



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**Interacciones genéticas y físicas entre el complejo NAC y la proteína Sam37  
durante la importación de proteínas a la mitocondria.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
MARIA CLARA AVENDAÑO MONSALVE

TUTOR PRINCIPAL  
Dra. María Soledad Funes Argüello-Instituto de Fisiología Celular

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dra. Bertha González Pedrajo-Instituto de Fisiología Celular  
Dra. Nuria Sánchez Puig-Instituto de Química

Ciudad de México. Febrero, 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

“Me doy cuenta de que si fuera estable, prudente y  
estático viviría en la muerte.

Por consiguiente acepto la confusión, la incertidumbre,  
el miedo y los altibajos emocionales,  
porque ése es el precio que estoy dispuesto a pagar  
por una vida fluida, perpleja y excitante”

Carl Rogers

# AGRADECIMIENTOS

---

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. Bertha González Pedrajo Instituto de Fisiología Celular

Dra. Nuria Sánchez Puig Instituto de Química

Dra. María Soledad Funes Argüello Instituto de Fisiología Celular

Este trabajo se realizó gracias al Programa UNAM-DGAPA-PAPIIT (IA200813 e IN202715) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-CB 105631 y 237344).

A CONACyT por la beca otorgada para la realización de los estudios de maestría con número de registro 576692

Al Programa de Apoyo a los estudios de Posgrado PAEP, por el apoyo brindado para la asistencia a los congresos: XIX Reunión de la rama de Bioenergética y Biomembranas y XXXI Congreso Nacional de Bioquímica.

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.

Al Dr. Francisco Torres Quiroz, investigador del Instituto de Fisiología Celular, y a todo su grupo de trabajo, por su valiosa ayuda en la elaboración y análisis de los ensayos de Complementación de Fragmentos Proteicos por DHFR.

A la Dra. Fabiola Jaimes Miranda por la ayuda técnica brindada.

# Índice

---

1. Resumen	7
2. Introducción	8
2.1 Señales de localización mitocondrial	9
2.2 Rutas de importación	10
2.2.1 Proteínas de la membrana externa mitocondrial	10
2.2.2 Proteínas del espacio intermembranal	10
2.2.3 Proteínas de la membrana interna mitocondrial	11
2.2.4 Proteínas de la matriz mitocondrial	11
2.3 Complejos proteicos que participan en la biogénesis de proteínas mitocondriales	12
2.3.1 Complejo TOM	12
2.3.2 Complejo TIM23	14
2.3.3 Complejo PAM	14
2.3.4 Complejo TIM22	15
2.3.5 OXA	15
2.3.6 Complejo TOB/SAM	15
2.3.7 Complejo MIM	16
2.3.8 Complejo MIA	16
2.4 Importación post-traducciona l y co-traducciona l	17
2.4.1 Evidencias del modelo co-traducciona l en mitocondrias	18
2.5 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudio	20
3. Antecedentes Directos	22
4. Hipótesis	23
5. Justificación	24

6. Objetivos	25
6.1 Objetivo General	25
6.2 Objetivos específicos	25
7. Materiales y métodos	26
7.1 Cepas	26
7.1.1 Cepas mutantes en <i>S. cerevisiae</i>	26
7.1.2 Construcciones en el genoma en <i>S. cerevisiae</i>	27
7.1.3 Bacterias	30
7.2 Plásmidos	30
7.2.1 Plásmidos para amplificación de módulos de selección de mutantes	30
7.2.2 Plásmidos para la síntesis de proteínas	31
7.2.3 Plásmidos para las construcciones PCA-DHFR	32
7.3 Preparación de células competentes	33
7.4 Transformación en bacterias	33
7.5 Transformación en levadura	33
7.6 Electroforesis en geles de agarosa	34
7.7 Electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida SDS-PAGE e inmunorréplica tipo western blot	34
7.8 Extracción total de proteína	36
7.9 Cinética de inducción	36
7.10 Generación de cepas mutantes	37
7.10.1 PCR para amplificación de módulos de selección a antibióticos	37
7.10.2 Confirmación de cepas mutantes	37
7.11 Análisis de Esporas al Azar (RSA)	38

7.12 Ensayos de crecimiento por diluciones seriadas	39
7.13 Complementación de Fragmentos Proteicos (PCA) usando DHFR	39
7.14 Co-precipitación por afinidad	41
7.14.1 Clonaciones de los genes <i>SAM37</i> , <i>TOM70</i> , <i>OM14</i> , <i>EGD1</i> , <i>EGD2</i> y <i>BTT1</i>	41
7.14.2 Co-precipitación por afinidad	43
7.14.3 Análisis de co-precipitación por afinidad	44
8. Resultados y discusión	45
8.1 Análisis de las interacciones genéticas entre los genes <i>SAM37</i> , <i>TOM70</i> , <i>OM14</i> , <i>EGD1</i> , <i>EGD2</i> y <i>BTT1</i>	45
8.1.1 Generación de la mutante sencilla $\Delta om14$	45
8.1.2 Generación de dobles mutantes	46
8.2 Evaluación del fenotipo de crecimiento	49
8.3 Interacciones físicas por el método PCA	51
8.4 Interacciones físicas por el método de co-precipitación por afinidad	56
8.4.1 Elaboración de construcciones	57
9. Modelo final	64
10. Conclusiones	66
11. Perspectivas	67
12. Referencias	68
Apéndice I	73
Apéndice II	76
Apéndice III	80

# 1. Resumen

---

La mayoría de las proteínas mitocondriales se encuentran codificadas en el genoma nuclear, por lo tanto, son sintetizadas por ribosomas presentes en el citosol y posteriormente, son llevadas a la mitocondria donde diferentes complejos proteicos se encargan de la ubicación final de las mismas. Hasta la fecha, no se sabe con exactitud cómo las proteínas mitocondriales son reconocidas en el citoplasma y entregadas al organelo y cuáles componentes intervienen en este proceso. Se han descrito dos modelos; el primero de ellos denominado co-traducciona, en el cual la traducción y la importación ocurren de forma simultánea, mientras que el segundo, post-traducciona, la importación es independiente de la traducción de la proteína. En el modelo co-traducciona se ha descrito la participación de la chaperona citosólica NAC, al ser capaz de unirse al ribosoma y prevenir un mal plegamiento del péptido naciente. Adicionalmente, en el grupo de investigación, se estudió la interacción genética negativa entre esta chaperona y la proteína de la membrana externa mitocondria Sam37, identificando así su relación funcional en la biogénesis mitocondria. En el presente trabajo, se estudiaron las interacciones físicas entre NAC y las proteínas de la membrana externa mitocondria Sam37, Tom70 y Om14. Se resalta que hay interacción entre Sam37 y  $\alpha\beta_2$ -NAC, demostrando así su papel funcional en la importación co-traducciona de proteínas a la mitocondria.

## 2. Introducción

---

La principal característica de las células eucariontes es que poseen un núcleo definido por una membrana nuclear en donde se encuentra el material genético y adicionalmente poseen organelos celulares. Algunos de los organelos presentes en estas células son aparato de Golgi, retículo endoplasmático, vacuolas, cloroplastos, peroxisomas, núcleo, lisosomas, citoesqueleto y mitocondrias. A pesar de que todos son igualmente importantes para mantener la homeostasis en la célula; las mitocondrias son un punto central de interés científico debido a las múltiples funciones que realiza y a su interesante origen evolutivo.

Las mitocondrias son organelos con doble membrana, la membrana externa que delimita su interior y la membrana interna, que forma invaginaciones denominadas crestas, estas últimas proporcionan mayor área superficial, puesto que la membrana interna alberga los complejos que conforman la cadena transportadora de electrones, el complejo ATP sintasa y otros complejos proteicos mitocondriales. De esta forma, es posible distinguir cuatro compartimentos en la mitocondria: membrana externa, espacio intermembranal, membrana interna y matriz.

La principal función de las mitocondrias es la producción de energía, mediante la síntesis de ATP por el proceso de fosforilación oxidativa. Adicionalmente, es importante en el metabolismo aerobio, metabolismo de lípidos, síntesis de centros hierro-azufre, señalización, diferenciación y muerte celular programada, entre otros.

En 1967 Lynn Margulis, planteó el origen endosimbionte de las mitocondrias, proponiendo que un eucarionte primitivo engulló a un procarionte de vida libre (Margulis, 1971). Actualmente, esta teoría es la más aceptada por la comunidad científica sobre el origen de estos organelos. Uno de los remanentes del organismo procarionte que les dio origen, es el material genético que poseen (mtDNA). El DNA mitocondrial humano, posee 37 genes de los cuales 13 codifican para proteínas que participan en la fosforilación oxidativa, 2 RNAs ribosomales y 22 RNAs de transferencia (Tuena & Vázquez, 2002).

A pesar de que los genes que se encuentran en los mtDNAs son esenciales para ciertas funciones mitocondriales, la gran mayoría de las proteínas que realizan su función en estos organelos están codificadas actualmente en el DNA nuclear, son traducidas por ribosomas en el citoplasma y posteriormente, deben ser importadas a la mitocondria. Para asegurar que las proteínas mitocondriales lleguen hasta su destino final en la mitocondria, las células han desarrollado una variedad de mecanismos que en la literatura se conocen como “rutas de importación” mitocondrial (Chacinska, Koehler, Milenkovic, Lithgow, & Pfanner, 2009; Hewitt, Gabriel, & Traven, 2014). Cada una de estas rutas se ha especializado de acuerdo con las características fisicoquímicas de las proteínas que reconoce y del sub-compartimento que deben alcanzar.

## **2.1 Señales de localización mitocondrial**

Las proteínas mitocondriales que son sintetizadas por ribosomas citosólicos poseen elementos que permiten su reconocimiento y posterior localización en este organelo. Las señales son variables y dependen principalmente, del tipo de proteína que se importe y de la ruta de importación que las reconoce.

La más estudiada es la denominada MTS (por las siglas en inglés de *Mitochondrial Targeting Sequence*) y que consiste de una alfa hélice anfipática de alrededor de 50 aminoácidos y que puede ser o no, removida una vez que la proteína ha alcanzado su destino funcional. La MTS es necesaria también para el proceso de localización subsecuente dentro de la mitocondria (Neupert, 2015; Schulz, Schendzielorz, & Rehling, 2014). Algunas otras, como las proteínas integrales de membrana, pueden contener señales internas en la secuencia, pero se desconoce exactamente cómo funcionan (Neupert, 2015; Schulz et al., 2014). Algunos autores han postulado que se reconocen los cruces transmembranales de las proteínas (Bohnert, Pfanner, & van der Laan, 2015; Ellenrieder, Martensson, & Becker, 2015). Finalmente, las proteínas del espacio intermembranal, poseen señales con motivos de cisteínas que por un lado facilitan el que sean retenidas en

el organelo y por otro permiten su plegamiento y asociación a cofactores (Dudek, Rehling, & van der Laan, 2013).

## **2.2 Rutas de Importación**

Dependiendo del tipo de proteína, existen diferentes rutas de importación que involucran distintos complejos proteicos que se describirán a detalle más adelante. En este apartado, se explicarán de forma muy general las rutas de importación, según el compartimento mitocondrial donde se encuentren. En la figura 1 se esquematizan las rutas mencionadas a continuación.

### *2.2.1 Proteínas de la membrana externa mitocondrial*

Estas a su vez se dividen en dos, barriles beta y aquellas que en su topología están conformadas por hélices alfa. Las primeras deben atravesar el poro de importación formado por el complejo TOM y posteriormente, son ubicadas en la membrana externa por el complejo SAM desde el espacio intermembranal (Dudek et al., 2013; Höhr, Straub, Warscheid, Becker, & Wiedemann, 2015). Por otro lado, las proteínas con hélices alfa, son importadas por el complejo MIM, aquellas que solo tienen un cruce transmembranal llegan directo a la membrana desde el citoplasma, en cambio, las que tienen más de un cruce, deben pasar por el complejo TOM y posteriormente, MIM las inserta en la membrana (Ellenrieder et al., 2015).

### *2.2.2 Proteínas del espacio intermembranal*

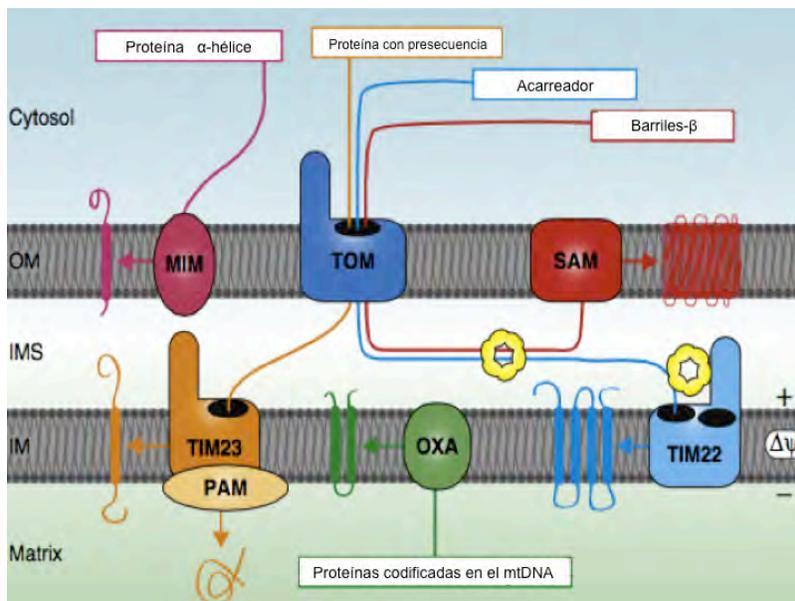
Estas proteínas deben igualmente ser importadas inicialmente por el complejo TOM, posteriormente el complejo MIA es el encargado de su ubicación y plegamiento. La importación de estas proteínas es guiada por cisteínas en motivos particulares que forman puentes disulfuro con las cisteínas del complejo MIA (Dudek et al., 2013).

### *2.2.3 Proteínas de la membrana interna mitocondrial*

Existe una variedad de complejos que participan en la importación de proteínas de la membrana interna mitocondrial. Todas las que son sintetizadas en el citosol deben ser internalizadas por el complejo TOM, una vez en el espacio intermembranal siguen diferentes rutas según sus características. Aquellas que tienen una presecuencia tipo MTS, son importadas por el complejo TIM23. Otras, que se reconocen como transportadores son insertadas en la membrana interna por el complejo TIM22. Finalmente, hay un grupo de proteínas que son insertadas desde la matriz hasta la membrana interna por el complejo OXA, en este grupo se incluyen aquellas que atraviesan completamente la membrana interna por el complejo TIM23 y también las que son sintetizadas en la matriz por ribosomas mitocondriales (Bohnert et al., 2015; Stiller et al., 2016).

### *2.2.4 Proteínas de la matriz mitocondrial*

Estas proteínas contienen la MTS canónica, que es editada una vez que la proteína llega a la matriz mitocondrial. Siguen la ruta complejo TOM-TIM23-PAM. PAM es considerado el motor de importación ya que utiliza ATP para guiar la importación completa hasta la matriz (Schulz et al., 2014) .



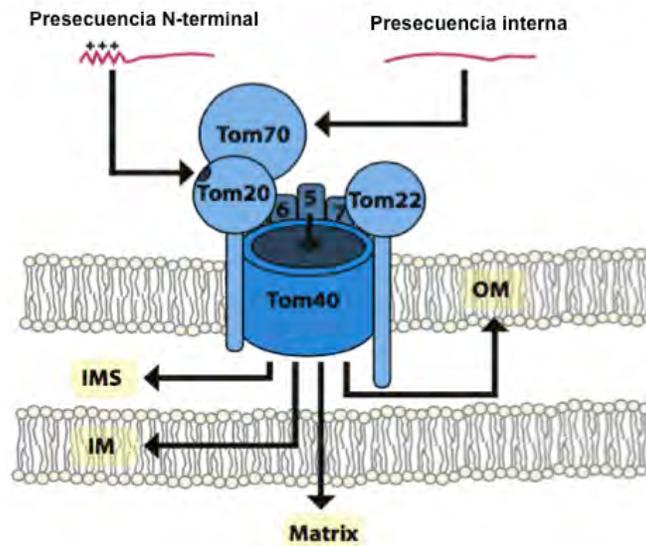
**Figura 1. Rutas de importación de proteínas mitocondriales.** El esquema resume las diferentes rutas de importación de proteínas mitocondriales según su compartimento final en este organelo y su topología. En el esquema no aparece el complejo MIA. Modificado de (Bohnert et al., 2015).

