoyarme en la generación de cepas y continua supervisión en mi aprendizaje durante la maestría.

Al Dr. Daniel Flores Mireles por sus consejos y apoyo técnico

Al Dr. Aldo García Guerrero por su apoyo técnico a pesar de la distancia encontró el tiempo para apoyarme.

A la Dra. Victoria Chagoya de Sánchez y a la Dra. Gabriela Velasco Loyden por el préstamo del rotor SW40-Ti, que fue de gran importancia para obtención de mitocondrias puras.

Al Dr. Antonio Peña Díaz por el anticuerpo α -Hog1, proteína que ocupé como control citosólico.

A la a la Q. B. P. Miriam Vázquez Acevedo, por su apoyo en el uso de la ultracentrífuga.

Este proyecto fue apoyado por: UNAM-PAPIIT-IN223623 y 202720; CONACYT-284514.

Durante los estudios de maestría conté con una beca otorgada por CONACYT No. CVU: 1083515, numero de apoyo 779475

Se agradece el apoyo otorgado por el PAEP para asistir al congreso de la Sociedad Mexicana de Bioquímica (XXII Congreso de la Rama de Bioenergética y Biomembranas).

Se agradece por sus comentarios y consejos al jurado integrado por:

Dra. Alicia Manjarrez González

Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar

Dra. Ma. Del Carmen Beltran Nuñez

Dra. Rosa Estela Navarro González

Dra. Sobeida Sánchez Nieto

DEDICATORIAS

Mi tesis se la dedico con mucho amor a mi mamá Cecilia Lorena Cordero Camacho por ser la persona que impulsa mis sueños, por su sacrificio y esfuerzo, durante mi crianza, por creer en mi capacidad y animarme en todo momento.

A mi papá.

A la memoria de mi papá José Luis García Avendaño que cumple 10 años de fallecimiento, pero el tiempo que lo tuve a mi lado siempre creyó en mí.

A mi tía.

Delia Cordero por permitirme entrar en su casa y apoyarme de forma incondicional en esta etapa de mí de vida, gracias por su amor paciencia y dedicación

A mi abuelito

Efraín cordero Lozano por ser el motor más impórtate en mi vida, por iluminarme en los momentos más oscuros y por tener la ilusión de verme como una persona exitosa.

A mis hermanos

Julio García, Carolina García y Cecilia García por motivarme a seguir con mis estudios y estar conmigo en los mejores y peores momentos.

A mis tíos.

Por ser un apoyo incondicional durante toda mi etapa de estudiante y por creer en mí y darme la fortaleza para seguir adelante.

A mis amigos

Paulina, Alí, Mari, Armado y Juan; gracias por estar siempre cuando más los necesite y con su cariño impulsarme y motivarme para seguir adelante.

A mis sobrinos Zaid García y Samara García por llenar mi vida de alegría y por motivarme en mis estudios

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
ADP	Adenosin difosfato
APS	Presulfato de Amonio
ATP	Adenosin trifosfato
mRNA	ARN mensajero
tRNA	ARN de transferencia
CIV	Complejo IV o citocromo c oxidasa
Cox1	Subunidad 1 del complejo IV, proteína codificada por el gen <i>COX1</i>
EIM	Espacio Intermembranal
MM	Matriz mitocondrial
MIM	Membrana interna mitocondrial
GE	Gránulos de estrés
ORF	Marco abierto de lectura (Open reading frame)
<i>TIF4631</i>	Gen que codifica la proteína eIF4G1 en <i>S. cerevisiae</i>
UTR	Región no traducida (Untranslated región)

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
RESUMEN.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 La mitocondria.....	10
1.2 La cadena de transporte de electrones en <i>S. cerevisiae</i>	11
1.3 La subunidad 1 del Citocromo c Oxidasa: Cox1.....	13
1.4 Traducción mitocondrial.....	14
1.5 Traducción de cox1.....	15
1.6 La función mitocondrial depende de la importación de proteínas codificadas nuclearmente.....	17
1.7 La traducción de proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo está acoplada a la mitocondria.....	19
1.8 Factor de inicio de la traducción eIF4G.....	20
1.9 <i>S. cerevisiae</i> posee dos formas de eIF4G.....	22
1.10 Diferencias funcionales de las isoformas de eIF4G.....	23
1.11 eIF4G desempeña múltiples funciones en el metabolismo del RNA.....	24
1.12 Localización intracelular de <i>TIF4631</i> (eIF4G1) y <i>TIF4632</i> (eIF4G2).....	25
2. ANTECEDENTES DIRECTOS.....	26
2.1 eIF4G es una proteína que regula la síntesis de Cox1.....	26
3. JUSTIFICACIÓN.....	31

4. HIPÓTESIS.....	32
5. OBJETIVO GENERAL.....	32
5.1 Objetivos particulares.....	33
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
6.1 Cepas.....	33
6.2 Medios.....	34
6.3 Obtención de mitocondrias crudas.....	34
6.4 Purificación de mitocondrias crudas.....	36
6.5 Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE)	37
6.6 Western blot.....	37
6.7 Diluciones seriadas.....	39
6.8 Purificación de DNA total de levadura.....	41
6.9 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	42
6.10 Transformación integrativa de levadura.....	42
7. RESULTADOS	44
7.1 Los niveles de Cox1 se mantienen estables en la mutante Δ eIF4G1.....	44
7.2 Búsqueda de presecuencia mitocondrial en eIF4G1.....	45
7.3 Búsqueda de eIF4G1 mitocondrial.....	48
7.4 En eIF4G1 se han detectado más interacciones físicas con mitocondrias que con eIF4G2	50
7.5 La mayoría de los interactores mitocondriales de eIF4G1 encontrados son subunidades del ribosoma mitocondrial.....	55

7.6 Interactores mitocondriales de eIF4G2.....	57
8. DISCUSIÓN.....	58
8.1 Los niveles de Cox1 se mantienen estables en la mutante Δ eIF4G1.....	58
8.2 La localización mitocondrial de eIF4G1 no es concluyente.....	59
8.3 La localización de la mayoría de los interactores de eIF4G1 son de la matriz mitocondrial.....	61
8.4 ¿Están relacionados los mecanismos de protección a estrés con la función de eIF4G1 en la traducción de Cox1?.....	62
8.5 eIF4G1 se relaciona con la función mitocondrial.....	65
9. CONCLUSIONES	67
10. PERSPECTIVAS	68
LITERATURA CITADA.....	68

RESUMEN

En *S. cerevisiae*, la traducción de los mRNA codificados por las mitocondrias depende de proteínas de origen nuclear, conocidas como activadores traduccionales. Éstos reconocen las regiones 5' no traducidas (UTR) de sus mRNA para activar el inicio de la traducción. Mss51 es uno de los activadores de la traducción del transcrito de *COX1* que codifica para la subunidad 1 del citocromo *c* oxidasa, último aceptor de electrones de la cadena respiratoria. Cuando Mss51 se elimina, Cox1 no se traduce y por lo tanto no se ensambla el citocromo *c* oxidasa (CIV). Con la finalidad de comprender con mayor profundidad las funciones de Mss51, en el laboratorio se encontró que una mutación supresora permite que Cox1 se vuelva a sintetizar a pesar de la ausencia de Mss51. La mutación supresora incide en eIF4G1, un factor de inicio de la traducción citosólica que funciona como proteína modular para unir otras proteínas de inicio de la traducción y permitir que el mRNA en el citosol se circularice. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es investigar si la proteína eIF4G1 forma parte del proteoma mitocondrial.

Los resultados indican que es posible detectar eIF4G1 en las preparaciones de mitocondrias purificadas. Sin embargo, otros marcadores citoplasmáticos también pueden ser detectados. eIF4G1 se ha identificado en diferentes estudios como una proteína auxiliar esto significa que afecta la función, la morfología y la dinámica mitocondrial porque se ha probado su papel en el correcto funcionamiento de la mitocondria.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La mitocondria

Las mitocondrias proporcionan energía a las células mediante la generación de moléculas de ATP mediante de la fosforilación oxidativa en eucariotas (Saraste, 1999). También llevan a cabo muchas otras funciones vitales, incluida la síntesis de lípidos y esteroides, la biosíntesis de grupos hierro-azufre y hemo (Atamna et al., 2002). Las mitocondrias están organizadas como una red de túbulos de doble membrana interconectados que se remodelan continuamente por fusión y fisión (Chen y Chan, 2009). Las membranas externa e interna delimitan dos compartimentos acuosos: el espacio intermembrana (EIM) y la matriz mitocondrial (MM). (Chen y Chan, 2009).

Las mitocondrias poseen su propio genoma, remanente de un genoma procariótico ancestral (Gray, 2017; Margulis, 1975) que se ha reducido considerablemente en tamaño debido a una transferencia masiva de genes durante la evolución eucariota. Como resultado, la mayoría de las proteínas necesarias para la estructura y las funciones mitocondriales se expresan a partir del genoma nuclear (Thorsness & Weber, 1996)

1.2 La cadena de transporte de electrones en *S. cerevisiae*

Los complejos respiratorios acoplan el transporte de electrones hacia al O_2 con el bombeo de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal, para generar un gradiente electroquímico que después aprovecha la ATP sintasa para generar ATP (Zhao et al., 2019)

La cadena de transporte de electrones eucariota típica consiste en cuatro complejos que poseen múltiples proteínas (I-V) y dos acarreadores de electrones libres, el citocromo *c* y la ubiquinona. El sistema de *S. cerevisiae* es muy similar al sistema de los mamíferos excepto que el complejo I se reemplaza por una NADH deshidrogenasa (Ndi1p) en el lado interno de la MI y dos NADH deshidrogenasas en el lado externo de la membrana interna (Nde1p, Nde2p) que entregan electrones a la ubiquinona sin translocar protones (Lasserre et al., 2015).

El complejo II es clave en dos rutas metabólicas acopladas. Primero oxida el succinato a fumarato en el ciclo del ácido tricarboxílico y los electrones se utilizan para reducir FAD a $FADH_2$, lo que finalmente reduce la ubiquinona a ubiquinol en la cadena respiratoria. El complejo III o complejo *bc₁* cataliza la transferencia de electrones desde el ubiquinol al citocromo *c*.

Por último, el citocromo *c* oxidasa o complejo IV acarrea electrones desde del citocromo *c* al O_2 catalizando su reducción a H_2O . Los complejos III y IV son los únicos que acoplan la transferencia de electrones con la translocación de protones hacia el espacio intermembranal, y por lo tanto contribuyen a la generación del gradiente electroquímico (Hartley et al., 2019). En este trabajo se estudió al complejo IV respiratorio, en particular a su subunidad 1 que en adelante será referido como Cox1

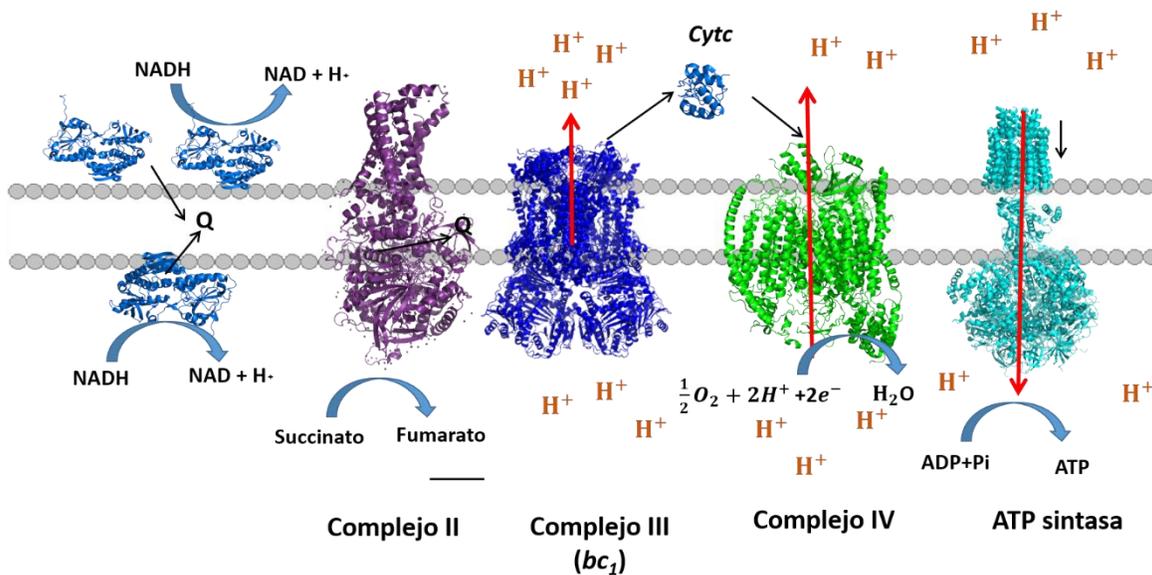


Figura 1. Cadena respiratoria de *S. cerevisiae*. Q= Poza de quinonas, se muestra solo una de las dos NADH deshidrogenasas que se encuentran del lado del espacio intermembrana. PDB: 4G-6G. Complejo II, PDB: 1ZOY. Complejo III, PDB: 1KY0. Complejo IV, PDB: 6HU9 modificado de (Letts & Sazanov, 2017).

1.3 La subunidad 1 del Citocromo *c* Oxidasa: Cox1

El citocromo *c* oxidasa (o complejo IV, CIV) es la última enzima de la cadena de transporte de electrones. El CIV está embebido en la membrana interna de las mitocondrias, cataliza la reducción de oxígeno molecular a agua. El CIV en mamíferos se compone de 11 subunidades mientras el de *S. cerevisiae* se compone de 12 (Hartley et al., 2019). La mayoría de las subunidades de la enzima se codifican en el núcleo a excepción de 3 que forman parte de su núcleo catalítico conservadas en todos los reinos, codificadas en el DNA mitocondrial Cox1, Cox2 y Cox 3. El extremo C- terminal de Cox1 está expuesto hacia la matriz mitocondrial, esta región de Cox1 es un centro de señalización para su biogénesis, ya que es importante para la regulación de síntesis de la proteína y posterior ensamblaje del complejo IV (Hartley et al., 2018; Shingú-Vázquez et al., 2010).

Cox1 es la subunidad más grande del CIV, con 12 cruces transmembrana que comprenden la mayor parte de la proteína. Cox1 contiene grupos hemo a y a₃, más el cofactor de Cu_B para la reducción de oxígeno, así como los canales para la translocación de protones. Cox1 se sintetiza dentro de la mitocondria porque está codificada en el genoma mitocondrial, y su ensamblaje está muy acoplado a su síntesis (Fontanesi et al., 2006).

1.4 Traducción mitocondrial

La maquinaria de traducción mitocondrial es distinta a la citosólica y a la bacteriana. Los mRNA mitocondriales no poseen cap 5' ni secuencias Shine-Dalgarno (García-Guerrero et al., 2016). En algunas especies, como en *S. cerevisiae*, los mRNA mitocondriales no poseen cola poli (A). Las mitocondrias utilizan códigos genéticos modificados, descifrados por RNA de transferencia (tRNA) codificados por las mismas mitocondrias. En el caso de la levadura todos los tRNA que se requieren para la traducción mitocondrial son sintetizados por el mismo organelo (Couvillion et al; 2016).

El genoma mitocondrial de *S. cerevisiae* codifica ocho proteínas principales: siete son subunidades esenciales de los complejos respiratorios: Cytb (subunidad del complejo III o complejo bc1), Cox1, Cox2 y Cox3 (subunidades del complejo IV o citocromo *c* oxidasa); Atp6, Atp8 y Atp9 (subunidades de la ATP sintasa) y Var1 gen que traduce a una proteína que forma parte de la subunidad pequeña del ribosoma (Herrmann et al.,2013). Los transcritos que codifican proteínas tienen regiones no traducidas conocidas como UTRs (Untranslated regions) en los extremos 5' y 3', las cuales desempeña funciones reguladoras importantes. El genoma mitocondrial de *S. cerevisiae* también codifica genes de RNA ribosomales, y se complementan con factores que son codificados en el genoma nuclear e importados a la mitocondria (Ott et al., 2016).

En *S. cerevisiae*, la traducción de los mRNA codificados por las mitocondrias depende de proteínas conocidas como activadores traduccionales, que son proteínas unidas a la

membrana interna que reconocen los extremos 5'-UTR del mRNA mitocondrial blanco e interactúan con los ribosomas mitocondriales, (Fox, 2012). La eliminación de cualquier gen que codifique para un activador de la traducción da como resultado una pérdida completa de la fosforilación oxidativa, lo que demuestra un papel esencial de estas proteínas en las mitocondrias. Por ejemplo, Pet111 activa específicamente la traducción del mRNA codificado mitocondrialmente para Cox2 (subunidad II del complejo IV) (Green-Willms et al., 2001), mientras Pet54, Pet122 y Pet494 son activadores traduccionales del mRNA de *COX3* (Wang et al., 2021).

