



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

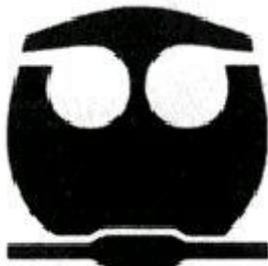
MAPEO DE LAS INTERACCIONES
GENÉTICAS DEL COMPLEJO NAC Y SU
RELEVANCIA DURANTE EL PROCESO
CO-TRADUCCIONAL DE IMPORTACIÓN
DE PROTEÍNAS A LA MITOCONDRIA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:

J O S É CARLOS PONCE ROJAS



Tutora: DRA. MARÍA SOLEDAD FUNES ARGÜELLO

MÉXICO, D. F.

Agosto 2012



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.

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. María Soledad Funes Argüello en el laboratorio 204 Sur del Departamento de Genética Molecular de la División de Ciencias Básicas del Instituto de Fisiología Celular (UNAM).

El comité tutor que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo conformado por:

Dra. Xóchitl Pérez Martínez Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco Facultad de Medicina, UNAM

Dra. María Soledad Funes Argüello Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Al Dr. Alexander de Luna Fors y la Dra. Erika Garay del Laboratorio de Sistemas Genéticos del LANGEBIO, CINVESTAV, Irapuato. Por su colaboración y excelente asesoría para la realización de los experimentos de SGA.

A la Dra. Fabiola Jaimes Miranda por la ayuda técnica brindada y por su valiosa participación en este trabajo.

Este trabajo constituye parte del proyecto de investigación apoyado por el donativo 105631 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), así como por el donativo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA, UNAM) número IN215810.

A la Dra. Laura Ongay Larios, a la Biól. Guadalupe Códiz Huerta y a la M. en C. Minerva Mora Cabrera miembros de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular (UNAM) por la síntesis de oligonucleótidos y secuenciación de plásmidos.

A Gerardo Coello Coutiño, Juan Manuel Barbosa Castillo e Ivette Rosas Arciniega miembros de la Unidad de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular (UNAM) por su ayuda técnica.

AGRADECIMIENTOS

Primero que nadie a usted, Dra. Soledad. No tengo nada más agradecerle con el corazón el haberme permitido entrar en su grupo de trabajo. Me ha enseñado muchísimo en todo este tiempo... porque siempre tiene atención para cualquier idea y las palabras adecuadas para guiar el camino... por convertir la estancia en el laboratorio en una experiencia muy grata y alegre de trabajo en equipo...

A mis compañeros del laboratorio 204 Sur... muchas gracias por todo su apoyo... porque todos sus consejos, comentarios y compañía me han ayudado enormemente a crecer en todos los aspectos... A Fabiola, José Luis, Manuel e Itzel...

A Paola... has iluminado mi vida y mi corazón... confías en mi tanto como nadie y siempre me das todo tu apoyo a pesar de lo complicado que el panorama pueda ser... este trabajo es de ambos, porque tu amor y tu comprensión inspiran mi corazón para seguir luchando por los sueños que persigo... gracias por ser mi luz, mi apoyo e inspiración...

A mi mamá... Que cuando leas estas líneas, sientas el logro que esto representa, tanto para mí como sé que para ti. Esto es nuestro, porque hasta ahora no te has detenido al luchar por mí, y tu amor siempre me da alegría y ganas de continuar... hemos recorrido este camino juntos... te dedico este trabajo con todo mi amor...

Finalmente a mi Padre... porque sin ti no podría haber hecho nada de lo que me he propuesto hasta ahora... siempre me has cuidado, aconsejado y me has dado alas y aliento para llegar tan lejos como pueda... este trabajo es una pequeña respuesta a todo el amor que me has brindado...

Índice

1. Resumen	7
2. Introducción	8
2.1 Importación de proteínas a la mitocondria	9
2.1.1 Las secuencias señal de proteínas mitocondriales.....	9
2.1.2 La vía de entrada: el complejo TOM	10
2.1.3 Distribución a los diferentes subcompartimentos mitocondriales	11
2.2 ¿Existe una ruta co-traducciona de importación de proteínas a la mitocondria?	13
2.3 Evidencias del modelo co-traducciona de importación	15
2.4 Proteínas asociadas a la importación co-traducciona de proteínas mitocondriales	16
2.5 El complejo NAC (complejo de asociación a polipéptidos nacientes)	17
2.5.1 NAC en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
2.5.2 Función de NAC	19
2.6 Modelo de estudio: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
3. Antecedentes	22
4. Hipótesis	24
5. Objetivos	25
5.1 Objetivo general	25
5.2 Objetivo particular	25
6. Materiales y Métodos	26
6.1 Cepas y plásmidos utilizados	26
6.2 Preparación de células competentes (<i>E. coli</i>)	27
6.3 Transformación de bacterias	27
6.4 Purificación de plásmidos	28
6.5 PCR para amplificar módulos de selección a antibióticos y auxotrofia	28
6.6 Generación de cepas mutantes a los genes del complejo NAC	29
6.7 Confirmación de cepas de levadura mutantes	30
6.8 Electroforesis en geles de agarosa	30
6.9 Análisis de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i>	31
6.10 Evaluación de crecimiento después de estrés oxidativo	31
6.11 Rastreo de interacciones genéticas (SGA)	32
7. Resultados	36
7.1 Purificación de plásmidos pAG25, pAG32, pAG60	36
7.2 PCR de los módulos de resistencia a antibióticos y auxotrofia	36
7.3 Generación de cepas mutantes	37

7.4 El fenotipo de crecimiento de las cepas mutantes a los genes <i>EGD1</i> , <i>BTT1</i> y <i>EGD2</i> no se ve afectado tanto en condiciones de fermentación como de respiración	39
7.5 La ausencia de complejo NAC compromete la resistencia a estrés oxidativo	40
7.6 Rastreo de interacciones genéticas o SGA	41
7.7 Comparación de interacciones genéticas y réplica a medio respiratorio	47
8. Discusión	51
8.1 Análisis del fenotipo de las mutantes $\Delta\alpha$, $\Delta\beta$ y Δnac	52
8.2 Interacciones genéticas observadas y su relevancia en importación a la mitocondria	54
9. Conclusiones	60
10. Perspectivas	61
11. Apéndices	62
12. Referencias	86

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ADP	Adenosindifosfato
ATP	Adenosintrifosfato
CCCP	Carbonilcianida <i>m</i> -clorofenilhidrazona
CMS	Colección de mutantes sencillas
DO	Densidad óptica
mt	Mitocondrial
MTS	Presecuencia mitocondrial, de las siglas en inglés " <i>Mitochondrial Targeting Signal</i> "
ORF	Marco de lectura abierto, de las siglas inglés " <i>Open Reading Frame</i> "
rpm	Revoluciones por minuto
SGA	Rastreo de interacciones genéticas, de las siglas en inglés " <i>Synthetic Genetic Array</i> "
UTR	Región no traducida de un ARN, de las siglas en inglés " <i>Untranslated Region</i> "
WT	Cepa silvestre, de las siglas en inglés " <i>Wild Type</i> "
β-ME	β-mercaptoetanol
ΔΨ	Potencial de membrana mitocondrial

1. Resumen

La mayor parte de las proteínas mitocondriales son codificadas por genes nucleares y se sintetizan por ribosomas en el citoplasma celular. En general, se considera que su transporte a la mitocondria, o *importación*, sigue un modelo *post-traducciona*l. Es decir, las proteínas se sintetizan por completo en el citosol asociándose con chaperonas que evitan su agregación irreversible y las guían hasta su posterior translocación. Sin embargo, existe un grupo de proteínas que no sigue este modelo. Para estos casos se ha propuesto que su importación ocurre de manera *co-traducciona*l, donde la traducción y la translocación ocurren de manera acoplada. A pesar de ser un proceso descrito desde hace varias décadas, hasta ahora no se han dilucidado claramente los mecanismos que rigen la ruta co-traducciona

Uno de los complejos que se ha relacionado con la importación co-traducciona

En organismos como moscas, nemátodos y ratones, la eliminación de los genes que codifican para cada una de las subunidades del complejo NAC es letal. Sin embargo, no genera ningún fenotipo observable en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Tomando en cuenta que existen procesos metabólicos que pueden ser llevados a cabo por uno o varios sistemas, una posible explicación para lo observado en levadura es que existen proteínas o complejos proteicos que tienen una función redundante a NAC.

El presente trabajo tuvo como objetivo identificar las interacciones genéticas del complejo NAC en la levadura *S. cerevisiae*, en otras palabras, identificar genes cuya eliminación simultánea con los genes de NAC, comprometa la viabilidad del organismo. Esto llevará a identificar proteínas funcionalmente redundantes a NAC que tengan un papel papel en la biogénesis mitocondrial, en particular durante la importación co-traducciona

2. Introducción

Las mitocondrias son organelos presentes en células eucariontes que participan en diversos procesos metabólicos esenciales como son la producción de energía, la muerte celular programada, algunos procesos de señalización, la formación de centros hierro/azufre, así como el metabolismo de lípidos y aminoácidos (Revisado en Chacinska y cols., 2009). Estos organelos se componen de dos membranas: una externa y una interna (Revisado en Okamoto y Shaw, 2005). Ambas membranas tienen una composición lipídica distinta y por lo tanto propiedades diferentes. La membrana externa está en contacto con el citosol y delimita al organelo. La membrana interna extiende prolongaciones tubulares denominadas crestas mitocondriales hacia el espacio acuoso que rodea: la matriz mitocondrial. Esta membrana aloja a todos los complejos necesarios para la producción de energía en forma de ATP. La porción de la membrana interna que no forma crestas mitocondriales, delimita junto con la membrana externa al espacio intermembranal. Finalmente en la matriz mitocondrial se llevan a cabo reacciones químicas relacionadas con los procesos celulares arriba mencionados, además de que contiene el ADN mitocondrial (Harner y cols., 2011; Malsburg y cols., 2011).

Se ha postulado que las mitocondrias derivan de un evento endosimbiótico (Margulis, 1970), en el cual un ancestro procarionte “engulló” a una célula de la familia de las α -proteobacterias. Esta asociación simbiótica se ha mantenido a lo largo de la evolución y una gran parte del genoma de dicha α -proteobacteria se perdió. Por un lado al representar funciones redundantes y por otro debido a una migración gradual al núcleo de la célula hospedera (Andersson y cols., 2003).

Actualmente se estima que el 99% de todas las proteínas mitocondriales están codificadas en el genoma nuclear, mientras que el genoma mitocondrial contiene únicamente el 1% de los genes. Para llevar a cabo las funciones mencionadas anteriormente, las mitocondrias albergan un grupo grande de proteínas (aproximadamente 1000 proteínas en levadura), las cuales se

sintetizan principalmente por ribosomas citosólicos. Esto implica la existencia de un sistema que pueda reconocer a las proteínas mitocondriales sintetizadas en el citosol para llevarlas al interior de la mitocondria (Lithgow, 2000; Revisado en Neupert y Herrmann, 2007; Revisado en Chacinska y cols., 2009).

2.1 Importación de proteínas a la mitocondria

Existe un sistema de translocación y distribución de proteínas mitocondriales, que consta tanto de elementos citoplasmáticos como del organelo. Su función es reconocer específicamente proteínas de éste organelo y distribuir las al subcompartimento requerido. El proceso empieza con la síntesis de la proteína por los ribosomas del citosol. Una vez sintetizada, se asocia a chaperonas del tipo Hsp70/90 que evitan su agregación y guían su transporte hasta proteínas receptoras en la membrana externa mitocondrial (Young y cols. 2003; Li y cols., 2009). Una vez que han alcanzado la superficie externa del organelo, se distribuyen a los diferentes subcompartimentos en procesos dependientes o independientes del potencial de membrana ($\Delta\Psi$) y de ATP. A continuación se dará una descripción más detallada del proceso.

2.1.1 Las secuencias señal de proteínas mitocondriales

Las proteínas mitocondriales se sintetizan con señales en su cadena de aminoácidos que las dirigen hacia la mitocondria. Las más representativas son las “presecuencias” o MTSs (de las siglas en inglés de *Mitochondrial Targeting Signal*), regiones en el extremo amino terminal de la proteína que tienden a adoptar una estructura de alfa hélice anfifílica (hélice con una cara hidrofóbica y una cara con cargas positivas, Moberg, 2004). Las proteínas que tienen MTS dependen del potencial de membrana ($\Delta\Psi$) para ser importadas, ésto debido al efecto electroforético que crea el $\Delta\Psi$ sobre la MTS. Una vez que ingresan a la matriz, se editan por la proteasa MPP (de las siglas en inglés de *Mitochondrial Processing Protease*) que las convierte a su forma madura (de menor peso molecular) (Revisado en Neupert y Herrmann, 2007).

En algunos casos, las MTSs están seguidas por segmentos hidrofóbicos internos, que funcionan para anclar a proteínas de membrana interna. Algunas proteínas residentes del espacio intermembranal tienen la misma estructura, sólo que la eliminación de la MTS es seguida por otra edición del segmento hidrofóbico por la proteasa del espacio intermembranal Imp1 (Glick y cols., 1992).

Sin embargo no todas las proteínas mitocondriales presentan MTSs. Algunas de las proteínas integrales de la membrana interna, como los acarreadores de fosfatos o los translocadores de ADP/ATP, contienen secuencias internas que no son editables (Wiedemann y cols., 2001).

Otro tipo de proteínas son las del espacio intermembranal, que contienen cisteínas que les permiten formar enlaces covalentes con la proteína receptora Mia40 (residente en la membrana interna). Mediante reacciones de óxido-reducción, estas proteínas se liberan al espacio intermembranal (Herrmann y Riemer, 2012).

2.1.2 La vía de entrada: el complejo TOM

Una vez que la proteína mitocondrial se ha sintetizado por completo en los ribosomas citosólicos (Figura 1, paso 1), se lleva al complejo TOM de la membrana externa mitocondrial para su incorporación al organelo.

El complejo TOM (por las siglas en inglés de *Translocase of the Outer Membrane*) es el poro de entrada principal por el que ingresa la gran mayoría de las proteínas sintetizadas en ribosomas citosólicos y destinadas a la mitocondria. Está constituido por un dímero de la proteína Tom40 que se asocia con cuatro receptores encargados de reconocer y translocar proteínas mitocondriales: Tom20, Tom70, Tom71 y Tom22. Tom20 une preferentemente proteínas con secuencias señal en el extremo amino terminal (MTSs, Saitoh y cols., 2007), mientras que Tom70 reconoce preferencialmente proteínas con señales internas (Young y cols., 2003). Sin embargo, se ha observado que ambos pueden compensar mutuamente su función. Una vez que reconocen a la proteína

blanco, la ceden al receptor común Tom22 que a su vez la entrega al poro transmembranal Tom40, por el cual la proteína ingresa al espacio intermembranal. Para el caso de Tom71, se ha observado que puede unir proteínas con señales internas de manera similar a Tom70, aunque con menor afinidad (Schlossmann y cols., 1996).

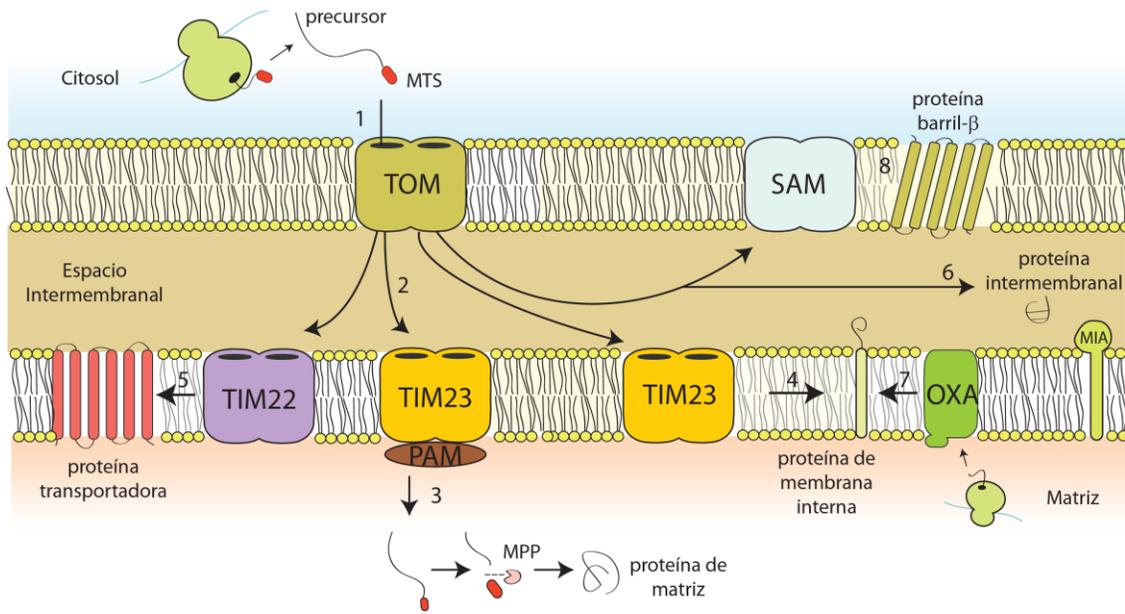


Figura 1. Modelo de importación post-traduccional de proteínas a la mitocondria. Las proteínas se sintetizan por completo en el citosol y después se llevan a la membrana externa mitocondrial. Con la ayuda de diferentes complejos proteicos, la proteína es guiada hacia el subcompartimento mitocondrial requerido. Ver detalles en el texto.

2.1.3 Distribución a los diferentes subcompartimentos mitocondriales

Dependiendo del destino final de cada proteína mitocondrial, su distribución se lleva a cabo por TOM de manera coordinada con alguno de los siguientes complejos proteicos.

Para las proteínas residentes de la matriz, el complejo TIM23 (de las siglas en inglés de *Translocase of the Inner Membrane*) en asociación con el

complejo motor PAM (de las siglas en inglés de *Protein Associated Motor*), ambos localizados en la membrana interna, translocan a la proteína hasta la matriz (Figura 1, paso 2). TIM23 es un complejo proteico compuesto por la proteína Tim23 asociada con Tim17, formando un poro en la membrana interna por el cual la proteína precursora puede translocarse (Chacinska y cols., 2005; Mokranjac y cols., 2009; Tamura y cols., 2009). Otra de sus subunidades es Tim50 que funciona como receptor de precursores una vez que han atravesado el complejo TOM. PAM está constituido por diversas proteínas entre ellas la mtHsp70, que con la hidrólisis de ATP, retienen a la proteína blanco en la matriz mitocondrial, donde se edita su MTS por la proteasa MPP (Okamoto y cols., 2002; Li y cols., 2004; Figura 1, paso 3). Sin embargo, TIM23 puede operar de manera independiente a PAM. En estos casos TIM23 distribuye y libera lateralmente proteínas integrales de membrana interna (Figura 1, paso 4). Esto sucede para proteínas con un solo segmento transmembranal (Glick y cols., 1992; van der Laan y cols., 2007).

Sin embargo, existen proteínas de la membrana interna que tienen más de un cruce transmembranal. Entre éstas se encuentran las pertenecientes a la familia de acarreadores (por ejemplo el acarreador de ATP/ADP). En estos casos se ha visto involucrado otro complejo proteico denominado TIM22 (Rehling, 2003; Figura 1, paso 5).

Cuando el destino final de una proteína es el espacio intermembranal, su distribución se lleva a cabo de manera dependiente de reacciones de óxido-reducción por el complejo MIA (de las siglas en inglés de *Mitochondrial Intermembrane space Assembly machinery*; Banci y cols, 2009; Figura 1, paso 6). Esto sucede gracias a la presencia de residuos de cisteína en la secuencia de estas proteínas, con los cuales el receptor Mia40 puede asociarse (Grumbt y cols., 2007).

Para el caso de las proteínas codificadas en el genoma mitocondrial (*COX1, COX2, COX3, ATP6, ATP8, ATP9, COB, VAR1*), la proteína Oxa1 lleva a cabo su inserción a la membrana interna mitocondrial (Hell, Neupert y Stuart, 2001; Ott y Hermann, 2010; Figura 1, paso 7).

Finalmente para el caso de las proteínas integrales de la membrana externa con estructura barril- β (por ejemplo Tom40 o la porina), se ha observado la participación del complejo SAM (de las siglas en inglés de *Sorting and Assembly Machinery*, Wiedemann, 2003; Paschen y cols., 2003, Waizenegger y cols., 2004). SAM se compone de las proteínas Sam50 (que forma un poro en la membrana externa mitocondrial), Sam35 y Sam37 (relacionadas con estabilizar al complejo y en la liberación de proteínas a la membrana externa, Figura 1, paso 8).

2.2 ¿Existe una ruta co-traducciona de importación de proteínas a la mitocondria?

Hasta este momento, se ha descrito que la importación de proteínas ocurre de manera post-traducciona, esto es, la proteína mitocondria se asocia a chaperonas del citosol en su proceso de síntesis y únicamente cuando se libera por el ribosoma viaja a través del citoplasma hasta que la proteína se entrega a los receptores del complejo TOM para su importación (Young y cols., 2003). Experimentos de importación *in vitro* con proteínas diversas como la subunidad β de la ATPasa, mtHsp60, Tom40, AAC1 (transportador ADP/ATP), Su9-DHFR (proteína reportera de fusión), que han demostrado el modelo (Maccacchini y cols., 1979; Reid y Schatz, 1982; Knox y cols., 1998; Schmidt y cols., 2011). Estos experimentos consisten en realizar la traducción del ARNm de la proteína de interés en un sistema libre de células y en presencia de un aminoácido radioactivo. Una vez que se tiene la proteína sintetizada por completo, se incuba con mitocondrias purificadas. Después se adiciona una proteasa a la reacción. Mediante centrifugación se recuperan las mitocondrias y el sobrenadante. Con electroforesis desnaturizante seguida de autoradiografía, se puede observar si la proteína de interés es resistente a la acción de la proteasa añadida, es decir si la proteína se ha importado. Para el caso de proteínas que tienen MTS, se evalúa además un cambio de peso molecular que sufre la proteína al editarse su

MTS por la MPP mitocondrial (Mokranjac y Neupert, 2007; Mokranjac y cols., 2009).

Sin embargo, en años posteriores se observó que el modelo experimental post-traducciona l no servía para la importación de algunas proteínas mitocondriales. Ejemplos de ello son las enzimas fumarasa (Fum1) y superóxido dismutasa 2 (Sod2). Mediante experimentos *in vitro* se observó que para importarse eficientemente, estas proteínas tenían que sintetizarse en presencia de mitocondrias purificadas (Knox y cols., 1998; Luk y cols., 2005). Estos datos se comprobaron también mediante experimentos *in vivo*, en los cuales se observó el mismo comportamiento (Yogev y cols., 2007).

Para el caso particular de Fum1, que es la proteína más estudiada en este tipo de sistemas, algunas de las observaciones más relevantes son las siguientes:

- i) en experimentos de importación *in vitro* como los descritos anteriormente, incluso en condiciones donde la proteína precursora se encuentra desnaturalizada con urea, la tasa de importación es prácticamente nula (Knox y cols., 1998).
- ii) la proteína madura de Fum1 (sin MTS), se detecta a tiempos muy cortos en experimentos de importación *in vivo* de pulso y caza (Yogev y cols., 2007). Lo que lleva a proponer que su entrada a la mitocondria sucede inmediatamente al inicio de su síntesis, ya que el encontrar proteína madura, indica que la proteína entró a la mitocondria.
- iii) si se provoca una acumulación del precursor de Fum1 en el citosol al abatir el $\Delta\Psi$ (y por lo tanto inhibir la importación) y posteriormente reiniciar la reacción de importación restableciendo el $\Delta\Psi$, se observa una fracción prácticamente nula de la versión madura de Fum1 (Knox y cols., 1998; Yogev y cols., 2007). En otras palabras, la proteína no puede ingresar al organelo cuando su síntesis se ha completado.

Todo esto ha llevado a considerar que Fum1 se importa de una manera co-traducciona l, es decir, de manera paralela a su síntesis.

2.3 Evidencias del modelo co-traduccion de importación

Además de los ensayos de importación de Fum1 y Sod2, se han reportado otros trabajos en los que se sugiere y propone un modelo de importación co-traduccion.

En la década de los setentas Kellems y colaboradores (1975), observaron la asociación de ribosomas y polisomas citosólicos a la membrana externa mitocondrial en experimentos de microscopía electrónica. Para ello utilizaron mitocondrias que habían sido purificadas en presencia de cicloheximida y magnesio (la cicloheximida inhibe el paso de elongación de la traducción). Con este tratamiento evitaban la liberación de las cadenas nacientes de los ribosomas (Kellems y cols., 1975; Fujiki y Verner, 1993; revisado en Lithgow, 2000; Figura 2).