## 2.3 Complejos proteicos que participan en la biogénesis de proteínas mitocondriales

### 2.3.1 COMPLEJO TOM

El complejo TOM (por las siglas en inglés de “*Translocase of Outer Membrane*”) localizado en la membrana externa mitocondrial, es la puerta de entrada para la mayoría de las proteínas mitocondriales que se encuentran codificadas en el genoma nuclear (Neupert, 2015; Schulz et al., 2014); ya que la mayoría de éstas deben atravesar la membrana externa de la mitocondria independientemente de su ubicación final. El complejo TOM está formado por siete subunidades diferentes: Tom40 es una proteína con estructura de barril  $\beta$  y es el poro o canal de entrada por el que atraviesa la membrana; Tom20 y Tom70 (ver figura 2) son proteínas de un cruce transmembranal que exponen el extremo C-terminal hacia el citosol, Tom22 también tiene un cruce transmembranal pero su extremo N-terminal se expone al citosol, estas tres subunidades son los receptores que participan en el reconocimiento de la secuencia señal de los precursores mitocondriales.

Finalmente las subunidades pequeñas Tom5, Tom6 y Tom7 son importantes para la estabilización del complejo (Bohnert, Pfanner, & van der Laan, 2007).



**Figura 2 Complejo TOM.** El complejo TOM está formado por siete subunidades diferentes. Tom40 es el poro central; Tom20, Tom22 y Tom70 son los receptores del complejo y Tom5, Tom6 y Tom7 son las subunidades mas pequeñas que estabilizan el complejo. Modificado de (Höhr et al., 2015).

Mientras que Tom20 reconoce secuencias en la región N-terminal del precursor, Tom70 reconoce señales que se encuentran al interior de la proteína, las cuales pueden estar distribuidas a lo largo de la misma (Bohnert et al., 2007). En ambos casos, una vez la secuencia es reconocida, el precursor es entregado a Tom22 como segundo receptor (Bohnert et al., 2007).

Es importante resaltar, que este proceso es independiente de energía o de un gradiente de membrana (Schulz et al., 2014), es decir, no hay un mecanismo claro acerca de las fuerzas que conducen la translocación. Al parecer, las interacciones entre la presecuencia y las subunidades Tom20 y Tom22 incrementan la afinidad permitiendo el proceso de importación (Schulz et al., 2014). Actualmente, se conoce la estequiometría de este complejo, son tres subunidades de Tom40 junto tres subunidades de Tom20, aunque hay una transición dinámica entre trímero:dímero, sin embargo, en este estudio no se tomó en cuenta a la subunidad Tom70 (Shiota et al., 2015).

### 2.3.2 COMPLEJO TIM23

El complejo TIM23 (por las siglas en inglés de “*Translocase of the Inner Membrane*”) es el encargado de translocar a los precursores con presecuencia que se dirigen hacia la membrana interna o hacia la matriz mitocondrial (Schulz et al., 2014). La región central y canal de translocación de este complejo, está formada por las subunidades Tim23 y Tim17, cada una con cuatro dominios transmembranales. La proteína Tim50 funciona como receptor de las presecuencias que provienen del complejo TOM. El complejo TIM23 puede distinguir entre proteínas que deben insertarse directamente en la membrana interna y proteínas que deben atravesarla para llegar a la matriz. Para poder llevar a cabo estas dos funciones diferentes, Tim23-Tim17 se asocian con otras subunidades del complejo que facilitan tanto la apertura de una compuerta lateral hacia la membrana interna, como el paso transversal a través de la membrana. Tim50 es la subunidad que reconoce la presecuencia proveniente del complejo TOM, a través de la interacción con su dominio de unión a la presecuencia PBD (por las siglas en inglés de “*Presequence-Binding Domain*” (Bohnert et al., 2007; Schulz et al., 2014). Mgr2 funciona como compuerta lateral, permitiendo el paso de las proteínas que se insertan directamente a la membrana interna, aunque se sabe poco de su mecanismo de acción (Schulz et al., 2014). En caso de que las proteínas sean translocadas por completo a través de la membrana interna, Tim21 se disocia del complejo y se asocia Pam17 (Neupert, 2015; Schulz et al., 2014), consecuentemente, el precursor es entregado al complejo PAM si el destino final de la proteína es la matriz mitocondrial.

A diferencia el complejo TOM, la translocación a través del complejo TIM23 sí requiere de un gradiente de membrana para conducir al precursor a través de la membrana interna (Neupert, 2015; Schulz et al., 2014).

### 2.3.3 COMPLEJO PAM

El complejo PAM (por las siglas en inglés de “*Presequence translocase-Associated Motor*”) está formado por cinco proteínas diferentes: mtHsp70 es el

motor central, la chaperona Pam18, el intercambiador de nucleótidos Mge1 y dos proteínas encargadas del plegamiento Pam16 y Tim44. Este complejo es el encargado del paso final en la internalización de proteínas hacia la matriz mitocondrial. Se le conoce también como el motor del complejo TIM23 ya que utiliza la hidrólisis de ATP para asegurar la entrada a la matriz mitocondrial (Neupert, 2015).

#### 2.3.4 COMPLEJO TIM22

Es similar al complejo TIM23, pero se encarga de insertar en la membrana interna a todos los transportadores de metabolitos presentes en la mitocondria, que carecen de la canónica MTS, pero sus múltiples dominios hidrofóbicos actúan como señal que los dirige hacia su destino final (Bohnert et al., 2015). Está compuesto también por diferentes subunidades proteicas. Su poro central es un dímero de la subunidad Tim22, mientras que la subunidad Tim54 expone un gran dominio hacia el espacio intermembranal y es quien recibe a los precursores para su posterior inserción en la membrana interna. Al igual que TIM23 requiere del potencial de membrana para llevar a cabo su función (Bohnert et al., 2015).

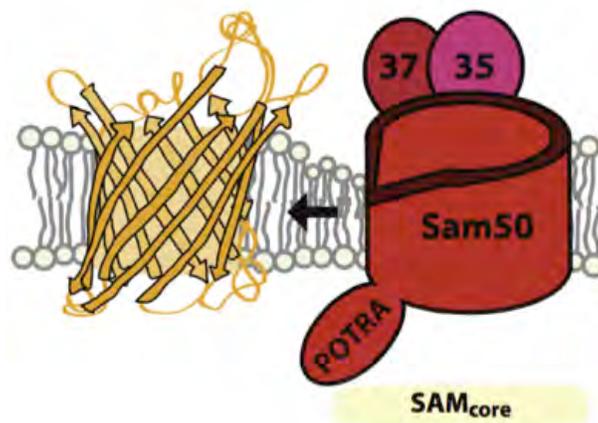
#### 2.3.5 OXA

Oxa1 (por las siglas en inglés de “*Oxidase Assembly*”) está implicada en la inserción a la membrana interna de un número pequeño de proteínas codificadas en el mtDNA y que son sintetizadas por ribosomas mitocondriales, adicionalmente, de proteínas con MTS que llegan a la matriz mitocondrial vía TOM-TIM23 y que posteriormente se integran a la membrana interna (Neupert, 2015; Stiller et al., 2016). Oxa1 tiene un homólogo en bacterias conocido como YidC y en las membranas de tilacoides en donde se conoce como Alb3.

#### 2.3.6 COMPLEJO TOB/SAM

El complejo SAM (por las siglas en inglés de “*Sorting and Assembly Machinery*”) está presente en la membrana externa y es el encargado de la inserción de proteínas con topología de barriles- $\beta$ , una vez la proteína ha atravesado el

complejo TOM (Bohnert et al., 2007). Lo forman tres subunidades Sam50/Tob55, Sam35/Tob38 y Sam37/Tob37 en una estequiometría de 1:1:1. Sam50 es un barril beta, cuyo homólogo en bacterias es BamA, posee un dominio POTRA que reconoce la señal de los barriles beta en el espacio intermembranal (Höhr et al., 2015). Sam35 y Sam37 tienen dominios hidrofílicos expuestos del lado citosólico (Neupert, 2015).



**Figura 3 Complejo SAM.** Formado por las subunidades Sam50, barril  $\beta$ , Sam37 y Sam35, juntas se encargan de la inserción de barriles  $\beta$  en la membrana mitocondrial interna. Modificado de (Höhr et al., 2015)

### 2.3.7 Complejo MIM

Es el complejo encargado de la inserción de proteínas con cruces transmembranles tipo hélice alfa que residen en la membrana externa mitocondrial. Está formado por las proteínas Mim1 y Mim2. La importación de algunas proteínas como por ejemplo Tom20 y Tom70, las cuales se anclan por su extremo N-terminal, es independiente de Tom40. Otras con más de un cruce transmembranle son dependientes de Tom40, por lo que MIM las inserta en la membrana desde el espacio intermembranal (Bohnert et al., 2015). El mecanismo detallado de cómo funciona esta maquinaria no está del todo claro.

### 2.3.8 Complejo MIA

Está formado por Mia40 y Erv1. Se encarga de localizar proteínas con motivos de cisteínas CX3C o CX9C en el espacio intermembranal. Las proteínas entrantes

forman enlaces disulfuro transitorios con Mia40 evitando su translocación inversa al citoplasma. Estos enlaces disulfuro se rompen posteriormente cuando se unen cofactores metálicos o se forman intramolecularmente para estabilizar la estructura terciaria de la proteína entrante (Bohnert et al., 2007).

## **2.4 Importación post-traducciona l y co-traducciona l**

El proceso mediante el cual proteínas son entregadas a la membrana plasmática en procariontes y a los diferentes organelos en eucariotes, se ha descrito mediante dos modelos. El primero de ellos es el post-traducciona l, en el cual la síntesis de la proteína es un proceso independiente de su importación o ubicación en su destino final. El modelo co-traducciona l es de nuestro particular interés y por esta razón se describe con mayor detalle.

La translocación co-traducciona l de proteínas, es un mecanismo presente tanto en células procariontes como eucariotes, mediante el cual se importan las proteínas de membrana citoplasmática y periplasma en el primer caso y retículo endoplasmático en el segundo caso. El proceso a grandes rasgos involucra el reconocimiento de proteínas durante el proceso de síntesis, es decir, mientras el ribosoma las sintetiza, de manera que el complejo formado por el ribosoma y la cadena polipeptídica naciente sea transportado hasta la membrana correspondiente antes de concluir la traducción. En este proceso la traducción y la translocación a través de la membrana ocurren de forma simultánea. Para los casos mencionados el reconocimiento y transporte se ha vinculado a un complejo ribonucleoproteico denominado Partícula de Reconocimiento de Señal o SRP (por las siglas en inglés de "*Signal Recognition Particle*"), el cual reconoce la secuencia señal de la cadena polipeptídica naciente y lleva todo el complejo hasta un receptor en la membrana correspondiente (Nagai et al., 2003).

El proceso de importación en mitocondria, se acepta que sucede de forma post-traducciona l. Sin embargo, se han realizado diversos estudios que plantean la hipótesis de que la translocación puede ser también co-traducciona l.

#### 2.4.1 Evidencias del modelo co-traducciona l en mitocondrias

En la década de los años 70's se publicaron las primeras evidencias del proceso co-traducciona l en mitocondrias. Una de las primeras evidencias que apoyan la importación de forma co-traducciona l fue la observación de ribosomas y polisomas asociados a la membrana externa mitocondria l mediante microscopía electrónica en *Saccharomyces cerevisiae* (Kellems, Allison, & Butow, 1975). Adicionalmente, al utilizar un sistema similar de importación de proteínas mitocondria les, se encontró que la importación de la proteína fusionada CoxIV-DHFR no se inhibe por el metotrexato (que inhibiría la importación post-traducciona l al catalizar el plegamiento de DHFR), por lo tanto, debe ocurrir de forma co-traducciona l, (Fujiki & Verner, 1993).

En años recientes, en estudios en la línea celular HeLa, se etiquetó a GFP (por las siglas en inglés de "*Green Fluorescent Protein*") en el extremo N-terminal con una secuencia líder mitocondria l y en el extremo C-terminal una secuencia líder de retículo endoplasmático, encontrando fluorescencia únicamente en mitocondria; la única forma de explicar esto es porque su importación debe ocurrir de forma co-traducciona l (Mukhopadhyay, Ni, & Weiner, 2004). Estudios de q-PCR así como de visualización *in situ* de 112 mRNAs asociados a mitocondria, revelaron que tales mRNAs presentan un homólogo en procariontes. Resaltan de este estudio el hallazgo de mRNAs que codifican para diferentes subunidades de la ATPsintasa, entre ellas: *ATP2*, *ATP6* y *ATP7* (Garcia et al., 2007).

Además, se conoce que algunas proteínas mitocondria les, no se importan en sistemas *in vitro*, por ejemplo la superoxido dismutasa mitocondria l Sod2 (Luk, Carroll, Baker, & Culotta, 2003) y la fumarasa Fum1 (George, Walsh, Beddoe, & Lithgow, 2002; Knox, Sass, Neupert, & Pines, 1998).

Estos estudios y algunos otros (Fünfschilling & Rospert, 1999; MacKenzie & Payne, 2004) han sentado un camino amplio de investigación alrededor del cual se han planteado preguntas como: ¿Cuál es el mecanismo mediante el cual

sucede? ¿Qué proteínas interactúan y cuáles proteínas mitocondriales se translocan mediante este vía?

Uno de los primeros estudios para responder qué componentes interactúan en esta vía, demostró que dos chaperonas citosólicas Hsp90 y Hsp70 interactúan con Tom70 en humanos y Hsp70 en *S. cerevisiae*. Tom70 es uno de los dos receptores del complejo TOM, que reconoce la secuencia señal que se encuentran a lo largo de la cadena polipeptídica (Young, Hoogenraad, & Hartl, 2003).

Adicionalmente, diversos estudios (Beatrix, Sakai, & Wiedmann, 2000; Reimann et al., 1999; Zhang et al., 2012) muestran que el complejo NAC (por las siglas en inglés de "*Nascent polypeptide- Associated Complex*"), se asocia con ribosomas activos que sintetizan proteínas mitocondriales. El modo de acción no está claro, pero se ha propuesto que NAC promueve la unión a las cadenas peptídicas nacientes que posteriormente deben ser reconocidas por el complejo TOM, identificando la secuencia señal que presentan (Fünfschilling & Rospert, 1999).

Estudios realizados en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, indicaron que NAC provee especificidad durante la entrega de proteínas a la mitocondria. Se observó que la depleción de NAC (mediante iRNA) provoca una localización errónea de proteínas mitocondriales en el retículo endoplásmico. Esto desencadena una respuesta de estrés tanto en mitocondria como en el retículo endoplásmico (Gamerding, Hanebuth, & Tancred Frickey, 2015)

Recientemente se identificó a la proteína de la membrana mitocondrial externa Om14 como el receptor de NAC, al comprobar la interacción física mediante experimentos de co-inmunoprecipitación entre Egd1 (subunidad  $\beta_1$ ) y la proteína Om14. En adición a lo anterior, en mutantes de esta proteína, la asociación de ribosomas citoplásmicos a la membrana externa mitocondrial es menor que en una cepa silvestre. (Lesnik, Cohen, Atir-Lande, Schuldiner, & Arava, 2014).

NAC es una chaperona citosólica heterodimérica presente en arqueas y en eucariontes, formada por las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , y se ha identificado asociado al túnel de salida de los ribosomas, ayudando a la protección de las cadenas polipeptídicas, además actúa como regulador negativo en la translocación de proteínas de retículo endoplasmático y un regulador positivo de la translocación de proteínas mitocondriales (Fünfschilling & Rospert, 1999).

En *S. cerevisiae*, el gen de la subunidad  $\beta$  se encuentra duplicado, por lo que hay dos posibilidades para el complejo NAC,  $\alpha\beta_1$  y  $\alpha\beta_2$  (Beatrix et al., 2000). Estas subunidades individuales del complejo, han sido relacionadas con funciones a nivel transcripcional (Fünfschilling & Rospert, 1999). Los genes que codifican para este complejo son *EGD2* para la subunidad  $\alpha$  y *EGD1* y *BTT1* para las subunidades  $\beta_1$  y  $\beta_2$  respectivamente.