1.5 Traducción de *COX1*

En *S. cerevisiae* *COX1* se produce como un transcrito policistrónico que contiene a los genes *ATP6* y *ATP8* de la ATP sintasa, además contiene intrones (Manon & Guerin, 1989). El procesamiento del mRNA para generar el transcrito de *COX1* maduro es asistido por madurasas codificadas por *ORFs* ubicados dentro de algunos de los intrones del propio *COX1* (Lazowska et al., 1980). También requiere de genes nucleares como *MSS116* y *PET54* (De Silva et al., 2017, Mayorga et al., 2016). La traducción del mRNA de *COX1* está controlada por Pet309, Mam33, Mrx8 y Mss51 (Mick et al., 2011; Séraphin et al., 1989; Roloff & Henry, 2015., Verma et al., 2021). Pet309 se une a la región 5'-UTR del mRNA de *COX1* y recluta a Mss116, una helicasa DEAD-box, que desenrolla la región 5'UTR y facilita el acceso de Mss51 (Mss51 es una proteína que es capaz de unirse a un grupo Hemo B ya que contiene dos motivos de cisteína-prolina-X CPX hacia el extremo N que son capaces de unirse a grupos hemo (Soto et al., 2012)) al complejo de iniciación (De Silva et al., 2017). Mss51 no sólo promueve la traducción del

mRNA de *COX1* actuando sobre la región 5' del mRNA de este, sino que también interactúa con Cox1 recién sintetizado para mediar el montaje correcto del complejo respiratorio (Perez-Martinez et al., 2003). Si existen errores de ensamblaje, Mss51 actuará como inhibidor de la traducción del mRNA de *COX1* evitando la acumulación del péptido, la región C terminal de Cox1 juega un papel importante en la regulación que ejerce Mss51 sobre la síntesis de Cox1 (Figura 2) (Perez-Martinez et al., 2003, Shingú-Vázquez et al., 2010, García-Villegas et al., 2017).

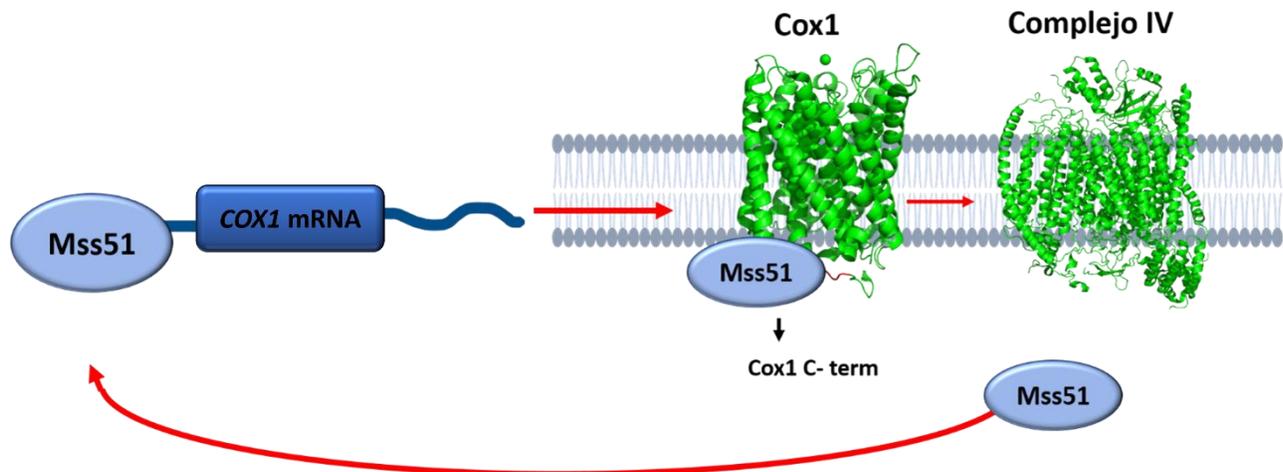


Figura 2. Modelo de la regulación de la traducción del mRNA de *COX1*. Mss51 ayuda a que se inicie la síntesis de Cox1 interactuando con su mRNA. Mss51 también interactúa físicamente con Cox1 cuando ésta formando intermediarios de ensamblaje, por lo que una vez sintetizado Cox1 le ayuda a insertarse en la membrana. Cuando hay un correcto ensamblaje del complejo IV, Mss51 puede disociarse de Cox1 e iniciar otra ronda de síntesis. Cuando hay un error de ensamblaje Mss51 permanece unido al intermediario de Cox1 disminuyendo la síntesis de esta subunidad, ya que no se encuentra disponible para llevar a cabo más rondas e traducción (Perez-Martinez et al., 2003, Micke et al., 2011). El C-terminal de Cox1 contribuye a la unión de Mss51 al intermediario de ensamblaje (Shingú-Vázquez et al., García-Villegas et al., 2017).

1.6 La función mitocondrial depende de la importación de proteínas codificadas nuclearmente

La función mitocondrial depende del suministro constante de proteínas codificadas en el núcleo. Alrededor del 99% de las proteínas mitocondriales son de origen nuclear y son conocidas como precursoras mitocondriales. El direccionamiento de las proteínas a este organelo depende de señales polipeptídicas (secuencias) dentro de la misma proteína a importar (Williams et al., 2014).

Una vez sintetizadas las proteínas precursoras que se dirigen a la mitocondria por los ribosomas citosólicos, para que puedan ingresar a la mitocondria primero se encuentran con el poro de importación general en la membrana externa, llamado translocasa de la membrana externa (TOM). La subunidad central del complejo TOM es la proteína de barril β formadora de poros Tom40, que es esencial para la supervivencia de la célula. Los dominios citosólicos de las tres subunidades de los receptores Tom20, Tom22 y Tom70 reconocen y se unen a las respectivas secuencias señal de las proteínas precursoras mitocondriales (Kulawiak et al., 2013).

Muchas de las proteínas importadas a las mitocondrias poseen una presecuencia N-terminal que comprende una hélice α anfipática con residuos hidrófobos en un lado y residuos polares en el otro lado. La mayoría de las presecuencias tienen una longitud de 10 a 55 aminoácidos y una carga neta entre + 3 y + 6. Después de la translocación a través del complejo TOM, los precursores entrantes con secuencias de direccionamiento N-terminales son presentados a la translocasa de presecuencia de la membrana interna (TIM23) (Vögtle et al., 2009).

La importación de proteínas precursoras a la matriz mitocondrial requiere la acción adicional del motor asociado a translocasas de presecuencia (PAM). El componente central de PAM es la mtHsp70 (Ssc1), que tiene un dominio de unión para el precursor entrante, así como un dominio de ATPasa (Voisine et al., 1999). Mediante múltiples rondas de unión al sustrato, las proteínas mtHsp70 pueden importar las proteínas precursoras a la matriz. Esta función esencial de mtHsp70 está regulada por otras subunidades del complejo PAM (Yamano et al., 2008).

La escisión de las presecuencias del extremo N-terminal por la peptidasa de procesamiento mitocondrial (MPP) en la matriz es crucial para el posterior plegamiento y la actividad catalítica de las proteínas precursoras importadas. La MPP consta de dos subunidades homólogas Mas1 y Mas2. La zinc-metaloproteasa Mas1 es la subunidad activa, que escinde el precursor en una conformación extendida durante o poco después del transporte a través del complejo TIM23. La escisión tiene lugar en un sitio específico, preferentemente con arginina en la posición menos 2 con respecto al extremo amino maduro (Taylor et al., 2001).

1.7 La traducción de proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo está acoplada a la mitocondria.

Se sabe que las proteínas mitocondriales se traducen en el citoplasma y se importan postraduccionalmente. Sin embargo, estudios apoyan que para una dirección eficiente de proteínas la traducción se da en las inmediaciones de la membrana externa mitocondrial (Lesnik et al., 2015). Se ha obtenido evidencia para la traducción acoplada a organelos ya que se ha observado que los polisomas pueden estar asociados a las mitocondrias (Kellems et al., 1975). Además, por criomicroscopía electrónica se mostró la presencia de ribosomas en la superficie de las mitocondrias, con sus túneles de salida hacia la membrana mitocondrial (Gold et al., 2017).

¿Cómo se dirigen los mRNA a las mitocondrias para la traducción acoplada a orgánulos?

En *S. cerevisiae* la señal polipeptídica de la secuencia de direccionamiento mitocondrial es reconocida por el receptor mitocondrial Tom20 de la membrana externa. Cuando la secuencia de direccionamiento mitocondrial ya está dentro de la mitocondria se requiere de factores adicionales que estabilizan la importación de proteínas que se están al mismo tiempo traduciendo. Un factor estabilizador probable para la asociación mitocondrial de ribosomas es el complejo asociado a cadena naciente (NAC), una chaperona asociada a ribosoma, que interactúa específicamente con el receptor mitocondrial Om14 de *S. cerevisiae* (Lesnik et al., 2014, Ponce-Rojas et al., 2017).

Otro factor que reconoce el RNA, es la proteína Puf3 de *S. cerevisiae*, que se localiza en la membrana externa de las mitocondrias y contiene un sitio de unión al extremo 3'UTR de mRNA diana, Puf 3 lleva a cabo funciones importantes durante la importación de proteínas cotraduccionalmente. Un análisis de su comportamiento muestra que se une a cientos de mRNA mitocondriales diferentes, lo que indica que influye en varios procesos celulares regulando, por ejemplo, la estabilidad y la traducción del mRNA (Gerber et al., 2004).

En *Drosophila melanogaster*, la cinasa Pink1 de Ser/Thr reconoce mRNA específicos que codifican proteínas de la cadena respiratoria, como las subunidades del complejo I. Pink1 recluta la ubiquitina ligasa E3 Parkin, que elimina los represores de la traducción como Pumilio y Glorund / hnRNP-F, además mejora la unión a eIF4G iniciando así la traducción. La interacción del péptido naciente traducido con Tom20 mantiene los mRNA en la superficie mitocondrial, lo que facilita la traducción local y la importación (Gehrke et al., 2015).

1.8 Factor de Inicio de la traducción eIF4G

TIF4631 codifica para el factor de inicio de la traducción eIF4G1 citosólico. Es la base del complejo de inicio de la traducción, ya que es una proteína de andamio a la que se unen diversas proteínas como la proteína de unión a Cap 5' eIF4E (*CDC33*), la helicasa miembro de la familia de proteínas DEAD-box eIF4A (*TIF1*) y su activador eIF4B (*TIF3*). Así mismo, se le une la proteína de unión a la cola de Poli-A (*PAB1*). Esto permite la circularización del mRNA y su posicionamiento en el complejo de preiniciación 43s (Prévôt et al; 2003) (Figura 3).

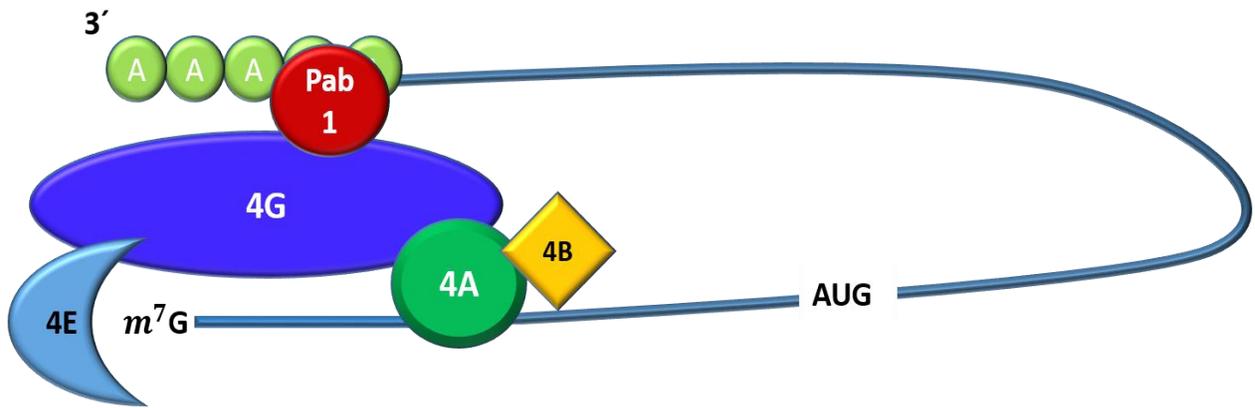


Figura 3. Modelo esquemático de la circularización del mRNA durante la traducción citosólica. eIF4G1 se une al extremo 5' del mRNA a través de la interacción al 5' cap/eIF4E y al extremo 3' a través de una interacción Pab1/polyA (Prévôt et al., 2003).

Debido a la función de eIF4G1 en el inicio de la traducción las principales proteínas con las que interacciona son aquellas que cumplen esta misma función, como se puede observar en la tabla 1.

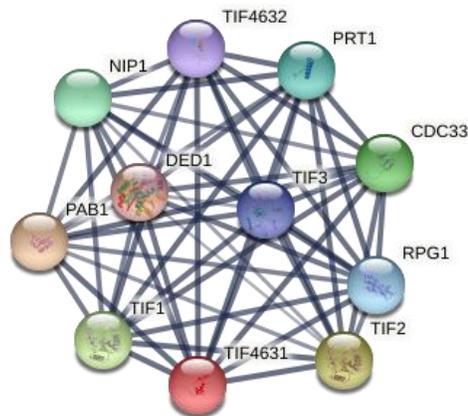


Figura 4. Representación de los principales interactores de eIF4G1 (TIF4631). Los nodos de la red representan proteínas. Las líneas indican que las proteínas directamente unidas forman parte del mismo complejo físico.

Tabla 1. Principales proteínas que interactúan con eIF4G1	
PAB1	Proteína de unión a cola poli(A)
TIF1	Factor de inicio de la traducción eIF4A; una helicasa de RNA tipo DEAD/-box
NIP1	Subunidad eIF3c del factor 3 de inicio de la traducción eucariota (eIF3); involucrados en el montaje del complejo de preiniciación
CDC33	Proteína de unión a Cap del mRNA y factor de inicio de la traducción eIF4E; el complejo eIF4E-cap es responsable de mediar la traducción de mRNA dependiente de cap mediante interacciones con el factor de iniciación de la traducción eIF4G
TIF3	Factor de iniciación de la traducción eIF-4B; contiene un motivo de reconocimiento de RNA y se une al RNA monocatenario
RPG1	Subunidad eIF3a del factor 3 de inicio de la traducción eucariota (eIF3); subunidad del complejo central de eIF3; esencial para la traducción
PRT1	Subunidad eIF3b del factor 3 de inicio de la traducción eucariota (eIF3); subunidad del complejo central de eIF3; esencial para la traducción
DED1	helicasa de RNA tipo DEAD- Box dependiente de ATP; requerido para el inicio de la traducción de todos los mRNA de levadura.
Tabla 1. Descripción de los principales interactores de eIF4G1. https://string-db.org/cgi/input?sessionId=b2aMRC7o377X&input_page_show_search=on	

1.9 *S. cerevisiae* posee dos formas de eIF4G

S. cerevisiae expresa dos formas de eIF4G que poseen 51 % de identidad y 72 % de similitud entre ellas, codificadas por los genes *TIF4631* (eIF4G1) y *TIF4632* (eIF4G2) (Clarkson et al., 2010). Ambas isoformas comparten una arquitectura de dominio conservado evolutivamente, con las porciones que interactúan con PABP y eIF4E en el extremo N-terminal, un dominio MIF4G (Dominio Medio de eIF4G) característico que consta de 240 residuos de aminoácidos ubicados hacia la región C-terminal superpuesta con el dominio que interactúa con eIF4A, que presumiblemente adopta

una estructura α -helicoidal y puede participar en interacciones proteína-proteína y proteína-RNA (Das, 2016). El dominio MIF4G se ha relacionado como un adaptador multipropósito, que potencialmente conecta los otros dos elementos del complejo eIF4F, eIF4A y eIF4E (Goyer et al., 1993). Las dos isoformas de *S. cerevisiae* albergan tres motivos de reconocimiento de RNA (RRM), En la levadura, estos motivos se ubican en las regiones N-terminal, media y C-terminal, de las cuales las dos últimas son ricas en arginina y serina (Prevot et al., 2003).



Figura 5. Diagrama esquemático que muestra diferentes dominios funcionales de las isoformas de eIF4G de *S. cerevisiae* y los dominios funcionales verificados experimentalmente. Las longitudes de cada isoforma (en números de aminoácidos) se indican en el lado derecho. Los dominios central y C-terminal de unión a RNA (indicados por RS) son ricos en arginina y serina. Las líneas horizontales negras dentro del dominio eIF4A indican el dominio MIF4G (Clarkson et al., 2010).

1.10 Diferencias funcionales de las isoformas de eIF4G

La eliminación de alguna de las dos isoformas de eIF4G muestra ciertas diferencias, por ejemplo, las cepas que carecen de eIF4G1 ($\Delta tif4631$) crecen más lento que las que carecen de eIF4G2, esta última cepa crece de manera similar a una cepa WT (Park et al., 2011). anteriormente se consideraban funcionalmente redundantes con cualquier

diferencia fenotípica relacionada a la alteración en los niveles de expresión de eIF4G (Clarkson et al., 2010), pero se ha mostrado que eIF4G1 es específicamente necesario para mediar la respuesta de traducción al estrés oxidativo. (Cunningham et al., 2023)

1.11 eIF4G desempeña múltiples funciones en el metabolismo del RNA

De manera interesante, eIF4G no sólo participa en la traducción citosólica, sino que se le han descrito otras actividades no relacionadas con la traducción citosólica ya que esta proteína posee tres sitios de unión a RNA, lo que le permite desempeñar múltiples funciones en el metabolismo del RNA. Se ha visto que es un componente en la vía de degradación del mRNA nuclear (Das et al., 2014). También se ha detectado que interactúa con componentes del espliceosoma *in vitro* y la eliminación de una de las isoformas de eIF4G da como resultado la acumulación de precursores de mRNA sin llevar a cabo el splicing o empalme (Kafasla et al., 2009). Esto es de importancia, ya que el papel de eIF4G en la regulación de la síntesis de Cox1 que se ha detectado en nuestro laboratorio puede estar relacionada a alguna de estas funciones y no necesariamente a la interacción directa de eIF4G con los factores de traducción de Cox1 en la mitocondria, por lo que se resumen algunas funciones que se le han atribuido a eIF4G en la expresión de genes.