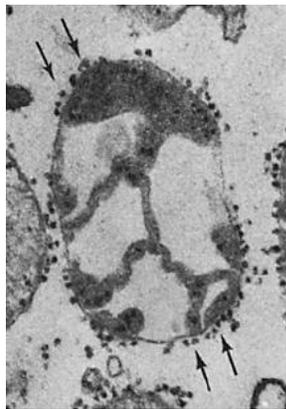


Figura 2. Asociación de ribosomas citosólicos a la membrana externa mitocondrial. Las flechas indican puntos de contacto de los ribosomas a la membrana externa mitocondrial. Tomado y modificado de Kellems y colaboradores (1975).

En años recientes esta hipótesis se ha reforzado por trabajos de diversos grupos, quienes con microscopía confocal han logrado detectar el ARNm de diversas proteínas mitocondriales localizado cerca de la membrana externa mitocondrial. Entre algunos de ellos se encuentran los ARNm de *ATP2*, *FUM1* y *SOD2* (García y cols., 2007; Gadir y cols., 2011). Y en particular, se ha observado que la región 3'UTR de los ARNms es importante para su localización (Figura 3, Ginsberg y cols., 2003; Marc y cols., 2002).

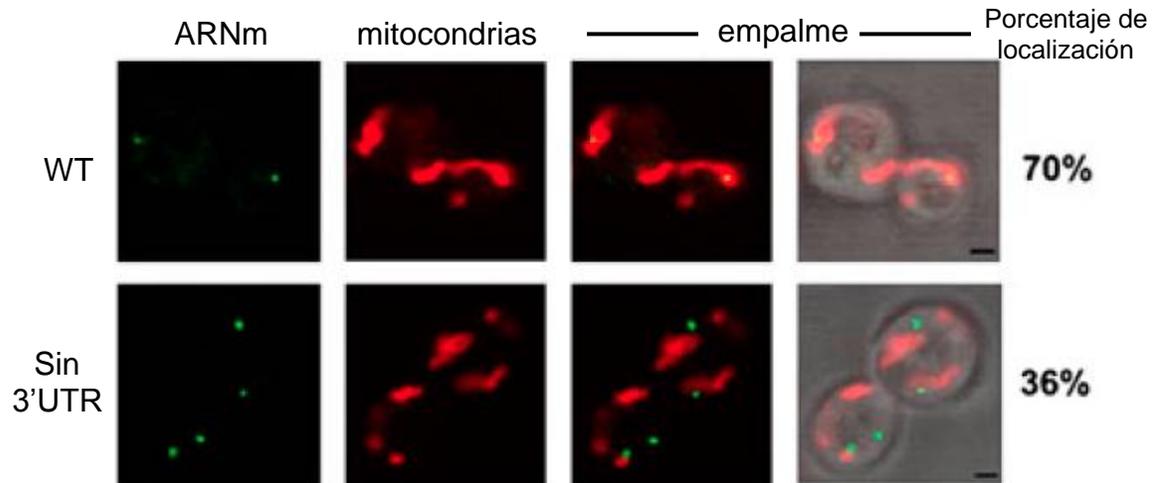


Figura 3. Asociación de ARNm que codifica para la proteína Atp2 a mitocondria. Se observa en color verde los puntos localizados de ARNm por hibridación *in situ*, en rojo las mitocondrias y el empalme (izquierda) de las dos imágenes. En el empalme (derecha) se muestra también el campo claro y por lo tanto el perímetro de las células. En los bloques superiores se muestra la localización silvestre del ARNm, mientras que en los bloques inferiores se observa el efecto al eliminar la región 3'UTR del mismo. Se indica el porcentaje de localización de ARNm a mitocondria en cada caso. Tomado y modificado de Gadir y colaboradores (2011).

2.4 Proteínas asociadas a la importación co-traducciona de proteínas mitocondriales

Diversos trabajos se han enfocado en tratar de identificar los componentes de la vía de importación co-traducciona de proteínas a la mitocondria (Ahmed y Fisher, 2009).

De manera general, se han buscado proteínas o complejos proteicos que funcionen como chaperonas moleculares que modulen alguno de los pasos que se asume ocurren durante el proceso co-traducciona de importación.

Se ha observado que las chaperonas del tipo Hsp70 y Hsp90 (por las siglas en inglés de *Heat Shock Protein 70* y *90* respectivamente) promueven la importación co-traducciona de proteínas (de bovino) como el transportador de fosfatos (PiC) y el transportador de péptidos (PT), al entregarlas al receptor Tom70 del complejo TOM (Young y cols., 2003).

Por otro lado, el complejo RAC (de las siglas en inglés de *Ribosome Associated Complex*) ha sido identificado como un factor de estimulación de

importación a mitocondria en levadura. Este complejo, formado por las proteínas Ssb1 (Hsp70), Ssz1 (Hsp70) y Zuo1 (Hsp40), se une al túnel de salida ribosomal. En experimentos de importación *in vitro*, se ha observado que promueve la importación de la malato deshidrogenasa (Mdh1; Gautschi y cols., 2001; Gautschi y cols., 2002).

Otro complejo de asociación al túnel de salida ribosomal es NAC, una chaperona del citosol involucrada en el reconocimiento de proteínas nacientes en el ribosoma. A continuación se dará una explicación más detallada.

2.5 El complejo NAC (complejo de asociación a polipéptidos nacientes)

El complejo NAC (de las siglas en inglés de *Nascent Polypeptide Associated Complex*) es una chaperona heterodimérica del citosol que se asocia a proteínas nacientes en el túnel de salida ribosomal (Wiedmann y cols., 1994). Dentro de otras funciones se le ha atribuido el papel de promover la importación de proteínas como Fum1 (Yogev y cols., 2007).

NAC se descubrió en 1994 por Wiedmann y colaboradores, quienes buscaban proteínas que pudieran asociarse a péptidos nacientes durante su proceso de síntesis. Mediante experimentos de traducción *in vitro* y entrecruzamiento, pudieron encontrar dos proteínas que co-purificaban y formaban un heterodímero al que llamaron *complejo de asociación a polipéptidos nacientes* o NAC (Wiedmann y cols., 1994; Rospert y cols., 2002).

Posteriormente, el trabajo de diversos grupos confirmó que este complejo es capaz de unirse a ribosomas traduccionalmente activos y se ha propuesto que juega un papel decisivo al discriminar entre la translocación al retículo endoplásmico o a la mitocondria (Wiedmann y cols., 1994, 1999; Möller y Beatrix, 1998; Raden y Gilmore, 1998; Luring y cols., 1995a; Luring y cols., 1995b).

NAC es un complejo heterodimérico cuyas subunidades se denominan α y β (Reinmann y Bradsher, 1999). Recientemente se determinó la estructura cristalográfica del complejo, tanto de arqueas como de humano (Figura 4, Wang

y cols., 2010). Se observó que adopta una estructura de barril- β aplanado y aunque las subunidades no tienen una identidad de secuencia significativa, se pliegan de manera similar. Como se mencionó anteriormente, NAC tiene la capacidad de asociarse a ribosomas. Esta asociación funcional, ocurre gracias a un segmento en el extremo amino terminal de la subunidad β , que promueve la unión del complejo con la proteína ribosomal L25 (o L23 en arqueas) que se encuentra en el túnel de salida (Wegrzyn y cols., 2006).

El papel específico que la subunidad α juega dentro del complejo es menos claro. Por un lado, se ha visto que tiene dominios susceptibles de ubiquitinación, sin embargo, este proceso no ha sido vinculado a ninguna función biológica (Spreter y cols., 2005; Panasenکو y cols., 2006; Panasenکو y cols., 2009). Por otro lado, se ha identificado que la subunidad α tiene una región de unión a ácidos nucleicos (Liu y cols., 2010); aunque de acuerdo con la estructura cristalográfica esta región estaría oculta por su interacción con la subunidad β en condiciones normales (Beatrix y cols., 2000; Liu y cols., 2010).

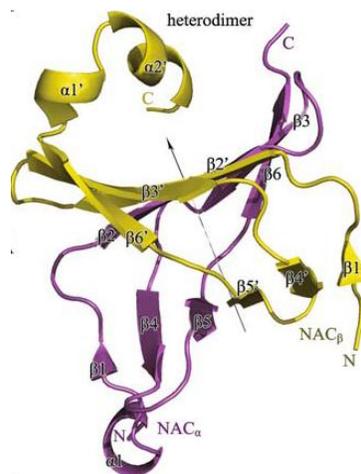


Figura 4. Estructura cristalográfica del complejo NAC de humano, a una resolución de 1.9 Å. En amarillo se esquematiza a la subunidad β y en morado a la subunidad α . Tomado de Wang, 2010.

2.5.1 NAC en *Saccharomyces cerevisiae*

En la levadura *S. cerevisiae* existen dos versiones de la subunidad β y una α , por lo tanto existen dos variantes del complejo NAC: el complejo α/β_1 y el complejo α/β_2 . Los tres genes que codifican para las subunidades de NAC son: *EGD1* y *BTT1* que codifican para las subunidades β_1 y β_2 respectivamente, mientras que *EGD2* codifica para la subunidad α (Parthun y cols., 1992; Guo-Zen y Ronne, 1994; Shi y cols., 1995). En *S. cerevisiae* se ha determinado que la subunidad β_1 es más abundante que la subunidad β_2 en una proporción de 100:1, por ello la cantidad de complejos α/β_1 es 100 veces mayor que α/β_2 (Reinmann y cols. 1999). No se ha observado ninguna condición en la que se exprese más el complejo α/β_2 .

2.5.2 Función de NAC

El papel funcional de NAC no se ha aclarado completamente y se han formulado diversas hipótesis.

- i) Debido a que el complejo se une a proteínas mientras están siendo sintetizadas en el ribosoma, se piensa que podría ayudar en el plegamiento y por lo tanto evitar la formación de agregados e interacciones improductivas. Prueba de ello es la interacción genética entre NAC y otros sistemas de chaperonas del citosol (Albanèse y cols., 2010). Las levaduras mutantes donde se elimina a NAC y al complejo SSB/RAC simultáneamente, crecen de manera deficiente y existe una disminución en la biogénesis de ribosomas. Este fenotipo se relacionó a que la ausencia simultánea de NAC y SSB/RAC produce una agregación de proteínas ribosomales y por lo tanto una disminución en la biogénesis ribosomal (Koplin y cols., 2010). Otra evidencia es que NAC protege a las proteínas nacientes de proteasas en el citosol (Wang y cols., 1995).
- ii) Se ha observado que NAC tiene una alta afinidad por proteínas que no deben ingresar a la vía de secreción. Por lo tanto, evita que las chaperonas y complejos de identificación de proteínas del retículo endoplásmico las

reconozcan y dirijan erróneamente (Wiedmann y cols., 1994; Lauring y cols., 1995a; Lauring y cols., 1995b; Möller y Beatrix, 1998; Wiedmann y Prehn, 1999).

iii) Por último, se ha sugerido que NAC promueve la importación de proteínas a la mitocondria de manera co-traducciona (George y cols., 2002; Mukhopadhyay y cols., 2004; Yogev y cols., 2007).

Todas estas hipótesis pueden ser funciones verdaderas de NAC en diversos contextos fisiológicos (Raden y Gilmore, 1998; Reinmann y cols., 1999; Wiedmann y cols., 1999). La importancia funcional de NAC se ve reflejada también por su concentración (3-5 μ M) determinada en diferentes tejidos de ratón, en la mosca de la fruta y en sistemas libres de células provenientes de reticulocitos de conejo o de germen de trigo. Visto de otra manera, en una célula de levadura existen aproximadamente 310,000 ribosomas y 400,000 moléculas de NAC. Esto contrasta con las 280,000 moléculas de Ssb1/2, una de las Hsp70 más abundantes en condiciones normales (Raue y cols., 2007).

La importancia de NAC en importación de proteínas a mitocondria se ha estudiado con proteínas como la malato deshidrogenasa (Mdh1), la fumarasa (Fum1), así como con proteínas de fusión como la proteína β -galactosidasa (con la MTS de la subunidad 9 de la ATPasa de *Neurospora crassa*) o la dihidrofolato reductasa de ratón (con la MTS de la subunidad IV de la citocromo *c* oxidasa). En todos estos casos se ha observado que la eliminación del gen *EGD1* (β_1 -NAC) provoca una notable disminución en la importación de estas proteínas (George y cols., 1998; Mukhopadhyay y cols., 2004). Por ejemplo, ensayos de importación utilizando Mdh1 indicaron además que NAC parece interactuar con el complejo TOM para la importación del precursor (Fünfschilling y Rospert, 1999; George y cols., 2002).

Con todos estos trabajos, se ha propuesto que NAC participa en la importación de proteínas a la mitocondria y probablemente de modo co-traducciona (George y cols., 2002; Yogev y cols., 2007).

2.6 Modelo de estudio: *Saccharomyces cerevisiae*

El hongo unicelular *S. cerevisiae* es el modelo de estudio utilizado en este trabajo. Las ventajas que presenta trabajar con esta levadura son entre otras, la facilidad de manipulación y crecimiento en medios de cultivo (su tiempo de duplicación es de aproximadamente 2 h en medio rico). Los genomas nuclear y mitocondrial han sido secuenciados y, para nuestro trabajo, conviene que se ha obtenido también el proteoma mitocondrial (Reinders J, 2006).

La generación de mutantes con relativa facilidad, permite evaluar fenotipos de crecimiento en mutantes de genes no esenciales. A su vez se cuenta con herramientas genéticas y de biología molecular que permiten evaluar el fenotipo en mutantes a genes esenciales. En ese sentido se tiene una colección de mutantes sencillas a cada uno de los genes o esenciales del genoma nuclear (mutantes *MATa*; Winzeler y cols., 1999).

Otras colecciones que se tienen en disposición son: i) colección de mutantes sencillas de sexo *MAT α* ; ii) colección de mutantes diploides homocigotas, iv) colección de mutantes diploides heterocigotas; v) una colección donde cada uno de los genes ha sido fusionado con la proteína verde fluorescente (GFP); vi) una colección en donde cada gen se ha fusionado con una etiqueta para purificación por afinidad en tándem; vii) una colección en la que los genes esenciales se encuentran regulados por promotores inducibles.

Para los objetivos de nuestro trabajo, destaca su capacidad de crecer tanto en medios fermentables como no fermentables, y de ese modo, ofrece una ventaja al evaluar mutaciones que afecten la función mitocondrial y evaluar su fenotipo en condiciones de fermentación.

3. Antecedentes

NAC es una chaperona heterodimérica que se une a los ribosomas del citosol y que se ha visto implicada en la importación de proteínas a la mitocondria (George y cols., 1998; George y cols., 2002; Fünfschilling y Rospert, 1999). La importancia funcional de NAC está reflejada en el fenotipo letal que resulta por la eliminación de los genes que codifican a sus subunidades en organismos como *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* (Deng y Behringer, 1995; Markesich y cols., 2000; Bloss y cols., 2003). Sin embargo, en la levadura *S. cerevisiae* nuestro modelo de estudio, existe una diferencia importante ya que una cepa carente de complejo NAC no presenta ningún fenotipo aparente de crecimiento tanto en medios fermentables como respiratorios (Reinmann y cols., 1999).

Una explicación para esta falta de fenotipo es la posible existencia de proteínas funcionalmente redundantes a NAC que pueden compensar y sostener la importación de proteínas a la mitocondria, que es un proceso esencial para la biogénesis mitocondrial y por lo tanto para la célula.

El objetivo del presente trabajo es identificar dicha(s) proteína(s) mediante un rastreo de interacciones genéticas o SGA (por las siglas en inglés de *Synthetic Genetic Array*). En otras palabras, buscar genes que cuando se eliminen junto a los genes que codifican para NAC, ocasionen un fenotipo letal en levadura debido a la pérdida de la función esencial involucrada (Figura 5). Estas interacciones genéticas se denominan como “sintético letales” y permiten identificar genes que participan dentro de una misma ruta o proceso metabólico.

a) Silvestre



Fenotipo Viable

b) Δnac



Fenotipo Viable

c) $\Delta nac \quad \Delta x$



Fenotipo letal

Figura 5. El rastreo de interacciones genéticas se basa en la redundancia funcional que existe entre proteínas o complejos proteicos relacionados en un mismo proceso fisiológico (señalado con la flecha roja en (a), como el empalme de los rectángulos que representan la función de NAC y de un componente "X"). Cuando se elimina uno de los componentes del sistema, (b) la presencia de "X" puede compensar su ausencia. Sin embargo, cuando ambos son eliminados (c) la función se pierde y ocasiona el fenotipo letal en el organismo.

4. Hipótesis

La chaperona citosólica NAC comparte su papel en la importación cotraduccional de proteínas a la mitocondria con otras proteínas, en la levadura *S. cerevisiae*. Eliminar los genes que la codifican no generará un fenotipo. Sin embargo, eliminar otros genes en un fondo genético Δnac si ocasionará un fenotipo.

5. Objetivos

5.1 Objetivo General:

- Identificar las interacciones genéticas de los genes codificantes para el complejo NAC en la levadura *S. cerevisiae*.

5.2 Objetivos Específicos:

- Generar cepas mutantes en uno, dos o tres genes codificantes para las subunidades del complejo NAC.
- Evaluar el fenotipo de crecimiento de las cepas mutantes generadas, en medio fermentable y no fermentable, así como a tres diferentes temperaturas.
- Evaluar el fenotipo de crecimiento de las cepas mutantes generadas, en medio fermentable y no fermentable en condiciones de estrés oxidativo.
- Realizar el rastreo de interacciones genéticas de las mutantes en uno, dos o tres genes codificantes a las subunidades del complejo NAC.

6. Materiales y Métodos

6.1 Cepas y plásmidos utilizados

a) Levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*)

Cepa	Fondo silvestre	Genotipo nuclear	Referencia
Y8205	BY4742	<i>Mata</i> , <i>can1Δ::STE2pr-spHIS5</i> , <i>lyp1Δ::STEP3ps-LEU2</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i>	Tong y Boone, 2007
Δα	BY4742	<i>Mata</i> , <i>can1Δ::STE2pr-spHIS5</i> , <i>lyp1Δ::STEP3ps-LEU2</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>egd2Δ::hph</i>	Este trabajo
Δβ ₁	BY4742	<i>Mata</i> , <i>can1Δ::STE2pr-spHIS5</i> , <i>lyp1Δ::STEP3ps-LEU2</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>egd1Δ::hph</i>	Este trabajo
Δβ ₂	BY4742	<i>Mata</i> , <i>can1Δ::STE2pr-spHIS5</i> , <i>lyp1Δ::STEP3ps-LEU2</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>btt1Δ::hph</i>	Este trabajo
Δβ	BY4742	<i>Mata</i> , <i>can1Δ::STE2pr-spHIS5</i> , <i>lyp1Δ::STEP3ps-LEU2</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>egd1Δ::hph</i> , <i>btt1Δ::caURA3</i>	Este trabajo
Δ <i>nac</i>	BY4742	<i>Mata</i> , <i>can1Δ::STE2pr-spHIS5</i> , <i>lyp1Δ::STEP3ps-LEU2</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>egd1Δ::hph</i> , <i>btt1Δ::caURA3</i> , <i>egd2Δ::nat1</i>	Este trabajo

Colección de Euroscarf

La colección de mutantes sencillas utilizada fue la construida por Winzeler y colaboradores (1999). El fondo genético es el siguiente:

BY4741 *MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*

b) Bacterias

Escherichia coli DH5α (Promega)

F– Φ80*lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)* U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK–, mK+) *phoA supE44 λ– thi-1 gyrA96 relA1*

c) Plásmidos (EUROSCARF)

Plásmido	Módulo amplificado para transformación en <i>S. cerevisiae</i>	Resistencia en <i>Escherichia coli</i>	Referencia
pAG25	<i>nat1</i>	<i>Amp</i>	Goldstein y McCusker, 1999
pAG32	<i>hph</i>	<i>Amp</i>	Goldstein y McCusker, 1999
pAG60	<i>caURA3</i>	<i>Amp</i>	Goldstein y McCusker, 1999

6.2 Preparación de células competentes (*E. coli*)

Se preparó un cultivo de *E. coli* DH5 α en 5 mL de medio LB (Ver Apéndice I). Se incubó durante 16 h a 37 °C, en agitación a 200 rpm. Al día siguiente se tomó 1 mL del medio y se transfirió a 50 mL de nuevo medio líquido LB. Se incubó durante 2-3 h y se midió la DO₆₀₀. Se detuvo el crecimiento al llegar a una DO₆₀₀ entre 0.5 y 0.6. Luego se centrifugó a 600 *xg* por 10 min a 4 °C. El botón resultante se resuspendió en 40 mL de la solución TfbI fría (Ver Apéndice I), con agitación suave. Se dejó reposar durante 2 h en hielo. Luego se centrifugó nuevamente a 600 *xg* por 10 min a 4 °C. El botón resultante se resuspendió en 4 mL de la solución TfbII fría (Ver Apéndice I). Se dejó en reposo durante 1 h en hielo. Finalmente las células se alicuotaron en volúmenes pequeños hasta su posterior uso.

6.3 Transformación de bacterias

Las transformaciones de *E. coli* DH5 α , se realizaron por choque térmico. A 50 μ L de células competentes se agregaron de manera independiente, 100 ng de los plásmidos pAG25, pAG32 o pAG60 (EUROSCARF; Goldstein y

McCusker, 1999). A continuación, se incubaron por 30 min en hielo antes de aplicar un choque térmico de 1.5 min a 42 °C. Posteriormente se colocaron nuevamente en hielo por 10 min. A cada una de las reacciones, se agregó 1 mL de medio LB y se incubaron por 1 h en agitación a 37 °C. Se centrifugaron y se resuspendieron en el medio residual antes de estriarlas en medio sólido de selección e incubarse toda la noche a 37 °C.

6.4 Purificación de plásmidos

A partir de una colonia aislada de las transformaciones realizadas, se inocularon cultivos líquidos de 200 mL en medio LB con ampicilina 100 µg/mL los cuales se incubaron 16 h a 37 °C en condiciones de agitación a 200 rpm. Las bacterias se recuperaron por centrifugación a 2000 xg (Allegra X-22R Beckman-Coulter).

Los plásmidos se purificaron utilizando el kit Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System (Promega) siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor.

Para verificar la integridad de los plásmidos se realizaron reacciones de digestión con la enzima *NotI*.

6.5 PCR para amplificar módulos de selección a antibióticos y auxotrofia

Los plásmidos mencionados contienen los módulos *hph*, *nat1* o *URA3* que pueden ser utilizados para eliminar genes de levadura. Por ello se realizaron reacciones de PCR con tres pares diferentes de oligonucleótidos (un par para cada gen de NAC, ver Apéndice II) y con cada uno de los plásmidos disponibles para amplificar módulos de resistencia a antibióticos o auxotrofia. Cada par de oligonucleótidos permite amplificar el marcador de selección deseado y contiene fragmentos flanqueantes adicionales que permiten eliminar cada uno de los tres genes que codifican para las subunidades del complejo NAC.

En cada reacción se utilizaron los siguientes componentes: 20 pmol de cada oligonucleótido, 100 ng del DNA templado, 1.5 mM de MgCl₂, 2.5 U de

TaqPol (Fermentas) y 200 μ M de dNTPs (Fermentas), en reacciones de 50 μ l como volumen final.

Las reacciones se llevaron a cabo con el siguiente protocolo:

94 °C por 5 min

35 ciclos de

94 °C por 1 min (desnaturalización)

50 °C por 2 min (alineamiento)

72 °C por 3 min (elongación)

72 °C por 8 min

Las reacciones se verificaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% en amortiguador TAE 1X (ver Apéndice I).

6.6 Generación de cepas mutantes a los genes del complejo NAC

Se eliminaron los genes del complejo NAC mediante recombinación homóloga de acuerdo con el protocolo de transformación de levaduras por $\text{CH}_3\text{COOLi}/\text{ADN}$ acarreador/Polietilenglicol (Gietz, 2002). Brevemente, las levaduras se incubaron toda la noche en medio rico (YPD) un día antes de cada transformación. Al día siguiente se midió la densidad óptica del cultivo y se diluyó a una $\text{DO}_{600}=0.3$. Se incubó en medio nuevo por 4 h más hasta alcanzar una $\text{DO}_{600}=1$. Pasado este tiempo se tomaron 1.5 mL del cultivo y se centrifugaron a 16,000 xg durante 2 min. Se desechó el sobrenadante y se dio un lavado con 500 μ L de agua desionizada. Se centrifugaron nuevamente a 16,000 xg por 2 min y después se incubaron por 10 min en 1 mL de acetato de litio 0.1 M. Se centrifugaron las células y se desechó el sobrenadante. Se agregaron en orden secuencial al botón resultante: 240 μ L de polietilenglicol 3350 50% w/v; 36 μ L de acetato de litio 1 M; 10 μ L de esperma de salmón 10 mg/mL; 45 μ L del producto de PCR con marcador de selección utilizado y finalmente 24 μ L de agua desionizada. Se resuspendieron las células y se dejaron en incubación a 42 °C por 45 min. Se centrifugó y el botón celular resultante se resuspendió en 100 μ L de agua desionizada. Las células se

estriaron en medio no selectivo YPD. Se incubaron durante 16-20 h a 30 °C para su posterior replica a medio selectivo en el cual se crecieron durante 48 h para el aislamiento de colonias resistentes.