A pesar de que la función de NAC no ha sido completamente esclarecida, se ha involucrado como un componente fundamental en el modelo co-traducciona l de importación de proteínas a la mitocondria. En consecuencia, mutantes de este complejo en organismos multicelulares como *Drosophila melanogaster*, *Mus musculos* y *C. elegans* generan un fenotipo letal en las primeras etapas del desarrollo embrionario (Bloss, Witze, & Rothman, 2003; Deng, Jian Min; Behringer, 1995; Markesich, Gajewski, Nazimiec, & Beckingham, 2000). En cambio la mutación nula de cualquiera de los genes de NAC en *S. cerevisiae*, inclusive una triple mutante, no presenta un fenotipo de crecimiento diferente al de una cepa silvestre; lo que hace a la levadura un modelo de estudio adecuado para esclarecer la función de NAC en la importación de precursores mitocondriales.

## **2.5 *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudio**

En el párrafo anterior se explicó porqué la levadura es un buen modelo de estudio para estudiar el papel del complejo NAC en la importación de proteínas mitocondriales, sin embargo, *S. cerevisiae* presenta otras características clave

como organismo modelo: es un organismo eucariote unicelular de rápido crecimiento, fácil mantenimiento en el laboratorio, sus genomas nuclear y mitocondrial se encuentran secuenciados y el proteoma mitocondrial está identificado. Adicionalmente, se cuenta con colecciones de mutantes que son fundamentales para el estudio de la genética, biología molecular y bioquímica de proceso de traducción y translocación de proteínas mitocondriales.

### 3. Antecedentes Directos

---

Una de las líneas de investigación del grupo de trabajo es la biogénesis mitocondrial. Hasta la fecha se han desarrollado dos trabajos que aportan evidencia del papel de NAC en la importación de proteínas a la mitocondria.

Inicialmente, con base en que una mutante del complejo NAC en la levadura *S. cerevisiae* no tiene un fenotipo diferente u observable al compararlo con una cepa silvestre, se realizó una búsqueda de posibles interactores genéticos, mediante la técnica de “*Synthetic Genetic Array*” (SGA, por sus siglas en inglés), para encontrar genes que codificaran para una proteína que pudiera tener una función redundante al complejo NAC. De este estudio se encontraron diversos genes, pero dos de ellos llamaron particularmente la atención: *SAM37* y *TOM71*, por ser proteínas implicadas en la maquinaria de importación de proteínas a la mitocondria (Ponce Rojas, 2012).

Posteriormente, se evaluaron los niveles basales de algunas proteínas mitocondriales en diferentes combinaciones de mutantes *nac-sam37*. Se encontró que el nivel basal de Sod2, Oxa1, Nfs1 y Tom40 se disminuye en mutantes  $\Delta\alpha\Delta sam37$ ,  $\Delta\beta_2\Delta sam37$ ,  $\Delta\alpha\Delta\beta_2\Delta sam37$  y  $\Delta\beta_1\Delta\beta_2\Delta sam37$ . Al estudiar la cinética de importación de las proteínas Sod2 y Mmf1 se observó que ambas se acumulan en el citoplasma como proteínas precursoras (es decir, aún presentan la MTS) en una mutante  $\Delta\beta_2\Delta sam37$  (Ponce-Rojas, 2016). Así mismo, la cinética de importación *in vivo* de estas dos proteínas mitocondriales ocurre más lentamente que en una cepa silvestre (Yañez Falcón, 2014). Estos trabajos aportan evidencia clara, acerca de la función de la subunidad  $\beta_2$  del complejo NAC junto con la proteína de la membrana externa Sam37 en la importación co-traducciona de proteínas mitocondriales.

## 4. Hipótesis

---

El complejo NAC reconoce proteínas mitocondriales en proceso de síntesis y transporta ribosomas traduccionalmente activos hasta la superficie mitocondrial en donde interacciona físicamente con las proteínas mitocondriales Sam37, Tom70 y Om14.

## 5. Justificación

---

Actualmente, se considera que la importación de proteínas a la mitocondria puede ser de manera post-traducciona l o co-traducciona l, situación análoga a otros organelos celulares como en retículo endoplasmático. A pesar de que existen evidencias que apoyan que la translocación de precursores mitocondriales ocurre de forma co-traducciona l, no hay un mecanismo claro y detallado que explique cómo ocurre el proceso de forma detallada.

La chaperona ribosomal NAC, se ha propuesto como uno de los componentes fundamentales en dicho proceso, dirigiendo a los precursores hacia la membrana mitocondrial externa. Resultados previos del laboratorio han permitido identificar a las proteínas mitocondriales Sam37 y Tom70 como componentes funcionalmente relacionados con NAC, por lo que evaluar las interacciones físicas entre estos componentes resultará clave para esclarecer el mecanismo de importación co-traducciona l de proteínas a la mitocondria. En adición a lo anterior, se evaluará a la proteína Om14 que ha sido reportada como un punto de anclaje mitocondrial del complejo NAC.

# 6. Objetivos

---

## 6.1 Objetivo General

Evaluar las interacciones genéticas y físicas entre la chaperona ribosomal NAC y las proteínas de la membrana externa mitocondrial Sam37, Tom70 y Om14.

## 6.2 Objetivos específicos

- Analizar las interacciones genéticas entre los genes *EGD1*, *EGD2* y *BTT1* (genes que codifican para el complejo NAC), y *SAM37*, *TOM70* y *OM14* (genes que codifican para posibles receptores mitocondriales) mediante el método de esporas al azar.
- Evaluar el fenotipo de las mutantes generadas en el objetivo anterior, mediante el crecimiento de diluciones seriadas en medio sólido.
- Determinar si hay interacción física entre NAC, Sam37, Tom70 y Om14 mediante ensayos de co-precipitación por afinidad o “*pull-down*”.
- Determinar si hay interacción física entre NAC, Sam37, Tom70 y Om14 mediante el método de complementación de fragmentos proteicos (PCA por las siglas en inglés de “*Protein-fragment Complementation Assay*”) usando como proteína reportera la Dihidrofolato reductasa (DHFR, por sus siglas en inglés).

# 7. Materiales y Métodos

## 7.1 Cepas

### 7.1.1 Cepas mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*.

Cepa	Fondo Silvestre	Genotipo	Referencia
BY4741		<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i>	(Winzeler et al., 1999)
BY4742		<i>MATα his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0</i>	(Winzeler et al., 1999)
Y8205	BY4742	<i>MATα, can1Δ::STEP2pr-spHIS5, lypΔ::STEP3ps-LEU2, his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0</i>	(Hin Yan Tong & Boone, 2007)
<i>Δom14</i>	Y8205	<i>MATα, can1Δ::STEP2pr-spHIS5, lypΔ::STEP3ps-LEU2, his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, om14Δ::hph</i>	Este trabajo
<i>Δsam37</i>	BY4741	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, sam37Δ::kanMX4</i>	(Winzeler et al., 1999)
<i>Δegd1</i>	BY4741	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, egd1Δ::kanMX4</i>	(Winzeler et al., 1999)
<i>Δegd2</i>	BY4741	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, egd2Δ::kanMX4</i>	(Winzeler et al., 1999)
<i>Δbtt1</i>	BY4741	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, btt1Δ::kanMX4</i>	(Winzeler et al., 1999)
<i>Δtom70</i>	BY4741	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, tom70Δ::kanMX4</i>	(Winzeler et al., 1999)
<i>Δnac</i>	Y8205	<i>MATα, can1Δ::STEP2pr-spHIS5, lypΔ::STEP3ps-LEU2, his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, egd1Δ::hph,</i>	(Ponce Rojas, 2012)

		<i>btt1Δ::caURA3, egd2Δ::nat1</i>	
<i>Δom14Δsam37</i>	Y8205	<i>MATa, can1Δ::STEP2pr-spHIS5, lypΔ::STEP3ps-LEU2, his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, om14Δ::hph, sam37Δ::kanMX4</i>	Este trabajo
<i>Δom14Δtom70</i>	Y8205	<i>MATa, can1Δ::STEP2pr-spHIS5, lypΔ::STEP3ps-LEU2, his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, om14Δ::hph, tom70Δ::kanMX4</i>	Este trabajo
<i>Δom14Δegd1</i>	Y8205	<i>MATa, can1Δ::STEP2pr-spHIS5, lypΔ::STEP3ps-LEU2, his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, om14Δ::hph, egd1Δ::kanMX4</i>	Este trabajo
<i>Δom14Δegd2</i>	Y8205	<i>MATa, can1Δ::STEP2pr-spHIS5, lypΔ::STEP3ps-LEU2, his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, om14Δ::hph, egd2Δ::kanMX4</i>	Este trabajo
<i>Δom14Δbtt1</i>	Y8205	<i>MATa, can1Δ::STEP2pr-spHIS5, lypΔ::STEP3ps-LEU2, his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, om14Δ::hph, btt1Δ::kanMX4</i>	Este trabajo
<i>Δom14Δnac</i>	Y8205	<i>MATα, can1Δ::STEP2pr-spHIS5, lypΔ::STEP3ps-LEU2, his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, egd1Δ::hph, btt1Δ::caURA3, egd2Δ::nat1, om14Δ::kanMX4</i>	Este trabajo

### 7.1.2 Construcciones en el genoma en *Saccharomyces cerevisiae*

Cepa	Fondo Silvestre	Genotipo	Referencia
Tom70-	BY4741	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0,</i>	Este trabajo

DHFR-1,2		<i>TOM70::DHFR-1,2</i>	
Sam37-DHFR-1,2	BY4741	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, SAM37::DHFR-1,2</i>	Este trabajo
Om14-DHFR-1,2	BY4741	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, OM14::DHFR-1,2</i>	Este trabajo
Egd2-DHFR-1,2	BY4741	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, EGD2::DHFR-1,2</i>	Este trabajo
Egd1-DHFR-3	BY4742	<i>MATα his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, EGD1::DHFR-3</i>	Este trabajo
Egd2-DHFR-3	BY4742	<i>MATα his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, EGD2::DHFR-3</i>	Este trabajo
Btt1-DHFR-3	BY4742	<i>MATα his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, BTT1::DHFR-3</i>	Este trabajo
Sam37-DHFR-3	BY4742	<i>MATα his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, SAM37::DHFR-3</i>	Este trabajo
Om14-DHFR-3	BY4742	<i>MATα his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, OM14::DHFR-3</i>	Este trabajo
Tom70-DHFR-1,2/Egd1-DHFR-3	Diploide	<i>MATa/MATα, his3Δ1/his3Δ1, leu2Δ0/leu2Δ0, MET15/met15Δ0, LYS2/lys2Δ0, ura3Δ0/ura3Δ0, TOM70::DHFR-1,2, EGD1::DHFR-3</i>	Este trabajo
Tom70-DHFR-1,2/Egd2-DHFR-3	Diploide	<i>MATa/MATα, his3Δ1/his3Δ1, leu2Δ0/leu2Δ0, MET15/met15Δ0, LYS2/lys2Δ0, ura3Δ0/ura3Δ0, TOM70::DHFR-1,2, EGD2::DHFR-3</i>	Este trabajo
Tom70-DHFR-1,2/Btt1-	Diploide	<i>MATa/MATα, his3Δ1/his3Δ1, leu2Δ0/leu2Δ0, MET15/met15Δ0, LYS2/lys2Δ0, ura3Δ0/ura3Δ0, TOM70::DHFR-1,2,</i>	Este trabajo

DHFR-3		<i>BTT1::DHFR-3</i>	
Sam37-DHFR-1,2/Egd1-DHFR-3	Diploide	<i>MATa/MATα, his3Δ1/his3Δ1, leu2Δ0/leu2Δ0, MET15/met15Δ0, LYS2/lys2Δ0, ura3Δ0/ura3Δ0, SAM37::DHFR-1,2, EGD1::DHFR-3</i>	Este trabajo
Sam37-DHFR-1,2/Egd2-DHFR-3	Diploide	<i>MATa/MATα, his3Δ1/his3Δ1, leu2Δ0/leu2Δ0, MET15/met15Δ0, LYS2/lys2Δ0, ura3Δ0/ura3Δ0, SAM37::DHFR-1,2, EGD2::DHFR-3</i>	Este trabajo
Sam37-DHFR-1,2/Btt1-DHFR-3	Diploide	<i>MATa/MATα, his3Δ1/his3Δ1, leu2Δ0/leu2Δ0, MET15/met15Δ0, LYS2/lys2Δ0, ura3Δ0/ura3Δ0, SAM37::DHFR-1,2, BTT1::DHFR-3</i>	Este trabajo
Om14-DHFR-1,2/Egd1-DHFR-3	Diploide	<i>MATa/MATα, his3Δ1/his3Δ1, leu2Δ0/leu2Δ0, MET15/met15Δ0, LYS2/lys2Δ0, ura3Δ0/ura3Δ0, OM14::DHFR-1,2, EGD1::DHFR-3</i>	Este trabajo
Om14-DHFR-1,2/Egd2-DHFR-3	Diploide	<i>MATa/MATα, his3Δ1/his3Δ1, leu2Δ0/leu2Δ0, MET15/met15Δ0, LYS2/lys2Δ0, ura3Δ0/ura3Δ0, OM14::DHFR-1,2, EGD2::DHFR-3</i>	Este trabajo
Om14-DHFR-1,2/Btt1-DHFR-3	Diploide	<i>MATa/MATα, his3Δ1/his3Δ1, leu2Δ0/leu2Δ0, MET15/met15Δ0, LYS2/lys2Δ0, ura3Δ0/ura3Δ0, OM14::DHFR-1,2, BTT1::DHFR-3</i>	Este trabajo
Tom70-DHFR-1,2/Egd1-DHFR-3	Diploide	<i>MATa/MATα, his3Δ1/his3Δ1, leu2Δ0/leu2Δ0, MET15/met15Δ0, LYS2/lys2Δ0, ura3Δ0/ura3Δ0, TOM70::DHFR-1,2, SAM37::DHFR-3</i>	Este trabajo
Tom70-	Diploide	<i>MATa/MATα, his3Δ1/his3Δ1, leu2Δ0/leu2Δ0,</i>	Este trabajo

DHFR-1,2/Egd1-DHFR-3		<i>MET15/met15Δ0, LYS2/lys2Δ0, ura3Δ0/ura3Δ0, TOM70::DHFR-1,2, OM14::DHFR-3</i>	
Tom70-DHFR-1,2/Egd1-DHFR-3	Diploide	<i>MATa/MATα, his3Δ1/his3Δ1, leu2Δ0/leu2Δ0, MET15/met15Δ0, LYS2/lys2Δ0, ura3Δ0/ura3Δ0, SAM37::DHFR-1,2, OM14::DHFR-3</i>	Este trabajo
Tom70-DHFR-1,2/Egd1-DHFR-3	Diploide	<i>MATa/MATα, his3Δ1/his3Δ1, leu2Δ0/leu2Δ0, MET15/met15Δ0, LYS2/lys2Δ0, ura3Δ0/ura3Δ0, EGD2::DHFR-1,2, EGD1::DHFR-3</i>	Este trabajo
Tom70-DHFR-1,2/Egd1-DHFR-3	Diploide	<i>MATa/MATα, his3Δ1/his3Δ1, leu2Δ0/leu2Δ0, MET15/met15Δ0, LYS2/lys2Δ0, ura3Δ0/ura3Δ0, EGD2::DHFR-1,2, BTT1::DHFR-3</i>	Este trabajo

### 7.1.3. Bacterias

*Escherichia coli* DH5α

F- Φ80*lacZΔM15Δ(lacZY A-argF)* U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK-,mK+) *phoA supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1*

## 7.2 Plásmidos

7.2.1 Plásmidos para amplificación de módulos de selección de mutantes

Plásmidos	Módulo de amplificación	Resistencia en <i>E. coli</i>	Referencia
pAG32	<i>hph</i>	Ampicilina	(Goldstein &

			McCusker, 1999)
pFA6a	<i>KanMX4</i>	Ampicilina	(Goldstein & McCusker, 1999)