1.12 Localización intracelular de *TIF4631* (eIF4G1) y *TIF4632* (eIF4G2)

Al ser un componente del complejo 4F del factor de inicio de la traducción, ambas formas de eIF4G se localizan en el citosol (Prévôt et al; 2003) (Figura 6) y aunque se ha comprobado su función en procesos que se llevan a cabo dentro de organelos como el núcleo (Das et al., 2014) y la mitocondria, como más adelante se muestra no se ha podido comprobar su localización en otro organelo. Está bien documentado que, en las células eucariotas, las moléculas de una proteína pueden ubicarse en varias ubicaciones subcelulares, un fenómeno denominado localización dual, un par de ejemplos de estas proteínas en *S. cerevisiae* son la histidina tRNA sintetasa (HTS1) y la valil-tRNA sintetasa (VAS1) que se localizan tanto en el citosol como en las mitocondrias. Los genes correspondientes codifican dos transcritos: uno largo, que incluye la secuencia dirigida a la mitocondria, que se traduce a la forma mitocondrial de la proteína, y uno corto que se traduce a la forma citosólica que carece de esta señal (Yogev & Pines, 2011).

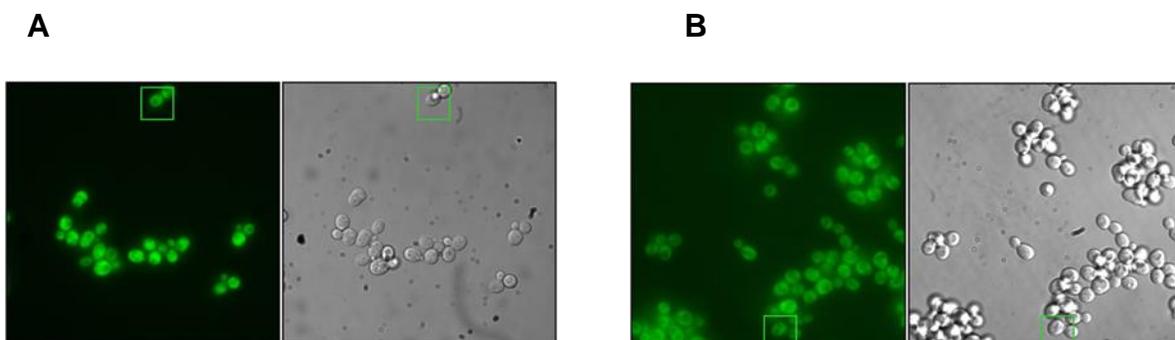


Figura 6. Localización intracelular de eIF4G1 (A) y eIF4G2 (B). Las imágenes se obtuvieron del repositorio YeastGFP. <https://yeastgfp.yeastgenome.org/displayLocImage.php?loc=1796> y <https://yeastgfp.yeastgenome.org/displayLocImage.php?loc=8188>

2. ANTECEDENTES DIRECTOS

2.1 eIF4G1 es una proteína que regula la síntesis de Cox1.

Con la finalidad de comprender con mayor detalle las funciones de Mss51 se ha estudiado cómo la ausencia de este activador afecta la traducción del gen mitocondrial reportero *ARG8^m*. Este gen se insertó en el DNA mitocondrial fusionado al gen que codifica para *COX1* (*COX1(1-512)::ARG8^m*) (Pérez-Martínez et al., 2003) y es capaz de complementar una eliminación nuclear de *ARG8* (Steele et al., 1996). Estas células son por lo tanto capaces de crecer en un medio sin arginina, pero las células que no poseen Mss51 ($\Delta mss51$) no pueden crecer en este medio ya que la traducción de *ARG8^m* depende de la traducción de *COX1*, la cual no puede iniciar por la ausencia de Mss51 (Pérez-Martínez et al., 2003). En el laboratorio buscamos supresoras espontáneas de mutantes $\Delta mss51$ que pudieran crecer en un medio sin arginina. Estas supresoras contenían la construcción *COX1(1-512)::ARG8^m* en el genoma mitocondrial (*datos no publicados*). Estos supresores podrían contener mutaciones que permiten ahora que el mRNA de *COX1(1-512)::ARG8^m* pueda traducirse nuevamente aunque Mss51 no se encuentre presente.

En la búsqueda de las supresoras se encontró una colonia que era capaz de crecer en un medio sin arginina, esto quiere decir que revirtió el fenotipo -Arg ya que se tradujo el mRNA que contenía al gen reportero *ARG8^m*. Sin embargo, esta levadura no era capaz de restablecer el fenotipo respiratorio, ya que Mss51 como se mencionó anteriormente no solo es el activador de la traducción del mRNA de *COX1*, sino que también es una

chaperona de ensamblaje de Cox1 en el complejo IV (Pérez-Martínez et al., 2003; Pérez-Martínez et al., 2009).

Al secuenciar el genoma de esta cepa supresora se encontró que esta poseía una mutación en la posición 1329 del gen *TIF4631* que codifica para la proteína eIF4G1. Por lo tanto, el codón que codifica para la tirosina 443 (TAC) mutó a un codón de paro (TAA) generando una proteína incompleta (eIF4G1^{Y443Stop}). Adicionalmente, en el laboratorio se encontró que una eliminación completa de eIF4G1 del genoma nuclear también podía suprimir el defecto de cepas $\Delta mss51$, *COX1(1-512)::ARG8^m* (Vergara-Gerónimo, sin publicar) (Figura 7).

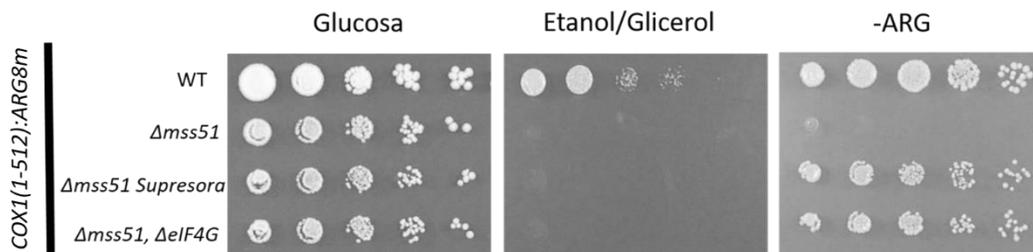


Figura 7. La eliminación de eIF4G1 puede suprimir el fenotipo en cepas $\Delta mss51$, *COX1(1-512)::ARG8^m* en un medio sin arginina. Crecimiento de las cepas WT (XPM78), $\Delta mss51$ (XPM76), $\Delta mss51$ supresora (XPM76 R6-1) y $\Delta mss51, \Delta eIF4G1$ (YC186) en medio completo (+ARG), sin arginina (-ARG) y respiratorio (Etanol/Glicerol). Todas las cepas cultivadas poseen la construcción *COX1(1-512)::ARG8^m*. Las levaduras se crecieron a 30°C durante 3 días.

Es importante resaltar que en la mutante eIF4G1^{Y443Stop} se pierde una parte del dominio de unión a 4E, todo el dominio de unión a eIF4A, así como dos sitios de unión de mRNA (Figura 8), Para corroborar el papel del dominio faltante sería necesario generar mutantes específicas para cada uno de los dominios que se pierden en la mutante supresora.

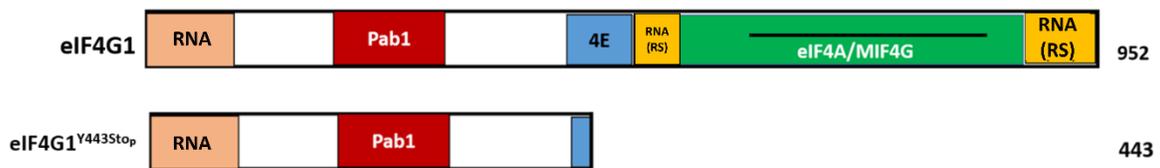


Figura 8. Diagrama esquemático que muestra la diferencia entre eIF4G1 en la cepa supresora y la cepa WT, como se puede observar eIF4G1 ha perdido parte del sitio de unión a 4E dos sitios de unión a RNA y el sitio de unión a eIF4A.

En el grupo del laboratorio de la Dra. Xochitl Pérez Martínez hemos demostrado que la eliminación de eIF4G2 a pesar de desempeñar casi las mismas funciones de eIF4G1 no suprime el fenotipo de la cepa $\Delta mss51$, sólo la eliminación de eIF4G1 es capaz de suprimir el fenotipo (Figura 9).

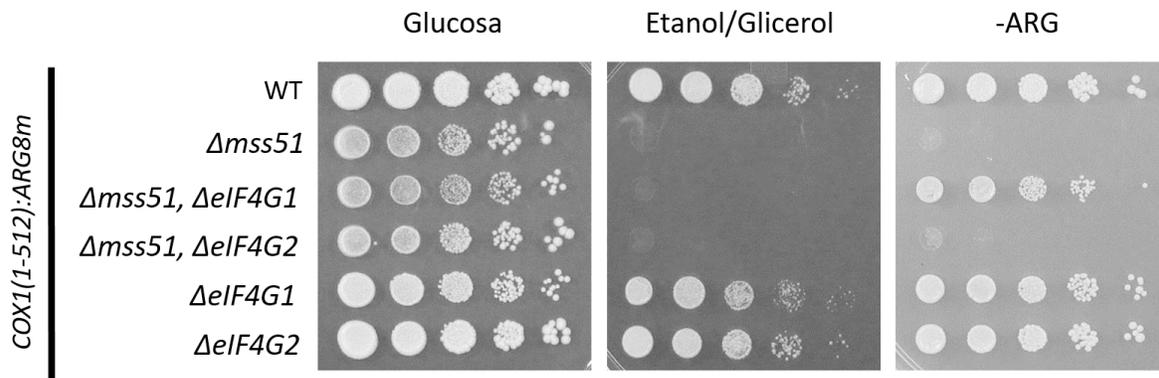


Figura 9. La eliminación de eIF4G2 no tiene el mismo efecto que la eliminación de eIF4G1. Crecimiento de las cepas WT (XPM78), $\Delta mss51$ (XPM76), $\Delta mss51, \Delta eIF4G1$ (YC185), $\Delta mss51, \Delta eIF4G2$ (YC189), $\Delta eIF4G1$ (YC189) y $\Delta eIF4G2$ (YC190), en medio completo (+ARG), sin arginina (-ARG) y respiratorio (etanol-glicerol). Todas las cepas cultivadas poseen la construcción *COX1(1-512):ARG8m*. Las levaduras se crecieron a 30°C durante 3 días.

Estos datos sugieren que directa o indirectamente, eIF4G1 reprime la síntesis de Cox1 en ausencia de Mss51 (Figura 10). En este trabajo es de interés comprender la función de eIF4G1 como regulador de la síntesis mitocondrial de Cox1. Nuestro grupo sugiere que una población de eIF4G1 se asocia a la mitocondria, ya que se han encontrado en análisis proteómicos masivos de la mitocondria la presencia de eIF4G1 (Sickmann et al., 2003; Reinders et al., 2006).

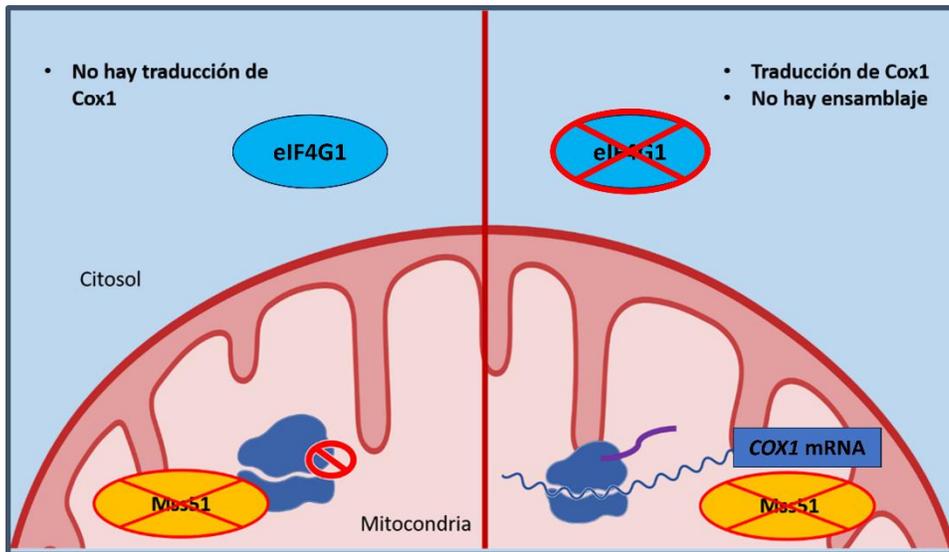


Figura 10. eIF4G1 parece ser un represor de la síntesis de Cox1 en ausencia de Mss51. Cuando Mss51 no está presente, pero si esta eIF4G1, la traducción mitocondrial del mRNA de *COX1* se inhibe (izquierda), pero cuando se elimina eIF4G1 ($\Delta eIF4G1$) la traducción se inicia nuevamente (derecha).

3. JUSTIFICACIÓN

La proteína eIF4G es central en la traducción citosólica, aunque todavía no se ha reportado como un posible efector mitocondrial. En el presente trabajo se planteó abordar las siguientes preguntas: ¿Acaso una población de eIF4G1 se localiza en la mitocondria? Creemos que ese será el caso, ya que en proteomas mitocondriales se ha observado su presencia (Sickmann et al., 2003; Wiederhold et al., 2009). De ser el caso ¿en qué subcompartimento del organelo se localizaría? Es posible que eIF4G1 se localizara por fuera, adosada a la membrana externa mitocondrial, del lado citosólico. Alternativamente, una subpoblación podría localizarse en el interior del organelo, en la matriz mitocondrial, donde se localizan los ribosomas mitocondriales. La localización de eIF4G1 en la mitocondria nos dará indicios del tipo de mecanismo de acción de esta proteína.

Se sugiere una localización mitocondrial de eIF4G ya que se ha demostrado un papel en la regulación de Cox1. Encontrar la localización de eIF4G en la mitocondria ayudaría a comprender el mecanismo por el que se regula la síntesis de Cox1.

Los mecanismos que regulan la traducción mitocondrial siguen siendo en gran parte desconocidos (Derbikova et al; 2018). Actualmente se reconoce que la síntesis de proteínas mitocondriales depende y es regulada por la traducción citosólica (Couvillion et al., 2016). Sin embargo, los mecanismos no se conocen. Previamente se había observado que eIF4G podía regular la traducción mitocondrial en humano y mosca (Gehrke et al., 2015).

Nuestro laboratorio ha identificado una función específica en la que el factor eIF4G1 ejerce un papel regulador: la inhibición de la síntesis de Cox1 mitocondrial en ausencia de Mss51. Es de interés para nuestro grupo entender cuáles son los mecanismos de dicha regulación, y para ello será necesario primero identificar si eIF4G1 se asocia a la mitocondria y en qué subcompartimento del organelo se encuentra. La proteína es rica en aminoácidos hidrofílicos por lo que se espera que sea soluble, se pueden prever tres topologías posibles de la proteína con respecto a la mitocondria: 1) En la periferia de la mitocondria, 2) en el espacio intermembrana y 3) en la matriz mitocondrial. También nos preguntamos si la cantidad de Cox1 o la proteína reportera *Cox1(1-512::)Arg8* cambia en ausencia de eIF4G1, independientemente de que se encuentre presente Mss51. Este resultado puede indicarnos si la función de eIF4G1 en la síntesis de Cox1 tiene algún tipo de función aún en presencia de Mss51.

4. HIPÓTESIS

Se espera que una población de eIF4G1 se localice en la mitocondria ya que se ha comprobado su efecto en la regulación de la traducción del mRNA de COX1 y su presencia en resultados de análisis proteómicos de mitocondrias.

5. OBJETIVO GENERAL

Identificar y caracterizar la asociación de eIF4G1 a la mitocondria.