De esta manera, se generaron tres cepas mutantes sencillas a cada uno de los genes del complejo NAC, denominadas: $\Delta\beta_1$ (*egd1Δ::hph*), $\Delta\alpha$ (*egd2Δ::hph*) y $\Delta\beta_2$ (*btt1Δ::hph*); se generó una cepa doble mutante denominada $\Delta\beta$ (*egd1Δ::hph*, *btt1Δ::caURA3*) y finalmente la cepa con los tres genes eliminados, denominada Δnac (*egd1Δ::hph*, *btt1Δ::caURA3*, *egd2Δ::nat1*). Ver sección 6.1 para los genotipos completos de cada una de las mutantes.

6.7 Confirmación de cepas de levadura mutantes

Las cepas mutantes se confirmaron mediante reacciones de PCR. En cada reacción se utilizaron 20 pmol de oligonucleótidos (ver Apéndice II), 200 μ M de dNTPs (Fermentas), 1.5 mM de MgCl₂, 1 U TaqPol (Fermentas) y 1 colonia de levaduras resistentes.

Las reacciones se llevaron a cabo con el siguiente protocolo:

94 °C por 10 min

32 ciclos de

94 °C por 1 min (desnaturalización)

55 °C por 1.5 min (alineamiento)

72 °C por 2 min (elongación)

72 °C por 8 min

6.8 Electroforesis en geles de agarosa

Todos las muestras de ADN utilizadas en este trabajo, se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% en amortiguador TAE 1X (ver Apéndice I). A cada muestra se agregaron 5 μ L de GelRed 3X (Biotium) y amortiguador de carga (ver Apéndice I). Las electroforesis se realizaron a 100V.

6.9 Análisis de crecimiento de *S. cerevisiae*

Se realizó en cajas Petri con medio rico sólido utilizando tanto una fuente fermentable (glucosa, YPD) como no fermentable (etanol/glicerol, YPEG) de carbono (ver Apéndice I para la composición de los medios de cultivo). Se analizaron también tres diferentes temperaturas de incubación (25, 30 y 37 °C).

El protocolo fue el siguiente: se prepararon cultivos líquidos de cada una de nuestras cepas mutantes y de la cepa silvestre en medio YPD. Se incubaron toda la noche a 30 °C en agitación. Al día siguiente se diluyó cada cultivo a una $DO_{600}=0.3$ y se incubaron nuevamente hasta alcanzar una DO_{600} entre 0.7 y 1. Se tomaron 0.5 DO de cada cultivo y se hicieron diluciones seriadas 1:10 de las cuales se depositaron 3.5 μ L sobre cajas de medio rico YPD (fermentable) y YPEG (no fermentable). Se colocaron en incubación dos (YPD, glucosa) o tres días (YPEG, etanol/glicerol) y a 25 °C, 30 °C o 37 °C.

6.10 Evaluación de crecimiento después de un estrés oxidativo

Se prepararon cultivos líquidos de cada una de nuestras cepas mutantes y la cepa silvestre. Se incubaron toda la noche a 30 °C en agitación. Al día siguiente se diluyeron los cultivos a una $DO_{600}=0.3$ y se incubaron nuevamente hasta alcanzar una DO_{600} entre 0.7 y 1.0 (los cultivos no se dejaron sobrepasar esta densidad óptica debido a que se vuelven más resistentes al estrés por peróxido de hidrógeno). Los cultivos se diluyeron nuevamente a una $DO_{600}=0.2$ en un volumen final de 2 mL de medio YPD. Se realizaron dos cultivos idénticos para cada cepa, salvo que a uno de ellos se le agregó peróxido de hidrógeno hasta una concentración final de 1.2 mM. Se incubaron en agitación por 4 h a 30 °C. Una vez transcurrido este tiempo se tomó 1 DO de cada cultivo y se realizaron diluciones 1:10 de las cuales se depositaron 3.5 μ L sobre cajas de medio rico YPD y YPEG. Se incubaron por dos (YPD) o tres días (YPEG) a 30 °C.

6.11 Rastreo de interacciones genéticas (SGA)

Se realizaron tres SGAs independientes con las cepas $\Delta\alpha$, $\Delta\beta$ y Δnac (ver sección 6.1). Cada uno se manejó en arreglos de 384 colonias en cajas de medio sólido para facilitar la manipulación de las cepas (Figura 6).

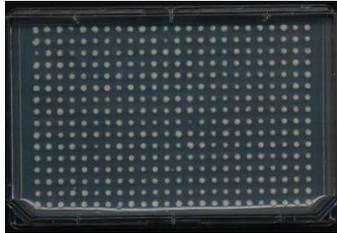


Figura 6. Cada SGA se realiza con arreglos de 384 colonias de levadura. Cada una de ellas tiene un gen no esencial del genoma de *S. cerevisiae* eliminado. En total se manejan 13 cajas de colonias que cubren aproximadamente 4700 genes eliminados.

A continuación se explican con detalle los pasos del protocolo de SGA (protocolo modificado de Tong y Boone, 2007; Figura 7):

1. Se prepararon cultivos saturados en medio rico líquido (YPD) para la cepa mutante de interés o cepa “carnada” (cepa $\Delta\alpha$, $\Delta\beta$ o Δnac). Después se vertieron 5 mL de los cultivos en cajas de medio sólido no selectivo (YPD) para crecer en césped (esto es, crecimiento en toda la caja) y se incubaron a 30 °C durante 24 h.
2. Se recuperó la colección de cepas mutantes sencillas (CMS) mantenidas en glicerol a -80 °C y se replicó en medio sólido YPD+G418 en formato de 384 colonias por caja de medio (Figura 6). Se incubaron por 48 horas a 30 °C (las cepas mutantes son resistentes al antibiótico G418 debido a la presencia del módulo *kanMX4*).

3. Cruzas: se cruzó a la cepa "carnada" con la CMS, replicando en medio sólido YPD primero la cepa "carnada" en formato de 384 colonias a partir de césped y después se replicó encima a la CMS. Se dejaron en incubación a temperatura ambiente (25 °C) por 24 h.

4. Selección de diploides: se replicaron las células *MATa/α* obtenidas en medio selectivo para diploides (YPD+G418/higromicina para el SGA de la cepa $\Delta\alpha$; SD-ura+G418/higromicina en el SGA de la cepa $\Delta\beta$ y SD-ura+G418/higromicina/cloNAT en el SGA de la cepa Δnac). Se incubaron por 2 días a 30 °C. En este paso se eliminan a las células haploides que no se cruzaron y se obtienen solo las células diploides.

5. Esporulación: las levaduras diploides se replicaron a medio de esporulación (medio de bajos nutrientes y nitrógeno) y se incubaron a 22 °C durante ocho días. Se busca que las células diploides generen ascas con esporas haploides. El objetivo es que con la división meiótica que acompaña a la esporulación, se obtengan esporas que contengan las mutaciones tanto del gen de la cepa "carnada" como del gen de la cepa de la colección de cada caso.

6. Selección de células haploides: las células se replicaron a medio de selección de células haploides de sexo *MATa* (SD-His/Arg/Lys+canavanina+tialisina) y se incubaron por 2 días a 30 °C. La cepa Y8205 es una variante de la cepa BY4741 que es auxótrofa para el aminoácido histidina. Sin embargo, la cepa Y2805 tiene añadido en su genoma el módulo *his5* de *Schizosacharomyces pombe*, pero regulado bajo el promotor de sexo *MATa*, que permite seleccionar solo la progenie *MATa* haploide (construcción *can1Δ::STE2pr_sphis5*) al crecer a las células en medio sin histidina. Este módulo, *sphis5*, está insertado en el locus del gen *CAN1* interrumpiéndolo (*CAN1* codifica para una arginina permeasa). Las células diploides residuales y las haploides *Matα*, se eliminan al agregar al medio el compuesto canavanina (análogo tóxico de la arginina), ya que éstas tienen una copia silvestre del gen *CAN1* y por lo tanto incorporan la canavanina del medio comprometiendo la viabilidad de las células.

De manera adicional, la cepa Y8205 tiene eliminado el gen *LYP1* que codifica a una lisina permeasa. La tialisina es un análogo tóxico de la lisina, y por lo tanto, las células diploides y haploides que contengan una copia silvestre del gen *LYP1* son eliminadas al agregar este compuesto al medio de cultivo.

7. Las células haploides obtenidas se replicaron nuevamente en medio de selección de haploides de sexo *MATa*. Se incubaron durante 24 h a 30 °C.

8. Selección *kanMX4*: las levaduras haploides se replicaron en medio de selección para el módulo *kanMX4* (SD-His/Arg/Lys+canavanina+tialisina+G418). Se colocaron en incubación durante 48 h a 30 °C.

9. Selección final: las levaduras se replicaron en medio de selección final tanto para el módulo *kanMX* como para la mutación de interés en la cepa "carnada" (medio SD-His/Arg/Lys+canavanina+tialisina+G418+higromicina para el caso de la cepa $\Delta\alpha$; medio SD-His/Arg/Lys/Ura+canavanina+tialisina+G418+higromicina para el SGA con la cepa $\Delta\beta$ y medio SD-His/Arg/Lys/Ura+canavanina+tialisina+G418+higromicina+clonNAT para el SGA de la cepa Δnac). Se incubaron durante 48 h a 30 °C.

10. Para poder evaluar el fenotipo final de cada una de las cruzas, se midió la densidad óptica de cada colonia de levaduras en las cajas de medio *kanMX4* (paso 8) y del medio de selección final (paso 9) para obtener el valor de la diferencia de crecimiento entre ambos medios.

Cada uno de los tres SGAs se realizaron por triplicado. Para obtener los resultados de interacciones genéticas, se promedió la diferencia de crecimiento en las tres réplicas de cada SGA para cada colonia. Luego se comparó cada diferencia de crecimiento con respecto al promedio de diferencias de crecimiento de la población. Con base en la desviación estándar de los datos y estableciendo un valor de confianza, se determinaron los resultados estadísticamente significativos (Figuras 7, 14 y 16).

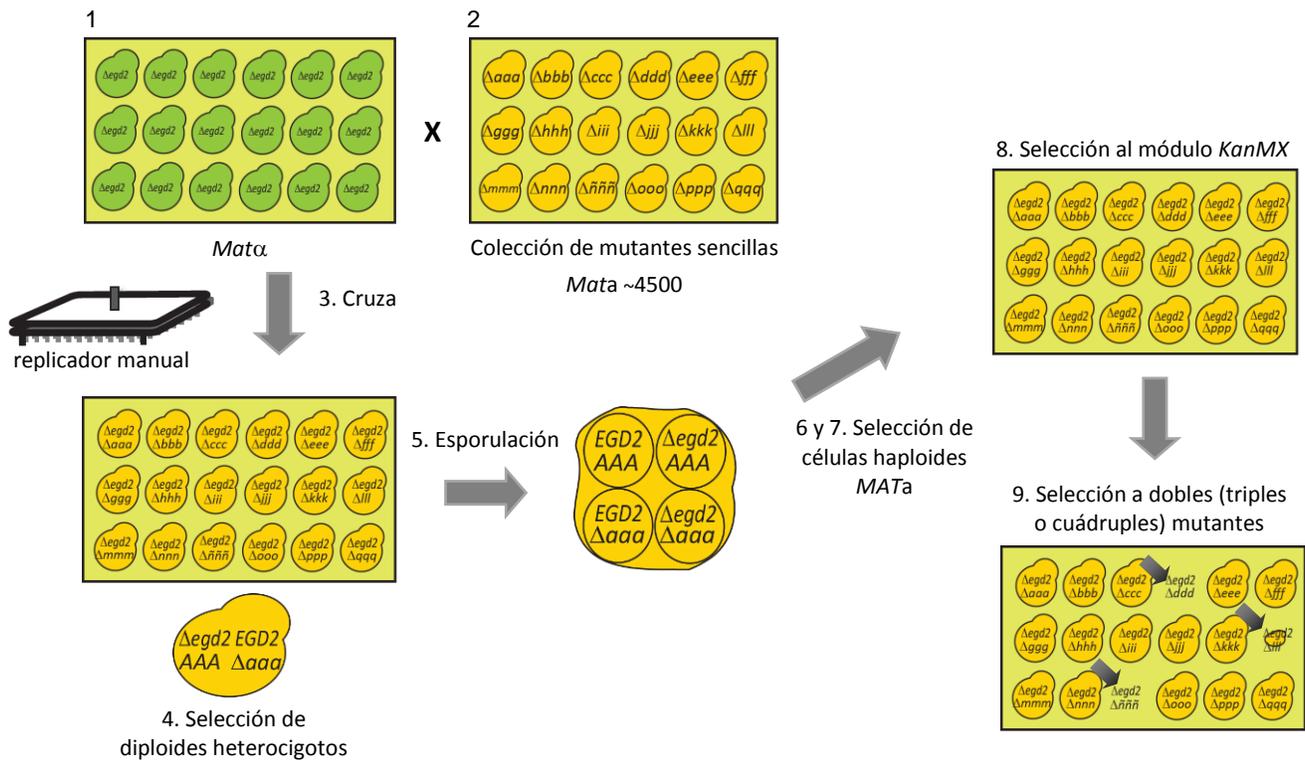


Figura 7. Esquema general del protocolo SGA. Los pasos del experimento se enumeran y se detallan en el texto. Se omitieron las imágenes correspondientes a los pasos de selección de células haploides. Las interacciones genéticas se identifican al comparar el crecimiento de las levaduras en el medio *kanMX* y el medio final (pasos 8 y 9). Aquellas colonias que crecen de modo deficiente o no crecen en el medio final con respecto al *kanMX*, se consideran como interacciones genéticas (paso 9, flechas negras). Las imágenes son representativas de los arreglos de levaduras en formato de 384 colonias.

7. Resultados

7.1 Purificación de plásmidos pAG25, pAG32, pAG60

Para comprobar la integridad de los plásmidos a partir de los cuales se obtendrían los módulos de resistencia y auxotrofia para construir las mutantes a utilizar en este trabajo, se realizaron digestiones con la enzima *NotI* (Figura 8).

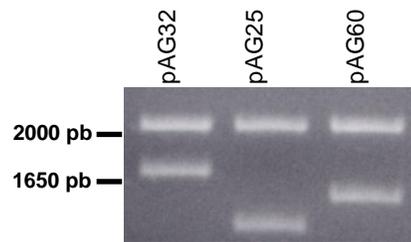


Figura 8. Digestión de los plásmidos utilizados con la enzima de restricción *NotI*. Productos esperados en: pAG32, 2390 y 1770; pAG25, 2423 y 1281; pAG60, 2390 y 1554.

Los fragmentos observados en cada digestión concuerdan con los valores esperados.

7.2 PCR de los módulos de resistencia a antibióticos y auxotrofia

Se diseñaron tres pares de oligonucleótidos que permitieran amplificar los módulos de resistencia a antibióticos o auxotrofia derivados de los plásmidos ya purificados. Posteriormente estos módulos se utilizaron para eliminar los genes codificantes a las subunidades del complejo NAC.

Estos cebadores tienen una longitud de 60 nucleótidos (ver Apéndice II). Los primeros 40 son idénticos a las regiones adyacentes a la región en el genoma de *S. cerevisiae* que se quiere eliminar. Los 20 nucleótidos restantes son secuencias que permiten amplificar cualquiera de los módulos. La figura 9 muestra las características de los oligonucleótidos diseñados.

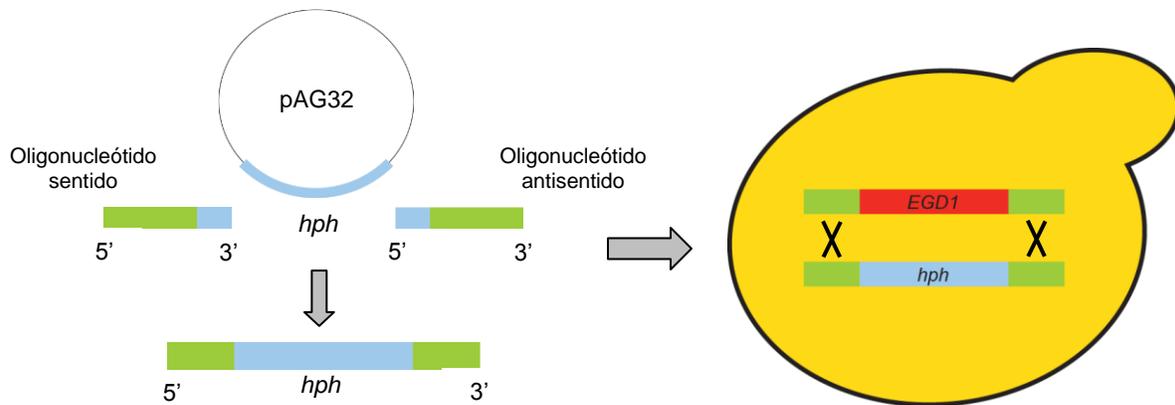


Figura 9. Amplificación de módulos de selección y mecanismo por el que se interrumpen los genes de interés. Los oligonucleótidos utilizados permiten amplificar módulos de selección (rectángulos azules). Además contienen regiones flanqueantes idénticas a las secuencias 5'UTR y 3'UTR del gen de interés (rectángulos verdes). Por recombinación homóloga el módulo utilizado reemplaza al gen blanco (rectángulo rojo).

Se amplificaron los módulos *hph* (que confiere resistencia al antibiótico higromicina), *nat1* (que confiere resistencia al antibiótico neourseotricina o cloNAT) y *caURA3* (que confiere auxotrofia a uracilo). Estos módulos se utilizaron para la generación de cepas carentes de los genes que codifican al complejo NAC.

Los productos obtenidos en las reacciones de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% confirmando que se obtuvieran los tamaños esperados (*nat1*=1361pb, *hph*=1817pb, *URA3*=1601pb).

7.3 Generación de cepas mutantes

Se transformó la cepa Y8205 por el método de acetato de litio (Gietz, 2002), con los módulos de selección de manera independiente. Se generaron tres cepas mutantes sencillas para cada gen por separado denominadas: $\Delta\alpha$ (eliminación del gen *EGD2*), $\Delta\beta_1$ (eliminación del gen *EGD1*) y $\Delta\beta_2$ (eliminación del gen *BTT1*); una cepa $\Delta\beta$ carente de los genes *EGD1* y *BTT1*; y una cepa triple mutante denominada Δnac (ver sección 6.1).

Las mutantes obtenidas se verificaron mediante reacciones de PCR. El diseño de las reacciones estuvo dirigido a amplificar una zona dentro del ORF de los genes de interés, utilizando un oligonucleótido sentido que se une a la

región 5' UTR del gen en cuestión y un oligonucleótido antisentido que se une a la secuencia del ORF. Si el gen está ausente, no habrá producto de PCR dado que el oligonucleótido antisentido no se puede unir (Figura 10).

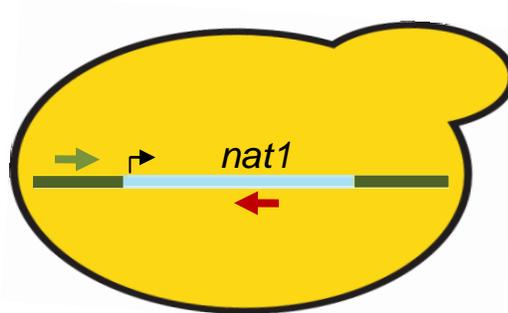


Figura 10. Esquema del diseño de reacciones de PCR realizadas para la confirmación de la eliminación de los genes del complejo NAC. La flecha en color verde representa el oligonucleótido sentido que se une río arriba de la región a eliminar (verde). La flecha en color rojo representa al oligonucleótido antisentido que se debería unir al ORF. Dado que existe un módulo interrumpiendo al gen de interés (representado en este caso por *nat1*), no se espera encontrar producto de PCR en las cepas mutantes.

Se realizaron reacciones de 20 μ L, añadiendo una colonia de levaduras a cada reacción (como fuente de ADN). Se puede observar la ausencia de las bandas correspondientes a los genes eliminados en cada una de las mutantes (Figura 11). Existen dos bandas ausentes en la cepa $\Delta\beta$ y las tres bandas ausentes en la cepa Δnac . Como control del experimento se realizaron reacciones de PCR utilizando como templado a la cepa silvestre. Estos resultados confirman las mutaciones en cada caso.

De manera paralela se realizaron reacciones en las que como oligonucleótido antisentido, se utilizó aquel que permitiera amplificar el módulo insertado. En todas las mutantes fue posible amplificar un producto de PCR del tamaño esperado en cada caso.

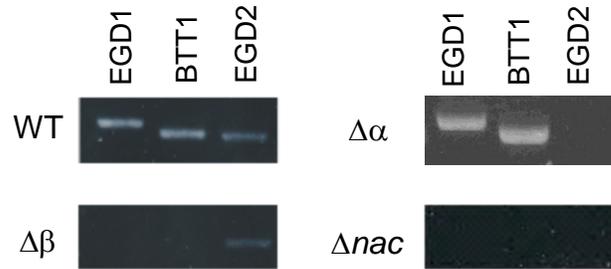


Figura 11. Confirmación por PCR de colonia de las mutantes carentes de uno (cepa $\Delta\alpha$) dos ($\Delta\beta$) o tres genes (Δnac) codificantes para NAC. La ausencia de producto de PCR en cada caso confirma las mutaciones. Como control se muestra el resultado con la cepa silvestre (cepa WT). En cada carril se indica el gen amplificado en cada reacción.

7.4 El fenotipo de crecimiento de las cepas mutantes a los genes *EGD1*, *BTT1* y *EGD2* no se ve afectado tanto en condiciones de fermentación como de respiración

Se evaluó el fenotipo de crecimiento de cada una de las cepas mutantes generadas, mediante diluciones seriadas en medio con una fuente fermentable o no fermentable de carbono (YPD y YPEG respectivamente) y a tres diferentes temperaturas (Figura 12).

El resultado obtenido demuestra que la eliminación de uno, dos o los tres genes que codifican para las subunidades del complejo NAC, no repercute en el crecimiento de las cepas, independientemente de si se encuentran fermentando o respirando y a tres diferentes temperaturas. Esto concuerda con reportes anteriores sobre la ausencia de fenotipo en una cepa mutante de los tres genes codificantes para NAC (Reinmann y cols., 1999).

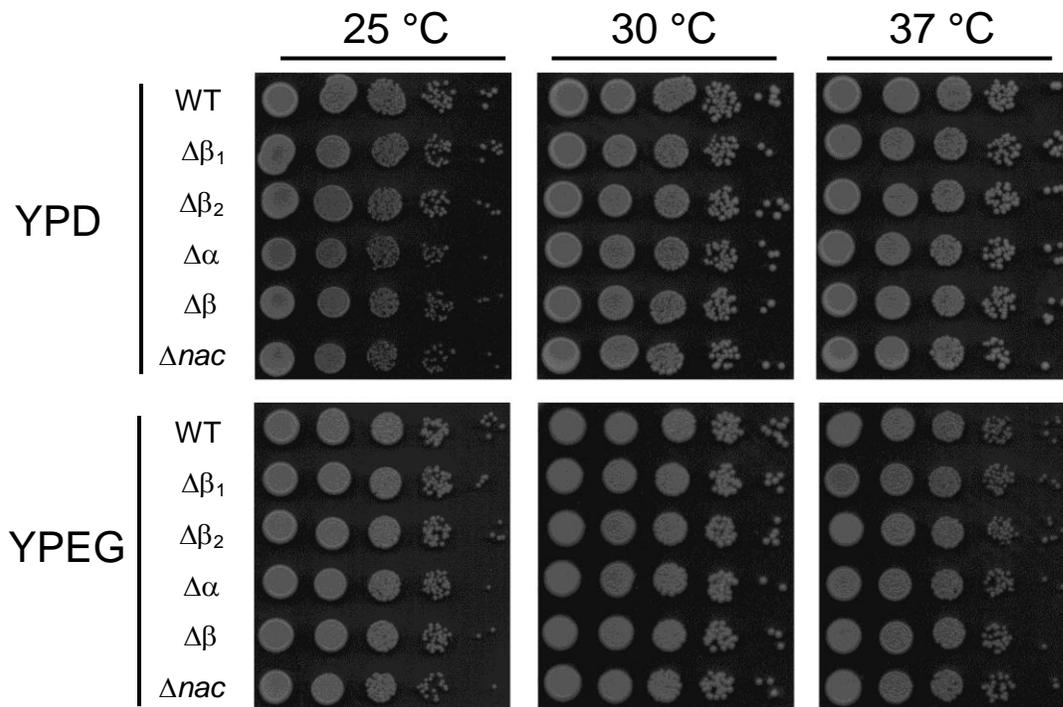


Figura 12. Análisis del fenotipo de crecimiento mediante diluciones seriadas. En el panel superior se muestra el crecimiento en medio YPD (glucosa) a 25 °C, 30 °C y 37 °C. El panel inferior se muestra el crecimiento en medio YPEG (etanol/glicerol) a las mismas temperaturas. Como referencia se muestra el crecimiento de la cepa silvestre (WT).