### 7.2.2 Plásmidos para la síntesis de proteínas

<b>Plásmido</b>	<b>Característica</b>	<b>Resistencia en E.coli</b>	<b>Referencia</b>
pGAL1- <i>MMF1</i> -3HA	Expresión de la proteína Mmf1 con una etiqueta de hemaglutinina bajo el promotor de galactosa	Ampicilina	(Yañez Falcón, 2014)
pRS315- <i>EGD1</i> -3HA	Expresión de la proteína Egd1 con una etiqueta de hemaglutinina bajo el promotor de galactosa	Ampicilina	Este Trabajo
pRS315- <i>EGD2</i> -3HA	Expresión de la proteína Egd2 con una etiqueta de hemaglutinina bajo el promotor de galactosa	Ampicilina	Este Trabajo
pRS315- <i>BTT1</i> -3HA	Expresión de la proteína Btt1 con una etiqueta de hemaglutinina bajo el promotor de galactosa	Ampicilina	Este Trabajo
pGAL1- <i>SAM37</i> -His	Expresión de la proteína Sam37 con una etiqueta de histidinas bajo el promotor de	Ampicilina	Este Trabajo

	galactosa		
pGAL1- TOM70-His	Expresión de la proteína Tom70 con una etiqueta de histidinas bajo el promotor de galactosa	Ampicilina	Este Trabajo
pGAL1- Om14-His	Expresión de la proteína Om14 con una etiqueta de histidinas bajo el promotor de galactosa	Ampicilina	Este Trabajo

\*pGAL1=pRS316-GAL1

c) Plásmidos para las construcciones PCA-DHFR

Plásmido	Característica	Resistencia en <i>E. coli</i>	Referencia
pAG25-DHFR-1,2	Amplificación del fragmento [1,2] de la DHFR	Ampicilina	(Freschi, Torres-Quiroz, Dube, & Landry, 2013)
pAG32-DHFR-3	Amplificación del fragmento [3] de la DHFR	Ampicilina	(Freschi et al., 2013)
pAG25-ZL-1,2	Control positivo que expresa el fragmento [1,2] de la DHFR	Ampicilina	(Freschi et al., 2013)
pAG32-ZL-3	Control positivo que expresa el fragmento [3] de la DHFR	Ampicilina	(Freschi et al., 2013)
pAG25-LL-1,2	Control negativo que expresa el fragmento [1,2] de la DHFR	Ampicilina	(Freschi et al., 2013)
pAG32-LL-3	Control negativo que expresa el	Ampicilina	(Freschi et al.,

	fragmento [3] de la DHFR		2013)
--	--------------------------	--	-------

### 7.3 Preparación de células competentes

Se preparó un cultivo de *E. coli* DH5 $\alpha$  en 5mL de medio LB, se dejó crecer durante toda la noche a 37°C a 200rpm. Al día siguiente, se tomó 1mL de cultivo y se diluyó en 50mL de medio LB. Se incubó hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0.5-0.6. El cultivo se centrifugó a 600g a 4°C durante 10 min; el botón celular se resuspendió en la solución TbfI fría con agitación suave, y se incubó durante 2 horas a 4°C. Posteriormente, se centrifugó a 600g a 4°C durante 10 min, el botón celular se resuspendió en la solución TbfII fría y se incubó durante 1 hora. Por último, las células se alicuotaron y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

### 7.4 Transformación de bacterias

La transformación en bacteria *E. coli* DH5 $\alpha$  se realizó por choque térmico. A 50 $\mu$ L de células competentes, se adicionó 20 $\mu$ L de la reacción de ligación (ver punto 7.14.1). Posteriormente, se incubaron durante 30min en hielo, seguido del choque térmico de 45 segundos a 42 °C. A continuación, se incubaron nuevamente en hielo durante 2min. A cada reacción de transformación se agregó 1mL de medio LB y se incubaron durante 1 hora con agitación a 37 °C. Se centrifugaron, se sembraron en medio sólido selectivo (LB + Ampicilina) y se incubaron a 37 °C durante toda la noche.

### 7.5 Transformación en levadura

Se siguió el protocolo de Acetato de Lito/DNA Acarreador/Polietilenglicol (Gietz & Woods, 2002). Brevemente, se parte de un cultivo fresco con una DO<sub>600</sub>=1. Se tomaron 1.5 mL de cultivo y se centrifugaron a 16000g durante 2min, se desechó

el sobrenadante, se hizo un lavado con 500µL de agua estéril, se volvió a centrifugar a 16000g durante 2min y se desechó el sobrenadante. Posteriormente, se incubó con 1mL de Acetato de Litio 0.1M durante 10min, se centrifugaron las células y se desechó el sobrenadante. Al botón celular, se adicionó en el siguiente orden: 240µL de polietilenglicol 3350 50% w/v, 36µL de acetato de litio 1M, 10µL de DNA de esperma de salmón 10mg/mL, 45µL de producto de PCR (5µL en caso de plásmido) y 24µL o 64µL de agua estéril según corresponda. Se resuspendieron las células y se incuban a 42 °C durante 45min. Se centrifugan y se desecha el sobrenadante. Se resuspendieron en 100µL de agua y se sembraron en medio sólido según corresponda.

## **7.6. Electroforesis en geles de agarosa**

Las muestras de DNA se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en amortiguador TAE 1X (ver apéndice 3). A cada muestra se adicionó 5µL de GelRed 3X (Biotium) y amortiguador de carga (6X DNA Loading Dye, Thermo Scientific). Las electroforesis se realizaron a 110V y 100mA. Adicionalmente, los productos de PCR se compararon con una escalera de DNA de fragmentos de longitud conocida (GeneRuler 1Kb DNA Ladder, Thermo Scientific).

## **7.7. Electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida SDS-PAGE e Inmunorréplica tipo Western-blot**

Los geles de poliacrilamida se realizaron como se indica en la siguiente tabla, se realizó primero el gel de corrida, se dejó polimerizar 40 min, se realizó el gel separador y se dejó polimerizar durante 30 min. El gel se corrió en amortiguador de corrida (ver apéndice 3) a 120V y 30mA por gel durante dos horas.

<b>Gel de poliacrilamida 17.5%</b>	<b>Gel de corrida</b>	<b>Gel Separador</b>
30% Acrilamida, 0.2% Bisacrilammida	3.1 mL	0.32 mL
Tris pH 8.8 1.875M	1.16 mL	-
Tris pH 6.8 0.6M	-	0.2 mL
H <sub>2</sub> O	1.16 mL	1.44 mL
10% w/v SDS	55.66 µL	20 µL
10% w/v AMPS	33.3 µL	10 µL
TEMED	3.3 µL	2 uL

\*Las cantidades que se muestran son para un gel

Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham™ Protran™ 0.2µm NC, GE Healthcare Life science) usando el amortiguador de transferencia (ver apéndice 3).

- Para las proteínas que tienen un etiqueta de Hemaglutinina, la membrana se bloqueó con Leche 5% en TBS (ver apéndice 3) durante toda la noche, posteriormente, se incubó con el anticuerpo α-HA-HRP (Roche) en leche 5% en TBS (dilución 1:3000) durante 2 horas. Luego, se hicieron tres lavados, cada uno de 10 minutos, el primero con TBS-Tween 0.1%, y los demás con TBS. Las membranas se revelaron por quimioluminiscencia utilizando el sistema Inmobilon Western Chemiluminiscent HRP Substrate (Millipore); finalmente, las membranas se expusieron a una película de autorradiografía Biomax XAR (Kodak).
- Para las proteínas que tienen etiqueta de histidinas, la membrana se bloqueó con BSA en Amortiguador de Bloqueo (ver apéndice 3) durante

toda la noche, se realizaron dos lavados de 10 minutos con Amortiguador de Bloqueo, se incubó con la sonda HisProbe™-HRP (Thermo) durante dos horas. Luego, se hicieron cuatro lavados de 10 minutos cada uno con amortiguador de bloqueo. Las membranas se revelaron por quimioluminiscencia utilizando el sistema Inmobilon Western Chemiluminiscent HRP Substrate (Millipore); finalmente, las membranas se expusieron a una película de autorradiografía Biomax XAR (Kodak).

## **7.8 Extracción total de proteína**

Se partió de un cultivo fresco, del cual se toman 2 DO<sub>600</sub> (2 mL de un cultivo con una DO<sub>600</sub> de 1), se centrifugó 2min a 8600g, se desechó el sobrenadante, el botón celular se resuspendió en 1mL de agua destilada, se centrifugó nuevamente 2min a 8600g y se descartó el sobrenadante. El botón celular se resuspendió en 250µL de Tris pH 8 50mM, se adicionó 50µL de amortiguador de extracción (ver apéndice 3) y se incubó 10min en hielo. Pasado este tiempo, se adicionó 60µL de ácido tricloroacético 72% w/v y se agitó por vortex. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a -20 °C. Posteriormente, se centrifugó a 18190g a 4 °C durante 30 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavó con 1mL de acetona (grado reactivo, Sigma) pre-enfriada a -20 °C. Nuevamente, se centrifugó a 18190g a 4 °C durante 30 minutos. El botón obtenido, se resuspendió en 100µL de amortiguador de carga LAE 2X (ver apéndice 3)

## **7.9 Cinéticas de inducción**

La cepa BY4741 transformada de forma independiente con cada uno de los plásmidos se creció en medio S<sub>Raf</sub>-Ura o S<sub>Raf</sub>-Leu según corresponda (ver apéndice 2). Se partió de un cultivo con una DO<sub>600</sub> de 1, se adicionó galactosa 2% w/v, este se definió como tiempo 0 horas. Se tomó 2 DO<sub>600</sub> en cada tiempo de inducción (0, 0.5, 1, 2, 3 y 5 horas). En cada una de las muestras se precipitó proteína como se describe en el punto 7.8. Finalmente, las muestras se analizaron

por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida como se describe en el punto 7.7, en cada gel se cargó el volumen equivalente a 0.2 DO<sub>600</sub> del cultivo original.

## 7.10 Generación de cepas mutantes

### 7.10.1 PCR para amplificación de módulos de selección a antibióticos

Los oligonucleótidos utilizados se muestran en el apéndice 1. Estos están diseñados de forma tal que flanquean al gen pero permiten amplificar el módulo de selección. Cada reacción de PCR contiene 20pmoles de oligonucleótidos, 10nmoles de dNTPs, 1.5 U Taq polimerasa (KAPA Taq PCR Kit, KAPABIOSYSTEMS), 100ng de DNA molde, 5µL Amortiguador de KAPA 10X y agua libre de nucleasas para un volumen final de 50µL.

Se utilizó el siguiente programa

Desnaturalización inicial	95 °C por 5 min	
Desnaturalización	95 °C por 1 min	
Alineamiento	55 °C por 1 min	30 ciclos
Extensión	72 °C por 2.15 min	
Extensión final	72 °C por 8 min	

Las reacciones se verificaron por electroforesis en geles de agarosa 1% en amortiguador TAE 1X (ver apéndice 3). Posteriormente, se transformó el producto de PCR en levadura como se explicó anteriormente.

### 7.10.2 Confirmación de cepas mutantes de levadura

Las cepas mutantes se verificaron por PCR de colonia. En cada reacción se usó 10pmoles de oligonucleótidos, 4nmoles de dNTPs, 0.75 U Taq polimerasa (KAPA Taq PCR Kit, KAPABIOSYSTEMS), 100ng de DNA molde, 2μL Amortiguador de KAPA 10X y agua libre de nucleasas para un volumen final de 20μL. El programa de PCR utilizado fue el siguiente

Desnaturalización inicial	95 °C por 10min	
Desnaturalización	95 °C por 1 min	
Alineamiento	55 °C por 1 min	30 ciclos
Extensión	72 °C por 1.5 min	
Extensión final	72 °C por 8 min	

Las reacciones se verificaron por electroforesis en geles de agarosa 1% en amortiguador TAE 1X (ver apéndice 3)

### **7.11 Análisis de esporas al azar (RSA)**

Se prepararon cultivos líquidos en medio rico (YPD) de la cepa carnada ( $\Delta om14$ ) y las cepas presa ( $\Delta egd1$ ,  $\Delta egd2$ ,  $\Delta btt1$ ,  $\Delta sam37$  o  $\Delta tom70$ ), y se plaquearon en medio sólido (YPD) en césped. Ambos tipos de cepas se incubaron a 30 °C durante 24 h.

Luego se replicó la cepa carnada a una caja nueva y encima se replicó la cepa presa correspondiente (Fase de cruce). Se incubaron durante 24 horas a 30 °C. A continuación las cepas se replicaron a medio de selección de células diploides, adicionando los antibióticos apropiados según el caso. Las cajas se incubaron durante 48 horas a 30 °C. Después, las cepas se replicaron a medio de bajos nutrientes y nitrógeno, para inducir esporulación. Las cajas se incubaron a 25 °C

durante 8 días. Pasando este tiempo, para confirmar la formación de esporas (es decir nuevas células haploides), se observó al microscopio una pequeña suspensión de células. A continuación se preparó una nueva suspensión de células y se depositaron cantidades crecientes de esporas en diferentes medios para seleccionar y analizar el crecimiento de: a) células haploides, b) células resistentes a uno u otro antibiótico de selección (mutantes sencillas) y c) para células resistentes a ambos antibióticos (dobles mutantes). La presencia o ausencia de interacciones genéticas se determinó cualitativamente al observar y comparar el crecimiento de las cepas mutantes sencillas y dobles. Para más detalle ver (Hin Yan Tong & Boone, 2007).

## **7.12 Ensayos de crecimiento por diluciones seriadas**

Para evaluar el fenotipo de crecimiento de cada cepa, es necesario partir de cultivos líquidos de las cepas correspondientes crecidos durante toda la noche, se deben diluir a una  $DO_{600}$  de 0.3 y se incuban hasta alcanzar una  $DO_{600}$  entre 0.7 y 1. Se tomaron 1 DO de cada cultivo y se realizan diluciones seriadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ ), de estas se toman 3 $\mu$ L y se siembran en cajas de medio sólido.

En este caso, se usaron dos fuentes de carbono, glucosa (YPD) y glicerol (YPG) y se incubaron durante dos o tres días a 25 °C, 30 °C y 37 °C. Para ver la composición de los medios de cultivo consultar el apéndice 2.

## **7.13 Complementación de fragmentos proteicos usando DHFR**

En primer lugar se diseñaron oligonucleótidos que flanquearan el extremo 3' de los genes sin incluir el codón de paro (apéndice 1). Posteriormente, se realizó una PCR para amplificar los fragmentos de la DHFR y mediante recombinación homóloga fusionarlos al extremo C-terminal de las proteínas. En cada reacción se usó 10 $\mu$ mol de oligonucleótidos, 10 $\mu$ L 2X Phusion Master Mix (Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix, New England Biolabs) y 10ng DNA molde . El programa de PCR utilizado fue el siguiente:

Desnaturalización inicial	98 °C por 30 seg	
Desnaturalización	98 °C por 10 seg	
Alineamiento	55 °C por 30 seg	30 ciclos
Extensión	72 °C por 1.5 min	
Extensión final	72 °C por 10 min	

Las reacciones se verificaron por electroforesis en geles de agarosa 1% en amortiguador TAE 1X (ver apéndice 3).

Los productos de PCR se transformaron en las cepas silvestre BY4741 o BY4742 según el protocolo PEG Yeast Transformation (Gietz & Schiestl, 2007). Una vez se obtuvieron las construcciones deseadas se probaron mediante PCR de colonia.

Posteriormente, se cruzaron la cepas de diferente sexo *MATa* y *MATα*. Para esto, se puso un cultivo en medio líquido YPD (Ver apéndice 2) de ambas cepas y se dejaron crecer durante 48 horas a 30 °C a 200rpm, la presencia de flóculos en el fondo del tubo de cultivo es indicativo que las cepas se cruzaron. Posteriormente, se sembraron en medio sólido con la selección respectiva para células diploides (SD-Lys-Met, ver apéndice 2)

Una vez se obtuvieron las células diploides, se realizó el ensayo de crecimiento por diluciones seriadas en placas de medio sólido con metotrexato. Para esto, se partieron de cultivos  $DO_{600}=1$ , del cual se hicieron diluciones seriadas (1,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ) y se depositaron 10 $\mu$ L en placas de medio sólido con metotrexato y Dimetil Sulfóxido (DMSO) como control. Se incubaron a 30°C y se documento el crecimiento a los días 3, 5 y 7.