5.1 Objetivos particulares

- Comprobar si los niveles de Cox1 se alteran por la eliminación de eIF4G1 cuando Mss51 está presente.
- Buscar mediante distintos programas la posible presencia en eIF4G1 en la mitocondria
- Determinar la localización de eIF4G1 en la mitocondria
- Analizar mediante distintas bases de datos posibles interacciones físicas de eIF4G1 con proteínas mitocondriales.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cepas

Cepa	Genotipo	Referencia
XPM78	<i>arg8::hisG, leu2-3,112, lys2, ura3-52, COX1::ARG8^m, ρ +, D273-10B</i>	<i>Pérez-Martínez, X et al., 2003</i>
XPM76	<i>arg8::hisG, leu2-3,112, lys2, ura3-52, COX1::ARG8^m, mss51::LEU2, ρ +</i>	<i>Pérez-Martínez, X et al., 2003</i>
XPM76 R6-1	<i>arg8::hisG, leu2-3,112, lys2, ura3-52, COX1::ARG8^m, mss51::LEU2, tif4631-1, ρ</i>	<i>Pérez-Martínez, X. Sin publicar</i>
Cav19	<i>arg8::hisG, leu2-3,112, mss51::LEU2, tif4631::KANMX4, His3::TIF4631 HA, COX1::ARG8^m</i>	<i>Vergara Gerónimo, C. A. Sin publicar</i>
Cav 20	<i>arg8::hisG, leu2-3,112, tif4631::KANMX4, His3::TIF4631 HA, COX1::ARG8^m</i>	<i>Vergara Gerónimo, C. A. Sin publicar</i>
YC185	<i>arg8::hisG, leu2-3,112, lys2, ura3-52, COX1::ARG8^m, mss51::LEU2, tif4631::KANMX ρ +</i>	<i>Camacho-Villasana, Y. Sin publicar</i>

YC186	<i>arg8::hisG, leu2-3,112, lys2, ura3-52, COX1::ARG8^m, tif4631::KanMX4, ρ+</i>	<i>Camacho-Villasana, Y. Sin publicar</i>
YC189	<i>arg8::hisG, leu2-3,112, lys2, ura3-52, COX1::ARG8^m, mss51::LEU2, tif4632::KANMXρ +</i>	<i>Camacho-Villasana, Y. Sin publicar</i>
YC190	<i>arg8::hisG, leu2-3,112, lys2, ura3-52, COX1::ARG8^m, tif4632::KANMX ρ +</i>	<i>Camacho-Villasana, Y. Sin publicar</i>

6.2 Medios

Los medios se esterilizaron durante 20 minutos a 120° C, para medios líquidos no se agregó agar.

Medio YPD: 1 % de extracto de levadura, 2% de BactoTM peptona (BD, USA), 2% de glucosa, 2 %de Bacto agar (BD, USA).

Medio YPGal: 1% de extracto de levadura, 2% de BactoTM peptona (BD, USA), 2% de galactosa, 2 %de BactoTM agar (BD, USA)

Medio YPEG: 1 % de extracto de levadura, 2 % de BactoTM peptona (BD, USA) 3 % de glicerol, 3 % de etanol, 2 % de BactoTM agar (BD, USA).

6.3 Obtención de mitocondrias crudas

Se incubaron dos precultivos uno de 2 mL de YPGal durante una noche para la cepa Cav20 y un precultivos de 5 mL de la cepa Cav19 durante 2 noches A partir de los precultivos se tomaron 700 µL, se inoculo un cultivo de 1 L para cada cepa y se incubó a 30° C hasta una OD₆₀₀ de 1-1.3. Se recolectaron las células en recipientes de

centrifugación previamente pesados y se determinó el peso húmedo de las células. Se centrifugo el cultivo a 3000 x *g* a temperatura ambiente. Para remover la pared celular, las células fueron incubadas con el tampón DTT (0.1 M Tris-SO₄, pH 9.4 y 10 mM DTT) (2 mL/g peso húmedo) y se llevó a agitación a 30 ° C durante 10 min, después se centrifugaron durante 5 min a 1500 x *g*. Se lavaron una vez con el buffer MPZ (1.2 M Sorbitol y 20 mM KPi, pH 7.4) sin zimoliasa, las células se centrifugaron a 1500 x *g* durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se incubo el pellet con el buffer MPZ (1.2 M Sorbitol, 20 mM KPi, pH 7.4 y zimoliasa 3mg/g de peso húmedo) y se llevó a agitación a 30 °C durante 30–45 min. Se concentraron los esferoplastos a 4500 x *g* durante 5 min. Se resuspendió el pellet en buffer de homogeneización frío (0.6 M Sorbitol, Tris pH 7.4 10 mM, 1mM EDTA, 0.2 % p/V BSA, 50 µg) (6,5 mL / g de peso húmedo). A partir de este paso, siempre se trabajó sobre hielo entre los pasos de centrifugación que se realizan a 4 ° C. Se homogenizaron los esferoplastos con 10 golpes utilizando un homogeneizador de vidrio. En este paso se tomó 1 mL que es el extracto total. Se centrifugó el homogeneizado a 1500 x *g* para sedimentar los restos celulares y los núcleos. Se recuperó el sobrenadante. Se centrifugó el sobrenadante a 1500 x *g* durante 5 min. Se recuperó el sobrenadante. Se aisló la fracción mitocondrial por centrifugación del sobrenadante a 12 000 x *g* durante 10 min. Se tomó 1 mL de la fracción citosólica (sobrenadante). Se resuspendió suavemente el sedimento mitocondrial crudo en 1mL de buffer de homogenización se centrifugó a 3000 x *g* durante 5 min. Se centrifugó a máxima velocidad durante a 12 min en centrifuga de mesa y se recuperó el pellet. Para evitar la congelación y descongelación repetidas de

muestras mitocondriales que se utilizaron en ensayos, la suspensión mitocondrial se dividió en alícuotas en pequeños volúmenes de 25 a 50 μ l y se almacenaron a -70° .

6.4 Purificación de mitocondrias crudas en gradiente de Histodenz.

Se preparó 10 mL de cada una de las siguientes soluciones de Histodenz (a partir de una disolución de Nicodenz 50 %) en amortiguador SEH 2X (HEPES 20mM, Sorbitol 1.2 M, EDTA 1 mM). 25 % de Nicodenz (5 mL de Nicodenz 50%, 5 mL de SEH 2X) 20 % de Nicodenz (4 mL de Nicodenz 50 %, 5 mL de SEH 2X, 1 mL de H₂O), 15% (3 mL de Nicodenz al 50 %, 5 mL de SEH 2X, 2mL de dH₂O), 10% = 2 mL de Nicodenz al 50% (w/v) + 5 mL de SEH 2X + 3 mL de H₂O) y 5% (1 mL de Nicodenz al 50 %, 5 mL de SEH 2X. 4 mL de dH₂O).

Se prepararon dos gradientes por cultivo (1 L de medio de cultivo), depositando 2 mL de cada una de las soluciones de Nicodenz en el siguiente orden; 25, 20, 15, 10 y 5 % (Se uso punta cortada en el extremo para micropipeta). Se depositó 0.5 mL del extracto crudo de mitocondrias sobre cada gradiente. Se centrifugo a $100,00 \times g$ por 39min en un rotor SW40Ti (Beckman). Al finalizar la Centrifugación se observaron cuatro bandas. Se removieron las bandas de mitocondrias y mitoplastos con una aguja y jeringa, se colocaron en tubos diferentes. Se diluyeron las mitocondrias y los mitoplastos en amortiguador SEH. Se centrifugo 10 min a $12000 \times g$ en rotor JA-25.5 a 4° C. Para eliminar completamente el Nicodenz se resuspendió el botón en 25 mL SEH. Se centrifugo 10min a $12,000 \times g$ en rotor JA-25.5 a 4° ., con la punta cortada en el extremo para micropipeta. Se resuspendió con 150 μ l de buffer SEH. Se cuantifico por espectrofotometría la proteína (método de Lowry; Markwell et al., 1978) Se congelo en

nitrógeno líquido y se guardó a -70°C . Para evitar la congelación y descongelación repetidas de muestras mitocondriales que se utilizaron en los ensayos, la suspensión mitocondrial se divide en alícuotas de 25 a 50 μL .

6.5 Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)

Las muestras para el ensayo se resuspendieron en amortiguador de carga (Amortiguador de carga 2X, Tris 1 M pH 6.8 100 mM, glicerol 20 %, SDS 4 %, β -mercaptoetanol 5 %, azul de bromofenol 0.02 % se calentaron durante 5 min a 65°C . la proteína se cargó en un gel chico de SDS-PAGE al 12% (Gel apilador 4% acrilamida/bisacrilamida 30 %/8 % 0.65 mL, Tris 2M pH 6.8 312.15 μL , SDS 20 % 25 μL , H_2O 3.95 μL , APS 10 % 50 μL , TEMED 5 μL . Gel separador 12% acrilamida/bisacrilamida 30 %/8 % 6 mL, Tris 2M pH 8.8 2.8 mL, SDS 20 % 75 μL , H_2O 6.08 mL, APS 10%, 75 μL TEMED 7.5 μL . la electroforesis se inició a 80V hasta que la muestra entro al gel separador, después se incrementó a 100 V, utilizando el amortiguador de corrida 1X (Amortiguador de carga 5X: Tris- HCl pH 8.3 0.125M, glicina 1.25 M, SDS 0.5%.

6.6 Western blot

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a membranas de PVDF (marca Millipore) a 1.5 mA por cm^2 a 10 V durante 120 min mediante el método semi-seco usando la cámara de electrotransferencia FisherBiotech con amortiguador de transferencia (Tris HCl pH 8.3 100 mM, glicina 100 mM, SDS 4%, metanol 20%). Las membranas obtenidas se lavaron con metanol por 10 segundos, se dejó secar durante

10 min. Se incubó la membrana en amortiguador de lavado (Tris-HCl 10 mM pH 7.6, NaCl 100 mM, EDTA 0.1 mM, 0.1 % Tween 20) hasta que se humedeció completamente. la membrana se bloqueó con solución de bloqueo (Tris 1M pH 7.6 50 mM, NaCl 150 mM, y leche en polvo descremada Svelty® al 10 %) toda la noche a 4°C. Se incubó la membrana con la solución de anticuerpo (Tris-HCl 10 mM pH 7.6, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, 0.1% Tween 20, leche en polvo descremada Svelty® al 1 %), la cual contuvo al anticuerpo primario (acoplado o no acoplado a peroxidasa, revisar el título de cada anticuerpo). Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó la membrana en solución de lavado por 10 min, se repitió el lavado 2 veces más. Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa. Se lavó la membrana en solución de lavado por 10 min, y se repitió el lavado 2 veces más. Se reveló la señal usando los kits de Pierce™ (Thermo Scientific™) o Immobilon (Milipore™). Se tomó una autoradiografía exponiendo el tiempo necesario según fuera el caso para cada anticuerpo. Se eliminó el anticuerpo unido a las proteínas de la membrana (para usar otro anticuerpo en la misma membrana) al incubar con la solución de eliminación de anticuerpo (β -mercaptoetanol 0.7%, Tris pH 6.8 63 mM, SDS 2%) por 30 min a 50°C. Se lavó 3 veces con amortiguador de lavado hasta quitar olor a β -mercaptoetanol. Si era necesario, se bloqueó nuevamente durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Se repitieron los pasos de incubación de los anticuerpos para revelar la presencia de una proteína distinta.

Anticuerpo	Especie	Dilución	Referencia
Anti-Cox1	Conejo	1:50000	Rodolfo García Villegas (Sin publicar)
Anti-Arg8	Conejo	1:20000	Donado por Thomas D. Fox (Steele et al., 1996)
Anti-CS	Conejo	1:1000	Donado por Thomas D. Fox
Anti-HA (acoplado a peroxidasa)	Rata	1:2000	Roche®, : Anti-HA-Peroxidase, High Affinity (3F10)
Anti-Hog1	Conejo	1:2000	Santa cruz Biotechnology y-215
Anti-G6PDH	Conejo	1/10000	Sigma® A9521
Anti-conejo IgG	Ratón	1/10000	Santa cruz Biotechnology
Lista de anticuerpos utilizados			

6.7 Diluciones seriadas de cepas de levadura

1. Se inoculo un precultivo de 2 mL por cepa en medio YPD durante una noche a 30° C
2. Se tomó 1 mL por cepa de precultivo y se colocaron en microtubos previamente pesados, se centrifugaron a máxima velocidad durante un minuto en la centrifuga de mesa y se eliminó el sobrenadante

3. Se lavó con 1 mL de agua estéril cada pellet y se centrifugo durante un minuto a máxima velocidad. Se eliminó el sobrenadante y se calculó el peso húmedo del pellet
4. Se agregó el agua necesaria para que en cada tubo tuviera una concentración de células de 0.02 g/mL
5. Las diluciones seriadas se realizaron en una caja de 96 pozos, para cada cepa correspondía una fila de 6 pozos, el primer pozo de cada fila correspondía a la mayor concentración, se cargaron 150 μ L de los tubos que tenían la concentración previamente ajustada, así que se formara una columna dependiendo del número de cepas a comparar, por ejemplo; si se utilizaron 3 cepas, la columna seria de tres pozos.
6. Una vez se cargó la primera columna, las columnas de la dos a la seis se cargaron con 135 μ L de agua estéril con una pipeta multicanal.
7. Se tomaron 15 μ L del primer pozo y se pasaron hacia el segundo pozo, se diluyo bien y se tomó 15 μ L del segundo pozo hacia el tercero mezclando bien, se realizó el mismo procedimiento hasta llegar al sexto pozo en cada cepa.
8. Se tomó el replicador y se esterilizo sumergiendo los dientes en etanol y pasándolo por la llama, se esperó a que se enfriase y se sumergió en los pozos con las diluciones asegurándonos de que los dientes del replicador llevaran las gotitas de las diluciones
9. Se selló las gotitas del replicador sobre los medios en los que analizaron las cepas, se esperó a que se secan las gotas sobre los medios sólidos y se llevaron a 30°. Se

fotodocumentó el crecimiento durante seis días, pero en este trabajo se muestran los resultados al tercer día.

6.8 Purificación de DNA total de levadura

1. Las cepas se cultivaron toda la noche a 30°C en 2 mL de medio YPD. Se Centrifugaron los cultivos a máxima velocidad en centrifuga de mesa durante 1 minuto, y se eliminó el sobrenadante. El botón celular obtenido se suspendió en 500 µL de agua desionizada estéril para lavar las células, que se centrifugaron nuevamente. El botón celular se resuspendió en 500 µL de amortiguador de lisis (Tris-HCl 100 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8, NaCl 100 mM, 1% SDS, 2% Tritón X-100).
2. Se agregaron 500 µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). La mezcla se agitó en vortex a máxima velocidad durante 5 min
3. Se centrifugó a máxima velocidad durante 5 min a temperatura ambiente. De los tubos obtenidos, se recuperaron 300 µL de la fase acuosa superior se agregaron 30 µL de acetato de sodio (3 M, pH 5.3) y 600 µL de etanol al 100% a -20°C. La mezcla se incubó 20 min a -20 °C para precipitar el DNA.
4. Se centrifugó la mezcla a máxima velocidad durante 10 min y a 4°C, y el botón obtenido se suspendió en 500 µL de etanol al 70%. La mezcla obtenida se centrifugó en las mismas condiciones y se eliminó el sobrenadante
5. El botón que contiene el DNA total se dejó secar durante 5 minutos al aire y se resuspendió en 50 µL de agua destilada estéril. El DNA se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.9 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

1. Las secuencias de DNA se amplificaron por medio de PCR usando la Taq DNA polimerasa “GoTaq® DNA Polymerase” de Promega™. Para cada reacción de 50µL se agregaron de 10µL de “5X Green or Colorless GoTaq® Reaction Buffer” 1X (1.5mM MgCl₂)², 1µL de mezcla de dNTPs (0.2mM por cada dNTP), upstream primer 1µl (0.1–1.0µM), downstream primer 1µl (0.1–1.0µM), GoTaq® DNA Polymerase 0.25µl (5u/µl), 1 µL de ADN templado y se llevó a 50µL con agua libre de nucleasas.
2. Se siguieron las especificaciones del fabricante. Las mezclas de reacción se cargaron con amortiguador de carga en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.
3. Se realizó la electroforesis a 100V durante 45 minutos en una cámara de electroforesis horizontal chica.

6.10 Transformación integrativa de levadura

1. Se inoculó un precultivo de 2 mL en YPD y se incubó a 30° C durante toda la noche
2. Se tomó 1 mL del precultivo, se inoculó 10 mL de YPD y se dejó crecer aproximadamente 2 horas hasta llegar a una densidad óptica de 600 menor 1.
3. Se tomaron 750 µL y 1000 µL para tener dos condiciones, se centrifugaron a máxima velocidad durante 1 minuto. Se lavaron con 500 µl de agua estéril y se eliminó el sobrenadante.
4. Se les añadió a las células 52.5µL la solución de transformación (40µL de PEG al 50%, 5 µL de DTT 1M, 5 µL de LiAc 2M y 2.5 µL de esperma de salmón 10mg/mL previamente hervido durante 10 minutos y enfriado en hielo). para cada condición, se añadió el ADN (6µL)

5. Se incubo durante 30 minutos a 30°C, se llevó al vortex cada 10 min.
6. Se incubo a 42° C durante 15 min, se llevó al vortex cada 10 min.
7. Se centrifugo y se aspiró el sobrenadante
8. Se resuspendió el pellet en 1 mL de YPD y se incubó durante 2 hrs a 30° C
9. Se centrifugó y el pellet resultante se plaqueó en el medio de selección

7. RESULTADOS

7.1 Los niveles de Cox1 se mantienen estables en la mutante $\Delta eIF4G1$

Se desconoce el mecanismo por el cual la ausencia de eIF4G1 permite la síntesis de Cox1, aunque no esté presente Mss51. Una forma de empezar a descifrar el enigma es comparando los niveles de Cox1 en una cepa WT contra una cepa que carece de eIF4G1, ya que esto nos diría si los niveles de Cox1 se ven afectados por la eliminación de eIF4G1, aun cuando Mss51 está presente. Esto nos indicaría si eIF4G1 es un regulador habitual en la biogénesis de Cox1, esté o no Mss51. Para responder esto se purificaron mitocondrias de las cepas WT y $\Delta eIF4G1$ se compararon los niveles de Cox1 por Western blot. Se emplearon cepas con el gen reportero $COX1(1-512)::ARG8^m$ en el genoma mitocondrial, lo cual nos permitió monitorear también a Arg8. Los niveles de Cox1 y de Arg8 no cambiaron entre las dos cepas así que el efecto supresor de eIF4G1 no se debe a un cambio en los niveles de Cox1 (Figura 11).