7.5 La ausencia del complejo NAC compromete la resistencia a estrés oxidativo

Se examinó la sensibilidad a estrés oxidativo en las cepas mutantes generadas, mediante un tratamiento de estrés con peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , Figura 13).

El resultado indica que la cepa Δnac presenta mayor sensibilidad al estrés por peróxido de hidrógeno que la cepa silvestre. Lo mismo sucedió con las cepas $\Delta\beta$ y $\Delta\beta_1$, lo que indica que la pérdida de las subunidades de NAC provoca una mayor sensibilidad al peróxido de hidrógeno. Se observa un efecto intermedio en la mutante $\Delta\alpha$.

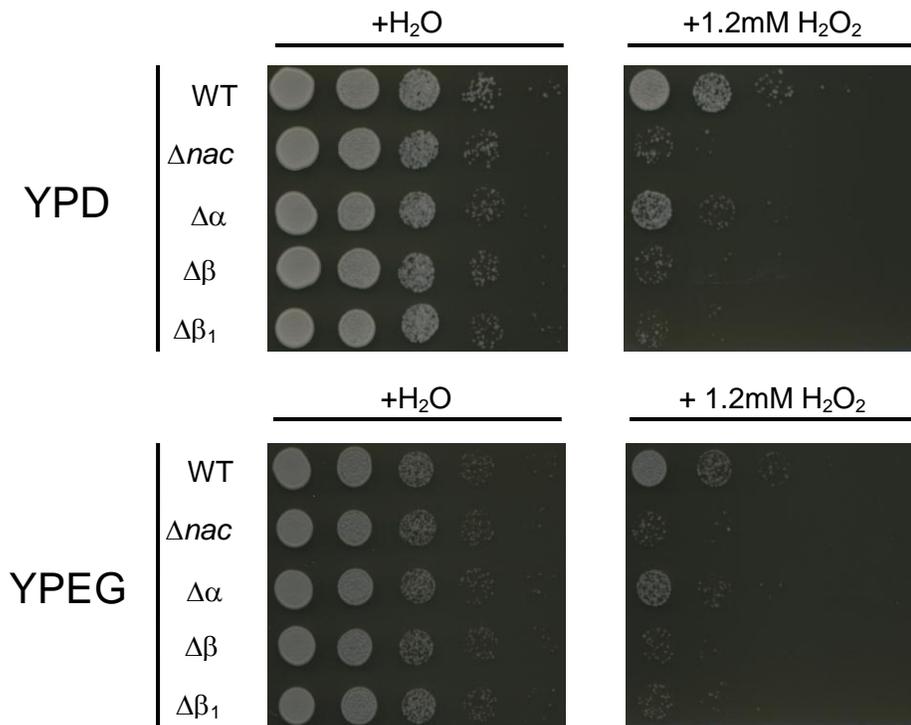


Figura 13. Análisis del fenotipo de crecimiento después de incubar durante cuatro horas con H_2O_2 . Cada cepa se trató como se describe en la sección 6.10. A continuación se realizaron diluciones seriadas que fueron depositadas en medio fermentable YPD (panel superior) y no fermentable YPEG (panel inferior). Se incubaron a 30 °C durante dos y tres días respectivamente. Como control se realizó el mismo experimento incubando con agua. Como referencia se muestra el crecimiento de la cepa silvestre (WT) sometida al mismo tratamiento que las mutantes.

7.6 Rastreo de interacciones genéticas o SGA

Una interacción genética ocurre cuando la eliminación de dos genes en un organismo, genera un fenotipo diferente del que se observa al eliminar cada gen individualmente. Estos resultados indican genes que participan en un mismo proceso o ruta metabólica y que pueden compartir cierta redundancia funcional. Cuando el fenotipo observado es la muerte del organismo, el efecto se denomina interacción genética “sintético-letal”. Cuando sólo se afecta el crecimiento o se mejora, se denominan interacciones “negativas” y “positivas” respectivamente.

En un rastreo de interacciones genéticas o “SGA” en levadura, se evalúan cepas dobles mutantes de manera masiva. Esto es, cepas que tengan la eliminación de algún gen de interés y además de un gen cualquiera del genoma de *S. cerevisiae* (Ooi y cols., 2006; Tong y Boone, 2007).

Una ventaja de esta herramienta en *S. cerevisiae*, es que se cuenta con una colección de cepas mutantes sencillas haploides (CMS), donde cada uno de los genes no esenciales del genoma de la levadura ha sido remplazado por el módulo *kanMX* que provee resistencia al antibiótico G418 (Winzeler y cols.,1999). Un SGA consiste en cruzar a una cepa mutante en un gen de interés (de sexo *MAT α*) con la CMS (aproximadamente 4700 mutantes de sexo *MATa*). Una vez que se obtienen levaduras diploides, las células se replican en medio de bajos nutrientes y nitrógeno o medio de esporulación, que obliga a las células a dividirse meióticamente y generar cuatro esporas haploides. Mediante pasos de replicado en medios de selección adecuados, es posible seleccionar sólo las células haploides dobles mutantes y evaluar su fenotipo de crecimiento. Las cepas que presentan fenotipo letal se denominan interacciones genéticas “sintético-letales”, en las cuales se considera que la doble mutación comprometió la viabilidad del organismo al eliminar la función compartida de los genes en estudio (Figura 7, Tong y Boone, 2007; Baryshnikova, 2010).

En el presente trabajo se realizaron tres SGAs por separado con las cepas $\Delta\alpha$, $\Delta\beta$ y Δnac . Ya que NAC es un complejo heterodimérico, se razonó que utilizar cualquiera de las tres mutantes mencionadas daría un resultado similar, que en los tres casos no habría complejo NAC funcional.

El primer SGA con la cepa $\Delta\alpha$ arrojó un total de 42 interacciones genéticas, con un índice de confianza del 95% (Figura 14, puntos rojos). La lista completa de estos genes se encuentra en el Apéndice III.

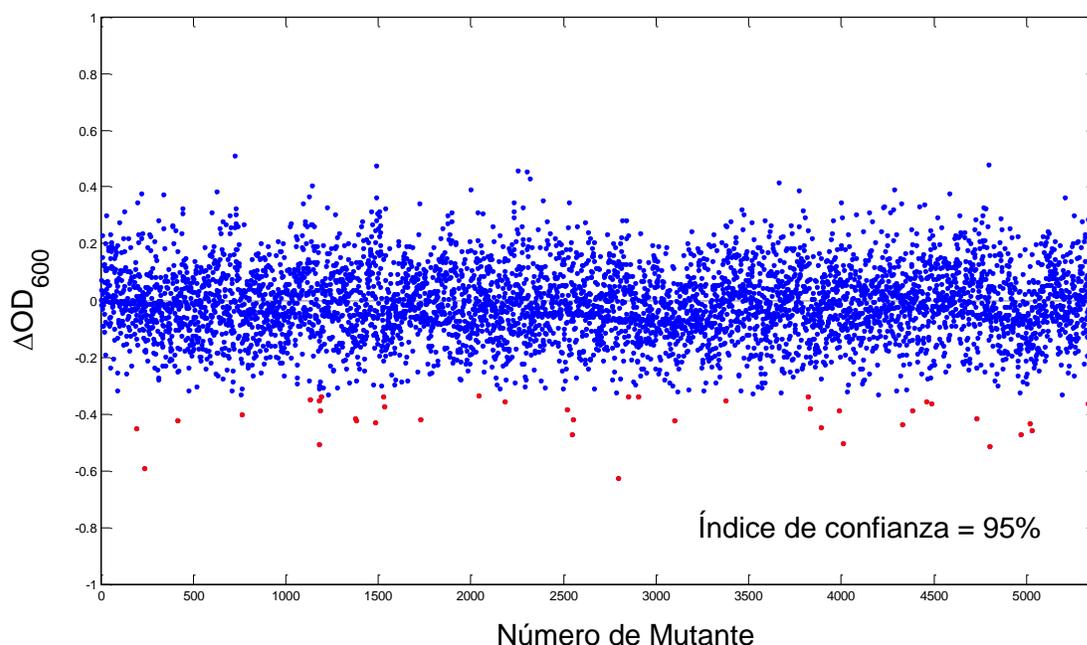


Figura 14. Gráfico de diferencia de crecimiento de cada cepa mutante (SGA de la cepa $\Delta\alpha$) entre el medio final y el medio de selección *kanMX4*. Los puntos en color rojo son considerados significativos, por lo tanto se consideran como interacciones genéticas negativas.

El análisis de la función de cada gen, reveló el enriquecimiento de algunas funciones celulares, entre ellas el sistema ubiquitina-proteasoma, metabolismo de lípidos, y biogénesis mitocondrial, como se muestra en la figura 15. Además se encontraron un número importante de factores de transcripción como interacciones genéticas.

De las interacciones genéticas que se encontraron, las que son importantes para los objetivos del presente estudio: i) *TOM71* que es uno de los receptores del complejo TOM de la membrana externa mitocondrial. *TOM71* es el gen parálogo de *TOM70* y se ha reportado que participa en el reconocimiento de precursores mitocondriales para su translocación a la mitocondria; ii) *TMA46* que codifica para una proteína citosólica sin una función atribuida hasta ahora pero que se sabe se asocia a ribosomas traduccionalmente activos; iii) *COX23* codifica a una proteína involucrada en la homeostasis del cobre y en el

ensamblaje de la citocromo *c* oxidasa; iv) *TOM1*, cuya proteína codificada tiene interacción genética con diversas proteínas ribosomales, como son *RPL6B*, *RPS1A*, *RPS31B*, *RPS30B*, *RPL13A*, *RPL16B*, además de asociarse físicamente con Rpl40A, Zuo1 y Hsp82. Cabe señalar que todas las interacciones identificadas fueron negativas. No se encontraron casos de interacción sintético-letal.

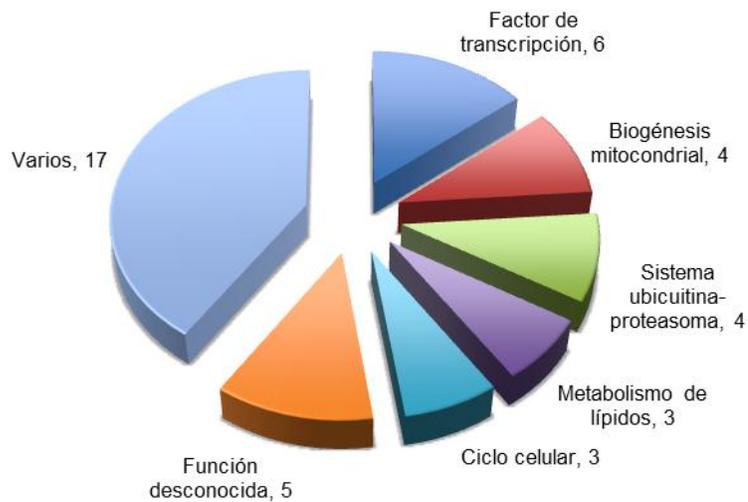


Figura 15. Procesos celulares asociados a las interacciones genéticas del gen *EGD2*. Las interacciones genéticas del gen *EGD2* están enriquecidas en ciertos procesos celulares. Se indica el número de genes en cada proceso celular.

En el SGA con la cepa $\Delta\beta$ se obtuvieron 165 interacciones genéticas (Figura 16, puntos rojos). La lista completa de estos genes se encuentra en el Apéndice VI. En éste SGA, 29 interacciones fueron sintético-letales y 139 interacciones negativas. El enriquecimiento de algunas funciones celulares se muestra en la figura 17.

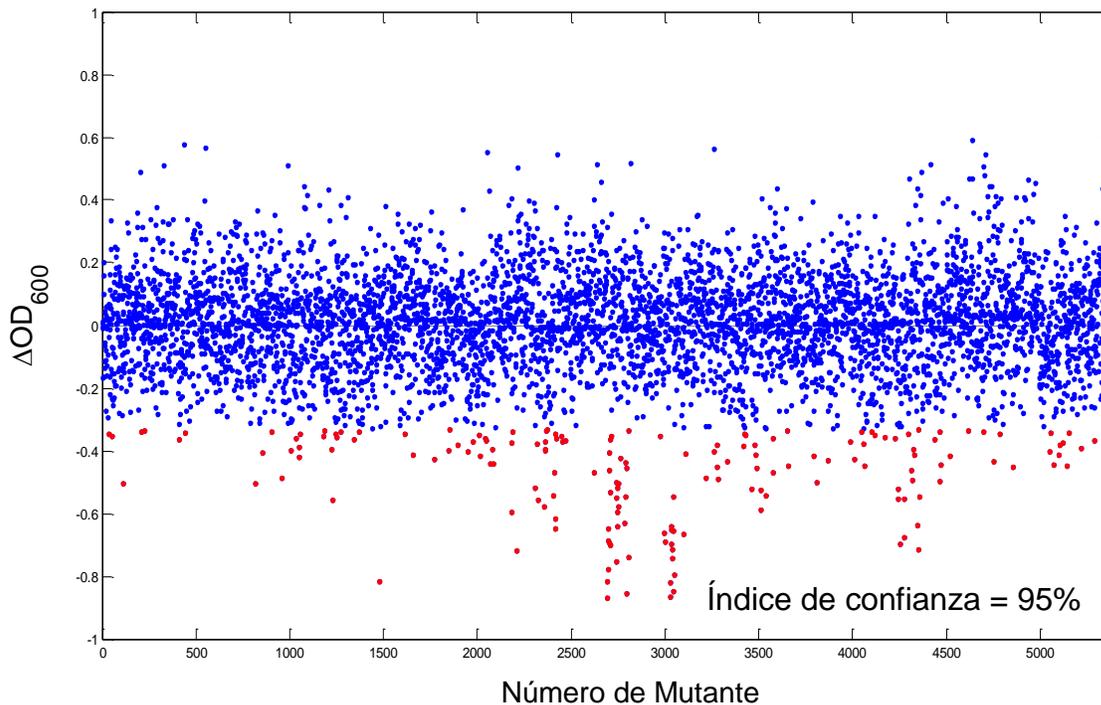


Figura 16. Gráfico de diferencia de crecimiento de cada cepa mutante (SGA de la cepa $\Delta\beta$) entre el medio final y el medio de selección *kanMX4*. Los puntos en color rojo son considerados significativos, por lo tanto se consideran como interacciones genéticas negativas o letales.

Algunas interacciones genéticas importantes son: i) *SAM37*, gen que codifica para una de las subunidades del complejo SAM de la membrana externa mitocondrial que se ha vinculado con la inserción de proteínas de estructura barril- β . *SAM37* además se ha reportado previamente que tiene interacciones genéticas letales con *TOM70*, *TOM20* y *HSC82*, tiene interacciones genéticas negativas con *MDM10*, *SEC63* y *TOM6*, por otro lado interactúa físicamente con Tom70, Mdm10, Tom40, Tom5 y Ssb1; ii) *UBS1*, codifica para una proteína que participa en transporte de proteínas del núcleo al citoplasma y que tiene interacción genética con diversos genes ribosomales como son *RPL35B*, *RPL40B*, *RPL8A* y *RPL9B*; iii) *MPA43*, que codifica para una proteína de función desconocida pero localizada en la mitocondria. *MPA43* tiene interacción genética

negativa con los genes de proteínas mitocondriales *MMM1*, *MDM10*, *MDM32*, *UGO1*, *PET130* y *ZUO1*.

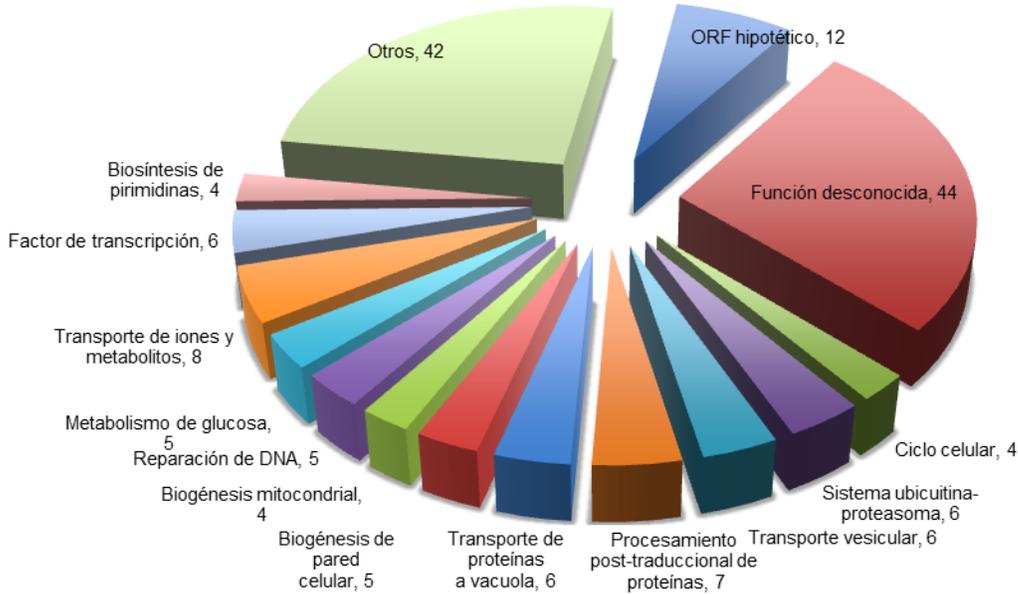


Figura 17. Procesos celulares asociados a las interacciones genéticas de los genes *EGD1* y *BTT1*. Las interacciones genéticas de los genes *EGD1* y *BTT1* están enriquecidas en ciertos procesos celulares. Se indica el número de genes en cada proceso celular.

Finalmente, en el SGA realizado con la cepa Δnac , el número de interacciones genéticas observado fue muy elevado (aproximadamente del 30-40% de los genes mostraron interacción genética). Este resultado no era esperado, dado que en un ensayo común el número de interacciones genéticas es menor. Para comprobar la confiabilidad de los resultados, se diseñó un experimento control, que permitiera determinar la cantidad de resultados falsos positivos en el procedimiento. El experimento consistió en cruzar la cepa Δnac con la mutante neutral ΔHO en un arreglo de 386 colonias. De antemano se sabe que no existe interacción genética entre estos genes, por lo cual el resultado esperado es un crecimiento similar en todas las colonias mutantes del arreglo.

El resultado obtenido se muestra en la figura 18. Este experimento control mostró un número elevado de falsos positivos, lo que abatió la confiabilidad de los resultados del SGA de la cepa Δnac . Debido a esto no se pudo llegar a resultados contundentes y se descartó el ensayo.

De manera paralela se realizaron experimentos control para los otros SGAs. La cantidad de falsos positivos en el SGA de la cepa $\Delta\alpha$ fue del 0.25%, mientras en el SGA de la cepa $\Delta\beta$ fue del 4%.



Figura 18. Resultado del SGA control utilizando a las cepas mutantes ΔHO y Δnac . Ya que se observa un crecimiento no uniforme de las colonias, es posible concluir que existe un problema metodológico que eleva el número de resultados falsos positivos en el experimento.

7.7 Comparación de interacciones genéticas y réplica a medio respiratorio

Los resultados obtenidos en los SGAs anteriores, muestran el fenotipo de las interacciones genéticas en medio fermentable. Sin embargo, se quiso probar si existen interacciones genéticas cuyo fenotipo se enmascare por el medio utilizado. Para ello se realizó una réplica de los SGAs de las cepas $\Delta\alpha$ y $\Delta\beta$ en medio de selección respiratorio, utilizando etanol/glicerol como fuente de carbono (se omitió trabajar con la cepa Δnac debido a los problemas metodológicos presentados en la sección anterior).

Se partió de las cajas de ambos SGAs en medio de selección *kanMX* (Figura 7, paso 8) y se replicaron al mismo medio para reactivar el crecimiento

de las levaduras (las células habían permanecido en refrigeración por dos meses hasta este punto). Una vez que las levaduras crecieron, el SGA de la cepa $\Delta\alpha$ se replicó simultáneamente a medio de selección doble SD+higromicina+G418 y medio no fermentable SEG+higromicina+G418. El SGA $\Delta\beta$ se replicó a medio de selección triple SD-Ura+higromicina+G418 y medio no fermentable SEG-Ura+higromicina+G418. Se replicaron a medio fermentable nuevamente para evaluar la reproducibilidad de los resultados. Sin embargo las levaduras del SGA $\Delta\alpha$ no lograron crecer adecuadamente, tal vez debido al tiempo de refrigeración al que se expusieron. Por ello este SGA se replicó nuevamente del medio *kanMX* a medio rico (pero manteniendo la selección doble, YPD+higromicina+G418) y a medio no fermentable (YPEG+higromicina+G418, Figura 19).

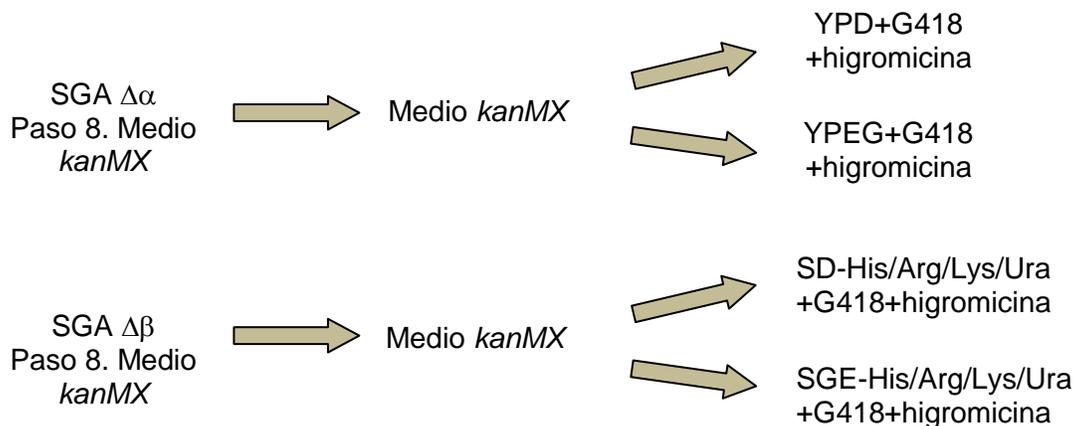


Figura 19. Esquema de réplicas realizadas a medio fermentable y respiratorio de los SGAs originales (con las cepas $\Delta\alpha$ y $\Delta\beta$). Las réplicas de la cepa $\Delta\alpha$ se hicieron en medio rico en vez de sintético debido a un defecto de crecimiento.

Como resultado de las réplicas a medio fermentable, se confirmaron diversas interacciones genéticas previamente identificadas. Sin embargo, algunas no se pudieron reproducir y se observaron interacciones genéticas nuevas. En total se obtuvieron 39 interacciones genéticas del SGA $\Delta\alpha$ (12

interacciones letales y 25 negativas, Apéndice IV) y 192 en el SGA $\Delta\beta$ (16 sintético-letales y 176 negativas, Apéndice VII).

Para obtener una lista final de las interacciones genéticas, se compararon los resultados de ambos SGAs ($\Delta\alpha$ y $\Delta\beta$) y se consideraron solo aquellos genes que se repitieron en los resultados. Estos datos se compararon también con los resultados obtenidos por el grupo de Costanzo y colaboradores (2010), y se obtuvieron las interacciones genéticas repetidas en al menos dos de las tres listas de resultados (Tabla I). Para la elaboración de esta lista, se omitieron las réplicas en medio fermentable debido a la variabilidad de resultados encontrada.

Tabla I. Interacciones genéticas comunes entre los SGA con las cepas $\Delta\alpha$ y $\Delta\beta$ (este trabajo) y los identificados por Costanzo y colaboradores (2010). n.a., no asignado.