## 7.14 Co-precipitación por afinidad

### 7.14.1 Clonaciones de los genes *SAM37*, *TOM70*, *OM14*, *EGD1*, *EGD2* y *BTT1*

Se diseñaron dos grupos de oligonucleótidos. El primer grupo está diseñado de forma tal que se adiciona una etiqueta de 10 codones de histidinas en el extremo 3' para los genes *SAM37*, *TOM70* y *OM14*. El segundo grupo está diseñado para agregar una etiqueta de tres hemaglutininas en el extremo 3' para los genes *EGD1*, *EGD2* y *BTT1*. En el caso de *OM14*, la reacción de PCR se realizó usando como DNA molde cDNA, debido a que la proteína tiene un intrón en su ORF. En cada reacción se usó 20pmoles de oligonucleótidos, 10ηmoles de dNTPs, 1.5 U Taq polimerasa (KAPA Taq PCR Kit, KAPABIOSYSTEMS), 100ηg de DNA molde, 5μL Amortiguador de KAPA 10X y agua libre de nucleasas para un volumen final de 50μL. El programa de PCR utilizado fue el siguiente:

Desnaturalización inicial	95 °C por 10 min	
Desnaturalización	95 °C por 1 min	
Alineamiento	(54.5 °C a 61.5 °C) por 1 min	30 ciclos
Extensión	72 °C por 1.5 min	
Extensión final	72 °C por 5 min	

Las temperaturas de alineamiento varían en el rango indicado, porque dependen de la longitud de los oligonucleótidos utilizados. Las reacciones se verificaron por electroforesis en geles de agarosa 1% en amortiguador TAE 1X (ver apéndice 3).

Posteriormente, se hicieron las respectivas digestiones de plásmido y de producto de PCR. Las reacciones de digestión se incubaron a 37 °C durante 3 horas, cada reacción contiene lo que se indica a continuación

<b>Sustancia</b>	<b>Plásmido</b>	<b>Producto PCR</b>
Amortiguador	3µL	10µL
BSA	3µL	10µL
Enzimas de Restricción (New England BioLabs)	1µL c/u	2µL c/u
DNA	3µg	4 rxn purificadas
H <sub>2</sub> O	X	X
<b>Volumen Final</b>	<b>20µL</b>	<b>100µL</b>

Consecutivamente, se realizó la reacción de ligación, las cuales se incubaron a 16°C durante toda la noche; cada reacción contiene lo indicado a continuación.

<b>Sustancia</b>	<b>Cantidad</b>
Amortiguador	2 µL
Vector	100 ng
Ligasa (New England BioLabs)	1 µL
Inserto	0.2 pmol*
H <sub>2</sub> O	X

<b>Volumen Final</b>	<b>20<math>\mu</math>L</b>
----------------------	----------------------------

\*Se asumió que 1 nucleótido pesa 330g/mol

La reacción de ligación se transformó en *E. coli* DH5 $\alpha$  como se indicó en el punto 7.4 . Las colonias obtenidas se probaron por PCR de colonia y digestión. Se tomó una de las colonias positivas y se realizó la purificación del plásmido. La purificación de los plásmidos se realizó utilizando el kit comercial Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System (Promega) siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor.

Los plásmidos purificados se transformaron en la levadura *S. cerevisiae* siguiendo el protocolo explicado en el punto 7.5. Las transformaciones se realizaron por pares de plásmidos según las interacciones que se quieren estudiar (Tom70-NAC, Sam37-NAC y Om14-NAC).

#### *7.14.2 Co-precipitación por afinidad*

Se parte de 200mL de cultivo SRaf-Ura-Leu (apéndice 2) con una DO<sub>600</sub> entre 0.7 y 0.8, posteriormente se realiza la inducción con galactosa 2% durante una o dos horas (ver resultados punto 8.4).

Pasado este tiempo se realizó la obtención de esferoplastos para facilitar la lisis celular. El primer paso es centrifugar las células 5 min a 3900g, se desechó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió el 10 mL de agua destilada, se centrifugó nuevamente 5 min a 3900g, se desechó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 10mL de Amortiguador de Zymoliasa (MP Biomedicals, LCC) (ver apéndice 3) y se incubó durante una hora a 30°C con agitación continua, finalmente, se centrifugó 5 min a 3900g a 4 °C.

Una vez obtenidos los esferoplastos, se realizó la lisis celular usando perlas de vidrio de 2mm de diámetro. Para esto, se resuspendió el botón celular obtenido en el último paso en 2mL de amortiguador de lisis. En tubos de 2mL se pusieron 1.8mL de células y aproximadamente 200µL de perlas, se realizaron pulsos de 1.5 minutos que se intercalaron con incubaciones en hielo del mismo tiempo. Posteriormente, se centrifugó a 18190g a 4 °C durante un minuto, se recuperó el sobrenadante con ayuda de una jeringa y se centrifugó nuevamente 18190g a 4°C durante 10 minutos. Al lisado clarificado se le llamó extracto total.

El extracto total se puso en contacto con 400µL de resina TALON® Metal Affinity Resin (Clontech), previamente equilibrada con amortiguador de lisis y se incubó durante 1.5 horas. Pasado este tiempo, se realizaron dos lavados con 1.8mL amortiguador de lavado (ver apéndice 3). Por último, se eluyó con 20µL de amortiguador de elución (ver apéndice 3).

En cada uno de los pasos (extracto total, “flow through” y ambos lavados) se tomó una muestra de 100µL a la cual se le hizo precipitación de proteínas con ácido tricloroacético TCA (Sigma).

#### *7.14.3 Análisis de co-precipitación por afinidad*

Para el análisis de la co-precipitación por afinidad se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE) como se describen en el punto 7.6 . Se cargaron en este orden: extracto total, “flow through”, lavado1, lavado2 y elución.

# 8. Resultados y Discusión

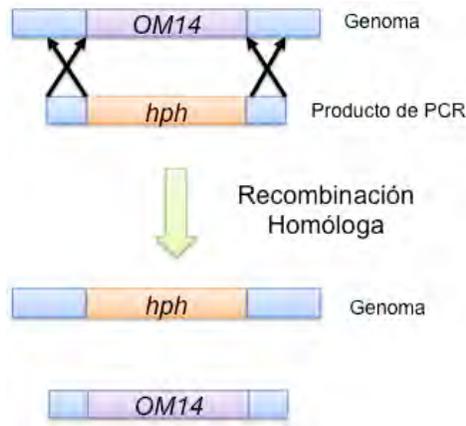
---

## 8.1. Análisis de las interacciones genéticas entre los genes *EGD1*, *EGD2*, *BTT1*, *SAM37*, *TOM70* y *OM14*

### 8.1.1. Generación de la mutante sencilla $\Delta om14$

Para poder analizar las interacciones genéticas entre los genes que codifican para las subunidades de NAC y los que codifican para los posibles receptores de la superficie mitocondrial, se planteó utilizar la estrategia de análisis de esporas al azar (Hin Yan Tong & Boone, 2007). El punto inicial de esta estrategia experimental es contar con las mutantes nulas para cada uno de los genes de interés. La única mutante con la que no se contaba en el laboratorio es la mutante sencilla del gen *OM14* por lo que el primer paso fue generar esta mutante sencilla. El marco de lectura abierto completo se reemplazó por un casete que confiere resistencia al antibiótico higromicina B.

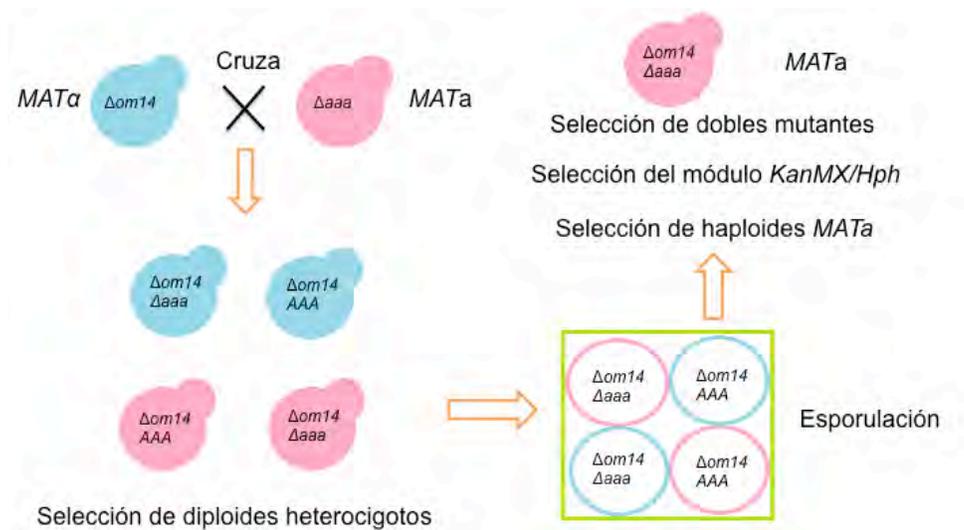
Para esto se amplificó por PCR el casete *hph* del plásmido pAG32 (Goldstein & McCusker, 1999) añadiendo en sus extremos regiones flanqueantes al gen *OM14*. El producto amplificado se transformó en la cepa Y8205 en donde por el fenómeno natural de recombinación homóloga, se sustituye el gen por este casete. En la figura 4, se muestra con más detalle este proceso.



**Figura 4. Generación de la mutante sencilla  $\Delta om14$ .** Se diseñaron oligonucleótidos que flanquearan el gen *OM14* y se amplificó por PCR el casete que confiere resistencia a higromicina B. Posteriormente, el producto de PCR se transformó en la cepa Y8205 que mediante recombinación homóloga reemplazó el gen por el casete. La mutante se verificó mediante PCR de colonia.

#### 8.1.2. Generación de dobles mutantes

Se realizaron combinaciones de dobles mutantes de los genes que codifican para las subunidades de NAC con *OM14*, así como de *SAM37* y *TOM70* con *OM14* mediante el método RSA (por las siglas en inglés de *Random Spore Analysis*). Las mutantes generadas fueron las siguientes  $\Delta om14\Delta egd1$ ,  $\Delta om14\Delta egd2$ ,  $\Delta om14\Delta btt1$ ,  $\Delta om14\Delta sam37$  y  $\Delta om14\Delta tom70$ . En la figura 5 se esquematiza el método de RSA.



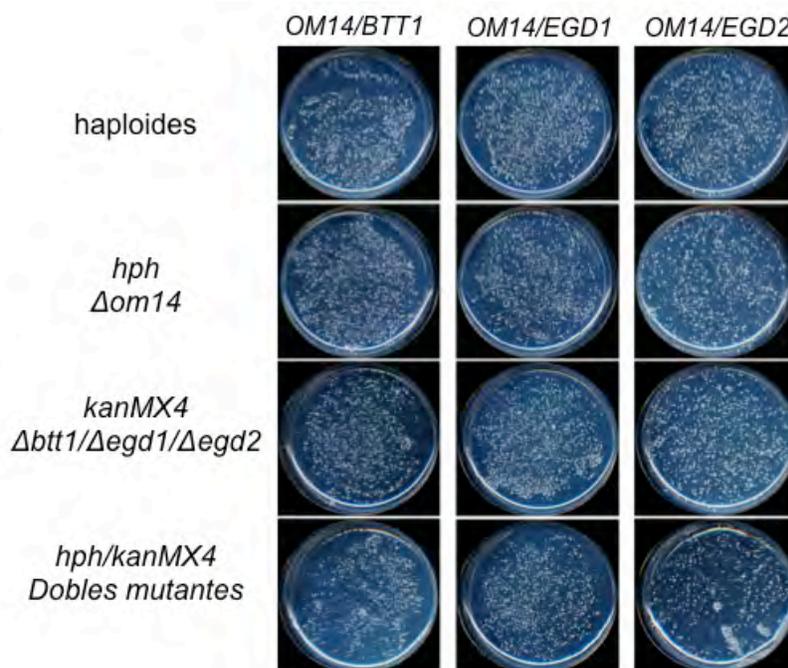
**Figura 5. Esquema general del método RSA.** Se parte de dos mutantes de diferentes sexo, *MATα* y *MATa*, las cuales se cruzan y se seleccionan las células diploides heterocigotas, estas se llevan a esporulación y posteriormente se selecciona la doble mutante y el sexo deseado. El método se explica con detalle en la sección de materiales y métodos.

Además de la generación de mutantes, este método permite evaluar la interacción entre los genes que se estudien mediante el crecimiento en placa ya que el colocar a las cepas resultantes en medios de selección particulares, permite aislar únicamente las cepas haploides dobles mutantes de interés. La interacción funcional de los genes en estudio se analizan mediante el análisis del crecimiento y viabilidad en dichos medios.

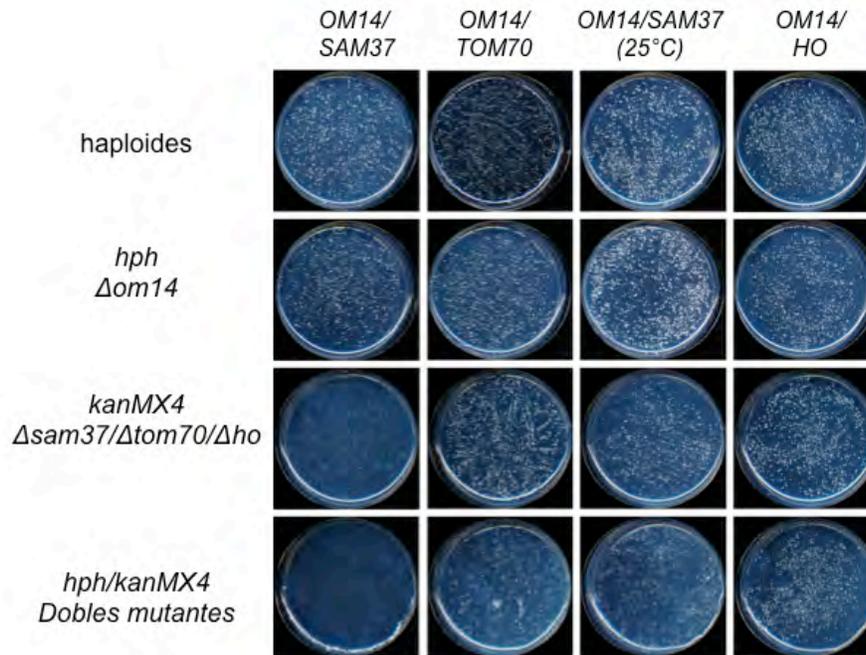
Previamente en el grupo de trabajo se habían analizado por este método las interacciones genéticas entre los genes *EGD1*, *EGD2* y *BTT1* y los genes *SAM37* y *TOM70* (Ponce-Rojas, 2016) por lo que en el presente trabajo analizamos únicamente las interacciones genéticas entre los genes que codifican subunidades de NAC y *OM14* así como las interacciones entre los genes que codifican para los posibles receptores membranales.

En la figura 6, se muestra el resultado obtenido para la interacción genética entre los genes que codifican para las subunidades de NAC y *OM14* y en la figura 7, se

muestra el resultado obtenido para *OM14-SAM37* y *OM14-TOM70*. De estos resultados, es posible decir que no hay una interacción genética negativa entre los genes estudiados, debido a que el crecimiento es muy similar en todas las placas. En las dobles mutantes  $\Delta om14\Delta btt1$  y  $\Delta om14\Delta sam37$  parece haber un menor número de colonias, lo cual indicaría una posible interacción genética negativa, sin embargo, no es posible asegurar nada al respecto ya que las colonias pueden ser muy pequeñas y causar este efecto.