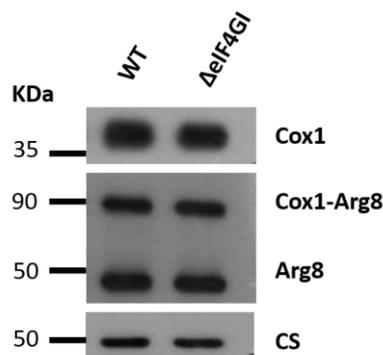


Figura 11. Los niveles de Cox1 se mantienen estables en la mutante $\Delta eIF4G1$.

Western blot (50 μ g) de proteína mitocondrial. Se usaron los anticuerpos α -Cox1, α -Citrato sintasa (CS) y α -Arg8 en mitocondrias crudas de las cepas WT y $\Delta eIF4G1$. Cox1-Arg8 representa el producto precursor del gen reportero $COX1(1-512)::ARG8^m$.

7.2 Análisis bioinformáticos sugieren que eIF4G1 podría localizarse en el espacio intermembrana.

Como se mencionó con anterioridad muchas proteínas mitocondriales están codificadas en el genoma nuclear y son importadas por complejos translocadores de las membranas mitocondriales. Estas proteínas mitocondriales se pueden clasificar en dos grupos según el tipo de señal de dirección que contienen: una señal de dirección escindible N-terminal (presecuencia); o una señal de localización interna no escindible. Los resultados de un análisis proteómico de levadura mostraron que aproximadamente el 70% de las proteínas mitocondriales poseen una presecuencia (Fukasawa et al., 2015).

Las presecuencias se encuentran entre los primeros 10 a 90 residuos de la región N-terminal, exhiben una alta composición de arginina y muy pocos residuos cargados negativamente, Las proteínas que contienen tales presecuencias son translocadas por los complejos de proteínas TOM y TIM en las membranas externa e interna, respectivamente (Neupert et al., 2007).

A continuación, nos preguntamos si en la secuencia de eIF4G1 hay residuos en el extremo amino terminal que pudieran actuar como presecuencia y que se puedan escindir por los complejos de importación. Se utilizó como herramienta de predicción el software MitoFates <http://mitf.cbrc.jp/MitoFates/> (Fukasawa et al., 2015). Como se puede observar en la tabla 2 las proteínas de interés eIF4G1/2 no presentan probabilidad de presecuencia. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que esto no es sinónimo de que no sea posible su importación mitocondrial ya que hay ejemplos como

el de la proteína mitocondrial Pet54 que no presenta una presecuencia y se ha identificado como una proteína de la membrana interna y de la matriz de la mitocondria (McMullin & Fox, 1993).

Una fracción significativa de las proteínas mitocondriales (alrededor del 30%) carece de presecuencias N-terminales típicas. En particular, todas las proteínas de la membrana externa mitocondrial y algunas proteínas del espacio intermembrana y la membrana interna están desprovistas de dichas señales. Para un pequeño número de estas preproteínas se han identificado diversas señales de orientación mitocondrial que pueden estar localizadas en el extremo C-terminal o N-terminal de las proteínas a importar (Diekert et al, 1999). Para identificar si existe alguna probabilidad de que eIF4G1 se encuentre en la mitocondria se utilizó un software llamado Deep mito.

Deepmito está basado en una red neuronal convolucional (CNN) este tipo de herramientas puede ser utilizado para detectar patrones en secuencias proteicas, Los CNNs consisten en 2 capas diferentes; las convolucionales (Convolutional layers) y las de agrupación (Pooling layers), las capas convolucionales extraen las características destacadas de una entrada dada (en este caso la proteína a analizar) mediante filtros o detectores de motivos, estos parámetros se entrenan y aprenden para ser utilizados en él escaneo de una entrada, mientras que las capas de agrupación reducen la dimensionalidad de la entrada seleccionando las características más relevantes extraídas por las capas convolucionales de acuerdo a una función determinada (el promedio, valor máximo o valor mínimo).

Posteriormente los datos obtenidos de las capas anteriores se incorporan a una red de salida totalmente conectada que comprende una determinada cantidad de unidades ocultas (Hidden Layer), cuya función principal es transformar las entradas en algo que la capa de salida pueda utilizar. las cuatro unidades de salida corresponden a los cuatro compartimentos mitocondriales. La función de activación softmax se aplica en la salida de la capa (obteniendo una salida de probabilidad para cada clase) y el compartimento predicho es el que tiene la mayor probabilidad. DeepMito fue entrenado y probado en validación cruzada en un conjunto de datos que comprende 424 proteínas no redundantes extraídas de UniProtKB/SwissProt (lanzada en febrero de 2018) y dotadas de sustento experimental de la localización mitocondrial (<http://busca.biocomp.unibo.it/deepmito/>) (Savojardo et al., 2020).

En resumen, Deepmito es una herramienta para predecir la localización submitocondrial de proteínas. El uso de Deepmito no encontró probabilidad de que sea una proteína mitocondrial, predice que posiblemente que la proteína de interés puede localizarse en el espacio intermembrana. Como control encontramos que mejora la probabilidad de localización mitocondrial de proteínas sin presecuencia que sabemos, con un gran sustento experimental, de su localización mitocondrial. Tal fue el caso de Pet54, Tom70 y de forma notable Odc2. Como control negativo se tomó a Hog1, proteína citosólica, obteniendo una probabilidad de importación muy baja. Por lo que la herramienta Deepmito nos ofrece un sustento teórico de una posible localización mitocondrial de eIF4G1. (tabla 2).

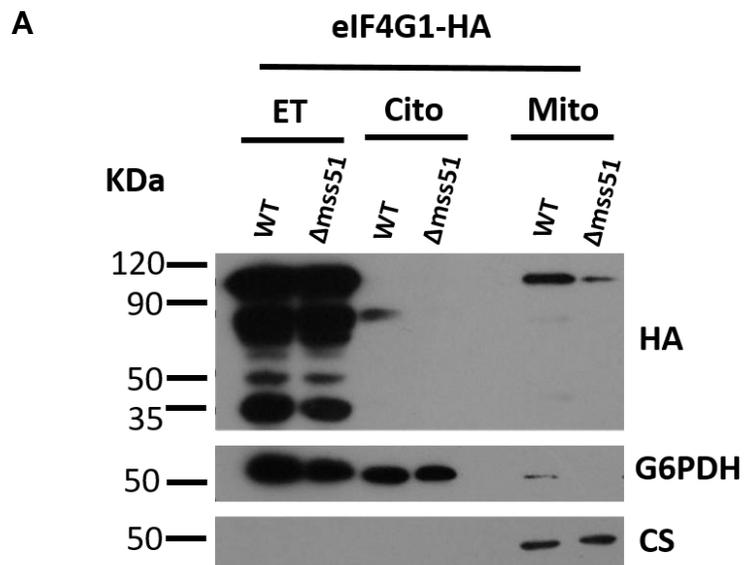
Tabla 2.		
Proteína	Probabilidad de presecuencia MITOFATES	Probabilidad de localización mitocondrial DeepMito
eIF4G1 (<i>S. cerevisiae</i>)	0.000	0.4 (EIM)
eIF4G1 (<i>H. Sapiens</i>)	0.000	0.12 (MIM)
eIF4G2 (<i>S. cerevisiae</i>)	0.004	0.3 (EIM)
eIF4A (<i>S. cerevisiae</i>)	0.000	0.2 (EIM)
Mss51 (<i>S. cerevisiae</i>)	0.996	0.3 (MIM)
Mss116 (<i>S. cerevisiae</i>)	0.996	0.91 (MM)
Pet54 (<i>S. cerevisiae</i>)	0.036	0.103 (MIM)
Tom70 (<i>S. cerevisiae</i>)	0.012	0.38(MEM)
Odc2 (<i>S.cerevisiae</i>)	0.000	0.87 (MIM)
Hog1 (<i>S.cerevisiae</i>)	0.008	0.09

7.3 Búsqueda de eIF4G1 mitocondrial

Como ya se ha demostrado, la ausencia de eIF4G1 produce alteraciones en la síntesis de Cox1. Para comprender este mecanismo es importante conocer si eIF4G1 es una proteína mitocondrial. Para ello se aislaron mitocondrias, las cuales se purificaron por ultracentrifugación en un gradiente de Histodenz. Durante el aislamiento se recuperó el extracto total (ET) y la fracción citosólica, y finalmente se realizó un ensayo de Western blot utilizando diferentes anticuerpos: α -HA que detecta a eIF4G1-HA, a citrato sintasa (CS) como control mitocondrial y Hog1 como control citosólico. Se realizó un experimento independiente empleando a la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH) como control de proteína citosólica. Esto se realizó en dos cepas, Cav19 cuyo genotipo es: $\Delta mss51$, eIF4G1-HA y tiene Cox1 fusionado con ARG8^m ($COX1(1-512::ARG8^m)$); Cav 20 que presenta a eIF4G1-HA y $COX1(1-512::ARG8^m)$. Estas dos cepas se eligieron para asegurar que la importación de eIF4G1 no depende de la presencia o ausencia de Mss51.

Mediante Western blot detectamos a eIF4G1-HA (peso molecular es de 107 KDa aproximadamente en ambas cepas. Creemos que las bandas que están más abajo son el producto de la degradación de la proteína (Figura 12). Para poder observar a eIF4G1 en la mitocondria se cargó el gel de SDS-PAGE con distintas concentraciones de proteína y solo fue observable a partir de 300µg de proteína (Figura 12).

En cuanto a los controles citosólicos Hog1 y G6PDH, es posible ver un poco de señal en la fracción mitocondrial, lo cual no asegura la genuina localización de eIF4G1 en la mitocondria, ya que dicho resultado puede ser efecto de contaminantes citosólicos.



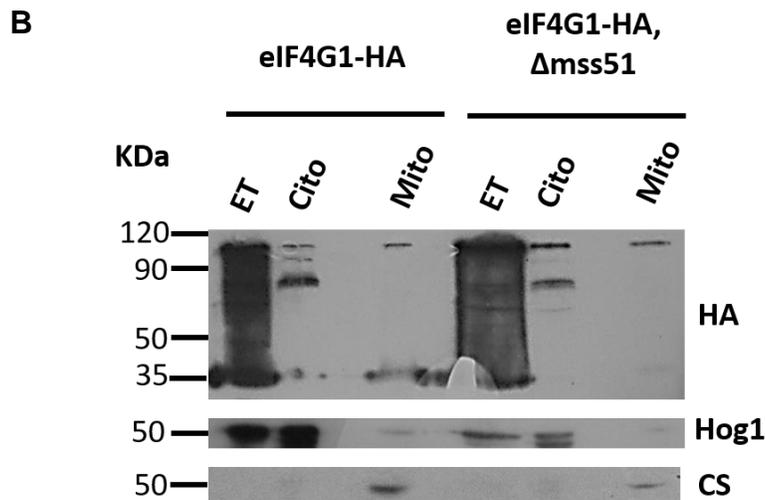


Figura 12. La localización mitocondrial de eIF4G1 no es concluyente. Western blot. Se usaron 50 microgramos de proteína para el extracto total y citosol mientras para poder observar a eIF4G1-HA en la mitocondria se utilizaron 300 μ g. Se utilizaron los anticuerpos α -HA (eIF4G1 a 107 KDa), α -Citrato sintasa (CS), α -Hog1 y α -G6PDH en extractos totales (ET), Citosol (Cito) y mitocondrias (Mito) de las cepas WT y Δ mss51. Panel A; Western blot con G6PDH como control citosólico. Panel B Western blot con Hog1 como control citosólico.

7.4 En eIF4G1 se han detectado más interacciones físicas con proteínas mitocondriales que en su parólogo eIF4G2

Para poder hacer un vínculo entre eIF4G1 con las funciones mitocondriales se hizo una búsqueda bioinformática de proteínas que interactuaran físicamente con ambas isoformas, eIF4G1 y eIF4G2, y para los que se conozca su función mitocondrial. Para buscar estos interactores se emplearon las bases de datos SGD (<https://www.yeastgenome.org>) e Intact (<https://www.ebi.ac.uk>) (Orchard et al., 2014). Como se puede apreciar el número de interacciones con proteínas

mitocondriales de eIF4G1 es de 25 (tabla 3), mostrando una gran diferencia con respecto a eIF4G2 que solo cuenta con 2 interactores; Puf3 y Psp2. Esto respalda en parte que las funciones de eIF4G no son idénticas entre los dos parálogos.

Tabla 3. Interactores mitocondriales de eIF4G1			
Interactor (GEN)	Descripción	Localización en la mitocondrial	Referencia/ Ensayo
ALD5	Aldehído deshidrogenasa mitocondrial involucrada en la biosíntesis de acetato (Saint-Prix et al., 2004)	MM	Jain S, et al. (2016) Affinity Capture-MS
ATP1	El gen ATP1 codifica para la subunidad alfa del sector alfa de la F1-ATPasa (Takeda et al., 1986)	MM	Jain S, et al. (2016) Affinity Capture-MS
COQ6	El gen COQ6 codifica una monooxigenasa mitocondrial dependiente de la flavina necesaria para la biosíntesis de la ubiquinona (Gin et al., 2003)	MIM	Jain S, et al. (2016) Affinity Capture-MS
COR1	Subunidad central del complejo ubiquinol-citocromo c reductasa (Conte et al., 2015)	MIM	Jain S, et al. (2016) Affinity Capture-MS
GLR1	El glutatión reductasa es una flavoenzima que cataliza la reducción de GSSG a GSH utilizando el poder reductor de NADPH. En la	EIM	Jain S, et al. (2016)

	levadura Glr1 se localiza tanto en el citosol como en la mitocondria. (Grant, et al., 1996)		Affinity Capture-MS
HEM1	La 5-aminolevulinato sintasa es la primera enzima limitante de la biosíntesis del hemo, Cataliza la síntesis de ácido 5-aminolevulínico, el primer precursor común de todos los tetrapirroles, a partir de glicina y succinil-coenzima A de forma dependiente de piridoxal 5'-fosfato (Astner et al., 2005).	MM	Jain S, et al. (2016) Affinity Capture-MS
IDH2	El isocitrato deshidrogenasa cataliza la descarboxilación oxidativa del isocitrato (Taylor et al., 2008)	MM	Jain S, et al. (2016) Affinity Capture-MS
ILV6	Subunidad reguladora de la acetolactato sintasa; la acetolactato sintasa cataliza el primer paso de la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada (Richie et al., 2013).	MM	(Jain et al., 2016) Affinity Capture-MS
LSC1	Subunidad alfa de succinil-CoA ligasa; la succinil-CoA ligasa es una enzima mitocondrial del ciclo TCA que cataliza la conversión dependiente de nucleótidos de succinil-CoA a succinato (Przybyla-Zawislak et al., 1998)	MM	Jain et al. (2016) Affinity Capture-MS
MAS1	Subunidad catalítica de la proteasa de procesamiento mitocondrial esencial (MPP), que escinde la secuencia mitocondrial de las proteínas precursoras recién importadas (Ieva et al., 2013)	MM	Jain S, et al. (2016) Affinity Capture-MS

MDH1	Malato deshidrogenasa mitocondrial; cataliza la interconversión de malato y oxaloacetato; involucrado en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) (Minard & McAlister-Henn, 1991)	MM	Jain S, et al. (2016) Affinity Capture-MS
MIC12	Subunidad del complejo mitocondrial MICOS, se requiere para la formación de crestas y se localiza en la unión de la cresta mitocondrial. (Zerbes et al., 2016)	MIM	Jain S, et al. (2016) Affinity Capture-MS
MRP1	Proteína ribosómica mitocondrial de la subunidad pequeña (Graack & Wittmann-Liebold, 1998).	MM	Jain S, et al. (2016) Affinity Capture-MS
MRP7	Proteína ribosómica mitocondrial de la subunidad grande; involucrado junto con Mrpl35p en el ensamblaje del citocromo <i>c</i> oxidasa (Graack & Wittmann-Liebold, 1998).	MM	Gavin AC, et al. (2002) Affinity Capture-MS
MRPL11	Proteína ribosómica mitocondrial de la subunidad grande; se localiza en vacuola en respuesta a H ₂ O ₂ (Graack & Wittmann-Liebold, 1998).	MM	Jain S, et al. (2016) Affinity Capture-MS
MRPS5	Proteína ribosómica mitocondrial de la subunidad pequeña (Saveanu et al., 2001)	MM	Gavin AC, et al. (2002) Affinity Capture-MS

MTF2	Proteína mitocondrial que interactúa con la RNA polimerasa mitocondrial.	MM	Jain S, et al. (2016) Affinity Capture-MS
NAM9	Componente de la subunidad pequeña del ribosoma mitocondrial (Graack & Wittmann-Liebold,1998).	MM	Jain S, et al. (2016) Affinity Capture-MS
NDE1	NADH deshidrogenasa externa mitocondrial, cataliza la oxidación del NADH citosólico. (Overkamp et al., 200)	MIM	Jain S, et al. (2016) Affinity Capture-MS
ODC2	Transportador de la membrana interna mitocondrial; transportador de 2-oxodicarboxilato, exporta 2-oxoadipato y 2-oxoglutarato desde la matriz mitocondrial al citosol para su uso en la biosíntesis de lisina y glutamato y en el catabolismo de la lisina; (Tibbetts et al., 2002)	MIM	Jain S, et al. (2016) Affinity Capture-MS
RIP1	Proteína de hierro-azufre de Rieske del complejo mitocondrial citocromo <i>bc₁</i> (Conte et al., 2015)	MIM MM	Jain S, et al. (2016) Affinity Capture-MS
RSM23	Subunidad pequeña ribosomal de la mitocondria	MM	Jain S, et al. (2016) Affinity Capture-MS
SSC1	ATPasa de la familia Hsp70; constituyente de la maquinaria de importación de la translocasa de la membrana interna mitocondrial (complejo TIM23 (Kang et al., 1990)	MM	Archer SK, et al. (2015)

			Affinity Capture-RNA
TOM40	Tom40 es el componente principal de la preproteína translocasa de la membrana externa de las mitocondrias (complejo TOM) (Gabriel et al, 2003)	MEM	Jain S, et al. (2016) Affinity Capture-MS
VAS1	Valil-tRNA sintetasa mitocondrial y citoplasmática (Chatton et al., 1988)	MM	Jain S, et al. (2016)
MIM: Membrana interna mitocondrial, MM: Matriz mitocondrial, MEM: Membrana externa mitocondrial			

7.5 La mayoría de los interactores mitocondriales de eIF4G1 encontrados son subunidades del ribosoma mitocondrial

Como se aprecia en el gráfico de abajo la mayor parte de las proteínas reportadas como interactores de eIF4G1 son subunidades del mitorribosoma (Mrp1, Mrp7, Mrp11, Mrps5 Nam9 y Rsm23), seguido por subunidades de los complejos respiratorios (Atp1, Cor1, Nde1, y Rip1) el metabolismo, así como del transporte e importación de proteínas a la mitocondria. El que haya varias subunidades del mitorribosoma es interesante porque en el trabajo de Gavin et al., (2002) en el que se analizan y caracterizan a gran escala la composición de diferentes complejos multiproteicos, se detectó a eIF4G1 junto con varias proteínas del mitorribosoma como Mrps5, Mrp1, Mrp7 y Nam9 formando un complejo. Lo anterior relaciona a eIF4G1 con una posible función en la síntesis de

proteínas en la mitocondria. Sin embargo, estas interacciones deben verificarse experimentalmente ya que para establecer la reproducibilidad del enfoque se obtuvo que la probabilidad de detectar la misma interacción es de alrededor del 70 %. Por lo tanto, en promedio, el 30% de todas las asociaciones detectadas y presentadas en ese estudio deben tratarse con precaución.