ORF	Nombre	Función	Proceso celular asociado	SGA $\Delta\alpha$	SGA $\Delta\beta$	SGA Costanzo
YBR058C	<i>UBP14</i>	Proteasa de cadenas de ubiquitina	Sistema ubiquitina-proteasoma	X	X	X
YBR068C	<i>BAP2</i>	Leucina permeasa	Transportador de aminoácidos	X	X	
YBR165W	<i>UBS1</i>	Enzima conjugadora de ubiquitina	Sistema ubiquitina-proteasoma		X	X
YDR149C	n.a.	Desconocido	ORF hipotético		X	X
YDR293C	<i>SSD1</i>	Represor traduccional	Traducción	X	X	
YDR457W	<i>TOM1</i>	E3 ubiquitina ligasa	Sistema ubiquitina-proteasoma	X	X	X
YDR463W	<i>STP1</i>	Activador de la expresión de genes de permeasas de aminoácidos	Factor de transcripción	X	X	
YLR261C	<i>VPS63</i>	Desconocido	ORF hipotético		X	X
YLR262C	<i>YPT6</i>	GTPasa de la familia Rab	Transporte vesicular		X	X
YLR451W	<i>LEU3</i>	Regulador de la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de aminoácidos ramificados	Factor de transcripción	X	X	
YMR060C	<i>SAM37</i>	Componente del complejo SAM mitocondrial	Biogénesis mitocondrial		X	X
YOL011W	<i>PLB3</i>	Fosfolipasa B	Metabolismo de lípidos	X		X
YPL032C	<i>SVL3</i>	Proteína de función desconocida	Función desconocida		X	X

Como resultado de la réplica del SGA con la cepa $\Delta\alpha$ a medio respiratorio, se obtuvieron un total de 19 interacciones genéticas extras (omitiendo las cepas que no respiran, 5 letales y 14 negativas, Apéndice V). El gen *SSA1* es el resultado más notable debido al papel de las chaperonas del tipo Hsp70 durante la importación mitocondrial.

En el SGA en medio no fermentable de la cepa $\Delta\beta$ no se pudo obtener ningún resultado claro debido a que se presentó un crecimiento deficiente en los arreglos de levaduras.

8. Discusión

El transporte de proteínas a los diferentes organelos celulares puede ocurrir de modo post-traducciona l o co-traducciona l. En general, los peroxisomas, el núcleo y las mitocondrias son organelos que reciben proteínas de modo post-traducciona l, en donde la proteína blanco es reconocida y se dirige al organelo una vez que se ha sintetizado por completo. Por otro lado, en el caso del retículo endoplásmico se ha descrito que las proteínas ingresan de modo co-traducciona l, es decir acoplado la translocación a la reacción de traducción del ARNm. Se ha propuesto que un sistema co-traducciona l análogo al que existe en el retículo endoplásmico también podría operar en la mitocondria, a la par del sistema post-traducciona l. Sin embargo, los componentes y/o mecanismos involucrados no se han dilucidado hasta la fecha.

El presente trabajo tuvo como objetivo principal identificar proteínas funcionalmente redundantes al complejo NAC, que pudieran evidenciar componentes no descritos en el sistema de importación de proteínas a la mitocondria, en particular de modo co-traducciona l. Nuestra hipótesis se fundamentó en trabajos previamente publicados por otros grupos:

- i) Ciertas proteínas sólo ingresan a la mitocondria de modo co-traducciona l, en particular las enzimas Fum1 y Sod2 (Luk y cols., 2005).
- ii) La enzima Fum1 ingresa a la mitocondria *in vivo* de manera más eficiente cuando el complejo NAC está presente (Yogev y cols., 2007).
- iii) La ausencia de al menos uno de los genes que codifican para NAC en organismos como *M. musculus*, *C. elegans* o *D. melanogaster* produce un fenotipo letal (Deng y Behringer, 1995; Bloss y cols., 2003; Markesich y cols., 2000). Por el contrario, en la levadura *S. cerevisiae*, la ausencia de NAC no compromete la viabilidad celular (Reinmann y cols., 1999).

Dado que la importación de proteínas es fundamental para la biogénesis mitocondria l (un proceso vital para la viabilidad de los organismos eucariontes), es de esperarse que un componente de la maquinaria de importación sea

esencial, como se observa en el caso de los componentes centrales de los complejos membranales de importación en *S. cerevisiae* y en el caso de los componentes NAC en animales modelo. La falta de fenotipo observado en la levadura al eliminar al complejo NAC podría deberse a que existan sistemas redundantes que funcionen conjuntamente o a la par de la función de NAC.

Para cumplir con el objetivo del trabajo, se eligió utilizar el experimento SGA como método a seguir (Tong y Boone, 2007). Las ventajas que ofrece el SGA son: 1) la capacidad de análisis de interacciones genéticas a gran escala al utilizar una colección de mutantes en cada uno de los genes no esenciales del genoma de *S. cerevisiae*; 2) la resolución con la cual se pueden determinar interacciones genéticas, es decir, la posibilidad de detectar y diferenciar interacciones genéticas sintético-letales (en donde se observa un fenotipo letal) o interacciones genéticas negativas y/o positivas (donde el fenotipo de crecimiento es menor o mayor respectivamente, con respecto a las mutantes individuales involucradas); y 3) la obtención de resultados de un experimento masivo en relativamente poco tiempo.

8.1 Análisis del fenotipo de las mutantes $\Delta\alpha$, $\Delta\beta$ y Δnac

El trabajo se inició con la generación de diferentes cepas mutantes en cada uno de los tres genes que codifican para NAC. Las mutantes se realizaron por recombinación homóloga y se confirmaron mediante PCR de colonia. A continuación se analizó el fenotipo de crecimiento en medio fermentable (YPD) o no fermentable (YPEG) a tres diferentes temperaturas. No se encontraron diferencias en el crecimiento de nuestras mutantes en medio YPD y YPEG, lo que concuerda con lo reportado previamente (Reinmann y cols., 1999), donde se observó que la eliminación de uno, dos o tres genes no genera fenotipo de crecimiento observable. Tampoco se encontró ningún fenotipo de crecimiento en condiciones de estrés térmico.

Cabe señalar que Reinmann y colaboradores (1999) observaron una tasa de crecimiento más lenta en una cepa doble mutante $\Delta\beta$ únicamente al crecerla

a 43 °C en medio sintético fermentable. En este trabajo no se evaluó dicha condición. Por otro lado, George y colaboradores reportaron una menor capacidad de formación de colonias en una cepa doble mutante $\Delta egd1\Delta egd2$ en medio YPEG (George y cols., 2002). De manera contrastante, en el presente trabajo no se observó ese comportamiento. Esta diferencia podría deberse al fondo genético utilizado. El presente trabajo se realizó utilizando cepas derivadas de la silvestre BY4742, Reinmann y colaboradores (1999) utilizaron cepas derivadas de la W303-A y George y colaboradores (2002) utilizaron cepas derivadas de JK3-9da.

En este trabajo se observó un fenotipo de crecimiento en condiciones diferentes a las estándar de laboratorio, al someter a las cepas a estrés oxidativo tratándolas con peróxido de hidrógeno durante 4 h. Todas las cepas mutantes a los genes de NAC mostraron mayor sensibilidad que la cepa silvestre. Esto puede ser causado por un defecto en la importación de proteínas que contienen radicales libres en el interior de la mitocondria, como es el caso de Sod2. Otra alternativa, sería que al NAC funcionar como una chaperona citosólica y proteger a las proteínas nacientes en el túnel de salida ribosomal, exista una mayor exposición y daño a proteínas nacientes por el peróxido de hidrógeno cuando NAC está ausente. Llama la atención que se observa un efecto intermedio en la sensibilidad en la cepa mutante $\Delta\alpha$ (Figura 12). Esto puede deberse a una compensación parcial por las subunidades β remanentes. En condiciones adversas, dichas subunidades podrían dimerizarse (del Alamo y cols., 2011) y al ser éstas quienes se unen al túnel de salida ribosomal cumplir parcialmente las funciones del complejo NAC. Otra opción, sería que la subunidad β tenga alguna función compensatoria en su forma monomérica.

8.2 Interacciones genéticas observadas y su relevancia en importación a mitocondria

El análisis de interacciones genéticas se dividió básicamente en dos partes: a) un rastreo de interacciones genéticas para el gen *EGD2* (cepa $\Delta\alpha$) y b) uno para los genes *EGD1* y *BTT1* ($\Delta\beta$). Para cada caso se realizó un SGA con dos replicados a medio fermentable y un replicado a medio no fermentable.

En el SGA de la cepa $\Delta\alpha$ se identificaron 42 interacciones genéticas en medio fermentable en su primera réplica. Para el caso del SGA con la cepa $\Delta\beta$, se identificaron 169 interacciones genéticas. Como era de esperarse, hubo genes que se encontraron tanto en el SGA $\Delta\alpha$ como en el $\Delta\beta$. Estos resultados se muestran en la Tabla I. Estos datos corresponden a las interacciones genéticas más confiables, dado que se compararon además con los resultados obtenidos por el grupo de Costanzo y colaboradores (2010). En esta lista se omitieron los resultados de las réplicas de ambos SGAs, a medio fermentable. Esto debido a que como se mencionó, se mantuvo a los arreglos de levaduras en refrigeración hasta su uso posterior. Esto probablemente repercutió en los resultados con la pérdida de interacciones genéticas, debido a un deterioro en la viabilidad de las cepas. El efecto se refleja en la necesidad de haber replicado el SGA $\Delta\alpha$ a medio rico (YPD+G418/higromicina) para un crecimiento óptimo.

El resto de los genes identificados en ambos SGAs, que aparecen exclusivamente como interacciones en el SGA $\Delta\alpha$ o $\Delta\beta$ y que no se repiten en ambos, pueden obtenerse debido a varios factores:

i) Son interacciones genéticas particulares a cada gen, debido a que las subunidades individuales podrían estar cumpliendo funciones específicas de manera independiente a la formación del complejo heterodimérico. Esto se apoya también con el resultado observado en los ensayos de crecimiento después de estrés con peróxido de hidrógeno, donde se observa un efecto intermedio en la sensibilidad en la cepa $\Delta\alpha$ con respecto a las cepas.

ii) Desde el punto de vista metodológico, existe una variación durante la realización de cada una de las réplicas ya que se utiliza un replicador manual.

Por lo tanto, detalles como la posición e integridad de cada colonia sobre la caja de agar, podría afectar la lectura de densidad óptica automatizada durante el análisis final. Este problema, se compensa parcialmente al confirmar de manera manual los resultados arrojados por el lector y al realizar tres réplicas por cada SGA.

iii) Antes de realizar las réplicas en medio fermentable y no fermentable, las cajas originales permanecieron un periodo largo de tiempo en refrigeración. Esta incubación puede haber afectado la viabilidad de las cepas.

iv) El hecho de que cada SGA, depende fuertemente de la eficiencia de esporulación de las cepas para poder obtener y analizar el crecimiento de la mutante de interés. Esto se debe a que para obtener una "mutante doble" (en el caso del SGA de la mutante $\Delta\alpha$ por ejemplo) en la que ambos alelos de interés se encuentren eliminados, en realidad lo que se busca es una "mutante quíntuple", debido a que se necesita forzosamente de la segregación simultánea tanto de los módulos que están remplazando a los genes de interés, como de los alelos que se utilizan durante la selección. Esto se ve reflejado de manera extrema en la cepa Δnac utilizada en este trabajo, ya que en ella únicamente una de cada 128 esporas contiene a los siete alelos de interés. Se puede observar el efecto gradual de la dependencia de esporulación con el porcentaje de casos falsos positivos en cada experimento (0.25% en el SGA con la cepa $\Delta\alpha$, 4% con la cepa $\Delta\beta$ y 30-40% con la cepa Δnac).

Los resultados obtenidos en los SGAs exitosos ($\Delta\alpha$ y $\Delta\beta$) incluyen genes que codifican para ciertos procesos celulares que concuerdan con los trabajos previamente publicados acerca del papel funcional de NAC. Por ejemplo, se obtuvieron genes del sistema ubiquitina-proteasoma, que concuerdan con los reportes que plantean que la subunidad alfa de NAC tiene dominios de ubiquitinación, y podría con el sistema ubiquitina-proteasoma, etiquetar proteínas mal plegadas una vez que son sintetizadas en el túnel de salida ribosomal (Panasenکو y cols., 2009). Otro ejemplo es la obtención de diversos factores de transcripción involucrados en distintos procesos celulares. Esto puede tener

relación con la migración probable de las subunidades individuales al núcleo, y su papel como factores de transcripción (Moreau, 1998). Se obtuvieron también genes involucrados en el tráfico vesicular, aunque hasta ahora no se ha señalado que NAC participe en este proceso. El papel más estudiado de NAC hasta la fecha lo identifica como un elemento regulatorio del sistema de tráfico de proteínas a diversos organelos celulares (Wiedmann y cols., 1994; Fünfschilling y Rospert, 1999, Yogev y cols., 2007). En este sentido, se obtuvieron resultados que involucran el transporte hacia retículo endoplásmico, mitocondria y peroxisomas. Esto podría coincidir con la primera descripción del complejo NAC que propuso que se une a todas las proteínas nacientes durante el proceso de síntesis antes que cualquier otra chaperona (Wiedemann y cols., 1994). El destino final al que deba ser llevada la proteína en cuestión, estaría determinado por el tipo de proteínas que se le asocien posteriormente.

De las interacciones genéticas obtenidas en ambos SGAs destacan para este trabajo por su naturaleza funcional y de localización: *TOM71* y *SAM37*. Ambos genes codifican para proteínas que se localizan en la membrana externa mitocondrial y presentan un dominio prominente expuesto hacia el citoplasma (Gratzer y cols., 1995; Schlossmann y cols., 1996).

Tom71 es un receptor mitocondrial de la maquinaria TOM, que como se mencionó en la introducción, reconoce precursores mitocondriales para su importación. Sin embargo, no se ha estudiado con mucho detalle ya que en *S. cerevisiae* existe un parólogo (*TOM70*) que se expresa preferencialmente (Streger y cols., 1990). Sin embargo, se piensa que estos dos receptores cumplen funciones similares, aunque con diferencias de afinidad por los substratos (Schlossmann y cols., 1996). A pesar de que la interacción genética con el gen *TOM71* se obtuvo únicamente durante el SGA $\Delta\alpha$, en un trabajo previo (Costanzo y cols. 2010) se reportó la interacción genética del gen *EGD2* (subunidad α) con *TOM70*. En este punto es importante mencionar que en la colección de mutantes sencillas utilizada en el presente trabajo la cepa mutante al gen *TOM70*, no tenía el remplazo esperado (verificación por PCR, Manuel Semán datos no publicados).

TMA46 es otro gen cuya interacción genética se identificó también en el SGA $\Delta\alpha$. Esta es una proteína de asociación a ribosomas, pero no tiene una función atribuida hasta el momento. Tiene interacción física con la chaperona Ssz1, que como se mencionó anteriormente, forma parte del complejo RAC, relacionado con importación de proteínas mitocondriales (Gong y cols., 2009). Esta proteína podría ser parte del sistema de importación, en pasos sucesivos a NAC, al entregar al precursor mitocondrial al complejo TOM.

De los resultados en el SGA $\Delta\beta$ destaca *SAM37*, que codifica para una de las subunidades del complejo SAM que lleva a cabo la inserción de proteínas barril- β a la membrana externa mitocondrial. Hasta ahora la función de su producto proteico, Sam37, no ha sido esclarecida por completo. Se ha propuesto que participa al momento de liberar proteínas del complejo SAM cuando se incorporan a la membrana externa mitocondrial. Sin embargo, se piensa que también participa en la interacción funcional entre los complejos SAM y TOM. En otros reportes se describió una asociación física de Sam37 con el receptor Tom70, cuyo resultado se especuló que sería otorgar mayor especificidad al receptor por cierto tipo de precursores mitocondriales (Gratzer y cols., 1995). El resultado de *SAM37* en nuestro trabajo está reforzado por el trabajo de Costanzo y colaboradores (2010), donde se reportó también esta interacción con el gen *EGD2*. Este resultado resulta atractivo, dado que se puede especular con una movilidad de Sam37 en la membrana externa, y que en conjunto con TOM, sean parte del sistema que recibe proteínas de importación co-traduccionales. Un complejo de estas características no ha sido descrito hasta ahora, sin embargo es probable que no se haya caracterizado por su asociación transitoria, o porque pueda estar regulado bajo condiciones particulares que no han sido exploradas.

En este SGA se identificaron genes con función desconocida pero que codifican para proteínas mitocondriales. Dentro de estos, *MSP1* se ha relacionado con importación de proteínas a mitocondria. Se especula es un transportador de membrana interna (dependiente de ATP). Ésta proteína podría participar en pasos posteriores al reconocimiento del precursor por el complejo TOM.

MPA43 también se identificó en éste SGA. Este gen codifica para una proteína de función desconocida, pero de localización mitocondrial. Es notable el hecho de que *Mpa43* tiene interacción genética con componentes del complejo ERMES, como *Mmm1*, *Mdm32* y *Mdm10*. Además, tiene interacción genética negativa con *SSD1* (gen que se describirá a continuación) y con *Zuo1*. Este es un candidato atractivo dado que podría mediar interacciones con componentes del citoplasma en la vía de importación. Ya sea ayudando a proteína de unión a ARNm (como es el caso de *Ssd1*) o con proteínas de unión al ribosoma y la proteína naciente (en el caso de *Zuo1*).

Finalmente se decidió depurar la lista de interacciones genéticas, considerando aquellas que se repitieran en ambos SGAs, y que fueran más confiables. Para ello se compararon las listas de genes de las primeras réplicas de ambos SGAs (se prefirió omitir las interacciones genéticas de las réplicas en medio fermentable debido a que como se mencionó anteriormente, los arreglos de levaduras permanecieron en refrigeración por un periodo prolongado, alterando la viabilidad de las células y por ende, los resultados que se pudieron obtener. También se compararon con datos previos a cargo del trabajo de Costanzo (2010).

TOM1 es una de las interacciones genéticas letales que se repitió en los tres SGAs comparados. A pesar de que su función descrita está relacionada con exportación de ARNm del núcleo al citosol, tiene interacción genética negativa con genes ribosomales como son *RPL16A*, *RPL17B*, *RPS4B*, *RPS23A*, *RPL24A*, entre otros. Además *Tom1* tiene interacción física con *Ssz1* y *Zuo1* (proteínas que forman parte de RAC; Krogan NJ, 2006) y con *Hsp82*, que también se ha vinculado con importación de proteínas a mitocondria (Young y cols., 2003). Además, su sobreexpresión rescata el fenotipo de una mutante en *SSZ1* y *ZUO1*.

El otro gen de la lista que tuvo interacciones genéticas en los tres SGAs, fue *UBP14*. Esta proteína forma parte del sistema ubiquitina-proteasoma, y promueve la eliminación de cadenas de ubiquitina libres (generadas durante el

proceso de degradación de proteínas). Aunque su función principal no está relacionada directamente con importación de proteínas a la mitocondria, llama la atención que tiene interacción genética negativa con el gen *MDM12* (Costanzo, 2010). Este gen codifica para una proteína que se ha vinculado con la inserción de proteínas barril- β a la membrana externa mitocondrial. El rol de *UBP14*, se puede explicar por el papel adjudicado a NAC en el sistema ubiquitina-proteasoma (Panassenko, 2009). Resulta interesante el hecho de que éste sistema de degradación de proteínas hasta ahora no se ha relacionado con importación de proteínas a mitocondria. Este resultado puede deberse a que si existe un problema de plegamiento (producido por la falta de NAC) y se añade un problema en la degradación de cadenas de ubiquitina, el resultado es la acumulación de dichas cadenas, que compite con proteínas mal plegadas por el proteasoma. En tal caso, la degradación de proteínas disminuye y se genera estrés debido a la acumulación de proteínas no funcionales.

Finalmente, *SSD1* codifica para una proteína de unión a la región 5' UTR del ARNm. Hasta ahora se ha descrito como un represor traduccional. Probablemente esta proteína pueda tener un papel similar al de SRP en transporte de proteínas a retículo endoplásmico, donde la traducción se detiene y la proteína es llevada hasta el translocón Sec61. *SSD1* podría entonces, mediar la localización de los ARNm codificantes para proteínas mitocondriales.

9. Conclusiones

- La eliminación de al menos uno de los genes que codifican para las subunidades del complejo NAC (*EGD1*, *BTT1* o *EGD2*), provoca mayor sensibilidad a estrés oxidativo.
- Existen interacciones genéticas de los genes *EGD1*, *BTT1* y *EGD2* con otros genes no esenciales del genoma de *S. cerevisiae* que están enriquecidas en funciones celulares diversas, una de las cuales es la biogénesis mitocondrial.

10. Perspectivas

Para evaluar el papel funcional de las interacciones genéticas observadas en la importación de proteínas a la mitocondria, el proyecto tiene contempladas las siguientes estrategias experimentales a corto plazo:

- 1) Comprobar las interacciones genéticas identificadas mediante un experimento de “esporas al azar” (Tong y Boone, 2007).

- 2) Evaluar la función de las proteínas codificadas por los genes obtenidos, con experimentos de importación *in vivo* e *in vitro* a la mitocondria, utilizando como proteínas modelo a Fum1 y Sod2.

- 3) Evaluar la interacción física entre NAC y las proteínas codificadas por los genes obtenidos en experimentos de entrecruzamiento e inmunoprecipitación.

- 4) Evaluar la interacción física entre las proteínas codificadas por los genes obtenidos con ribosomas citoplásmicos mediante experimentos de migración en gradientes de sacarosa.

11. Apéndices

Apéndice I. Soluciones y medios de cultivo utilizados.

a) Amortiguadores

- TAE 50X: Tris 242 g/L, ácido acético glacial 57.1 ml/L, EDTA 0.5 M pH=8 100mL/L.
- TfbI (Para 45 mL): CH₃CO₂K 1 M 1.35 mL, MnCl₂ 1 M 2.25 mL, RbCl 1 M 4.5 mL, CaCl₂ 1 mM 0.45 mL, Glicerol 100% 5.4 mL, agua desionizada 31 mL.
- TfbII (Para 5 mL): MOPS 1 M 50 µL, CaCl₂ 1 mM 375 µL, RbCl 1M 50 µL, Glicerol 100% 600 µL, agua desionizada 3.93 mL.
- Amortiguador de carga 6X: 0.25% azul de bromofenol, 0.25% xileno cianol, 30% glicerol.

b) Soluciones Madre:

- G418 (Geneticina, Invitrogen): 200 mg/mL.
- Higromicina B (Invitrogen): 50 mg/mL.
- CloNAT (Werner BioAgents): 100 mg/mL.
- Canavanina (L-sulfato de canavanina, Sigma, C-9758): 100 mg/mL.
- Tialisina (Sigma, A-2636): 100 mg/mL.

c) Medios de Cultivo

- YPD: Extracto de levadura 1%, glucosa 2%, peptona 2%. Para medios sólidos, añadir agar 2%.
- YPEG: Extracto de levadura 1%, glicerol 2% v/v, etanol 2% v/v, peptona 2%. Para medios sólidos, añadir agar 2%.