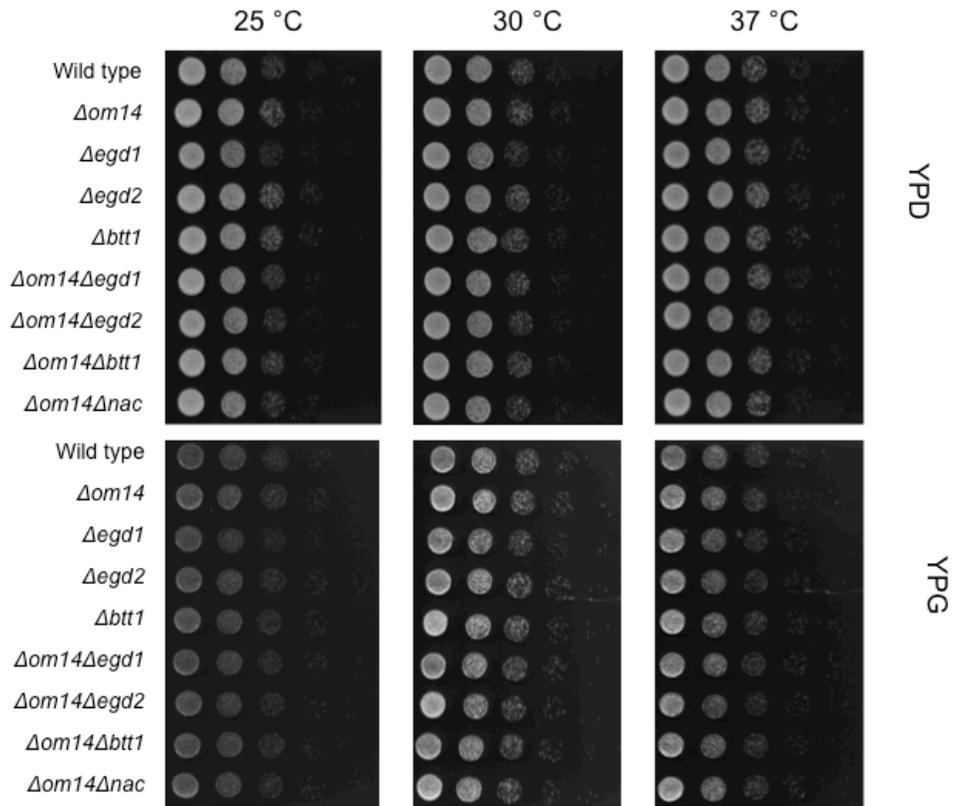
**Figura 6. No hay interacción genética entre los genes *OM14-EGD1*, *OM14-EGD2* y *OM14-BTT1*.** Las dobles mutantes se generaron por el método de Esporas al Azar (Ver materiales y métodos). La presencia de crecimiento en los tres paneles de selección indica que no existe relación genética entre los genes estudiados. Se indica el casete de selección utilizado en cada caso así como la deleción específica que se selecciona por ese antibiótico.



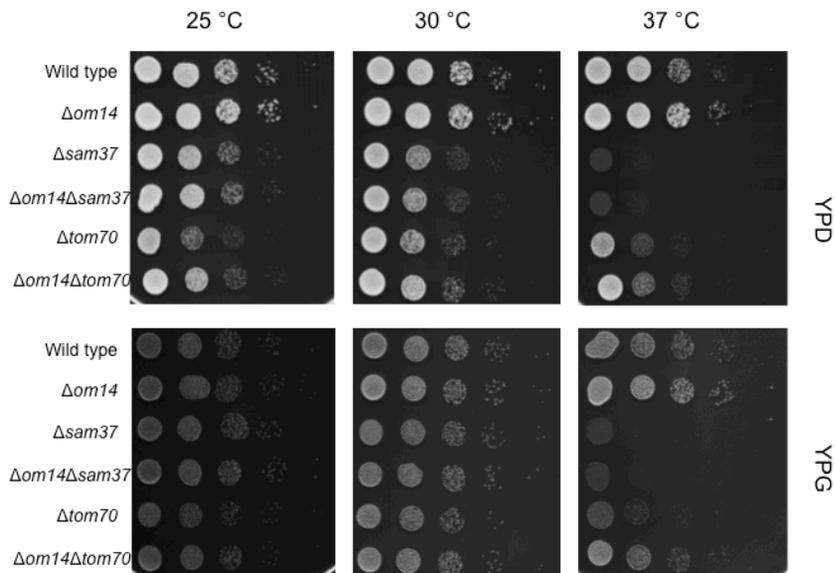
**Figura 7. No hay interacción genética entre los genes *OM14-SAM37* y *OM14-TOM70*.** La dobles mutantes se generaron por el método de Esporas al Azar (Ver materiales y métodos). La presencia de crecimiento en los cuatro paneles de selección indica que no existe relación genética entre los genes estudiados. La mutante *SAM37/OM14* se creció además a 25 °C ya que se sabe que una cepa  $\Delta sam37$  crece más lentamente a 30 °C que es la temperatura estándar de crecimiento de *S. cerevisiae*. La mutante neutral  $\Delta ho$  se utilizó como control experimental. Se indica el casete de selección utilizado en cada caso así como la deleción específica que se selecciona por ese antibiótico.

## 8.2. Evaluación del fenotipo de crecimiento

Para evaluar con más detalle si hay o no algún tipo de interacción genética (negativa o positiva), se hicieron ensayos de crecimiento por goteo en placa utilizando diferentes fuentes de carbono (glucosa y glicerol) y diferentes temperaturas (25, 30 y 37 °C). Los resultados pueden observarse en la figura 8 para *OM14-NAC* y en la figura 9 para *OM14-SAM37* y *OM14-TOM70*.



**Figura 8. Fenotipo de crecimiento de las dobles mutantes  $\Delta om14\Delta egd1$ ,  $\Delta om14\Delta egd2$  y  $\Delta om14\Delta btt1$ .** Se sembraron en placa gotas de una dilución seriada de un cultivo de la cepa correspondiente. Se evaluaron dos fuentes de carbono, glucosa (YPD) y glicerol (YPG) a diferentes temperaturas.



**Figura 9. Fenotipo de crecimiento de las dobles mutantes  $\Delta om14\Delta sam37$  y  $\Delta om14\Delta tom70$ .** Se sembraron en placa gotas de una dilución seriada de un cultivo de la cepa correspondiente. Se evaluaron dos fuentes de carbono, glucosa (YPD) y glicerol (YPG) a las temperaturas indicadas. Se crecieron durante dos o tres días.

En general, no hay diferencia en el crecimiento al compararlos con la cepa silvestre o inclusive con las mutantes sencillas en todos los casos. Es posible que la doble mutante  $\Delta om14\Delta sam37$  crezca un poco en mejor en glucosa al compararlo con la mutante sencilla  $\Delta sam37$ , pero es difícil determinarlo con certeza porque en las otras fuentes de carbono evaluadas no se observa esta diferencia. Inclusive, en la última línea de la figura 8, se observa el fenotipo de una cuádruple mutante  $\Delta om14\Delta egd1\Delta egd2\Delta btt1$ , el cual es muy similar al de la cepa silvestre, demostrando que no existe interacción genética entre *OM14* y el complejo NAC.

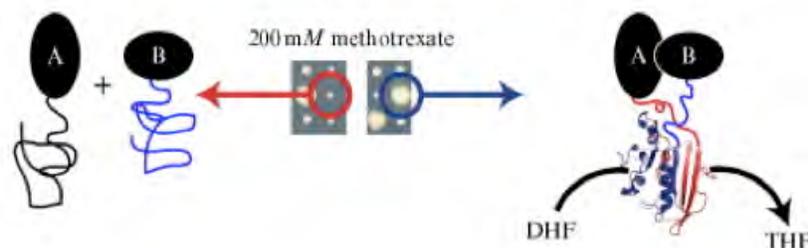
Los resultados hasta aquí obtenidos nos muestran que no existe ningún tipo de interacción genética entre los genes estudiados, lo cual nos indica que es posible que no exista una relación funcional entre ellos. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, en el caso específico de la proteína de la membrana externa mitocondrial *Om14*, se reportó que interacciona físicamente con *Egd1*, subunidad  $\beta_1$  del complejo NAC (Lesnik et al., 2014), pero no hay interacción genética. Lo anterior es poco común, pero podría indicar que existen otros componentes en el sistema o que existen diferentes rutas que estén actuando en la biogénesis mitocondrial.

De trabajo realizado en el grupo de investigación (Ver Antecedentes Directos), se sabe que *SAM37* tiene interacción genética negativa con *EGD2* y *BTT1*, subunidades  $\alpha$  y  $\beta_2$  de NAC respectivamente, indicando su relación funcional directa. Como se mencionó anteriormente, *OM14* aparece como un nuevo componente en la vía de importación, sin embargo, al no presentar interacción genética con *SAM37*, es posible que existan dos rutas paralelas, una donde participan *Om14* en conjunto con el complejo  $\alpha\beta_1$ -NAC y otra, en donde participan  $\alpha\beta_2$ -NAC y *Sam37*. Es por esta razón, que se hace imperativo el estudio de las interacción físicas entre estos componentes para esclarecer los pasos iniciales de la importación de proteínas mitocondriales.

### 8.3 Interacciones físicas por el método PCA

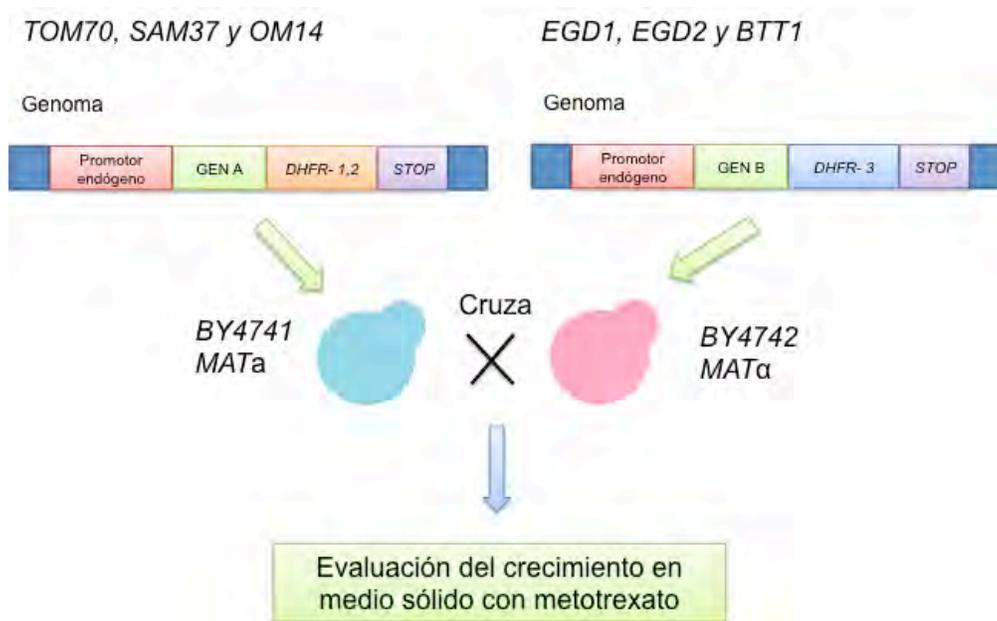
El primer método que se realizó para estudiar las interacciones físicas se denomina PCA (por las siglas en inglés de *Protein Complementation Assay*) (Tarassov et al., 2008) y consiste básicamente en el plegamiento de una proteína reportera que ha sido correctamente fragmentada según sus dominios; hasta la fecha, el método ha sido desarrollado para proteínas fluorescentes o enzimas, para seguir su función (Michnick, 2003; Morell, Ventura, & Avilés, 2009).

En este trabajo, se utilizó como proteína reportera la enzima dihidrofolato reductasa de murino mDHFR, que cataliza la reducción del ácido dihidrofólico a tetrahidrofolico, reacción esencial en la síntesis de bases nitrogenadas. Se sabe que el metotrexato es un inhibidor de esta enzima, sin embargo, la mDHFR se modificó de forma tal que sin perder su actividad catalítica, es funcional en presencia de este inhibidor. Por lo tanto, si las dos proteínas interaccionan, los fragmentos de la DHFR recuperan el plegamiento y así su estructura tridimensional, por lo que la célula es viable en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Pelletier, Campbell-Valois, & Michnick, 1998). En la figura 10 se muestra un esquema que representa la situación descrita anteriormente.



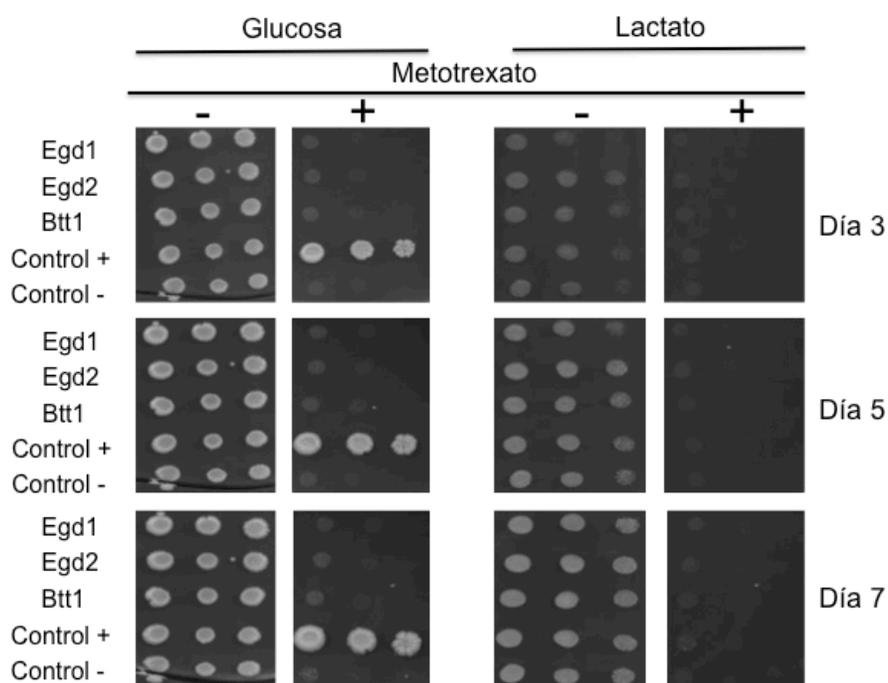
**Figura 10. Esquema general del método PCA-DHFR.** Las proteínas A y B tienen cada una un fragmento de la proteína reportera mDHFR, la cual no es inhibida por metotrexato, por lo tanto, la célula puede crecer en presencia de este inhibidor. Si las proteínas A y B interactúan físicamente (lado derecho del esquema) por lo que la DHF lleva a cabo su reacción enzimática esencial y la célula es viable; por el contrario, si no interactúan físicamente (lado izquierdo del esquema), no hay reacción y la célula es inviable. Tomado de Michnick, Ear, Landry, Malleshaiah, & Messier (2010).

Las cepas necesarias para realizar este ensayo con nuestras proteínas de interés se hicieron añadiendo los fragmentos codificantes de los dominios de mDHFR en el genoma mediante recombinación homóloga. En el extremo C-terminal de las proteínas se adicionaron los fragmentos de mDHFR complementarios, por ejemplo, a la Proteína A, se le adiciona el fragmento [1,2] y a la Proteína B el fragmento [3]. La construcción de la Proteína A debe hacerse en una cepa de sexo *MATa* mientras que la construcción de la Proteína B se hace en una cepa de sexo *MATα*. Posteriormente, ambas cepas se cruzan obteniendo células diploides que contienen ambas construcciones en el mismo genoma. La descripción de cómo se hicieron las construcciones para nuestro modelo de estudio se esquematiza en la figura 11. Finalmente, se evalúa el crecimiento por goteo en placa, en un medio de cultivo que contiene metotrexato y como fuente de carbono glucosa o lactato; el crecimiento se observa a los días 3, 5 y 7 de inoculación. Las construcciones realizadas se pueden consultar en materiales y métodos.



**Figura 11. Esquema del método PCA-mDHFR para el modelo de estudio.** A las proteínas de la membrana externa mitocondrial se les adicionó por recombinación homóloga el fragmento [1,2] de la DHFR en el extremo C-terminal en una cepa silvestre de sexo *MATa*. Por otro lado, a las proteínas que forman el complejo NAC, se les adicionó por recombinación homóloga el fragmento [3] de la DHFR en el extremo C-terminal en una cepa silvestre de sexo *MATα*. Posteriormente, las cepas se cruzan y se evalúa su crecimiento en medio sólido que contiene metotrexato. Todas las construcciones se probaron por PCR y se secuenciaron.