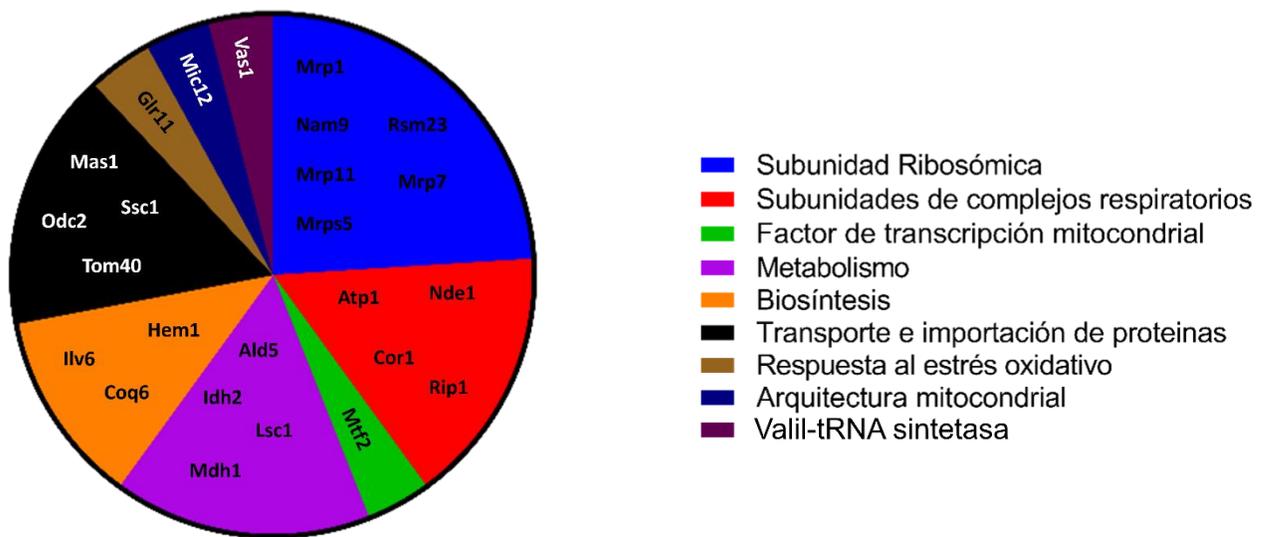


Figura 13. Función general de los interactores mitocondriales de eIF4G1 encontrados en las diferentes bases de datos.

7.6 Interactores mitocondriales de eIF4G2

Para la isoforma eIF4G2 solo se encontraron dos interactores uno de ellos es Puf3 que se ha relacionado con la traducción acoplada a la inserción de proteínas mitocondriales al interactuar con los mRNA anclándolos a la mitocondria (Lesnik et al., 2015) (Tabla4).

Tabla 4. Interactores mitocondriales de eIF4G2			
Interactor (GEN)	Descripción	Localización en la mitocondrial	Referencia
PUF3	Proteína de la superficie externa mitocondrial; une el complejo Arp2/3 con las mitocondrias durante el movimiento mitocondrial anterógrado; también se une y promueve la degradación de mRNA para proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo seleccionadas; reprime traduccionalmente los genes ligados al estrés oxidativo; regula la biosíntesis de CoQ (Kershaw et al., 2015)	MEM	Freeberg MA, et al. (2013) Kershaw CJ, et al. (2015) PMID:26493364
PSP2	Proteína citoplasmática rica en Asn que contiene motivos RGG, tiene un posible papel en el empalme del mRNA mitocondrial. (Formosa et al,1988)	Citosol	Krogan NJ, et al. (2006) Yin Z, et al. (2019) PMID:31666677
MIM: Membrana interna mitocondrial, MM: Matriz mitocondrial, MEM: Membrana externa mitocondrial			

8 DISCUSIÓN

8.1 Los niveles de Cox1 no cambian en la mutante $\Delta eIF4G1$

La delección del gen *eIF4G1* restablece la traducción del mRNA de *COX1*(1-512: *ARG8^m*) en una cepa $\Delta mss51$. El fenotipo de esta cepa supresora es la capacidad de crecer en un medio sin arginina. Sin embargo, la supresora no recupera la facultad de respirar, debido a que *Mss51* tiene dos funciones en el metabolismo de *Cox1*; la primera función es crucial para el inicio de la traducción del mRNA de *COX1* y la segunda está involucrada en la regulación del ensamblaje correcto de *Cox1* postraduccionalmente (Perez-Martinez et al., 2009). Por lo que la primera pregunta que nos elaboramos fue ¿Los niveles de *Cox1* se ven afectados por la delección de *eIF4G1* aun cuando *Mss51* está presente? Lo que se esperaba encontrar era un aumento en los niveles de *Cox1* y *Arg8* por que dicha mutación promueve la traducción aun sin *Mss51*, de modo que pudiera actuar como un factor habitual en el control de la traducción de *Cox1* que no se había estudiado antes. Como podemos observar en la figura 9 los niveles de *Cox1* y *Arg8* se mantienen estables en la cepa $\Delta eIF4G1$ con respecto a los niveles de proteína en la cepa WT. Este resultado sugiere que *eIF4G1* sólo participa cuando *Mss51* no está. Es decir, que normalmente reprimiría la síntesis de *Cox1* si no está *Mss51*, pero si *Mss51* se encuentra funcional, entonces no se requiere de la función de *eIF4G1*. Sin embargo, un Western Blot solo nos brinda una sección del panorama ya que con este ensayo no es posible saber qué procesos influyen en el mantenimiento de los niveles de *Cox1*. Como alguna alteración en la traducción del transcrito de *COX1* que puede compensarse con el tiempo.

8.2 La localización mitocondrial de eIF4G1 no es concluyente

En este trabajo se sugiere una localización mitocondrial del factor de inicio de la traducción eIF4G1, ya que en el laboratorio se ha encontrado que dicho factor está involucrado en el proceso de síntesis de Cox1. Por lo que se recurrió a diferentes predictoras *in silico* para tratar de predecir una posible localización de eIF4G1 en la mitocondria. Se encontró que carece de la presecuencia en el extremo amino terminal característico de las proteínas de la matriz mitocondrial. Sin embargo, hay varias proteínas de mitocondria, incluyendo de matriz mitocondrial que no poseen presecuencia (Diekert et al, 1999), por lo que no se descarta la posibilidad de que pudiera tener una localización mitocondrial. Para comprobar experimentalmente la ubicación de eIF4G1 se utilizó el método clásico para detectar la localización de una proteína específica que implica el fraccionamiento subcelular seguido del sondeo con anticuerpos control de cada fracción para determinar la presencia de la proteína de estudio que en este caso posee una etiqueta de hemaglutinina. Nuestros experimentos muestran una pequeña porción de eIF4G1-HA presente en la mitocondria, mientras que la mayoría se localiza en el citosol, como es de esperarse. Sin embargo, este método está sujeto a artefactos resultantes de las ligeras impurezas en la preparación de las fracciones. Por lo tanto, no es posible confirmar de manera concluyente que eIF4G1 sea parte del proteoma mitocondrial ya que para poder observar este factor en la mitocondria se requiere de cargar una gran cantidad de proteína (300µg), además de que es posible observar la proteína utilizada como control citosólico (Hog1 y G6PDH) en la fracción mitocondrial (figura 10).

Resolver los proteomas mitocondriales es un desafío debido a la dificultad de obtener mitocondrias 100% puras y porque muchas proteínas se encuentran en otras partes de las células como es el caso de eIF4G1 que es parte del citosol. Se sabe que hasta un 10-20 % del mitoproteoma de la levadura está compuesto por proteínas con otra ubicación en las células (Ben-Menachem and Pines, 2017; Morgenstern et al., 2017). Es posible que la localización mitocondrial de eIF4G1 en los proteomas mitocondriales fuera un artefacto (Reinders et al., 2006; Reinders et al., 2006; Flores-Mireles et al., no publicado). Sin embargo, no deja de llamar la atención que en todos estos proteomas mitocondriales aparezca eIF4G1 y no aparezca eIF4G2. Esta última hasta el momento no ha demostrado tener un efecto en la mitocondria.

Una alternativa para ubicar proteínas en la mitocondria es la fusión de la proteína fluorescente (GFP) con la proteína de interés ya que pueden visualizarse en células vivas (Westermann et al., 2000). Sin embargo, en el caso de eIF4G1, hay un problema importante que podría dificultar su detección en mitocondrias, ya que se encuentra en una gran cantidad en el citosol lo que podría eclipsar una segunda población en la mitocondria. Para resolver este problema se puede utilizar el sistema "Split GFP", donde las 11 hebras β que forman el fluoróforo GFP en forma de barril se separan en un fragmento grande que contiene las 10 hebras β N-terminales (GFP1-10) y un fragmento pequeño (16 aminoácidos) que contiene la hebra β del C-terminal. Los fragmentos solos no son fluorescentes, pero la GFP1-11 reconstituida es fluorescente. La reconstitución es espontánea, ocurre in vivo e in vitro y no requiere ningún factor adicional (Foglieni et al., 2017).

En el sistema Split-GFP para detectar proteínas mitocondriales, los primeros 10 segmentos de barril beta GFP (GFP β 1-10) se expresan a partir del genoma mitocondrial y se traducen dentro del organelo sin interferir con la función mitocondrial. El barril beta restante (GFP β 11ch), se etiqueta con la proteína de interés y se expresa a partir de los ribosomas citosólicos. Como resultado, cualquier fluorescencia detectada de GFP se origina obligatoriamente en la mitocondria, lo que demuestra una localización mitocondrial para las proteínas analizadas (Bader et al., 2020).

Otro método que podría ser útil para la identificación de proteínas en las mitocondrias basado en la complementación es el que consiste en la fragmentación de la β -galactosidasa en un fragmento α de 77 aminoácidos y uno ω de 993 aminoácidos. En este enfoque, el fragmento α se une al extremo C de la proteína de interés y se coexpresa dentro de las células de levadura con un fragmento ω expresado en la mitocondria, si los dos fragmentos se localizan en el mismo compartimento subcelular, la actividad enzimática debe detectarse mediante la producción de colonias azules en las placas que contienen X-gal (Ben-Menachem et al., 2017)

8.3 La localización de la mayoría de los interactores de eIF4G1 son de la matriz mitocondrial

La localización de la mayoría de las interactores reportados para eIF4G1 mitocondriales que en condiciones normales están en la matriz mitocondrial por lo que se genera la siguiente pregunta ¿en qué circunstancias ocurren estas interacciones? Responder esta pregunta nos puede dar una idea de la posible localización dentro del mismo organelo de nuestra proteína de interés en el caso de eIF4G1.

8.4 ¿Están relacionados los mecanismos de protección a estrés en la función de eIF4G1 en la traducción de Cox1?

Es interesante resaltar que la mayoría de las interacciones físicas reportadas en la base de datos de SGD son de un único trabajo (Jain et al. 2016) (tabla 3). Donde realizaron un análisis proteómico de los núcleos de gránulos de estrés (GE). Los GE son condensados biomoleculares, no rodeados por membranas, que consisten en mRNA y proteínas que se forman en condiciones en donde se detiene la traducción (Aryanpur et al., 2022). Los GE contienen varios componentes de proteínas o ácidos nucleicos, algunas proteínas encontradas en los gránulos de estrés en *S. cerevisiae* son las siguientes: Pub1, Pab1, eIF4G1, eIF4G2, eIF4E, Pbp1, Ngr1, Eap1, Hrp1, Ygr250c, Gbp2 y Nrp1 (Buchan et al., 2008). El ensamblaje de los GE se considera un mecanismo de protección adaptativo de las células en respuesta a ciertos estímulos externos. Cuando se somete a las células a estrés ambiental, el proceso de traducción de proteínas se suspende temporalmente, los mRNA se liberan de los ribosomas y se trasladan hacia a los GE para protegerse bajo la escolta de proteínas de unión a RNA específicas. (Morano et al., 2012). Cuando se libera el estrés, los mRNA pueden abandonar la estructura de los GE para ser degradados o volver a ser traducidos (Decker et al, 2012).

La evidencia acumulada indica que los GE están asociados al estrés mitocondrial por ejemplo el tratamiento de células de levadura con malonato, un tipo de inhibidor de la cadena respiratoria mitocondrial puede inducir el ensamblaje de los GE y estrés mitocondrial (Fu et al, 2016). Además, se ha observado que, durante el estrés por inanición, los GE interactúan con las mitocondrias y regulan la remodelación

metabólica, ya que la formación de GE conduce a una regulación negativa de la β -oxidación de ácidos grasos (FAO) a través de la modulación de los canales de aniones dependientes del voltaje mitocondrial, que importan ácidos grasos a las mitocondrias. (Amen & Kaganovich, 2021).

El ensamblaje de los gránulos de estrés se puede ver disminuido por la delección de las proteínas Pbp1 (El ortólogo de mamíferos Ataxin-2) y Pub1 (homólogo de la proteína humana TIA-1), curiosamente se ha observado que las cepas con niveles reducidos de eIF4G1 mostraron disminuciones en la cantidad de gránulos de estrés (Buchan et al., 2008).

Planteado lo anterior se propone un mecanismo no directo en la función de eIF4G1 como regulador de la síntesis de Cox1, este mecanismo sugiere que la eliminación de Mss51 provoca estrés oxidativo y la formación de los gránulos de estrés, proceso que se ve alterado por la eliminación de eIF4G1. y por lo tanto se desencadene un cambio en la traducción o la reubicación de ciertas proteínas contenidas en los GE que, modifiquen la función de la mitocondria y por consiguiente se inicie la síntesis de Cox1 sin su activador traduccional Mss51. Por lo que, se decidió eliminar a Pbp1 porque al igual que eIF4G1 es una proteína de unión a RNA, además de cumplir función en los gránulos de estrés, para probar la hipótesis de que la formación de los gránulos de estrés está asociado al traducción de Cox1, se generó una cepa sin Pbp1 con la construcción COX1(1-512::ARG8m) y sin Mss51, se espera que esta cepa sea capaz de crecer en un medio sin arginina.