- LB: NaCl 1%; bactotripton 1%; extracto de Levadura 0.5%. Para medios sólidos, añadir agar 2%.
- YPD+G418 (para 1 L): Extracto de Levadura 10 g, pepton 20 g, agar 20 g, glucosa (40%) 50 mL, G418 200 µg/µL.
- SD-ura+G418/higromicina (para 1 L): 1.7 g base nitrogenada sin aminoácidos y sulfato de amonio, 1 g de ácido glutámico monosódico, 2 g suplemento de aminoácidos (*DropOut-Ura*), agar 20 g, glucosa (40%) 50 mL, G418 1 mL, higromicina B 4 mL.
- SD-ura+G418/higromicina/cloNAT (para 1 L): 1.7 g base nitrogenada sin aminoácidos y sulfato de amonio, 1 g de ácido glutámico monosódico, 2 g suplemento de aminoácidos (*DropOut-Ura*), agar 20 g, glucosa (40%) 50 mL, G418 1 mL, higromicina B 4 mL, cloNAT 2 mL.
- Esporulación (para 1 L): 10 g acetato de potasio, 1 g extracto de levadura, 0.5 g glucosa, 0.1 g de suplemento de aminoácidos para esporulación, agar 20 g.
- SD-His/Arg/Lys+can/tial (para 1 L): 1.7 g base nitrogenada sin aminoácidos y sulfato de amonio, 5 g sulfato de amonio, 2 g suplemento de aminoácidos (*DropOut-His/Arg/Lys*), agar 20 g, glucosa (40%) 50 mL, 500 µL sulfato de canavanina, 500 µL tialisina.
- SD-His/Arg/Lys+can/tial+G418 (para 1 L): 1.7 g base nitrogenada sin aminoácidos y sulfato de amonio, 1 g de ácido glutámico monosódico, 2 g suplemento de aminoácidos (*DropOut-His/Arg/Lys*), agar 20 g, glucosa (40%) 50 mL, 500 µL sulfato de canavanina, 500 µL tialisina, G418 1 mL.
- SD-His/Arg/Lys+can/tial/G418/higromicina (para 1 L): 1.7 g base nitrogenada sin aminoácidos y sulfato de amonio, 1 g de ácido glutámico monosódico, 2 g suplemento de aminoácidos (*DropOut-His/Arg/Lys*), agar

- 20 g, glucosa (40%) 50 mL, 500 μ L sulfato de canavanina (50 mg/L), 500 μ L tialisina (50 mg/l), G418 1 mL, higromicina B 4 mL .
- SD-His/Arg/Lys/Ura+can/tial/G418/higromicina (para 1 L): 1.7 g base nitrogenada sin aminoácidos y sulfato de amonio, 1 g de ácido glutámico monosódico, 2 g suplemento de aminoácidos (*DropOut-His/Arg/Lys/Ura*), agar 20 g, glucosa (40%) 50 mL, 500 μ L sulfato de canavanina, 500 μ L tialisina, G418 1 mL, higromicina 4 mL 50 mg/ μ L.
 - YPD+higromicina+G418 (para 1 L): Extracto de levadura 10 g, glucosa 2%, peptona 2%, agar 20 g, 4 mL higromicina 50 mg/mL, G418 1 mL.
 - YPEG+higromicina+G418 (para 1 L): Extracto de levadura 10 g, peptona 20 g, glicerol 2% v/v, etanol 2% v/v, agar 20 g, higromicina B 4 mL, G418 1 mL.
 - SEG-His/Arg/Lys/Ura+can/tial/G418/higromicina (para 1 L): 1.7 g base nitrogenada sin aminoácidos y sulfato de amonio, 1 g de ácido glutámico monosódico, 2 g suplemento de aminoácidos (*DropOut-His/Arg/Lys/Ura*), agar 20 g, glicerol 2% v/v, etanol 2% v/v, 500 μ L sulfato de canavanina, 500 μ L tialisina, G418 1 mL, higromicina 4 mL 50 mg/ μ L.
 - Suplemento para esporulación: 2 g L-histidina, 10 g L-leucina, 2 g L-lisina, 2 g uracilo.
 - Suplemento para medio sintético (*DropOut*): 3 g L-adenina, 2 g uracilo, 2 g inositol, 0.2 g ácido p-aminobenzoico, 2 g L-alanina, 2 g L-arginina, 2 g L-asparagina, 2 g L-ácido aspártico, 2 g L-cisteína, 2 g L-ácido glutámico, 2 g L-glutamina, 2 g L-glicina, 2 g L-histidina, 2 g L-isoleucina, 10 g L-leucina, 2 g L-lisina, 2 g L-metionina, 2 g L-fenilalanina, 2 g L-prolina, 2 g L-serina, 2 g L-treonina, 2 g L-triptófano, 2 g L-tirosina y 2 g valina. En los medios indicados, cada *DropOut* es una combinación de estos componentes menos los particulares para cada medio, por ejemplo: – His/Arg/Lys.

Apéndice II. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo. Se señala en subrayado y negro la región que permite amplificar cualquiera de los módulos *nat1*, *hph* o *URA3*.

Nombre	Región del Gen donde se une	Secuencia (5' a 3')
InF	5' UTR, <i>EGD1</i>	GAA TAG AAC ATC TCA CAC CAG ACG CGA CTC ATA ATT CAT A <u>CCA GCT GAA GCT TCG TAC GC</u>
InR	3' UTR, <i>EGD1</i>	GTG TTT TTT TAT TTA ACG TTA AAA TTA AAG ATT AAG TTA T <u>TCG ATG AAT TCG AGC TCG TT</u>
CuF	5' UTR, <i>BTT1</i>	GCT AAA TTA AAT AAA CTA CTA CAT AAT CCT ACA ACA TCA A <u>CCA GCT GAA GCT TCG TAC GC</u>
CuR	3' UTR, <i>BTT1</i>	ATC TGT CGC CCA GCT GGT CGA GCA CCG TCT GTT CAT TTT C <u>TCG ATG AAT TCG AGC TCG TT</u>
BusF	5' UTR, <i>EGD2</i>	ACC CTT ACA AGC AAC CAC ACA CCC ACA TAC TCA ATT GAT A <u>CCA GCT GAA GCT TCG TAC GC</u>
BusR	3' UTR, <i>EGD2</i>	ATC CTT ATT CAA GTC ACC GGC ATC AAC TTC ACC TTC TTC G <u>TCG ATG AAT TCG AGC TCG TT</u>

Apéndice III. Interacciones genéticas obtenidas del SGA con la cepa $\Delta\alpha$ en medio SD-His/Arg/Lys+can/tial/G418/higromicina. Se incluyen los genes resultantes en orden alfabético del ORF (n.a., no asignado). Información obtenida de la base de datos del genoma de *S. cerevisiae* www.yeastgenome.org.

ORF	Nombre	Descripción o función de la proteína codificada	Proceso celular asociado
YBL001C	<i>ECM15</i>	Función desconocida	Organización de pared celular
YBR058C	<i>UBP14</i>	Proteasa de cadenas de ubiquitina	Sistema ubiquitina-proteasoma
YBR068C	<i>BAP2</i>	Leucina permeasa	Transporte
YBR097W	<i>VPS15</i>	Cinasa de tráfico de proteínas vacuolares	Transporte
YDR065W	n.a.	Función desconocida, localización mitocondrial	Desconocido
YDR293C	<i>SSD1</i>	Represor traduccional	Traducción
YDR364C	<i>CDC40</i>	Factor de edición y empalme de pre-ARNm	Edición y empalme de ARNm
YDR443C	<i>SSN2</i>	Subunidad de la RNA polimerasa II	Factor de transcripción
YDR457W	<i>TOM1</i>	E3 ubiquitina ligasa	Sistema ubiquitina-proteasoma
YDR463W	<i>STP1</i>	Activador de genes codificantes para permeasas de aminoácidos	Factor de transcripción
YDR506C	n.a.	Proteína relacionada en la progresión meiótica	Ciclo celular
YDR508C	<i>GNP1</i>	Permeasa de glutamina	Transporte
YGR220C	<i>MRPL9</i>	Subunidad del ribosoma mitocondrial	Biogénesis mitocondrial
YHR116W	<i>COX23</i>	Ensamblaje de la citocromo c oxidasa	Biogénesis mitocondrial
YHR117W	<i>TOM71</i>	Receptor del complejo TOM mitocondrial	Biogénesis mitocondrial
YHR171W	<i>ATG7</i>	Enzima E1 activadora de ubiquitina	Macroautofagia
YHR195W	<i>NVJ1</i>	Proteína de la envoltura nuclear	Microautofagia
YHR200W	<i>RPN10</i>	Subunidad de la partícula 19S del proteasoma	Sistema ubiquitina-proteasoma
YHR206W	<i>SKN7</i>	Regulador de respuesta nuclear a estrés	Factor de transcripción
YIR023W	<i>DAL81</i>	Regulador positivo de múltiples vías de degradación de nitrógeno	Factor de transcripción
YJL175W	n.a.	ORF hipotético	ORF hipotético

YJR018W	n.a.	ORF hipotético	ORF hipotético
YLR260W	<i>LCB5</i>	Cinasa de esfingolípidos de cadena larga	Metabolismo de lípidos
YLR390W-A	<i>CCW14</i>	Glicoproteína de la pared celular	Organización de pared celular
YLR451W	<i>LEU3</i>	Regulador de la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de aminoácidos ramificados	Factor de transcripción
YML008C	<i>ERG6</i>	Enzima de la vía de síntesis de ergosterol	Metabolismo de lípidos
YMR187C	n.a.	Proteína de función desconocida	Desconocido
YNL020C	<i>ARK1</i>	Cinasa de serina/treonina	Organización de citoesqueleto
YNL229C	<i>URE2</i>	Regulador transcripcional de represión catabólica por nitrógeno	Factor de transcripción
YNL321W	<i>VNX1</i>	Antiportero Ca/H	Transporte
YOL011W	<i>PLB3</i>	Fosfolipasa B	Metabolismo de lípidos
YOL013C	<i>HRD1</i>	Ubiquitina ligasa	Sistema ubiquitina-proteasoma
YOL044W	<i>PEX15</i>	Proteína asociada a la membrana peroxisomal	Importación peroxisomal
YOR091W	<i>TMA46</i>	Proteína de asociación a ribosomas	Desconocido
YOR205C	n.a.	Función desconocida	Desconocido
YOR316C	<i>COT1</i>	Transportador vacuolar de zinc	Homeostásis de zinc y cobre
YPL024W	<i>RMI1</i>	Subunidad del complejo RecQ-TopoIII	Ciclo celular
YPL183W	n.a.	Proteína involucrada con traducción mitocondrial	Biogénesis mitocondrial
YPL227C	<i>ALG5</i>	Glicosil-transferasa	Procesamiento post-traduccionales de proteínas
YPL249C	<i>GYP5</i>	Proteína activadora de GTPasa	Transporte vesicular
YPR119W	<i>CLB2</i>	Ciclina tipo B	Ciclo celular
YPR123C	n.a.	ORF hipotético	Desconocido

Apéndice IV. Interacciones genéticas obtenidas del SGA con la cepa $\Delta\alpha$ en la réplica YPD+G418/higromicina. Se incluyen los genes resultantes en orden alfabético del ORF, n.a., no asignado, en fondo negro se indican las interacciones genéticas sintético-letales. Información obtenida de la base de datos del genoma de *S. cerevisiae* www.yeastgenome.org.

ORF	Nombre	Descripción o función de la proteína codificada	Proceso celular asociado
YAL049C	n.a.	Proteína citoplasmática involucrada en función mitocondrial	Desconocido
YAR027W	<i>UIP3</i>	Proteína de membrana de función desconocida	Desconocido
YCL026C	n.a.	Función desconocida	Desconocido
YCL061C	<i>MRC1</i>	Proteína requerida para replicación de ADN	Ciclo celular
YDL239C	<i>ADY3</i>	Formación de la pared celular en espora	Organización de pared celular
YDR183W	<i>PLP1</i>	Proteína que interactúa con CCT en plegamiento	Plegamiento de proteínas
YDR305C	<i>HNT2</i>	Dinucleósido trifosfato hidrolasa	Metabolismo de nucleótidos
YDR443C	<i>SSN2</i>	Subunidad de la RNA polimerasa II	Transcripción
YDR457W	<i>TOM1</i>	E3 ubiquitina ligasa	Sistema ubiquitina-proteasoma
YDR508C	<i>GNP1</i>	Permeasa de glutamina	Transporte
YEL054C	<i>RPL12A</i>	Componente de la subunidad 60S ribosomal	Traducción
YGR011W	n.a.	ORF hipotético	Desconocido
YHR031C	<i>RRM3</i>	Helicasa de ADN	Replicación de ADN
YHR034C	<i>PIH1</i>	Componente del complejo R2TP	Plegamiento de proteínas
YHR039W	<i>PUT2</i>	Delta-1-pyrrolina-5-carboxilato deshidrogenasa	Metabolismo de nitrógeno
YHR181W	<i>SVP26</i>	Proteína integral del aparato de Golgi	Vía de secreción
YHR191C	<i>CTF8</i>	Subunidad del complejo Ctf18c	Cohesión de cromátides hermanas
YHR199C	n.a.	Proteína mitocondrial de función desconocida	Desconocido
YHR202W	n.a.	Proteína citoplasmática de función desconocida	Desconocido

YIL060W	n.a.	Proteína de función desconocida	Desconocido
YIL089W	n.a.	Proteína de retículo endoplásmico de función desconocida	Desconocido
YIL111W	<i>COX5B</i>	Subunidad Vb de la citocromo c oxidasa	Transporte de electrones
YJR056C	n.a.	Proteína de función desconocida	Desconocido
YJR148W	<i>BAT2</i>	Aminotransferasa de residuos ramificados	Metabolismo de aminoácidos
YKL026C	<i>GPX1</i>	Peroxidasa de fosfolípidos	Manejo de estrés oxidativo
YLL020C	n.a.	ORF hipotético	Desconocido
YLR231C	<i>BNA5</i>	Quinureninasa	Biosíntesis de NAD
YML008C	<i>ERG6</i>	Delta(24)-sterol C-metiltransferasa	Biosíntesis de ergosterol
YML096W	n.a.	Proteína citosólica de función desconocida	Función desconocida
YMR036C	<i>MIH1</i>	Fosfatasa involucrada en ciclo celular	Ciclo celular
YMR237W	<i>BCH1</i>	Proteína que media la exportación de proteínas del aparato de Golgi a membrana plasmática	Transporte
YNL257C	<i>SIP3</i>	Factor de transcripción	Transcripción
YNL270C	<i>ALP1</i>	Transportador de arginina	Transporte
YOL081W	<i>IRA2</i>	Proteína activadora de GTPasa tipo Ras	Señalización
YOL138C	n.a.	Subunidad del complejo SEA, de asociación a vacuola	Asociación a vacuola
YPL183W	n.a.	Proteína involucrada con traducción	Traducción
YPR049C	<i>ATG11</i>	Proteína adaptadora para peroxifagia	Autofagia

Apéndice V. Interacciones genéticas obtenidas del SGA con la cepa $\Delta\alpha$ en medio no fermentable YPEG+G418/higromicina. Se incluyen los genes resultantes en orden alfabético del ORF, n.a., no asignado, en fondo negro se indican las interacciones genéticas sintético-letales. Información obtenida de la base de datos del genoma de *S. cerevisiae* www.yeastgenome.org.

ORF	Nombre	Descripción o función de la proteína codificada	Proceso celular asociado
YAL004W	n.a.	ORF hipotético, traslapa al gen SSA1	Desconocido
YAL005C	SSA1	Hsp70, involucrada en transporte de proteínas núcleo-citoplasma. Localiza en núcleo, citoplasma y pared celular	Plegamiento de proteínas
YAL053W	FLC2	Transportador FAD de retículo endoplásmico	Transporte
YBL002W	HTB2	Histona H2B	Organización de cromatina
YBR200W	BEM1	Proteína con dominios SH3, necesaria para la polaridad celular y morfogénesis	Organización de la pared celular
YDR024W	FYV1	ORF hipotético	Desconocido
YGL088W	n.a.	ORF hipotético	Desconocido
YGL167C	PMR1	Bomba de transporte de Ca y Mn ⁺² al aparato de Golgi	Transporte
YGR272C	n.a.	Proteína esencial para la maduración del 18S ARNr	Biosíntesis de rARN
YHR049W	FSH1	Serina hidrolasa hipotética	Desconocido
YKL081W	TEF4	Subunidad gama del factor eEF1B	Traducción
YLL055W	YCT1	Transportador de cisteína	Transporte
YLR200W	YKE2	Subunidad del complejo Gim/prefoldina (plegamiento α y β -tubulina y actina)	Plegamiento de proteínas
YLR399C	BDF1	Proteína de inicio de transcripción en genes con promotores con caja TATA	Transcripción
YML073C	RPL6A	Proteína N-acetilada de la subunidad grande del ribosoma	Traducción
YMR151W	YIM2	ORF hipotético	Desconocido
YMR175W	SIP18	Hidrofílica de unión a fosfolípidos. Respuesta a desecación.	Desconocido
YNL069C	RPL16B	Proteína N-acetilada de la subunidad grande del ribosoma	Traducción
YOL064C	MET22	3'bifosfato-nucleasa, involucrada en tolerancia a sal y biogénesis de metionina	Respuesta a estrés
YOR270C	VPH1	ATPasa de protones vacuolar	Transporte
YOR316C	COT1	Transportador de Zinc Vacuolar, además de Cobalto y rodium	Transporte

Apéndice VI. Interacciones genéticas obtenidas del SGA con la cepa $\Delta\beta$ en medio SD-His/Arg/Lys/Ura+can/tial/G418/higromicina. Se incluyen los genes resultantes en orden alfabético del ORF, n.a., no asignado, en fondo negro se indican las interacciones genéticas sintético-letales. Información obtenida de la base de datos del genoma de *S. cerevisiae* www.yeastgenome.org.

ORF	Nombre	Descripción o función de la proteína codificada	Proceso celular asociado
YAL027W	n.a.	Proteína involucrada en reparación de cortes de cadena doble de ADN	Reparación de ADN
YBL064C	<i>PRX1</i>	Peroxiredoxina mitocondrial	Respuesta a estrés oxidativo
YBL094C	n.a.	ORF hipotético	Desconocido
YBR058C	<i>UBP14</i>	Proteasa de cadenas de ubiquitina	Sistema ubiquitina-proteasoma
YBR068C	<i>BAP2</i>	Leucina permeasa	Transporte
YBR093C	<i>PHO5</i>	Fosfatasa ácida	Metabolismo de fosfato
YBR128C	<i>ATG14</i>	Subunidad del complejo fosfatidil-inositol-3-cinasa I	Autofagia
YBR162C	<i>TOS1</i>	Proteína de pared celular de función desconocida	Organización de la pared celular
YBR164C	<i>ARL1</i>	GTPasa involucrada en tráfico vesicular	Transporte vesicular
YBR165W	<i>UBS1</i>	Supresor de enzimas conjugantes de ubiquitina	Transporte de proteínas nucleares
YCL005W	<i>LDB16</i>	Proteína de función desconocida	Desconocido
YCL012W	<i>BUD3</i>	Proteína requerida para gemación	Desconocido
YCL016C	<i>DCC1</i>	Subunidad de un complejo requerido para la cohesión de cromátides hermanas	Reparación de ADN
YCR032W	<i>BPH1</i>	Proteína involucrada en tráfico de proteínas	Transporte de proteínas
YDL039C	<i>PRM7</i>	Proteína regulada por feromona	Fusión celular
YDL214C	<i>PRR2</i>	Cinasa de serina-treonina de la vía MAPK	Fusión celular
YDR029W	n.a.	ORF hipotético	Desconocido
YDR074W	<i>TPS2</i>	Subunidad del complejo trealosa 6-fosfato sintasa/fosfatasa	Metabolismo de trealosa
YDR080W	<i>VPS41</i>	Proteína de membrana vacuolar	Transporte vesicular
YDR093W	<i>DNF2</i>	Flipasa que localiza en la membrana plasmática	Transporte de fosfolípidos
YDR108W	<i>GSG1</i>	Subunidad de TRAPP III	Autofagia
YDR136C	<i>VPS61</i>	ORF hipotético	Desconocido

YDR149C	n.a.	ORF hipotético	Desconocido
YDR200C	<i>VPS64</i>	Proteína requerida para transporte de proteínas a vacuola	Transporte de proteínas a vacuola
YDR212W	n.a.	Subunidad del complejo Chaperonina T	Plegamiento de proteínas
YDR242W	<i>AMD2</i>	Amidasa hipotética	Desconocido
YDR247W	<i>VHS1</i>	Cinasa de serina-treonina	Ciclo celular
YDR248C	n.a.	Proteína hipotética de función desconocida	Desconocido
YDR249C	n.a.	Proteína hipotética de función desconocida	Desconocido
YDR250C	n.a.	ORF hipotético	Desconocido
YDR251W	<i>PAM1</i>	Proteína de función desconocida	Desconocido
YDR253C	<i>MET32</i>	Factor de transcripción de biosíntesis de metionina	Transcripción
YDR254W	<i>CHL4</i>	Proteína del cinetocoro necesaria requerida para estabilidad cromosomal	Ensamblaje de cinetocoro
YDR255C	<i>RMD5</i>	Proteína con actividad ubiquitina-ligasa	Sistema ubiquitina-proteasoma
YDR256C	<i>CTA1</i>	Catalasa A	Respuesta a estrés oxidativo
YDR257C	<i>SET7</i>	Metiltransferasa de lisina	Procesamiento post-traduccional de proteínas
YDR258C	<i>HSP78</i>	Chaperona de matriz mitocondrial	Plegamiento de proteínas
YDR259C	<i>YAP6</i>	Factor de transcripción relacionado con metabolismo de carbohidratos	Transcripción
YDR260C	<i>SWM1</i>	Subunidad del complejo promotor de anafase	Ciclo celular
YDR261C	<i>EXG2</i>	Exo1,3-beta-glucanasa, involucrada en ensamblaje de pared celular	Organización de la pared celular
YDR263C	<i>DIN7</i>	Nucleasa mitocondrial que participa en reparación y replicación de ADN	Reparación de ADN
YDR264C	<i>AKR1</i>	Cinasa involucrada en organización del citoesqueleto cortical	Organización del citoesqueleto
YDR265W	<i>PEX10</i>	E3 ubiquitina ligasa peroxisomal	Transporte de proteínas peroxisomales
YDR266C	n.a.	Proteína de función desconocida que co-purifica con ribosomas	Desconocido
YDR269C	n.a.	ORF hipotético	Desconocido
YDR270W	<i>CCC2</i>	ATPasa tipo P de transporte de Cu ⁺²	Transporte
YDR272W	<i>GLO2</i>	Glioxilasa tipo II	Metabolismo de glucosa
YDR274C	n.a.	ORF hipotético	Desconocido
YDR275W	<i>BSC2</i>	Proteína de función desconocida	Desconocido

YDR276C	<i>PMP3</i>	Proteína de membrana plasmática	Desconocido
YDR277C	<i>MTH1</i>	Regulador negativo de la vía de señalización sensora de glucosa	Metabolismo de glucosa
YDR278C	n.a.	ORF hipotético	Desconocido
YDR279W	<i>RNH202</i>	Subunidad de la ribonucleasa H2	Replicación de ADN
YDR281C	<i>PHM6</i>	Proteína de función desconocida	Desconocido
YDR282C	n.a.	Proteína de función desconocida	Desconocido
YDR287W	n.a.	Inositol monofosfatasa	Metabolismo de inositol
YDR289C	<i>RTT103</i>	Proteína relacionada con terminación de transcripción por la RNA polimerasa II	Transcripción
YDR290W	n.a.	ORF hipotético	Desconocido
YDR291W	n.a.	Helicasa RecQ hipotética	Desconocido
YDR293C	<i>SSD1</i>	Represor traduccional	Traducción
YDR304C	<i>CPR5</i>	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa del retículo endoplásmico	Procesamiento post-traduccional de proteínas
YDR338C	n.a.	Proteína de función desconocida	Transporte de metabolitos
YDR363W-A	<i>SEM1</i>	Componente de la subunidad reguladora del proteasoma 26S	Sistema ubiquitina-proteasoma
YDR455C	n.a.	ORF hipotético	Desconocido
YDR457W	<i>TOM1</i>	E3 ubiquitina-ligasa	Sistema ubiquitina-proteasoma
YDR463W	<i>STP1</i>	Activador de genes codificantes para permeasas de aminoácidos	Transcripción
YEL006W	<i>YEA6</i>	Transportador NAD mitocondrial hipotético	Transporte
YEL037C	<i>RAD23</i>	Proteína relacionada en ubiquitinación	Reparación de ADN
YER034W	n.a.	Proteína de función desconocida	Desconocido
YER093C-A	n.a.	Proteína de función desconocida, su eliminación provoca mayor frecuencia de pérdida de ADN mitocondrial	Desconocido
YFR012W	n.a.	Proteína de función desconocida	Desconocido
YFR024C	n.a.	Factor de polimerización de actina	Organización del citoesqueleto
YGL226C-A	<i>OST5</i>	Subunidad Z del complejo oligosacariltransferasa de retículo endoplásmico	Procesamiento post-traduccional de proteínas
YGL230C	n.a.	Proteína de función desconocida	Desconocido
YGL248W	<i>PDE1</i>	Fosfodiesterasa de AMP cíclico	Metabolismo de AMPc
YGR028W	<i>MSP1</i>	Proteína (de membrana interna) involucrada en transporte de proteínas a mitocondria	Biogénesis mitocondrial