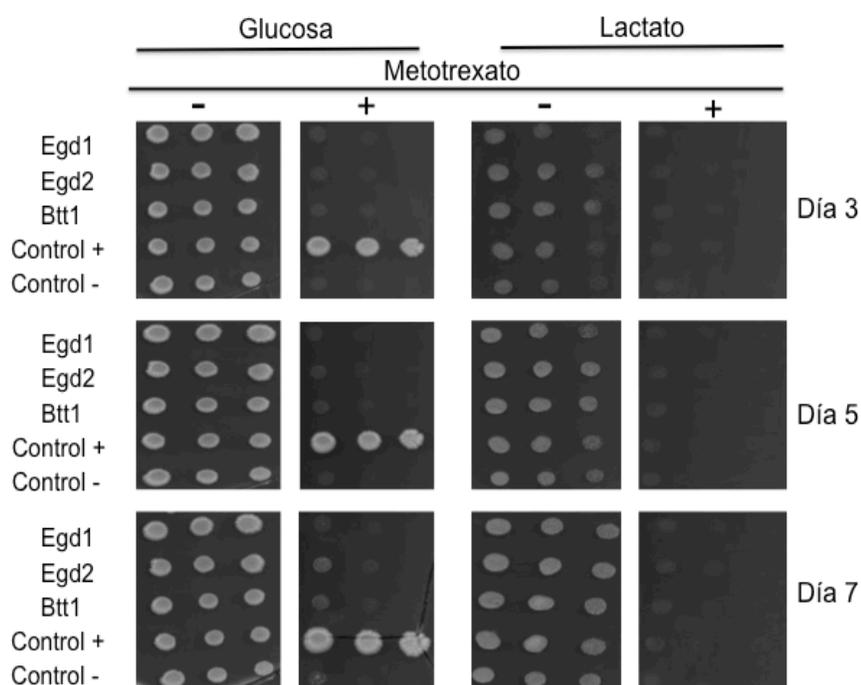
En la figura 12, se muestran los resultados obtenidos para las interacciones entre Tom70-NAC. En este caso, la ausencia de crecimiento para las tres combinaciones (Tom70-Egd1, Tom70-Egd2 y Tom70-Btt1) tanto en glucosa como en lactato, indica que no hay interacción física en ninguno de los casos. Tom70 es uno de los receptores del complejo TOM, perfilándose como un buen candidato para la interacción TOM-NAC-Ribosoma, sin embargo, no es contradictorio puesto que este resultado apoya la idea de que otros componentes, como las también proteínas mitocondriales Sam37 y Om14, participan en la ruta co-traduccion de importación de precursores mitocondriales.



**Figura 12. Tom70 no interacciona físicamente con el complejo NAC.** Se evaluó el crecimiento de las células diploides que expresan los fragmentos de la DHFR (Tom70-DHFR-1,2 y NAC-DHFR-3) en placas de medio sólido con metotrexato en dos fuentes de carbono, glucosa y lactato. El crecimiento se siguió a los 3, 5 y 7 días. Se indica el crecimiento de los controles positivo y negativo de interacción física.

En la figura 13, se observan los resultados obtenidos para las interacciones Sam37-NAC. Para este caso, hay crecimiento para las proteínas Egd2-Sam37 y Btt1-Sam37 desde el día cinco únicamente en glucosa, sin embargo, es tenue y deben hacerse otros ensayos, como evaluar el crecimiento en líquido para determinar con certeza si la interacción física existe. Adicionalmente, es probable que la interacción se observe de forma tenue debido a la regulación de los genes

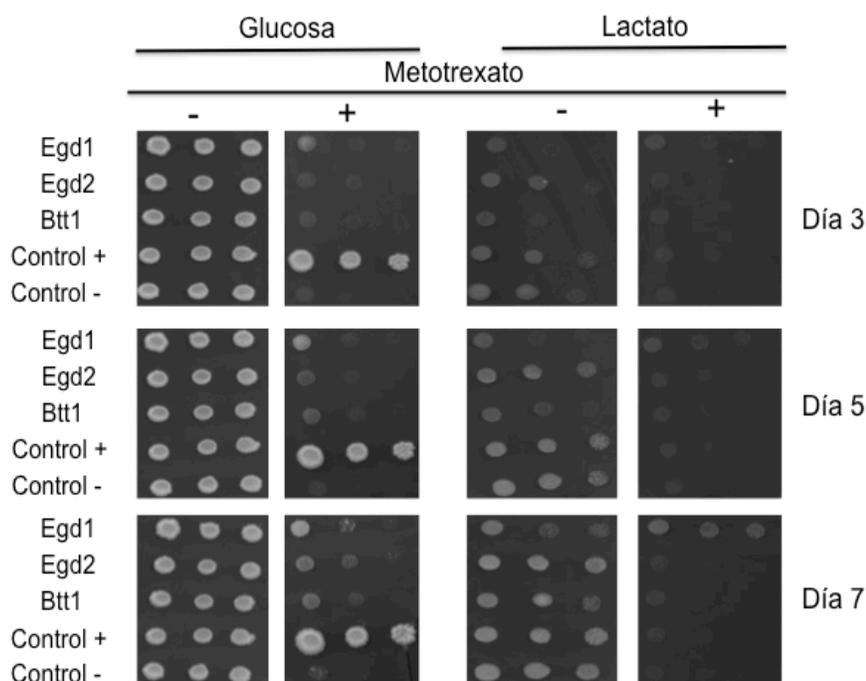
*EGD1* y *BTT1* que codifican para las subunidades  $\beta_1$  y  $\beta_2$  del complejo NAC es diferente; se sabe que la expresión de *EGD1* es 100 mayor a *BTT1* (Reimann et al., 1999), lo anterior podría explicar la formación de menos complejos entre  $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37. Este resultado es acorde con la interacción genética reportada previamente y un posible papel en conjunto de  $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37 en la biogénesis mitocondrial (Ponce-Rojas, 2016); si la interacción física se demuestra, se confirma la hipótesis de que estos componentes juegan un papel fundamental en los primeros pasos de la importación de proteínas a la mitocondria en el modelo co-traduccional.



**Figura 13. Sam37 interacciona físicamente con la subunidad  $\beta_2$  de NAC.** Se evaluó el crecimiento de las células diploides que expresan los fragmentos de la DHFR (Sam37-DHFR-1,2 y NAC-DHFR-3) en placas de medio sólido con metotrexato en dos fuentes de carbono, glucosa y lactato. El crecimiento se siguió a los 3, 5 y 7 días. Se indica el crecimiento de los controles positivo y negativo.

En la figura 14 se muestran los resultados obtenidos para las interacciones entre Om14 y los componentes del complejo NAC. La interacción entre Om14 y Egd1 ya ha sido reportada (Lesnik et al., 2014) y en este trabajo se confirmó. Es claro que desde el día tres hay crecimiento para Om14-Egd1 y Om14-Egd2 en glucosa y sólo Om14-Egd1 interaccionan en el medio que contiene lactato como fuente de

carbono. Lo anterior nos indica la especificidad de las rutas paralelas que se plantean en este trabajo. Una de ellas donde participan  $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37 y que es exclusiva de glucosa y la otra donde participa  $\alpha\beta_1$ -NAC y Om14 y que se da tanto en glucosa como en lactato.



**Figura 14. Om14 interacciona físicamente con la subunidad  $\beta_1$  de NAC.** Se evaluó el crecimiento de las células diploides que expresan los fragmentos de la DHFR (Om14-DHFR-1,2 y NAC-DHFR-3) en placas de medio sólido con metotrexato en dos fuentes de carbono, glucosa y lactato. El crecimiento se siguió a los 3, 5 y 7 días. Se indica el crecimiento de los controles positivo y negativo.

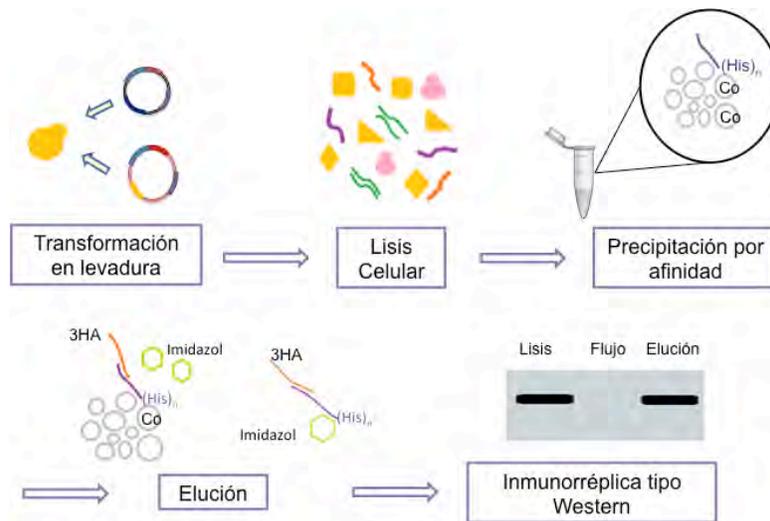
En estos ensayos se probaron dos fuentes de carbono, una fermentable (glucosa) y una respiratoria (lactato), esperando que en la fuente respiratoria se aumentaran el número de interacciones, ya que en este escenario la importación de proteínas a la mitocondria se incrementa debido al estado metabólico de la célula. Sin embargo, sólo se presentó interacción física para el caso de Om14 y Egd1 indicando que esta interacción es exclusiva de un estado respiratorio y apoyando la idea de la existencia de rutas paralelas.

En todos los casos, deben hacerse ensayos en medio de cultivo líquido (curvas de crecimiento), en donde se pueda determinar con certeza y precisión si hay interacción física midiendo la densidad óptica a 600nm, la cual debe ser mayor al del control negativo.

#### **8.4. Interacciones físicas por el método co-precipitación por afinidad**

Este método está basado en la capacidad que tienen dos compuestos para interactuar. Para este caso específico, una resina contiene un ión o algún compuesto que tiene afinidad por otro presente en el extracto que fluye a través de ella. En este caso, la resina contiene el ión cobalto  $\text{Co}^{2+}$  y es afín por el anillo imidazol presente en el aminoácido histidina, por lo que es útil para purificar proteínas con una etiqueta de histidinas.

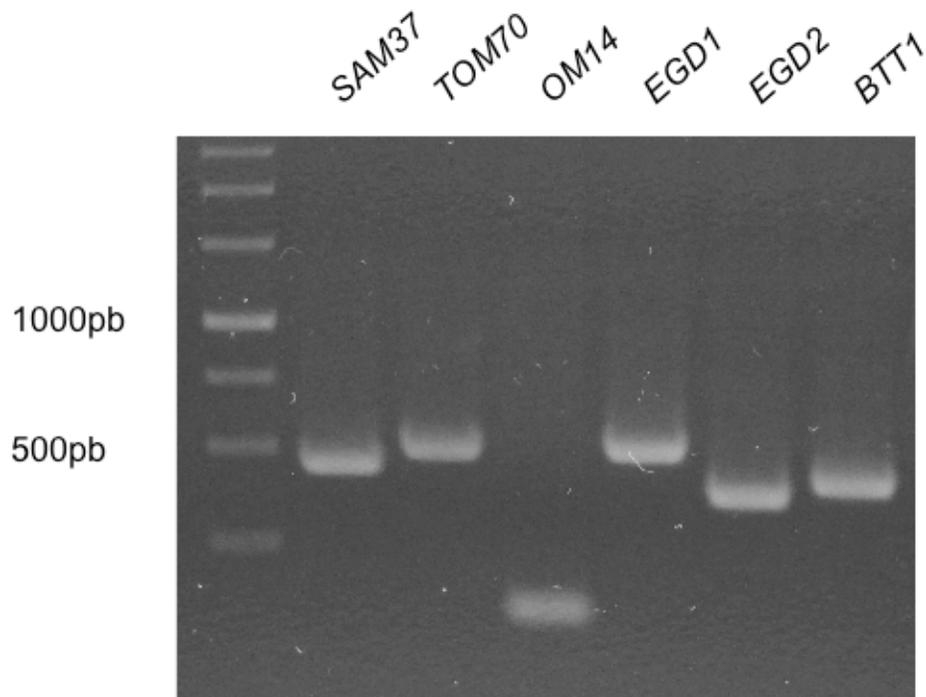
En el modelo planteado, suponemos que NAC interactúa físicamente con cada una de las proteínas de la membrana externa mitocondrial Tom70, Sam37 y Om14. Por lo cual se planteó una co-precipitación, al unir a la resina las proteínas que poseen la etiqueta de histidinas (Tom70, Sam37 y Om14), que a su vez, estas interactúan con las proteínas que forman el complejo NAC (Egd1, Egd2 y Btt1), las cuales tiene una etiqueta de hemaglutinina. En la figura 15 se muestra un resumen del protocolo seguido.



**Figura 15. Esquema general de la co-precipitación por afinidad.** Se transforma la cepa silvestre BY4741 con los dos plásmidos que contienen los genes que codifican para las proteínas de interés. Posteriormente, se realiza una lisis celular, seguido por la precipitación por afinidad en bloque usando la columna comercial TALON®. La elución se realiza con imidazol. Por último, se hace un gel desnaturalizante para proteína y detectan las proteínas de interés por inmunorréplica tipo Western.

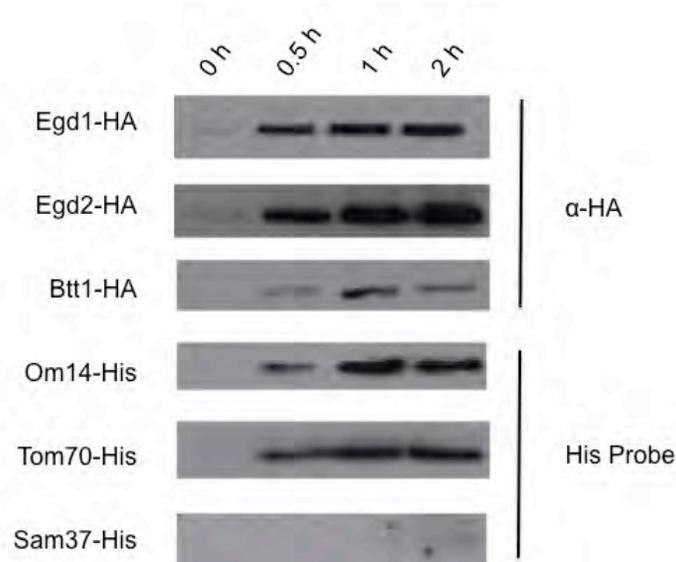
#### 8.4.1 Elaboración de construcciones

Como se mencionó anteriormente, se realizaron diferentes construcciones. Las proteínas de la membrana externa mitocondrial tienen una etiqueta de 10 histidinas en el extremo C-terminal; *TOM70*, *SAM37* y *OM14* fueron clonados bajo un promotor inducible por galactosa *GAL1* en el plásmido pRS316. Para las proteínas que forman en complejo NAC, se adicionó una etiqueta de tres hemaglutininas (3HA) en el extremo C-terminal; *EGD1*, *EGD2* y *BTT1* también fueron clonados bajo un promotor inducible por galactosa *GAL1* en el plásmido pRS315. En la figura 16, se muestra la prueba de las construcciones por PCR.



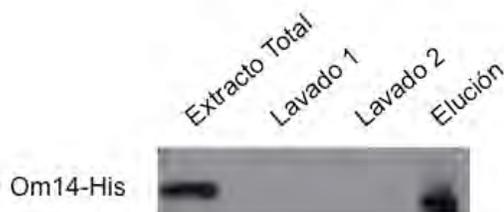
**Figura 16 Prueba por PCR de las clonaciones de *SAM37*, *TOM70*, *OM14*, *EGD1*, *EGD2* y *BTT1*.** Se realizó una PCR para confirmación de las construcciones señaladas. El oligonucleótido “forward” se une en el promotor de galactosa, mientras que el oligonucleótido “reverse” se une en el medio del gen.

Posteriormente, se realizaron cinéticas de inducción de proteína en cepas transformadas con cada uno de los plásmidos, para determinar el tiempo ideal en el cual el nivel de proteína sea el suficiente para ser detectada mediante inmunorréplica tipo Western. En la figura 17, se muestran los resultados obtenidos para la inducción de cada una de las proteínas estudiadas. Es claro que para todas las proteínas, excepto Sam37, el tiempo de inducción es de una hora. Por el contrario, Sam 37 se observa sólo hasta después de 2 horas de inducción.



**Figura 17. Cinética de inducción de proteínas.** La cepa silvestre BY4741 fue transformada con cada uno de los plásmidos que permiten la síntesis de las proteínas indicadas, todas se encuentran bajo un promotor inducible por galactosa. Se prepararon cultivos en medio mínimo con rafinosa y al llegar a 1 D.O.<sub>600</sub> se añadió galactosa para inducir la expresión de los genes de interés, se tomaron muestras de proteína a los tiempos indicados. Se muestra la detección de las proteínas con anticuerpo  $\alpha$ -HA o la sonda His- Probe en las condiciones que se indican en la sección de materiales y métodos.