Se realizaron diluciones seriadas en tres diferentes medios: glucosa, etanol/glicerol y -ARG. Contrario a lo esperado, el fenotipo -ARG no se suprime al eliminar el gen *PBP1* (Figura 15), Sin embargo, esta observación no excluye del todo a los gránulos de estrés o la función de la célula bajo estrés como parte del mecanismo de acción de eIF4G1, ya que no se ha comprobado la formación de gránulos de estrés en la ausencia de Mss51. Además, en el estudio hecho por Cunningham et al. (2023) se ha encontrado que eIF4G1 se requiere específicamente para mediar la respuesta traduccional al estrés oxidativo. Este mecanismo indica que eIF4G1 se une al cap de los mRNA y permanece asociado a los ribosomas manteniendo la traducción activa en condiciones de estrés oxidativo promoviendo cambios en el proteoma de las células, Además se encontró que esta respuesta traduccional esta mediada por la unión de eIF4G1 a la proteína Slf1. Todo lo anterior no ocurre con la isoforma eIF4G2, Mostrando funciones específicas de las isoformas. Por lo que es importante tomar en cuenta estos mecanismos de protección a estrés como posibles explicaciones a la función de eIF4G1 en la síntesis de Cox1-

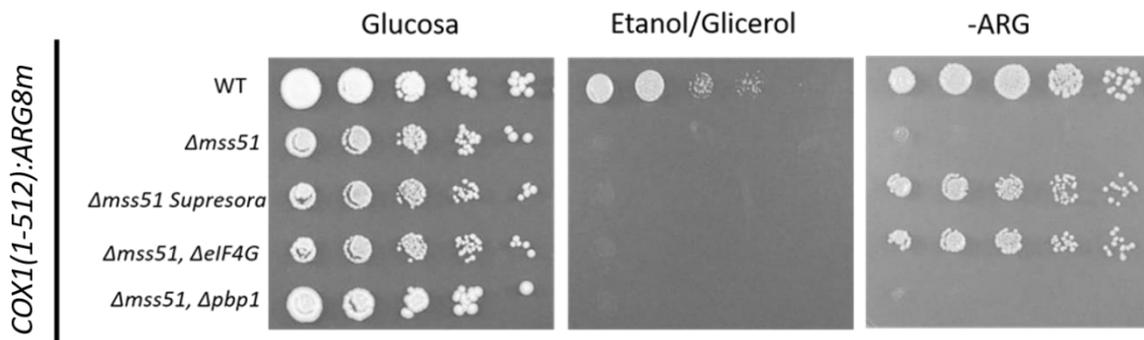


Figura 14. La eliminación del gen *PBP1* no suprime el fenotipo -ARG Diluciones seriadas en tres medios diferente; glucosa, etanol/ glicerol y -ARG en cepas que tiene la construcción COX1::ARG8 y no tienen a Mss51 a 30° C

8.5 eIF4G1 se relaciona con la función mitocondrial

La colección IMP (Integrated Mitochondrial Protein Index) identifica a eIF4G1 como una proteína auxiliar en la función mitocondrial en diversos casos. El fenotipo de enfermedad reportado desde la OMIM (base de datos de fenotipos y genes mendelianos) relaciona a eIF4G1 con la enfermedad de Parkinson, como en el caso de una familia con múltiples incidentes con Parkinson autosómico dominante. La enfermedad se explican por una mutación sin sentido c.3614G>A (p. Arg1205His) en el factor de inicio de la traducción eIF4G1, Además se han encontrado diversas mutaciones en este gen en personas que padecen Parkinson que afectan directamente la formación del complejo de inicio de la traducción, la pérdida de potencial de membrana mitocondrial y viabilidad en células sometidas a estrés oxidativo (Chartier-harlin et al., 2011).

Otro ejemplo encontrado en la literatura es el caso de un paciente con astenozoopermia severa (una reducción en la movilidad de los espermatozoides que produce infertilidad). En el trabajo de Sha et al. (2019) se encontraron mutaciones bialélicas en eIF4G1 que afectaban el dominio de unión a eIF4A. El análisis morfológico mostró abundantes defectos en la vaina mitocondrial y flagelo de los espermatozoides del paciente. Además, descubrieron que los niveles de las proteínas mitocondriales CoxIV y Atp6 también disminuyeron. Esta evidencia sugiere que eIF4G1 no solo tiene efectos sobre la mitocondria en *S. cerevisiae* sino también en otros organismos.

9. CONCLUSIONES

- La eliminación de eIF4G1 no afecta los niveles de Cox1 bajo condiciones “normales”.
- Por análisis bioinformáticos no se predijo la presencia de presecuencias que favorezcan su importación a la mitocondria en ninguna de las dos isoformas de eIF4G1. Sin embargo, mediante herramientas como Deepmito y la colección IMP se predijo una posible localización de eIF4G1 en la mitocondria a pesar de no contar con una presecuencia de direccionamiento.
- Si bien se detectaron pequeñas cantidades de eIF4G1 en mitocondrias aisladas, no se pudo comprobar contundentemente su localización en la mitocondria.
- Bioinformáticamente se encontraron al menos 25 interactores para eIF4G1 relacionados con funciones mitocondriales. La mayoría son subunidades del ribosoma mitocondrial lo que sugiere que actúa durante la traducción mitocondrial. Además, interactúa con subunidades de la cadena de transporte de electrones reforzando la hipótesis de una interacción más directa en el fenotipo supresor -Arg8. En contraste, para eIF4G2 solamente encontramos dos interactores.

10. PERSPECTIVAS

- Tratar las mitocondrias purificadas con proteinasa K para conocer si eIF4G1-HA se ubica dentro de la mitocondria o en el exterior.
- Generar cepas con el sistema “Split-GFP” para poder determinar de forma precisa si eIF4G1 se localiza dentro de la mitocondria.
- Clonar la mutante que no contenga el dominio de unión a eIF4E y una mutante que no posea el dominio de unión a 4A en eIF4G1, para reconocer si el efecto supresor es específico a una región de eIF4G1.

Literatura citada

1. Amen, T., & Kaganovich, D. (2021). Stress granules inhibit fatty acid oxidation by modulating mitochondrial permeability. *Cell Reports*, 35(11), 109237. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109237
2. Aryanpur, P. P., Mittelmeier, T. M., & Bolger, T. A. (2022). The RNA Helicase Ded1 Regulates Translation and Granule Formation during Multiple Phases of Cellular Stress Responses. *Molecular and cellular biology*, 42(1), e0024421. <https://doi.org/10.1128/MCB.00244-21>
3. Astner, I., Schulze, J., van den Heuvel, J., Jahn, D., Schubert, W., & Heinz, D. (2005). Crystal structure of 5-aminolevulinate synthase, the first enzyme of heme biosynthesis, and its link to XLSA in humans. *The EMBO Journal*, 24(18), 3166-3177. doi: 10.1038/sj.emboj.7600792

4. Abe, Y., Shodai, T., Muto, T., Mihara, K., Torii, H., & Nishikawa, S. et al. (2000). Structural Basis of Presequence Recognition by the Mitochondrial Protein Import Receptor Tom20. *Cell*, 100(5), 551-560. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80691-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80691-1)
5. Atamna, H., Killilea, D., Killilea, A., & Ames, B. (2002). Heme deficiency may be a factor in the mitochondrial and neuronal decay of aging. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 99(23), 14807-14812. doi: 10.1073/pnas.192585799
6. Bader, G., Enkler, L., Araiso, Y., Hemmerle, M., Binko, K., Baranowska, E., De Craene, J. O., Ruer-Laventie, J., Pieters, J., Tribouillard-Tanvier, D., Senger, B., di Rago, J. P., Friant, S., Kucharczyk, R., & Becker, H. D. (2020, July 13). Assigning mitochondrial localization of dual localized proteins using a yeast Bi-Genomic Mitochondrial-Split-GFP. *ELife*, 9. <https://doi.org/10.7554/elife.56649>
7. Barrientos, A. (2003). Yeast Models of Human Mitochondrial Diseases. *IUBMB Life*, 55(2), 89-95. doi: 10.1080/1521654031000098122
8. Ben-Menachem, R., & Pines, O. (2017). Detection of Dual Targeting and Dual Function of Mitochondrial Proteins in Yeast. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1567, 179-195. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6824-4_11
9. Béthune, J., Jansen, R., Feldbrügge, M., & Zarnack, K. (2019). Membrane-Associated RNA-Binding Proteins Orchestrate Organelle-Coupled

- Translation. *Trends In Cell Biology*, 29(2), 178-188. doi: 10.1016/j.tcb.2018.10.005
10. Bhagwat M, Aravind L. PSI-BLAST Tutorial. In: Bergman NH, editor. *Comparative Genomics: Volumes 1 and 2*. Totowa (NJ): Humana Press; 2007. Chapter 10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2590/>
 11. Buchan, J. R., Muhlrads, D., & Parker, R. (2008). P bodies promote stress granule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology*, 183(3), 441–455. <https://doi.org/10.1083/jcb.200807043>
 12. Brown, N. J., Costanzo, M. R., & Fox, T. D. (1994). Interactions among three proteins that specifically activate translation of the mitochondrial COX3 mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 14(2), 1045–1053. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.2.1045-1053.1994>
 13. Chacinska, A., Koehler, C., Milenkovic, D., Lithgow, T., & Pfanner, N. (2009). Importing Mitochondrial Proteins: Machineries and Mechanisms. *Cell*, 138(4), 628-644. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.005>
 14. Chartier-Harlin, M. C., Dachsel, J. C., Vilariño-Güell, C., Lincoln, S. J., Leprêtre, F., Hulihan, M. M., Kachergus, (2011). Translation initiator EIF4G1 mutations in familial Parkinson disease. *American journal of human genetics*, 89(3), 398–406. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.08.009>
 15. Chatton, B., Walter, P., Ebel, J., Lacroute, F., & Fasiolo, F. (1988). The yeast VAS1 gene encodes both mitochondrial and cytoplasmic valyl-tRNA

- synthetases. *Journal Of Biological Chemistry*, 263(1), 52-57. doi: 10.1016/s0021-9258(19)57354-9
16. Chen H, Chan DC. Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet*. 2009 Oct 15;18(R2):R169-76. doi: 10.1093/hmg/ddp326. PMID: 19808793; PMCID: PMC2758711.
17. Clarkson, B. K., Gilbert, W. V., & Doudna, J. A. (2010). Functional overlap between eIF4G isoforms in *Saccharomyces cerevisiae*. *PloS one*, 5(2), e9114. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009114>
18. Conte, A., Papa, B., Ferramosca, A., & Zara, V. (2015). The dimerization of the yeast cytochrome bc1 complex is an early event and is independent of Rip1. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*, 1853(5), 987–995. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.02.006>
19. Costanzo MC, Fox TD. Control of mitochondrial gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet*. 1990;24:91-113. doi: 10.1146/annurev.ge.24.120190.000515. PMID: 2088182.
20. Couvillion, M. T., Soto, I. C., Shipkovenska, G., & Churchman, L. S. (2016). Synchronized mitochondrial and cytosolic translation programs. *Nature*, 533(7604), 499–503. <https://doi.org/10.1038/nature18015>
21. Cunningham, J., Sfakianos, A. P., Kritsiligkou, P., Kershaw, C. J., Whitmarsh, A. J., Hubbard, S. J., Ashe, M. P., & Grant, C. M. (2023). Paralogous translation factors target distinct mRNAs to differentially regulate tolerance to

- oxidative stress in yeast. *Nucleic acids research*, gkad568. Advance online publication. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad568>
22. Das, S., Saha, U., & Das, B. (2014). Cbc2p, Upf3p and eIF4G are components of the DRN (Degradation of mRNA in the Nucleus) in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 14(6), 922-932. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12180>
23. Decker, C. J., & Parker, R. (2012). P-bodies and stress granules: possible roles in the control of translation and mRNA degradation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(9), a012286. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012286>
24. Derbikova, K., Levitsky, S., Chicherin, I., Vinogradova, E., & Kamenski, P. (2018). Activation of Yeast Mitochondrial Translation: Who Is in Charge?. *Biochemistry (Moscow)*, 83(2), 87-97. doi: 10.1134/s0006297918020013
25. De Silva, D., Poliquin, S., Zeng, R., Zamudio-Ochoa, A., Marrero, N., Perez-Martinez, X., Fontanesi, F., & Barrientos, A. (2017). The DEAD-box helicase Mss116 plays distinct roles in mitochondrial ribogenesis and mRNA-specific translation. *Nucleic acids research*, 45(11), 6628–6643. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx426>
26. Diekert, K., Kispal, G., Guiard, B., & Lill, R. (1999). An internal targeting signal directing proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*

of *America*, 96(21), 11752–11757.

<https://doi.org/10.1073/pnas.96.21.11752>

27. Foglieni, C., Papin, S., Salvadè, A. et al. Split GFP technologies to structurally characterize and quantify functional biomolecular interactions of FTD-related proteins. *Sci Rep* 7, 14013 (2017).
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-14459-w>
28. Fontanesi, F., Soto, I. C., Horn, D., & Barrientos, A. (2010). Mss51 and Ssc1 facilitate translational regulation of cytochrome c oxidase biogenesis. *Molecular and cellular biology*, 30(1), 245–259.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00983-09>
29. Fontanesi, F., Soto, I., Horn, D., & Barrientos, A. (2006). Assembly of mitochondrial cytochromec-oxidase, a complicated and highly regulated cellular process. *American Journal Of Physiology-Cell Physiology*, 291(6), C1129-C1147. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00233.2006>
30. Formosa, T., & Nittis, T. (1998). Suppressors of the temperature sensitivity of DNA polymerase alpha mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & general genetics: MGG*, 257(4), 461–468.
<https://doi.org/10.1007/s004380050670>
31. Fox T. D. (2012). Mitochondrial protein synthesis, import, and assembly. *Genetics*, 192(4), 1203–1234.
<https://doi.org/10.1534/genetics.112.141267>

32. Fukasawa, Y., Tsuji, J., Fu, S. C., Tomii, K., Horton, P., & Imai, K. (2015). MitoFates: improved prediction of mitochondrial targeting sequences and their cleavage sites. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 14(4), 1113–1126. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.043083>
33. Fu, X., Gao, X., Ge, L., Cui, X., Su, C., & Yang, W. et al. (2016). Malonate induces the assembly of cytoplasmic stress granules. *FEBS Letters*, 590(1), 22-33. doi: 10.1002/1873-3468.12049
34. Fullerton, M., McFarland, R., Taylor, R. W., & Alston, C. L. (2020). The genetic basis of isolated mitochondrial complex II deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism*, 131(1-2), 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2020.09.009>
35. Gabriel, K., Egan, B., & Lithgow, T. (2003). Tom40, the import channel of the mitochondrial outer membrane, plays an active role in sorting imported proteins. *The EMBO journal*, 22(10), 2380–2386. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg229>
36. García-Guerrero, A., Zamudio-Ochoa, A., Camacho-Villasana, Y., García-Villegas, R., Reyes-Prieto, A., & Pérez-Martínez, X. (2016). Evolution of Translation in Mitochondria. *Evolution Of The Protein Synthesis Machinery And Its Regulation*, 109-142. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39468-8_6
37. García-Villegas, R., Camacho-Villasana, Y., Shingú-Vázquez, M., Cabrera-Orefice, A., Uribe-Carvajal, S., Fox, T., & Pérez-Martínez, X. (2017). The Cox1

- C-terminal domain is a central regulator of cytochrome c oxidase biogenesis in yeast mitochondria. *Journal Of Biological Chemistry*, 292(26), 10912-10925. doi: 10.1074/jbc.m116.773077
38. Gehrke, S., Wu, Z., Klinkenberg, M., Sun, Y., Auburger, G., Guo, S. and Lu, B., 2015. PINK1 and Parkin Control Localized Translation of Respiratory Chain Component mRNAs on Mitochondria Outer Membrane. *Cell Metabolism*, 21(1), pp.95-108.
39. Gerber, A., Herschlag, D., & Brown, P. (2004). Extensive Association of Functionally and Cytotopically Related mRNAs with Puf Family RNA-Binding Proteins in Yeast. *Plos Biology*, 2(3), e79. doi: 10.1371/journal.pbio.0020079
40. Gin, P., Hsu, A. Y., Rothman, S. M., Jonassen, T., Lee, P. D., Tzagoloff, A., & Clarke, C. F. (2003). The *Saccharomyces cerevisiae* COQ6 Gene Encodes a Mitochondrial Flavin-dependent Monooxygenase Required for Coenzyme Q Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 278(28), 25308–25316. <https://doi.org/10.1074/jbc.m303234200>
41. Gotor, N. L., Armaos, A., Calloni, G., Torrent Burgas, M., Vabulas, R. M., De Groot, N. S., & Tartaglia, G. G. (2020). RNA-binding and prion domains: the Yin and Yang of phase separation. *Nucleic acids research*, 48(17), 9491–9504. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa681>
42. Gold, V. a. M., Chroscicki, P., Bragoszewski, P., & Chacinska, A. (2017). Visualization of cytosolic ribosomes on the surface of mitochondria by

- electron cryo-tomography. *EMBO Reports*, 18(10), 1786–1800.
<https://doi.org/10.15252/embr.201744261>
43. Goyer, C., Altmann, M., Lee, H. S., Blanc, A., Deshmukh, M., Woolford, J. L., Jr, Trachsel, H., & Sonenberg, N. (1993). TIF4631 and TIF4632: two yeast genes encoding the high-molecular-weight subunits of the cap-binding protein complex (eukaryotic initiation factor 4F) contain an RNA recognition motif-like sequence and carry out an essential function. *Molecular and cellular biology*, 13(8), 4860–4874.
<https://doi.org/10.1128/mcb.13.8.4860-4874.1993>
44. Graack, H., & Wittmann-Liebold, B. (1998). Mitochondrial ribosomal proteins (MRPs) of yeast. *Biochemical Journal*, 329(3), 433-448. doi: 10.1042/bj3290433
45. Grant, C., Collinson, L., Roe, J., & Dawes, I. (1996). Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Molecular Microbiology*, 21(1), 171-179. doi: 10.1046/j.1365-2958.1996.6351340.x
46. Gray, M. (2015). Mosaic nature of the mitochondrial proteome: Implications for the origin and evolution of mitochondria. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 112(33), 10133-10138. doi: 10.1073/pnas.1421379112
47. Green-Willms, N. S., Butler, C. A., Dunstan, H. M., & Fox, T. R. (2001). Pet111p, an Inner Membrane-bound Translational Activator That Limits