YGR042W	n.a.	Proteína de función desconocida	Desconocido
YGR109C	<i>CLB6</i>	Ciclina tipo B	Ciclo celular
YGR252W	<i>GCN5</i>	Acetiltransferasa de histonas	Remodelación de la cromatina
YHL025W	<i>SNF6</i>	Subunidad del complejo remodelador de cromatina SWI-SNF	Remodelación de la cromatina
YHL034C	<i>SBP1</i>	Proteína que se une a eIF4G que tiene rol en represión de traducción	Traducción
YHR017W	<i>YSC83</i>	Proteína mitocondrial de función desconocida	Desconocido
YHR034C	<i>PIH1</i>	Componente del complejo R2TP	Procesamiento de ARNm
YHR039C	<i>MSC7</i>	Proteína de función desconocida	Desconocido
YHR045W	n.a.	Proteína de función desconocida	Desconocido
YHR111W	<i>UBA4</i>	Proteína que activa Urm1 en urmilación de proteínas	Procesamiento post-traduccional de proteínas
YHR146W	<i>CRP1</i>	Proteína que une estructuras cruciformes de ADN	Desconocido
YIR005W	<i>IST3</i>	Subunidad del complejo U2 snRNP	Edición y empalme de ARNm
YIR009W	<i>MSL1</i>	Ensamblaje del complejo de edición y empalme de ARNm	Edición y empalme de ARNm
YJL130C	<i>URA2</i>	Enzima de la vía de biosíntesis de pirimidinas	Biosíntesis de pirimidinas
YJL165C	<i>HAL5</i>	Cinasa hipotética	Homeostasis de cationes
YJL187C	<i>SWE1</i>	Proteína que regula la transición G2-M del ciclo celular	Ciclo celular
YJR009C	<i>TDH2</i>	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	Metabolismo de glucosa
YJR053W	<i>BFA1</i>	Componente del complejo Bfa1-Bup2 activador de GTPasa	Ciclo celular
YJR056C	n.a.	Proteína de función desconocida	Desconocido
YJR096W	n.a.	Arabinosa reductasa hipotética	Metabolismo de glucosa
YJR106W	<i>ECM27</i>	Proteína de función desconocida	Organización de la pared celular
YJR124C	n.a.	Proteína de función desconocida	Desconocido
YKL044W	n.a.	Proteína de función desconocida	Desconocido
YKL062W	<i>MSN4</i>	Activador transcripcional, activado en condiciones de estrés	Transcripción
YKL075C	n.a.	Proteína de función desconocida	Desconocido
YKL076C	<i>PSY1</i>	ORF hipotético	Desconocido
YKL103C	<i>LAP4</i>	Amino peptidasa vacuolar	Procesamiento post-traduccional de proteínas

YKL216W	<i>URA1</i>	Dihidroorotato reductasa	Biosíntesis de pirimidinas
YKR027W	<i>BCH2</i>	Proteína que media la exportación de proteínas del aparato de Golgi a la membrana plasmática	Transporte de proteínas
YLL055W	<i>YCT1</i>	Transportador de cisteína	Transporte de aminoácidos
YLR030W	n.a.	Proteína de función desconocida	Desconocido
YLR063W	n.a.	Metil-transferasa hipotética	Procesamiento post-traducciona de proteínas
YLR184W	n.a.	ORF hipotético	Desconocido
YLR261C	<i>VPS63</i>	ORF hipotético	Transporte de proteínas a vacuola
YLR262C	<i>YPT6</i>	GTPasa de la familia Rab	Transporte vesicular
YLR294C	n.a.	ORF hipotético	Desconocido
YLR322W	<i>VPS65</i>	ORF hipotético	Desconocido
YLR374C	n.a.	ORF hipotético	Desconocido
YLR376C	<i>PSY3</i>	Componente del complejo Shu, de reparación de ADN	Reparación de ADN
YLR395C	<i>COX8</i>	Subunidad VIII de la citocromo <i>c</i> oxidasa	Biogénesis mitocondrial
YLR396C	<i>VPS33</i>	Subunidad de los complejos HOP y CORVET	Transporte vesicular
YLR417W	<i>VPS36</i>	Componente del complejo ESCRT-II	Sistema ubiquitina-proteasoma
YLR420W	<i>URA4</i>	Dihidroorotasa	Biosíntesis de pirimidinas
YLR436C	<i>ECM30</i>	Proteína de función desconocida, relacionada con la biosíntesis de pared celular	Organización de la pared celular
YLR451W	<i>LEU3</i>	Regulador de la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de aminoácidos ramificados	Factor de transcripción
YML081C-A	<i>ATP18</i>	Subunidad de la ATP sintasa mitocondrial	Biogénesis mitocondrial
YML106W	<i>URA5</i>	Orotato fosforibosil-transferasa	Biosíntesis de pirimidinas
YMR041C	<i>ARA2</i>	NAD deshidrogenasa dependiente de arabinosa	Metabolismo de NAD
YMR060C	<i>SAM37</i>	Componente del complejo SAM mitocondrial	Biogénesis mitocondrial
YMR154C	<i>RIM13</i>	Cisteína proteasa	Procesamiento post-traducciona de proteínas
YMR275C	<i>BUL1</i>	Subunidad del complejo Rsp5 (E3 ubiquitina ligasa)	Sistema ubiquitina-proteasoma

YMR306W	<i>FKS3</i>	Proteína involucrada en ensamblaje de pared celular	Organización de la pared celular
YNL074C	<i>MLF3</i>	Proteína de función desconocida	Desconocido
YNL091W	<i>NST1</i>	Proteína de función desconocida	Desconocido
YNL127W	<i>FAR11</i>	Proteína de recuperación de arresto celular dependiente de feromona	Ciclo celular
YNL249C	<i>MPA43</i>	Proteína mitocondrial de función desconocida	Desconocido
YNR059W	<i>MNT4</i>	Alfa 1,3-manosil-transferasa hipotética	Procesamiento post-traduccional de proteínas
YOR089C	<i>VPS21</i>	GTPasa de la familia Rab	Transporte de proteínas a vacuola
YOR240W	n.a.	tRNA metil-transferasa	Procesamiento de ARN
YOR274W	<i>MOD5</i>	Enzima requerida para modificación de tARN	Procesamiento de ARN
YOR349W	<i>CIN1</i>	Factor de plegamiento de tubulina	Plegamiento de proteínas
YPL002C	<i>SNF8</i>	Componente del complejo ESCRT-II	Transporte de proteínas a vacuola
YPL018W	<i>CTF19</i>	Proteína del cinetócoro requerida para segregación en mitosis de cromosomas	Ensamblaje de cinetócoro
YPL021W	<i>ECM23</i>	Proteína de función desconocida	Desconocido
YPL023C	<i>MET12</i>	Proteína con actividad metilentetrahidrofolato reductasa <i>in vitro</i>	Desconocido
YPL025C	n.a.	ORF hipotético	Desconocido
YPL026C	<i>SKS1</i>	Cinasa hipotética	Metabolismo de glucosa
YPL027W	<i>SMA1</i>	Proteína de función desconocida	Esporulación
YPL032C	<i>SVL3</i>	Proteína de función desconocida	Desconocido
YPL033C	n.a.	Proteína de función desconocida	Desconocido
YPL034W	n.a.	Proteína de función desconocida	Desconocido
YPL036W	<i>PMA2</i>	ATP-asa de H ⁺ de membrana plasmática	Transporte
YPL039W	n.a.	Proteína de función desconocida	Desconocido
YPL041C	n.a.	Proteína de función desconocida	Desconocido
YPL046C	<i>ELC1</i>	Proteína relacionada con ubiquitinación de la ARN polimerasa II	Sistema ubiquitina-proteasoma
YPL048W	<i>CAM1</i>	Proteína nuclear requerida para la transcripción de MXR1	Transcripción
YPL051W	<i>ARL3</i>	GTPasa de la familia Ras	Transporte vesicular
YPL058C	<i>PDR12</i>	Transportador ABC de membrana plasmática	Transporte
YPL065W	<i>VPS28</i>	Componente del complejo ESCRT-I	Transporte de proteínas a vacuola

YPR012W	n.a.	ORF hipotético	Desconocido
YPR013C	n.a.	Proteína con dedos de zinc	Desconocido
YPR014C	n.a.	ORF hipotético	Desconocido
YPR018W	<i>RLF2</i>	Subunidad del complejo de ensamblaje de cromatina	Remodelación de la cromatina
YPR021C	<i>AGC1</i>	Transportador de aminoácidos mitocondrial	Transporte
YPR023C	<i>EAF3</i>	Componente del complejo NuA4 acetiltransferasa	Remodelación de la cromatina
YPR026W	<i>ATH1</i>	Trehalasa ácida	Metabolismo de trealosa
YPR030W	<i>CSR2</i>	Proteína nuclear requerida para la utilización de fuentes no fermentables de carbono	Transcripción
YPR032W	<i>SRO7</i>	Proteína relacionada con tráfico vesicular y exocitosis	Transporte vesicular
YPR040W	<i>TIP41</i>	Proteína que interactúa con Tap42, que regula la fosfatasa 2 ^a	Transducción de señales
YPR079W	<i>MRL1</i>	Proteína de membrana con similitud a receptores para 6-manosa fosfato	Transporte de proteínas a vacuola

Apéndice VII. Interacciones genéticas obtenidas de la réplica del SGA con la cepa $\Delta\beta$ a medio SD-His/Arg/Lys/Ura+can/tial/G418/higromicina. Se incluyen los genes resultantes en orden alfabético del ORF, n.a., no asignado, en fondo negro se indican las interacciones genéticas sintético-letales. Información obtenida de la base de datos del genoma de *S. cerevisiae* www.yeastgenome.org.

ORF	Nombre	Descripción o función de la proteína codificada	Proceso celular asociado
YAL026C	<i>DRS2</i>	Flipasa de vesículas de secreción	Transporte vesicular
YAL043C-A	n.a.	ORF hipotético	Desconocido
YAL049C	n.a.	Proteína citoplasmática involucrada en función mitocondrial	Desconocido
YAR020C	<i>PAU7</i>	Proteína activa durante fermentación alcohólica	Fermentación
YAR028W	n.a.	Proteína hipotética integral de membrana	Desconocido
YBL094C	n.a.	ORF hipotético	Desconocido
YBR053C	n.a.	Proteína de función desconocida	Desconocido
YBR068C	<i>BAP2</i>	Leucina permeasa	Transporte de aminoácidos ramificados
YBR092C	<i>PHO3</i>	Fosfatasa ácida	Metabolismo de fosfato
YBR093C	<i>PHO5</i>	Fosfatasa ácida	Metabolismo de fosfato
YBR125C	<i>PTC4</i>	Fosfatasa tipo 2C	Metabolismo de fosfato
YBR147W	<i>RTC2</i>	Proteína de función desconocida	Desconocido
YBR162W-A	<i>YSY6</i>	Proteína de función desconocida	Desconocido
YBR255W	<i>MTC4</i>	Proteína de función desconocida	Desconocido
YBR260C	<i>RGD1</i>	Proteína activadora de GTPasas Rho	Organización de citoesqueleto
YBR283C	<i>SSH1</i>	Subunidad del translocón Ssh1	Transporte de proteínas
YBR300C	n.a.	ORF hipotético	Desconocido
YCL005W	<i>LDB16</i>	Proteína de función desconocida	Desconocido
YCL012W	<i>BUD3</i>	Proteína requerida para gemación	Gemación
YCR008W	<i>SAT4</i>	Cinasa requerida para tolerancia a sal	Resistencia a estrés
YCR067C	<i>SED4</i>	Proteína integral de retículo endoplásmico	Vía de secreción

YCR075C	<i>ERS1</i>	Exportador de cistina de lisosomas	Transporte
YDL074C	<i>BRE1</i>	E3 ubiquitina ligasa	Sistema ubiquitina-proteasoma
YDL100C	<i>GET3</i>	Subunidad del complejo GET, para inserción de proteínas a retículo endoplasmico	Transporte de proteínas
YDL106C	<i>PHO2</i>	Factor de transcripción de genes del metabolismo del fosfato	Metabolismo de fosfato
YDL202W	<i>MRPL11</i>	Proteína de la subunidad grande ribosomal	Traducción mitocondrial
YDL222C	<i>FMP45</i>	Proteína de membrana mitocondrial	Desconocido
YDL240W	<i>LRG1</i>	Proteína activadora de GTPasa	Organización de pared celular
YDR009W	<i>GAL3</i>	Regulador transcripcional de genes de respuesta a galactosa	Metabolismo de galactosa
YDR010C	n.a.	ORF hipotético	Desconocido
YDR029W	n.a.	ORF hipotético	Desconocido
YDR049W	n.a.	Componente del complejo CDC48 involucrado en control de calidad de proteínas	Sistema ubiquitina-proteasoma
YDR059C	<i>UBC5</i>	Enzima conjugadora de ubiquitina	Sistema ubiquitina-proteasoma
YDR117C	<i>TMA64</i>	Proteína de asociación a ribosomas	Desconocida
YDR126W	<i>SWF1</i>	Palmitoil-transferasa de proteínas de membrana	Procesamiento post-traduccional de proteínas
YDR128W	<i>MTC5</i>	Subunidad del complejo SEA vacuolar	Desconocido
YDR153C	<i>ENT5</i>	Proteína relacionada con tráfico vesicular	Transporte vesicular
YDR200C	<i>VPS64</i>	Factor de transporte de proteínas a vacuola	Transporte de proteínas
YDR203W	n.a.	ORF hipotético	Desconocido
YDR214W	<i>AHA1</i>	Co-chaperona de Hsp82	Plegamiento de proteínas
YDR217C	<i>RAD9</i>	Proteína relacionada con arresto de ciclo celular	Ciclo celular
YDR218C	<i>SPR28</i>	Proteína de la familia de microfilamentos	Organización de citoesqueleto
YDR221W	<i>GTB1</i>	Subunidad de la glicosidasa beta II	Esporulación
YDR223W	<i>CRF1</i>	Co-represor transcripcional	Transcripción
YDR229W	<i>IVY1</i>	Proteína de unión a fosfolípidos	Desconocido
YDR239C	n.a.	Proteína de función desconocida que se une a ribosomas	Desconocido
YDR242W	<i>AMD2</i>	Amidasa hipotética	Desconocido
YDR244W	<i>PEX5</i>	Receptor de membrana peroxisomal para importación de proteínas	Importación peroxisomal

YDR248C	n.a.	Proteína hipotética de función desconocida	Desconocido
YDR249C	n.a.	Proteína hipotética de función desconocida	Desconocido
YDR250C	n.a.	ORF hipotético	Desconocido
YDR251W	<i>PAM1</i>	Proteína de función desconocida	Desconocido
YDR253C	<i>MET32</i>	Factor de transcripción de biosíntesis de metionina	Transcripción
YDR254W	<i>CHL4</i>	Proteína del cinetócoro necesaria requerida para estabilidad cromosomal	Ensamblaje de cinetócoro
YDR255C	<i>RDM5</i>	Proteína con actividad ubiquitina-ligasa	Sistema ubiquitina-protasoma
YDR256C	<i>CTA1</i>	Catalasa A	Respuesta a estrés oxidativo
YDR257C	<i>SET7</i>	Metiltransferasa de lisina	Procesamiento post-traduccional de proteínas
YDR260C	<i>SWM1</i>	Subunidad del complejo promotor de anafase	Ciclo celular
YDR261C	<i>EXG2</i>	Exo1,3-betaglucanasa, involucrada en ensamblaje de pared celular	Organización de pared celular
YDR262W	n.a.	Proteína de función desconocida	Desconocido
YDR263C	<i>DIN7</i>	Nucleasa mitocondrial que participa en reparación y replicación de ADN	Reparación de ADN
YDR269C	n.a.	ORF hipotético	Desconocido
YDR274C	n.a.	ORF hipotético	Desconocido
YDR275W	<i>BSC2</i>	Proteína de función desconocida	Desconocido
YDR276C	<i>PMP3</i>	Proteína de membrana plasmática	Desconocido
YDR277C	<i>MTH1</i>	Regulador negativo de la vía de señalización sensora de glucosa	Metabolismo de glucosa
YDR278C	n.a.	ORF hipotético	Desconocido
YDR279W	<i>RNH202</i>	Subunidad de la ribonucleasa H2	Replicación de ADN
YDR285W	<i>ZIP1</i>	Subunidad del complejo sinaptonemal	Recombinación meiótica
YDR291W	n.a.	Helicasa RecQ hipotética	Desconocido
YDR295C	<i>HDA2</i>	RecQ helicasa hipotética	Remodelación de cromatina
YDR364C	<i>CDC40</i>	Proteína del sistema de edición y empalme	Edición y empalme de ARN
YDR447C	<i>RPS17B</i>	Proteína ribosomal 51 de la subunidad 30S	Traducción
YER019W	<i>ISC1</i>	Fosfolipasa C mitocondrial	Metabolismo de lípidos
YER052C	<i>HOM3</i>	Enzima de la vía de biosíntesis de metionina y treonina	Biosíntesis de serina y treonina

YER084W	n.a.	Proteína de función desconocida	Desconocido
YER086W	<i>ILV1</i>	Enzima de biosíntesis de isoleucina	Biosíntesis de isoleucina
YER174C	<i>GRX4</i>	Oxidoreductasa dependiente de glutatión	Respuesta a estrés
YFR024C-A	<i>LSB3</i>	Factor de polimerización de actina	Organización del citoesqueleto
YGL088W	n.a.	ORF hipotético	Desconocido
YGL108C	n.a.	Función desconocida	Desconocido
YGR015C	n.a.	Proteína mitocondrial de función desconocida	Desconocido
YGR043C	n.a.	Transaldolasa	Desconocido
YGR044C	<i>RME1</i>	Proteína con dedos de zinc involucrada en control de meiosis	Ciclo celular
YGR055W	<i>MUP1</i>	Metionina permeasa	Transporte
YGR133W	<i>PEX4</i>	Enzima peroxisomal conjugadora de ubiquitina	Sistema ubiquitina-proteasoma
YGR228W	n.a.	ORF hipotético	Desconocido
YGR235C	n.a.	Proteína de membrana interna mitocondrial	Desconocido
YGR281W	YOR1	Transportador de membrana plasmática	Transporte
YHL012W	n.a.	Proteína de función desconocida	Desconocido
YHL026C	n.a.	Proteína de función desconocida	Desconocido
YHL029C	n.a.	Proteína de función desconocida	Desconocido
YHR109W	<i>CTM1</i>	Citocromo c lisina-metiltransferasa	Procesamiento post-traduccional de proteínas
YHR125W	n.a.	ORF hipotético	Desconocido
YHR143W	<i>DSE2</i>	Enzima de localización a célula hija durante división, similar a glucanasas	Organización de la pared celular
YHR151C	n.a.	Proteína de función desconocida	Desconocido
YHR168W	<i>MTG2</i>	Proteína periférica de membrana interna mitocondrial, de asociación a ribosomas mitocondriales	Desconocido
YIL010W	<i>DOT5</i>	Thiol-peroxidasa nuclear	Respuesta a estrés oxidativo
YIL105C	<i>SLM1</i>	Proteína que regula la organización del citoesqueleto de actina	Organización de citoesqueleto
YIL159W	BNR1	Formina, relacionada con formación de filamentos de actina	Organización de citoesqueleto
YIL162W	<i>SUC2</i>	Invertasa, enzima que hidroliza sacarosa	Metabolismo de sacarosa
YJL095W	<i>BCK1</i>	Proteína cinasa activada por mitógenos	Señalización celular
YJL116C	<i>NCA3</i>	Proteína que regula la expresión de las subunidades 6 y 8 de la ATP sintasa	Biogénesis mitocondrial

YJL130C	URA2	Enzima de la vía de biosíntesis de pirimidinas	Biosíntesis de pirimidinas
YJL157C	FAR1	Cinasa dependiente de ciclina	Ciclo celular
YJR107W	n.a.	Proteína de función desconocida	Desconocido
YKL006W	RPL14A	Componente de la subunidad 60S ribosomal	Traducción
YKL062W	MSN4	Factor de transcripción activado en estrés	Respuesta a estrés
YKL176C	LST4	Proteína involucrada en la vía de secreción post-Golgi	Vía de secreción
YKL216W	URA1	Dihidrorotato reductasa	Biosíntesis de pirimidinas
YKL220C	FRE2	Reductasa férrica	Metabolismo de hierro
YKR072C	SIS2	Enzima de la vía de biosíntesis de coenzima A	Biosíntesis de Coenzima A
YLL001W	DNM1	Dinamina requerida para fisión mitocondrial	Fisión mitocondrial
YLL002W	RTT109	Acetil-transferasa de histonas	Ciclo celular
YLL015W	BPT1	Transportador vacuolar tipo ABC	Transporte
YLL026W	HSP104	Chaperona de choque térmico	Respuesta a estrés
YLL040C	VPS13	Proteína de función desconocida	Desconocido
YLR087C	CSF1	Proteína requerida para fermentación a baja temperatura	Fermentación
YLR120C	YPS1	Proteasa involucrada en mantenimiento de pared celular	Organización de pared celular
YLR226W	BUR2	Ciclina para la cinasa Sgv1	Ciclo celular
YLR228C	ECM22	Regulador de genes de biosíntesis de esteroides	Biosíntesis de esteroles
YLR248W	RCK2	Cinasa de respuesta a estrés oxidativo y osmótico	Respuesta a estrés
YLR253W	n.a.	Proteína mitocondrial de función desconocida	Desconocido
YLR266C	PDR8	Factor de transcripción	Transcripción
YLR279W	n.a.	ORF hipotético	Desconocido
YLR287-A	n.a.	Componente de la subunidad 40S ribosomal	Traducción
YLR373C	VID22	Proteína relacionada con la degradación de la fructosa 1-6 bifosfatasa	Desconocido
YLR420W	URA4	Enzima de la vía de biosíntesis de pirimidinas	Biosíntesis de pirimidinas
YLR454W	FMP27	Proteína mitocondrial de función desconocida	Desconocido
YML008C	ERG6	Enzima de la vía de síntesis de ergosterol	Biosíntesis de ergosterol
YML058W	SML1	Regulador de la biosíntesis de dNTP	Respuesta a daño de ADN

YMR022W	<i>UBC7</i>	Enzima conjugante de ubiquitina	Sistema ubiquitina-proteasoma
YMR034C	n.a.	Transportador hipotético	Desconocido
YMR119W	<i>ASI1</i>	E3 ubiquitina ligasa hipotética	Sistema ubiquitina-proteasoma
YMR126C	n.a.	Proteína de función desconocida	Desconocido
YMR173W-A	n.a.	ORF hipotético	Desconocido
YMR175W	<i>SIP18</i>	Hidrofilina de unión a fosfolípidos	Respuesta a estrés
YMR215W	<i>GAS3</i>	Glucanosiltransferasa hipotética	Desconocido
YMR259C	n.a.	Proteína de función desconocida	Desconocido
YNL056W	<i>OCA2</i>	Tirofosfatasa hipotética	Desconocido
YNL063W	<i>MTQ1</i>	Metil-transferasa dependiente de S-adenosilmetionina	Procesamiento post-traduccional de proteínas
YNL064C	<i>YDJ1</i>	Co-chaperona de tipo Hsp40	Plegamiento de proteínas
YNL081C	<i>SWS2</i>	Proteína del ribosoma mitocondrial	Traducción mitocondrial
YNL091W	<i>NST1</i>	Proteína de función desconocida	Desconocido
YNL122C	n.a.	Proteína mitocondrial de función desconocida	Desconocido
YNL140C	n.a.	Proteína de función desconocida	Desconocido
YNL183C	<i>NPR1</i>	Cinasa que estabiliza transportadores de aminoácidos	Transporte
YNL249C	<i>MPA43</i>	Proteína mitocondrial de función desconocida	Desconocido
YNL253W	<i>TEX1</i>	Proteína involucrada en exporte de ARNm	Transporte de ARN
YNL259C	<i>ATX1</i>	Metalochaperona citosólica	Metabolismo de cobre
YNL335W	n.a.	Proteína de función desconocida	Desconocido
YNR047W	n.a.	Proteína que regula translocasas de fosfolípidos	Fosforilación de proteínas
YOL029C	n.a.	Proteína de función desconocida	Desconocido
YOL031C	<i>SIL1</i>	Factor de intercambio de nucleótidos	Transporte de proteínas a retículo endoplásmico
YOL062C	<i>APM4</i>	Subunidad del complejo de asociación a clatrina	Transporte vesicular
YOL070C	n.a.	Proteína de función desconocida	Desconocido
YOR016C	<i>ERP4</i>	Proteína involucrada en la vía de secreción	Vía de secreción
YOR041C	n.a.	ORF hipotético	Desconocido
YOR064C	<i>YNG1</i>	Subunidad del complejo NuA3 acetiltransferasa	Remodelación de cromatina
YOR072W	n.a.	ORF hipotético	Desconocido

YOR088W	n.a.	Canal vacuolar de cationes	Transporte
YOR105W	n.a.	Proteína de función desconocida	Desconocido
YOR106W	VAM3	Proteína t-SNARE	Transporte vesicular
YOR107W	RGS2	Regulador negativo de la vía de señalización sensora a glucosa	Metabolismo de glucosa
YOR123C	LEO1	Componente del complejo Paf1	Remodelación de cromatina
YOR209C	NPT1	Nicotinato-ribosiltransferasa	Remodelación de cromatina
YOR219C	STE13	Dipeptidil amido-peptidasa	Procesamiento post-traduccional de proteínas
YOR234C	RPL33B	Proteína ribosomal de la subunidad 60S	Traducción
YOR240W	n.a.	tRNA metil-transferasa	Procesamiento de ARN
YOR297C	TIM18	Subunidad del complejo TIM mitocondrial, involucrado en inserción de proteínas a membrana interna	Biogénesis mitocondrial
YOR298C-A	MBF1	Co-activador transcripcional	Transcripción
YOR300W	n.a.	ORF hipotético	Desconocido
YOR304W	ISW2	DNA translocasa involucrada en remodelamiento de la cromatina	Remodelación de cromatina
YOR314W	n.a.	ORF hipotético	Desconocido
YOR338W	n.a.	Proteína de función desconocida	Desconocido
YOR339C	UBC11	Enzima conjugante de ubiquitina	Sistema ubiquitina-proteasoma
YOR346W	REV1	Dioxitidil-transferasa	Reparación de ADN
YOR371C	GPB1	Regulador de la señalización por PKA	Señalización celular
YOR380W	RDR1	Represor transcripcional	Transcripción
YPL065W	VPS28	Componente del complejo ESCRT-I	Transporte de proteínas
YPL145C	KES1	Proteína de unión a oxisterol	Transporte vesicular
YPL183W-A	n.a.	Proteína involucrada en traducción	Desconocido
YPR027C	n.a.	Proteína de función desconocida	Desconocido
YPR032W	SRO7	Proteína relacionada con tráfico vesicular y exocitosis	Tráfico vesicular
YPR046W	MCM16	Proteína del cinetocoro involucrada en la segregación cromosomal	Ensamblaje del cinetocoro
YPR079W	MRL1	Proteína de membrana con similitud a receptores para 6-manosa fosfato	Transporte de proteínas a vacuola
YPR092W	n.a.	ORF hipotético	Desconocido
YPR153W	n.a.	Proteína de función desconocida	Desconocido

YPR194C	<i>OPT2</i>	Transportador de oligopéptidos	Transporte
YPR195C	n.a.	ORF hipotético	Desconocido

12. Referencias

1. Ahmed A, Fisher P. (2009) "Import of nuclear encoded proteins: a co-translational perspective" *International review of cell and molecular biology*. 273: 49-68.
2. Albanèse V, Reissmann S, Frydman J. (2010) "A ribosome-anchored chaperone network that facilitates eukaryotic ribosome biogenesis" *The Journal of Cell Biology*. 189 (1): 69-81.
3. Andersson SG, Karlberg O, Canbäck B, Kurland CG. (2003) "On the origin of mitochondria: a genomics perspective" *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 358: 165-179.
4. Banci L, Bertini I, Cefaro C, Ciofi-Baffoni S, Gallo A, Martinelli M, Sideris DP, Katrakili N, Tokatlidis K. (2009) "Mia40 is an oxidoreductase that catalyzes oxidative protein folding in mitochondria". *Nature Structural and Molecular Biology*. 16: 198–206.
5. Baryshnikova A, Costanzo M, Dixon S, Vizeacoumar F, Myers C, Andrews B, Boone C, (2010) "Synthetic Genetic Array (SGA) analysis in *Saccharomyces cerevisiae* and *Squizosaccaromyces pombe*" *Methods in Enzymology*. 470:145-179.
6. Beatrix B, Sakai H, Wiedmann M. (2000) "The α and β subunits of the nascent polypeptide-associated complex have distinct functions" *The Journal of Biological Chemistry*. 275(48):37838-37845.
7. Bloss T, Witze E, Rothman J. (2003) "Supression fo CED-3-independent apoptosis by mitochondrial β NAC in *C. elegans*" *Nature*. 424(28): 1066-1071.
8. Chacinska A, Lind M, Frazier AE, Dudek J, Meisinger C, Geissler A, Sickmann A, Meyer HE, Truscott KN, Guiard B, Pfanner N, Rehling P. (2005). "Mitochondrial presequence translocase: switching between TOM tethering and motor recruitment involves Tim21 and Tim17". *Cell*. 120: 817–829.
9. Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T, Pfanner N. (2009) "Importing Mitochondrial proteins: machineries and mechanisms" *Cell*. 138: 628-644.
10. Costanzo M, Baryshnikova A, Bellay J, Kim Y, Spear ED, Sevier CS, Ding H, Koh JL, Toufighi K, Mostafavi S, Prinz J, St Onge RP, VanderSluis B, Makhnevych T, Vizeacoumar FJ, Alizadeh S, Bahr S, Brost RL, Chen Y, Cokol M, Deshpande R, Li Z, Lin ZY, Liang W, Marback M, Paw J, San Luis BJ, Shuteriqi E, Tong AH, van Dyk N, Wallace IM, Whitney JA, Weirauch MT, Zhong G, Zhu H, Houry WA,

- Brudno M, Ragibzadeh S, Papp B, Pál C, Roth FP, Giaever G, Nislow C, Troyanskaya OG, Bussey H, Bader GD, Gingras AC, Morris QD, Kim PM, Kaiser CA, Myers CL, Andrews BJ, Boone C. (2010) "The Genetic Landscape of a cell" *Science*. 327: 425-431.
11. del Alamo M, Hogan DJ, Pechmann S, Albanese V, Brown PO, Frydman J. (2011) "Defining the specificity of cotranslationally acting chaperones by systematic analysis of mRNA associated with ribosome-nascent chains complexes" *Plos Biology*. 9(7): 1-14.
 12. Deng J M, Behringer R R. (1995) "An insertional mutation in the BTF3 transcription factor gene leads to an early postimplantation lethality in mice" *Transgenic Research*. 4: 264–269
 13. Fujiki M, Verner K. (1993) "Coupling of cytosolic protein synthesis and mitochondrial import in yeast" *The Journal of Biological Chemistry*. 268(3): 1914-1920.
 14. Fünfschilling U, Rospert S. (1999) "Nascent polypeptide-associated complex stimulates protein import into yeast mitochondria" *Molecular Biology of the Cell*. 10: 3289-3299.
 15. Gautschi M, Lilie H, Fünfschilling U, Mun A, Ross S, Lithgow T, Rücknagel P, Rospert S. (2001) "RAC, a stable ribosome-associated complex in yeast is formed by the DnaK-DnaJ homologs Ssz1p and Zuotin" *PNAS*. 98(7): 3762-3767.
 16. Gautschi M, Mun A, Ross S, Rospert S. (2002) "A functional chaperone triad on the yeast ribosome" *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99(7): 4209-4214.
 17. García M, Darzacq X, Delaveau T, Jourden L, Singer R, Jacq C. (2007) "Mitochondria-associated yeast mRNA and the biogenesis of molecular complexes" *Molecular Biology of the Cell*. 18: 362-368.
 18. Gadir N, Haim-Vilmovsky L, Kraut-Cohen J, Gerst JE. (2011) "Localization of mRNA coding for mitochondrial proteins in the yeast *S. cerevisiae*". *RNA*. 17(8): 1-15.
 19. Gietz RD. (2002) "*Methods in Enzymology*" 350:87-96.
 20. Glick BS, Brandt A, Cunningham K, Müller S, Hallberg RL, Schatz G (1992) "Cytochromes *c1* and *b₂* are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a Stop-Transfer Mechanism" *Cell*. 69: 809-822.

21. George R, Beddoe T, Landl K, Lithgow T. (1998) "The yeast nascent polypeptide-associated complex initiates protein targeting to mitochondria *in vivo*" *PNAS*. 95:2296-2301.
22. George R, Walsh P, Beddoe T, Lithgow T. (2002) "The nascent polypeptide-associated complex (NAC) promotes interaction of ribosomes with the mitochondrial surface *in vivo*" *FEBS Letters*. 516:213-216.
23. Ginsberg MD, Feliciello A, Jones JK, Avvedimento EV, Gottesman ME. (2003) "PKA-dependent binding of mRNA to the mitochondrial AKAP121 protein" *Journal of Molecular Biology*. 327(4): 885:897.
24. Goldstein AL, McCusker JH. (1999) "Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *S. cerevisiae*" *Yeast*. 15:1541-15.
25. Gong Y, Kakihara Y, Krogan N, Greenblatt J, Emili A, Zhang Z, Houry WA. (2009) "An atlas of chaperone-protein interactions in *S. cerevisiae*: implications to protein folding pathways in the cell" *Molecular Systems Biology*. 5(275): 1-14.
26. Gratzner S, Lithgow T, Bauer RE, Lamping E, Paltauf F, Kohlwein SD, Haucke V, Junne T, Schatz G, Horst M. (1995) "Mas37 a novel receptor subunit for protein import into mitochondria" *The Journal of Cell Biology*. 129(1): 25-34.
27. Grumbt B, Stroobant V, Terziyska N, Israel L, Hell K. (2007) "Functional characterization of Mia40p, the central component of the disulfide relay system of the mitochondrial intermembrane space" *Journal of Biological Chemistry*. 282: 37461–37470.
28. Guo-Zen H, Ronne H. (1994) "Yeast BTF3 protein is encoded by duplicated genes and inhibits the expression of some genes *in vivo*" *Nucleic Acid Research*. 22(14): 2740-2743.
29. Harner M, Körner C, Walther D, Mokranjac D, Kaesmacher J, Welsch U, Griffith J, Mann M, Reggiori F, Neupert W. (2011) "The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture" *The EMBO Journal*. 30: 4356-4370.
30. Hell K, Neupert W, Stuart RA. (2001) "Oxa1 acts as a general insertion machinery for proteins encoded by the mitochondrial DNA" *EMBO Journal*. 15; 20(6): 1281-1288.
31. Herrmann J, Riemer J. (2012) "Mitochondrial disulfide relay: redox-regulated import into the intermembrane space" *The Journal of Biological Chemistry*. 287 (7): 4426-4433.

32. Kellems R, Allison V, Butow R. (1975) "Cytoplasmatic type 80S ribosomes associated with yeast mitochondria" *The Journal of Cell Biology*. 65:1-14.
33. Knox C, Sass E, Neupert W, Pines O. (1998) "Import into mitochondria, folding and retrograde movement of fumarase in yeast" *The Journal of Biological Chemistry*. 273 (40): 25587-25593.
34. Krogan NJ, Cagney G, Yu H, Zhong G, Guo X, Ignatchenko A, Li J, Pu S, Datta N, Tikuisis AP, Punna T, Peregrín-Alvarez JM, Shales M, Zhang X, Davey M, Robinson MD, Paccanaro A, Bray JE, Sheung A, Beattie B, Richards DP, Canadien V, Lalev A, Mena F, Wong P, Starostine A, Canete MM, Vlasblom J, Wu S, Orsi C, Collins SR, Chandran S, Haw R, Rilstone JJ, Gandi K, Thompson NJ, Musso G, St Onge P, Ghanny S, Lam MH, Butland G, Altaf-Ul AM, Kanaya S, Shilatifard A, O'Shea E, Weissman JS, Ingles CJ, Hughes TR, Parkinson J, Gerstein M, Wodak SJ, Emili A, Greenblatt JF. (2006) "Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*" *Nature*. 30; 440 (7084):637-643.
35. Koplín A, Preissler S, Ilina Y, Koch M, Scior A, Erhardt M, Deuerling E. (2010) "A dual function for chaperones SSB-RAC and the NAC nascent-polypeptide associated complex on ribosomes" *The Journal of Cell Biology*. 198 (1): 57-68.
36. Lauring B, Kreibich G, Wiedmann M. (1995a) "The intrinsic ability of ribosomes to bind to endoplasmic reticulum membranes is regulated by signal recognition particle and nascent-polypeptide associated complex" *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 92: 9435-9439.
37. Lauring B, Sakai H, Kreibich G, Wiedmann M. (1995b) "Nascent polypeptide-associated complex protein prevents mistargeting of nascent chains to the endoplasmic reticulum" *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 92: 5411-5415.
38. Li Y, Deudek J, Guiard B, Pfanner N, Rehling P, Voos W. (2004) "The presequence translocase-associated protein import motor of mitochondria: Pam16 functions in an antagonistic manner to Pam18" *The Journal of Biological Chemistry*. 279: 38047–38054.
39. Li J, Qian X, Hu J, Sha B. (2009) "Molecular chaperone Hsp70-90 prepares the mitochondrial outer membrane translocon receptor Tom71 for preprotein loading" *The Journal of Biological Chemistry*. 284(35): 23852-23859.
40. Lithgow T. (2000) "Targeting proteins to mitochondria" *FEBS Letters*. 476: 22-26.

41. Liu Y, Hu Y, Li X, Niu L, Teng M. (2010) "The crystal structure of human nascent polypeptide-associated complex domain reveals a nucleic acid-binding region of the NAC α subunit" *Biochemistry*. 49:2890-2896.
42. Luk E, Yang M, Jensen LT, Bourbonnais Y, Culotta VC. (2005) "Manganese activation of superoxide dismutase 2 in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*" *The Journal of Biological Chemistry*. 280(24): 22715-22720.
43. Maccechini ML, Rudin Y, Blobel G, Schatz G. (1979) "Import of proteins into mitochondria: precursor forms of the extramitochondrially made F₁-ATPase subunits in yeast" *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 76(1): 343-347.
44. Malsburg K, Müller JM, Bohnert M, Oeljeklaus S, Kwiatkowska P, Becker T, Loniewska-Lwowska A, Wiese S, Rao S, Milenkovic D, Hutu DP, Zerbes RM, Schulze-Specking A, Meyer HE, Martinou JC, Rospert S, Rehling P, Meisinger C, Veenhuis M, Warscheid B, van der Klei IJ, Pfanner N, Chacinska A, van der Laan M. (2011) "Dual role of mitophilin in mitochondrial membrane organization and biogenesis" *Developmental Cell*. 21: 694-707.
45. Marc P, Margeot A, Devaux F, Blugeon C, Corral-Debrinski M, Jacq C. (2002) "Genome wide analysis of mRNA targeted to yeast mitochondria" *EMBO reports*. 3(2):159-164.
46. Margulis L. "Origin of Eukaryotic Cells" Yale University Press, New Haven, Connecticut, 1970.
47. Markesich DC, Gajewski KM, Nazimiec ME, Beckingham K. (2000) "Bicaudal encodes the *Drosophila* beta NAC homolog, a component of the ribosomal translational machinery" *Development*. 127(3):559-72.
48. Moberg P, Nilsson S, Ståhl A, Eriksson AC, Glaser E, Måler L. (2004) "NMR solution of the F₁ β presequence from *Nicotiana plumbaginifolia*" *Journal of Molecular Biology*. 336: 1129-1140.
49. Möller I, Beatrix B. (1998) "Unregulated exposure of the ribosomal M-site caused by NAC depletion results in delivery of non-secretory polypeptides to the Sec61 complex" *FEBS Letters*. 441:1-5.
50. Mokranjac D, Neupert W. (2007) "Protein import into isolated mitochondria" *Mitochondria, Practical Protocols*. Humana Press. Capítulo 20: 277-286.
51. Mokranjac D, Sichting M, Popov-Celeketić D, Mapa K, Gevorkyan-Airapetov L, Zohary K, Hell K, Azem A, Neupert W. (2009) "Role of Tim50 in the transfer of

- precursor proteins from the outer to inner membrane of mitochondria” *Molecular Biology of the Cell*. 20: 1400–1407.
52. Moreau A, Yotov W, Glorioux F, Arnaud R. (1998) “Bone-Specific Expression of the Alpha Chain of the Nascent Polypeptide-Associated Complex, a Coactivator Potentiating c-Jun-Mediated Transcription” *Molecular and Cellular Biology*. 18(3): 1312-1321.
 53. Mukhopadhyay A, Ni L, Weiner H. (2004) “A co-translational model to explain the *in vivo* import of proteins into HeLa cell mitochondria” *Biochemistry Journal*. 382: 385-392.
 54. Neupert W, Herrmann J. (2007), “Translocation of proteins into Mitochondria” *Annual Review of Biochemistry*. 76: 723-749.
 55. Okamoto K, Shaw J. (2005) “Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes” *Annual Review of Genetics*. 39: 503-536.
 56. Ooi SL, Pan X, Peyser BD, Ye P, Meluh PB, Yuan DS, Irizarry RA, Bader JS, Spencer FA, Boeke JD. (2006) “Global synthetic-lethality analysis and yeast functional profiling” *Trends in Genetics*. 22(1): 56-63.
 57. Ott M, Herrmann JM. (2010) “Co-translational membrane insertion of mitochondrially encoded proteins” *Biochimica et Biophysica Acta*. 1803(6):767-775.
 58. Panasenko O, Landrieux E, Feuermann M, Finka A, Paquet N, Collart MA. (2006) “The Yeast Ccr4-Not Complex Controls ubiquitination of the nascent-associated polypeptide (NAC-EGD) complex” *The Journal of Biological Chemistry*. 281(42): 31389-31398.
 59. Panasenko O, David FP, Collart MA. (2009) “Ribosome association and stability of the nascent polypeptide-associated complex is dependant upon its own ubiquitination” *Genetics*. 181: 447-460.
 60. Parthun M, Mangus D, Jaehning J. (1992) “The Egd1 product, a yeast homolog of Human BTF3, may be involved in Gal4 DNA binding” *Molecular and Cellular Biology*. 12(12): 5683-5689.
 61. Paschen S, Waizenegger T, Stan T, Preuss M, Cyrklaff M, Hell K, Rapaport D, Neupert W. (2003) “Evolutionary conservation of biogenesis of β -barrel proteins” *Nature*. 426: 862-866.
 62. Raden D, Gilmore R. (1998) “Signal recognition particle-dependant targeting of ribosomes to the rough endoplasmic reticulum in the absence and presence of

- the nascent polypeptide-associated complex" *Molecular Biology of the Cell*. 8: 117-130.
63. Raue U, Oeller S, Rospert S. (2007) "Association of protein biogenesis factors at the yeast ribosomal tunnel exit is affected by the translational status and nascent sequence" *The Journal of Biological Chemistry*. 282(11): 7809-7816.
64. Rehling P, Model K, Brandner K, Kovermann P, Sickmann A, Meyer HE, Kühlbrandt W, Wagner R, Truscott KN, Pfanner N. (2003) "Protein insertion into the mitochondrial inner membrane by a twin-pore translocase". *Science*. 299: 1747–1751.
65. Reid G, Schatz G. (1982) "Import of proteins into mitochondria" *The Journal of Biological Chemistry*. 257(21): 13062-13067.
66. Reimann B, Bradsher J, et. al. (1999) "Initial characterization of the nascent polypeptide-associated complex in yeast" *Yeast*. 15: 397-407.
67. Reinders J, Zahedi R, Pfanner N, Meisinger C, Sickmann A. (2006) "Toward the complete yeast mitochondrial genome: multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics" *Journal of proteome research*. 5: 1543-1554.
68. Rospert S, Dubaquié Y, Gautschi M. (2002) "Nascent Polypeptide-associated complex" *Cellular and Molecular Life Sciences*. 59:1632-1639.
69. Saitoh T, Igura M, Obita T, Ose T, Kojima R, Maenaka K, Endo T, Kohda D. (2007) "Tom20 recognizes mitochondrial presequences through the dynamic equilibrium among multiple bound states" *The EMBO Journal*. 26: 4777-4787.
70. Schlossmann J, Lill R, Neupert W, Court D. (1996) "Tom71, a novel homologue of the mitochondrial preprotein receptor Tom70" *The Journal of Biological Chemistry*. 271 (30): 17890-17895.
71. Schmidt O, Harbauer AB, Rao S, Eyrich B, Zahedi RP, Stojanovski D, Schönfisch B, Guiard B, Sickmann A, Pfanner N, Meisinger C. (2011) "Regulation of mitochondrial protein import by cytosolic kinases" *Cell*. 144: 227-239.
72. Shi X., Parthun M., Jaehning J. (1995) "The yeast *EDG2* gene encodes a homologue of the α NAC subunit of the human nascent-polypeptide-associated complex" *Gene*. 165: 199-202.
73. Spreter T, Pech M, Beatrix B. (2005) "The crystal structure of archaeal nascent polypeptide-associated complex (NAC) reveals a unique fold and the presence of a ubiquitin-associated domain" *The Journal of Biological Chemistry*. 280(16): 15849-15854.

74. Steger HF, Söllner T, Kiebler M, Dietmeier KA, Pfaller R, Trülsch KS, Tropschug M, Neupert W, Pfanner N. (1990) "Import of ADP/ATP carrier into mitochondria: two receptors act in parallel" *Journal of Cell Biology*. 11(6): 2353-2363.
75. Tamura Y, Harada Y, Shiota T, Yamano K, Watanabe K, Yokota M, Yamamoto H, Sesaki H, Endo T. (2009) "Tim23-Tim50 pair coordinates functions of translocators and motor proteins in mitochondrial protein import" *Journal of Cell Biology*. 184: 129–141.
76. Tong A, Boone C. (2007) "High-Throughput Strain construction and Systematic Synthetic Lethal Screening in *Saccharomyces cerevisiae*" *Methods in Microbiology*. 36: 1-19.
77. van der Laan M, Meinecke M, Dudek J, Hutu DP, Lind M, Perschil I, Guiard B, Wagner R, Pfanner N, Rehling P. (2007) "Motor-free mitochondrial presequence translocase drives membrane integration of preproteins" *Nature Cell Biology*. 9: 1152–1159.
78. Waizenegger T, Habib SJ, Lech M, Mokranjac D, Paschen SA, Hell K, Neupert W, Rapaport D. (2004) "Tob38, a novel essential component in the biogenesis of beta-barrel proteins of mitochondria" *EMBO Reports*. 5(7): 704-709.
79. Wang S, Sakai H, Wiedmann M. (1995) "NAC covers ribosome-associated nascent chains thereby forming a protective environment for regions of nascent chains just emerging from the peptidyl transferase center" *The Journal of Cell Biology*. 130(3): 519-528.
80. Wang L, Zhang W, Wang L, Zhang XC, Li X, Rao Z. (2010) "Crystal structures of NAC domains of human nascent polypeptide-associated complex (NAC) and its α NAC subunit" *Protein Cell*. 1(4): 406-416.
81. Wegrzyn RD, Hofmann D, Merz F, Nikolay R, Rauch T, Graf C, Deuerling E. (2006) "A conserved motif is prerequisite for the interaction of NAC with ribosomal protein L23 and nascent chains" *The Journal of Biological Chemistry*. 281(5):2847-2857.
82. Wiedmann B, Sakai H, Davis T, Wiedmann M. (1994) "A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation" *Nature*. 370 (11): 434-440.
83. Wiedmann B, Prehn S. (1999) "The nascent polypeptide associated complex (NAC) of yeast functions in the targeting process of ribosomes to the ER membrane" *FEBS Letters*. 458:51-54.

84. Wiedemann N, Pfanner N, Ryan M. (2001) "The three modules of the ADP/ATP carrier cooperate in receptor recruitment and translocation into mitochondria" *The EMBO Journal*. 20(5): 951-960.
85. Wiedemann N, Kozjak V, Chacinska A, Schönfisch B, Rospert S, Ryan MT, Pfanner N, Meisinger C. (2003) "Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane" *Nature*. 424: 565–571.
86. Winzler EA, Shoemaker DD, Astromoff A, Liang H, Anderson K, Andre B, Bangham R, Benito R, Boeke JD, Bussey H, Chu AM, Connelly C, Davis K, Dietrich F, Dow SW, El Bakkoury M, Foury F, Friend SH, Gentalen E, Giaever G, Hegemann JH, Jones T, Laub M, Liao H, Liebundguth N, Lockhart DJ, Luca-Danila A, Lussier M, M'Rabet N, Menard P, Mittmann M, Pai C, Rebischung C, Revuelta JL, Riles L, Roberts CJ, Ross-MacDonald P, Scherens B, Snyder M, Sookhai-Mahadeo S, Storms RK, Véronneau S, Voet M, Volckaert G, Ward TR, Wysocki R, Yen GS, Yu K, Zimmermann K, Philippson P, Johnston M, Davis RW. (1999) "Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis" *Science*. 6(285): 901-906.
87. Yogev O, Karniely S, Pines O. (2007) "Translation-coupled translocation of yeast fumarase into mitochondria *in vivo*" *The Journal of Biological Chemistry*. 282(40):29222-29229.
88. Young J, Hoogenraad N, Hartl U. (2003) "Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the Mitochondrial Import Receptor Tom70" *Cell*. 112: 41-50.