- Expression of the *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondrial Gene COX2.
Journal of Biological Chemistry, 276(9), 6392–6397.
<https://doi.org/10.1074/jbc.m009856200>
48. Grousl, T., Vojtova, J., Hasek, J., & Vomastek, T. (2021). Yeast stress granules at a glance. *Yeast*, 39(4), 247–261. <https://doi.org/10.1002/yea.3681>
49. Hartley, A.M., Lukoyanova, N., Zhang, Y. et al (2019). Structure of yeast cytochrome c oxidase in a supercomplex with cytochrome bc1. *Nat Struct Mol Biol* 26, 78–83. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0172-z>
50. Herrmann, J., Woellhaf, M., & Bonnefoy, N. (2013). Control of protein synthesis in yeast mitochondria: The concept of translational activators. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(2), 286-294. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.03.007
51. Iborra, F., Jackson, D., & Cook, P. (2004). The case for nuclear translation. *Journal Of Cell Science*, 117(24), 5713-5720. <https://doi.org/10.1242/jcs.01538>
52. Kafasla, P., Barrass, J. D., Thompson, E., Fromont-Racine, M., Jacquier, A., Beggs, J. D., & Lewis, J. (2009). Interaction of yeast eIF4G with spliceosome components: implications in pre-mRNA processing events. *RNA biology*, 6(5), 563–574. <https://doi.org/10.4161/rna.6.5.9861>
53. Ieva, R., Heißwolf, A., Gebert, M., Vögtle, F., Wollweber, F., & Mehnert, C. et al. (2013). Mitochondrial inner membrane protease promotes assembly of

- presequence translocase by removing a carboxy-terminal targeting sequence. *Nature Communications*, 4(1). doi: 10.1038/ncomms3853
54. Kang, P., Ostermann, J., Shilling, J., Neupert, W., Craig, E., & Pfanner, N. (1990). Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature*, 348(6297), 137-143. doi: 10.1038/348137a0
55. Kellems, R. E., Allison, V. F., & Butow, R. A. (1975). Cytoplasmic type 80S ribosomes associated with yeast mitochondria. IV. Attachment of ribosomes to the outer membrane of isolated mitochondria. *Journal of Cell Biology*, 65(1), 1-14. <https://doi.org/10.1083>
56. Kershaw, C., Costello, J., Talavera, D., Rowe, W., Castelli, L., & Sims, P. et al. (2015). Integrated multi-omics analyses reveal the pleiotropic nature of the control of gene expression by Puf3p. *Scientific Reports*, 5(1). doi: 10.1038/srep15518
57. Kulawiak, B., Höpker, J., Gebert, M., Guiard, B., Wiedemann, N., & Gebert, N. (2013). The mitochondrial protein import machinery has multiple connections to the respiratory chain. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1827(5), 612-626. doi: 10.1016/j.bbabi.2012.12.004
58. Kurita, O., & Nishida, Y. (1999). Involvement of mitochondrial aldehyde dehydrogenase ALD5 in maintenance of the mitochondrial electron transport chain in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 181(2), 281-287. doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb08856.x

59. Lasserre, J., Dautant, A., Aiyar, R., Kucharczyk, R., Glatigny, A., & Tribouillard-Tanvier, D. et al. (2015). Yeast as a system for modeling mitochondrial disease mechanisms and discovering therapies. *Disease Models & Mechanisms*, 8(6), 509-526. doi: 10.1242/dmm.020438
60. Lesnik, C., Cohen, Y., Atir-Lande, A., Schuldiner, M., & Arava, Y. (2014). OM14 is a mitochondrial receptor for cytosolic ribosomes that supports co-translational import into mitochondria. *Nature Communications*, 5(1). doi: 10.1038/ncomms6711
61. Lesnik, C., Golani-Armon, A., & Arava, Y. (2015). Localized translation near the mitochondrial outer membrane: An update. *RNA Biology*, 12(8), 801-809. doi: 10.1080/15476286.2015.1058686
62. Letts, J. A., & Sazanov, L. A. (2017). Clarifying the supercomplex: the higher-order organization of the mitochondrial electron transport chain. *Nature structural & molecular biology*, 24(10), 800-808. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3460>
63. Lazowska, J., Jacq, C., & Slonimski, P. P. (1980). Sequence of introns and flanking exons in wild-type and box3 mutants of cytochrome b reveals an interlaced splicing protein coded by an intron. *Cell*, 22(2 Pt 2), 333-348. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(80\)90344-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90344-x)
64. Manon, S., & Guerin, M. (1989, October). Modifications of the relative proteolipid composition in the ATP synthase of a respiratory competent mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)*

- Biomembranes, 985(2), 127–132. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(89\)90356-8](https://doi.org/10.1016/0005-2736(89)90356-8)
65. Mayorga, J. P., Camacho-Villasana, Y., Shingú-Vázquez, M., García-Villegas, R., Zamudio-Ochoa, A., García-Guerrero, A. E., Hernández, G., & Pérez-Martínez, X. (2016). A Novel Function of Pet54 in Regulation of Cox1 Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, 291(17), 9343–9355. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.721985>
66. Margulis L. Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. *Symp Soc Exp Biol.* 1975;(29):21-38. PMID: 822529.
67. Markwell, M. A., Haas, S. M., Bieber, L. L., & Tolbert, N. E. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical biochemistry*, 87(1), 206–210. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90586-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90586-9)
68. McMullin, T. W., & Fox, T. D. (1993). COX3 mRNA-specific translational activator proteins are associated with the inner mitochondrial membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 268(16), 11737–11741.
69. Mick, D. U., Fox, T. D., & Rehling, P. (2011). Inventory control: cytochrome c oxidase assembly regulates mitochondrial translation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12(1), 14–20. <https://doi.org/10.1038/nrm3029>

70. Minard, K., & McAlister-Henn, L. (1991). Isolation, nucleotide sequence analysis, and disruption of the MDH2 gene from *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for three isozymes of yeast malate dehydrogenase. *Molecular And Cellular Biology*, 11(1), 370-380. doi: 10.1128/mcb.11.1.370-380.1991
71. Morano, K. A., Grant, C. M., & Moye-Rowley, W. S. (2012). The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190(4), 1157–1195. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.128033>
72. Neupert, W., & Herrmann, J. (2007). Translocation of Proteins into Mitochondria. *Annual Review Of Biochemistry*, 76(1), 723-749. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.052705.163409>
73. Orchard, S., Ammari, M., Aranda, B., Breuza, L., Briganti, L., Broackes-Carter, F., Campbell, N. H., Chavali, G., Chen, C., del-Toro, N., Duesbury, M., Dumousseau, M., Galeota, E., Hinz, U., Iannuccelli, M., Jagannathan, S., Jimenez, R., Khadake, J., Lagreid, A., Licata, L., ... Hermjakob, H. (2014). The MIntAct project--IntAct as a common curation platform for 11 molecular interaction databases. *Nucleic acids research*, 42(Database issue), D358–D363. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1115>
74. Ott M, Amunts A, Brown A. Organization and Regulation of Mitochondrial Protein Synthesis. *Annu Rev Biochem*. 2016 Jun 2;85:77-101. doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014334. Epub 2016 Jan 18. PMID: 26789594

75. Overkamp, K. M., Bakker, B. M., Kötter, P., van Tuijl, A., de Vries, S., van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (2000). In vivo analysis of the mechanisms for oxidation of cytosolic NADH by *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Journal of bacteriology*, 182(10), 2823–2830. <https://doi.org/10.1128/JB.182.10.2823-2830.2000>
76. Park, E. Y., Zhang, F., Blomberg, A., Sunnerhagen, P., & Hinnebusch, A. G. (2011). Depletion of eIF4G from yeast cells narrows the range of translational efficiencies genome-wide. *BMC Genomics*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-68>
77. Perez-Martinez, X., Broadley, S. A., & Fox, T. D. (2003). Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. *The EMBO journal*, 22(21), 5951–5961. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg566>
78. Pérez-Martínez, X., Butler, C. A., Shingu-Vazquez, M., & Fox, T. R. (2009). Dual Functions of Mss51 Couple Synthesis of Cox1 to Assembly of Cytochrome c Oxidase in *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondria. *Molecular Biology of the Cell*, 20(20), 4371–4380. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-06-0522>
79. Pestova, T. V., Hellen, C. U., & Shatsky, I. N. (1996). Canonical eukaryotic initiation factors determine initiation of translation by internal ribosomal entry. *Molecular and cellular biology*, 16(12), 6859–6869. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.12.6859>

80. Prévôt, D., Darlix, J. L., & Ohlmann, T. (2003). Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. *Biology of the cell*, 95(3-4), 141–156. [https://doi.org/10.1016/s0248-4900\(03\)00031-5](https://doi.org/10.1016/s0248-4900(03)00031-5)
81. Rajagopal, V., Park, E., Hinnebusch, A., & Lorsch, J. (2012). Specific Domains in Yeast Translation Initiation Factor eIF4G Strongly Bias RNA Unwinding Activity of the eIF4F Complex toward Duplexes with 5'-Overhangs. *Journal Of Biological Chemistry*, 287(24), 20301-20312.
82. Reinders, J., Zahedi, R. P., Pfanner, N., Meisinger, C., & Sickmann, A. (2006). Toward the complete yeast mitochondrial proteome: multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics. *Journal of proteome research*, 5(7), 1543–1554. <https://doi.org/10.1021/pr050477f>
83. Richie, D., Thompson, K., Studer, C., Prindle, V., Aust, T., & Riedl, R. et al. (2013). Identification and Evaluation of Novel Acetolactate Synthase Inhibitors as Antifungal Agents. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 57(5), 2272-2280. doi: 10.1128/aac.01809-12
84. Roloff, G. A., & Henry, M. R. (2015). Mam33 promotes cytochrome oxidase subunit I translation in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Molecular Biology of the Cell*, 26(16), 2885–2894. <https://doi.org/10.1091/mbc.e15-04-0222>
85. Saint-Prix, F., Bönquist, L., & Dequin, S. (2004). Functional analysis of the ALD gene family of *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth on glucose: the NADP⁺-dependent Ald6p and Ald5p isoforms play a major role

- in acetate formation. *Microbiology (Reading, England)*, 150(Pt 7), 2209–2220. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26999-0>
86. Saraste M. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science*. 1999 Mar 5;283(5407):1488-93. doi: 10.1126/science.283.5407.1488. PMID: 10066163.
87. Saveanu, C., Fromont-Racine, M., Harington, A., Ricard, F., Namane, A., & Jacquier, A. (2001). Identification of 12 new yeast mitochondrial ribosomal proteins including 6 that have no prokaryotic homologues. *The Journal of biological chemistry*, 276(19), 15861–15867. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010864200>
88. Savojardo, C., Bruciaferri, N., Tartari, G., Martelli, P. L., & Casadio, R. (2020). DeepMito: accurate prediction of protein sub-mitochondrial localization using convolutional neural networks. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 36(1), 56–64. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz512>
89. Séraphin, B., Simon, M., Boulet, A., & Faye, G. (1989). Mitochondrial splicing requires a protein from a novel helicase family. *Nature*, 337(6202), 84–87. <https://doi.org/10.1038/337084a0>
90. Sha, Y., Liu, W., Huang, X., Li, Y., Ji, Z., Mei, L., Lin, S., Kong, S., Lu, J., Kong, L., Zhu, X., Lu, Z., & Ding, L. (2019). EIF4G1 is a novel candidate gene associated with severe asthenozoospermia. *Molecular genetics & genomic medicine*, 7(8), e807. <https://doi.org/10.1002/mgg3.807>

91. Shingú-Vázquez, M., Camacho-Villasana, Y., Sandoval-Romero, L., Butler, C., Fox, T., & Pérez-Martínez, X. (2010). The Carboxyl-terminal End of Cox1 Is Required for Feedback Assembly Regulation of Cox1 Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondria. *Journal Of Biological Chemistry*, 285(45), 34382-34389.
<https://doi.org/10.1074/jbc.m110.161976>
92. Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H. E., Schönfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., Rehling, P., Pfanner, N., & Meisinger, C. (2003). The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100
93. Soto, I., Fontanesi, F., Myers, R. S., Hamel, P., & Barrientos, A. (2012). A Heme-Sensing Mechanism in the Translational Regulation of Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Biogenesis. *Cell Metabolism*, 16(6), 801–813.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.10.018>
94. Steele, D. F., Butler, C. A., & Fox, T. D. (1996). Expression of a recoded nuclear gene inserted into yeast mitochondrial DNA is limited by mRNA-specific translational activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(11), 5253–5257.
<https://doi.org/10.1073/pnas.93.11.5253>
95. Suhm, T., Kaimal, J., Dawitz, H., Peselj, C., Masser, A., & Hanzén, S. et al. (2018). Mitochondrial Translation Efficiency Controls Cytoplasmic Protein

- Homeostasis. *Cell Metabolism*, 27(6), 1309-1322.e6. doi: 10.1016/j.cmet.2018.04.011
96. Takeda, M., Chen, W. J., Saltzgaber, J., & Douglas, M. (1986). Nuclear genes encoding the yeast mitochondrial ATPase complex. Analysis of ATP1 coding the F1-ATPase alpha-subunit and its assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 261(32), 15126–15133. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)66841-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)66841-3)
97. Taylor, A., Hu, G., Hart, P., & McAlister-Henn, L. (2008). Allosteric Motions in Structures of Yeast NAD⁺-specific Isocitrate Dehydrogenase. *Journal Of Biological Chemistry*, 283(16), 10872-10880. doi: 10.1074/jbc.m708719200
98. Taylor, A., Smith, B., Kitada, S., Kojima, K., Miyaura, H., & Otwinowski, Z. et al. (2001). Crystal Structures of Mitochondrial Processing Peptidase Reveal the Mode for Specific Cleavage of Import Signal Sequences. *Structure*, 9(7), 615-625. doi: 10.1016/s0969-2126(01)00621-9
99. Tibbetts, A., Sun, Y., Lyon, N., Ghrist, A., & Trotter, P. (2002). Yeast mitochondrial oxodicarboxylate transporters are important for growth on oleic acid. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, 406(1), 96-104. doi: 10.1016/s0003-9861(02)00419-8
100. Verma, Y., Mehra, U., Pandey, D., Kar, J., Pérez-Martínez, X., Jana, S. S., & Datta, K. (2021). MRX8, the conserved mitochondrial YihA GTPase family member, is required for de novo Cox1 synthesis at suboptimal

- temperatures in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 32(21). <https://doi.org/10.1091/mbc.e20-07-0457>
101. Vögtle, F., Wortelkamp, S., Zahedi, R., Becker, D., Leidhold, C., & Gevaert, K. et al. (2009). Global Analysis of the Mitochondrial N-Proteome Identifies a Processing Peptidase Critical for Protein Stability. *Cell*, 139(2), 428-439. doi: 10.1016/j.cell.2009.07.045
102. Voisine, C., Craig, E., Zufall, N., von Ahsen, O., Pfanner, N., & Voos, W. (1999). The Protein Import Motor of Mitochondria. *Cell*, 97(5), 565-574. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80768-0
103. Wang, F., Zhang, D., Zhang, D., Li, P., & Gao, Y. (2021). Mitochondrial Protein Translation: Emerging Roles and Clinical Significance in Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.675465>
104. Weraarpachai, W., Antonicka, H., Sasarman, F. et al. (2009). Mutation in TACO1, encoding a translational activator of COX I, results in cytochrome c oxidase deficiency and late-onset Leigh syndrome. *Nat Genet* 41, 833–837 <https://doi.org/10.1038/ng.390>
105. Westermann, B., & Neupert, W. (2000). Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, 16(15), 1421–1427. [https://doi.org/10.1002/1097-0061\(200011\)16:15<1421::AID-YEA624>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1097-0061(200011)16:15<1421::AID-YEA624>3.0.CO;2-U)

106. Wiederhold, E., Veenhoff, L., Poolman, B., & Slotboom, D. (2009). Proteomics of *Saccharomyces cerevisiae* Organelles. *Molecular & Cellular Proteomics*, 9(3), 431-445. doi: 10.1074/mcp.r900002-mcp200
107. Williams, C., Jan, C., & Weissman, J. (2014). Targeting and plasticity of mitochondrial proteins revealed by proximity-specific ribosome profiling. *Science*, 346(6210), 748-751. doi: 10.1126/science.1257522
108. Yamano, K., Kuroyanagi-Hasegawa, M., Esaki, M., Yokota, M., & Endo, T. (2008). Step-size Analyses of the Mitochondrial Hsp70 Import Motor Reveal the Brownian Ratchet in Operation. *Journal of Biological Chemistry*, 283(40), 27325-27332. doi: 10.1074/jbc.m805249200
109. Yogev, O., & Pines, O. (2011). Dual targeting of mitochondrial proteins: mechanism, regulation and function. *Biochimica et biophysica acta*, 1808(3), 1012–1020. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.07.004>
110. Zhao, R., Jiang, S., Zhang, L., & Yu, Z. (2019). Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *International Journal of Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4188>
111. Zerbes, R., Höß, P., Pfanner, N., van der Laan, M., & Bohnert, M. (2016). Distinct Roles of Mic12 and Mic27 in the Mitochondrial Contact Site and Cristae Organizing System. *Journal Of Molecular Biology*, 428(8), 1485-1492. doi: 10.1016/j.jmb.2016.02.031