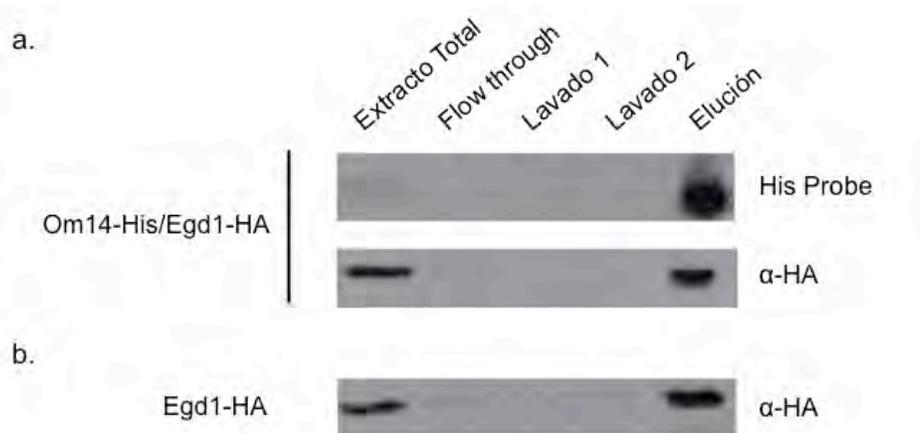
Una vez establecido el tiempo de inducción, se iniciaron los primeros ensayos de precipitación por afinidad. En primera instancia, se inició únicamente con la proteína Om14-His y de esta manera determinar las condiciones adecuadas. Estas fueron 200mL de medio de cultivo y una concentración de imidazol de 150mM en el amortiguador de elución (Amortiguador de carga LAE 4X e imidazol). En la figura 18, se observa que la proteína es detectada tanto en el extracto total como en la elución, como era de esperarse confirmando que Om14 se une específicamente a la resina.



**Figura 18. Precipitación por afinidad de la proteína Om14-his.** La cepa BY4741 se transformó con el plásmido que sintetiza Om14-his. La precipitación por afinidad se realizó como se describe en la sección de materiales y métodos. La proteína se detectó exitosamente en la elución.

A continuación, se realizaron los primeros ensayos de co-precipitación, es decir, con una célula transformada que expresa dos de los plásmidos. Inicialmente, se hizo con una cepa que expresaba a las proteínas Om14-his y Egd1-HA, este par proteico es un control positivo, debido a que su interacción física ya fue reportada (Lesnik et al., 2014) por lo que es un excelente punto de partida.

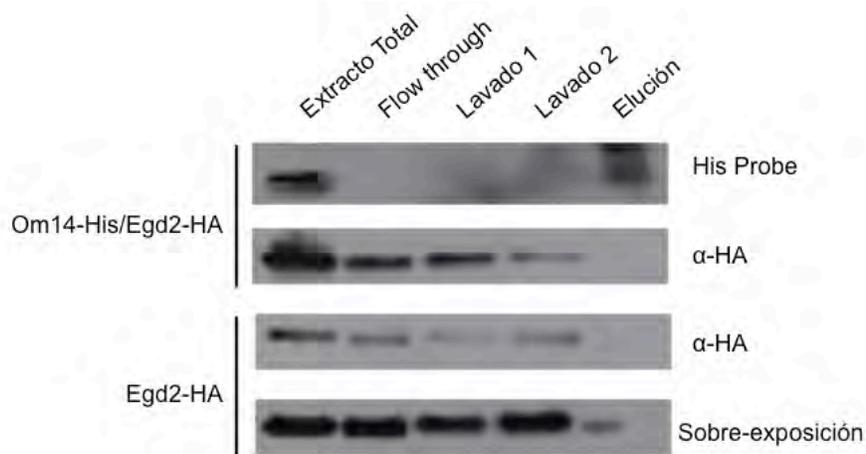
Cuando se realizó el experimento se observa que la proteína Egd1-HA se detecta en la elución así como también Om14-his, indicando que sí hay interacción física entre estas dos proteínas (Figura 19a). Sin embargo, cuando se realizó el experimento control, únicamente con Egd1-HA, también se detecta en la elución, concluyendo que la proteína se une de forma inespecífica a la resina (Figura 19b).



**Figura 19. La subunidad  $\beta_1$  interacciona físicamente con Om14.** a) La cepa silvestre fue co-transformada con los plásmidos que expresan las proteínas Om14-his y Egd1-HA, el extracto total se pasó por la columna TALON, seguido de diferentes lavados y por último, la elución con imidazol. Ambas proteínas se detectan en la elución. b) La cepa silvestre se transformó con el plásmido que expresa Egd1-HA, se siguió el protocolo descrito, la proteína se detecta en la elución.

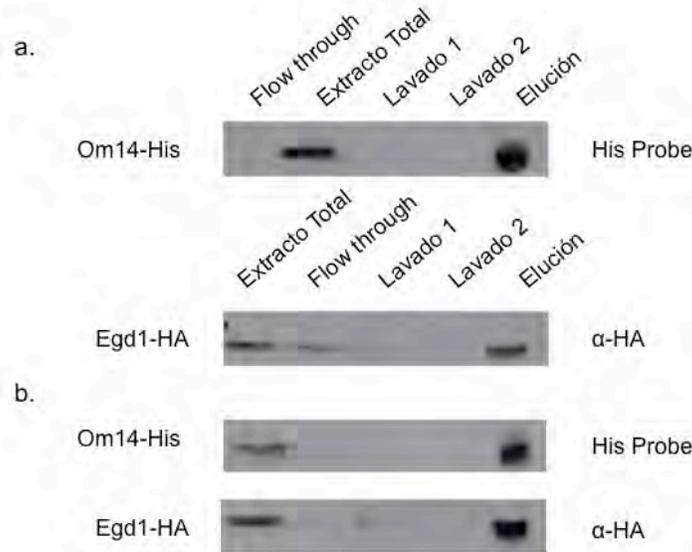
El experimento se repitió, esta vez para el par Om14-his/Egd2-HA, esto con el objetivo de conocer si la unión inespecífica es sólo de Egd1-HA. En la figura 20, se observa que la proteína Egd2-HA se detecta en el extracto total y los lavados más no en la elución, concluyendo que Om14-his y Egd2-HA no tienen interacción física. Al realizar el control respectivo con sólo Egd2-HA, se observa una tenue

banda en la elución cuando se realiza una sobre-exposición del film, situación que se podría corregir con un lavado adicional (Figura 20).



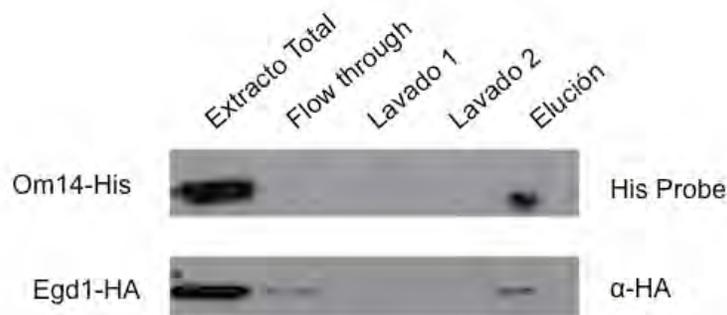
**Figura 20. La subunidad  $\alpha$  de NAC (Egd2) no interacciona con Om14.** La cepa silvestre fue co-transformada con los plásmidos que expresan las proteínas Om14-His y Egd2-HA, el extracto total se pasó por la columna TALON, seguido de diferentes lavados y por último, la elución con imidazol. La proteína Om14 se detecta en la elución mas no Egd2. Se hizo lo mismo pero con una cepa silvestre que sólo expresa Egd2-HA, la cual no fue detectada en la elución.

A continuación se hicieron modificaciones en los amortiguadores de lisis y lavado para determinar las condiciones adecuadas y que las interacciones inespecíficas entre Egd1-HA y la resina TALON se rompieran. En primer cambio fue aumentar la concentración del KCl en el amortiguador de lisis de 140mM a 250mM, para prevenir interacciones del tipo iónico. A pesar de este cambio, se observó que Egd1-HA continua uniéndose a la resina sin afectar la unión de Om14-his a la misma (Figura 21a). El segundo cambio fue incrementar aún mas la concentración de KCl a 400mM y se añadió 5% de glicerol al amortiguador de lisis, adicionalmente, en el amortiguador de lavado se cambió el acetato de potasio por KCl 400mM. El resultado obtenido fue similar a los anteriores, aunque en este caso se observa una disminución en el barrido inespecífico en el carril correspondiente a la elución de Om14-his (Figura 21b).



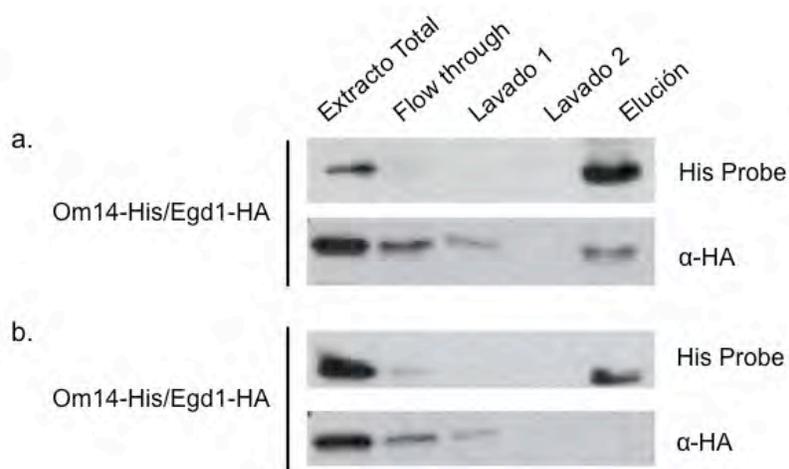
**Figura 21. La subunidad  $\beta_1$  se une de forma inespecífica a la resina TALON.** a) La cepa silvestre se transformó de forma independiente con los plásmidos que expresan Om14-his y Egd1-HA, se siguieron los pasos que se describen en la figura 16 pero se cambió la concentración de KCl a 250mM en el amortiguador de lisis. Egd1 se detecta en la elución. b) Igual al inciso a) pero en este caso, se adicionó 5% de glicerol y se aumentó a 400mM la concentración de KCl al amortiguador de lisis, además de que se cambió el acetato de potasio por KCl 400mM en el amortiguador de lisis. Egd1 se sigue detectando en la elución.

El último cambio que se hizo, fue la adición de 0.25% de SDS y se eliminó el EDTA del amortiguador de elución. A pesar de que hubo una reducción en la intensidad de la banda detectada para Egd1-HA, lo que indica menor cantidad de proteína, ésta aun se observa (Figura 22). Estas condiciones podrían ser las correctas para desarrollar el protocolo.



**Figura 22 La subunidad  $\beta_1$  disminuye su unión a la resina en presencia de SDS.** La cepa silvestre se transformó con el plásmido que expresan Om14-his y con Egd1-HA de forma independiente, se siguieron los pasos que se describen en la figura 16 pero se agregó 0.25% de SDS en el amortiguador de lisis. Egd1 se detecta levemente en la elución.

Posteriormente, se repitió el ensayo con dos condiciones: la primera de ellas no contiene SDS en el amortiguador de lisis y la segunda sí contiene SDS en el amortiguador de lisis, para verificar que sean las condiciones adecuadas para realizar la co-precipitación por afinidad, es decir 0.25% de SDS en el amortiguador de lisis. En la figura 23, se observa el resultado para ambos ensayos; para la condición en la cual no hay SDS la interacción Om14-Egd1 se mantiene (interacción reportada por Lesnik et al., 2014), control positivo en este caso); mientras que en la condición con SDS la interacción Om14-Egd1 se perdió, debido a que Egd1 no aparece en la elución.



**Figura 23. Om14 y Egd1 no interaccionan en presencia de SDS.** a) La cepa silvestre BY4741 se transformó con los plásmidos que expresan Om14-His y Egd1-HA, el protocolo de precipitación por afinidad se realizó sin SDS en el amortiguador de lisis. b) La cepa silvestre BY4741 se transformó con los plásmidos que expresan Om14-His y Egd1-HA, el protocolo de precipitación por afinidad se realizó con 0.25% de SDS en el buffer de lisis

En conclusión, no fue posible determinar las condiciones adecuadas para la co-precipitación por afinidad, por lo tanto, no fue posible determinar las interacciones físicas entre Tom70-NAC, Sam37-NAC y Om14-NAC por este método.

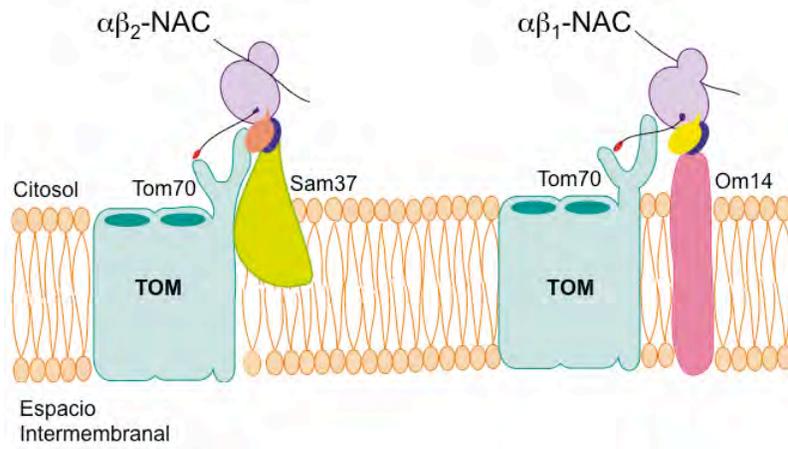
## 9. Modelo final

---

De los resultados obtenidos es posible plantear un modelo de importación co-traducciona de proteínas a la mitocondria. En modelo, esquematizado en la figura 24, plantea la existencia de dos rutas de importación paralelas, una de ellas en donde participan  $\alpha\beta_2$ -NAC y la proteína de membrana externa mitocondria Sam37 y la otra en donde participan  $\alpha\beta_1$ -NAC y la también proteína de la membrana externa mitocondria Om14.

La primera de la rutas, se encuentra planteada por el grupo de investigación (Ponce-Rojas, 2016) al describir la interacción genética negativa entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta_2$  de NAC y *SAM37*. En adición a lo anterior, en el presente trabajo se demuestra su interacción física, confirmando de esta forma la relación funcional directa en la biogénesis de proteínas mitocondriales.

Por otro lado, en la ruta alterna, únicamente se ha descrito la interacción física entre la subunidad  $\beta_1$  de NAC y Om14 (Lesnik et al., 2014) interacción confirmada en este trabajo. Sin embargo, los genes que codifican para estas proteínas, *EGD1* y *OM14* respectivamente, no tienen interacción genética, lo cual indicaría que, a pesar de que participan en la ruta de importación de proteínas a la mitocondria, es posible que existan otros componentes adicionales.



**Figura 24. Modelo de importación co-traduccional de proteínas mitocondriales.** En el esquema se describen dos rutas alternas en la importación de proteínas a la mitocondria. En la derecha se dibuja la ruta donde participan  $\alpha\beta_1$ -NAC y Om14. En la izquierda se dibuja la ruta donde participan  $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37.

# 10. Conclusiones

---

- Los genes *EGD1*, *EGD2*, *BTT1*, *SAM37* y *TOM70* no tiene interacción genética con *OM14*.
- No hay diferencia en el fenotipo de crecimiento al compararlo con la cepa silvestre de las dobles mutantes  $\Delta sam37\Delta om14$ ,  $\Delta tom70\Delta om14$ ,  $\Delta egd1\Delta om14$ ,  $\Delta egd2\Delta om14$  y  $\Delta btt1\Delta om14$ .
- Tom70 no tiene interacción física con ninguna de las subunidades del complejo NAC.
- Sam37 tiene interacción física con la subunidad  $\beta_2$  del complejo NAC en glucosa.
- Om14 tiene interacción física con la subunidad  $\beta_1$  del complejo NAC en glucosa y lactato.
- No fue posible determinar las condiciones adecuadas para la co-precipitación por afinidad.

# 11. Perspectivas

---

- Realizar experimentos de ensayos de curvas de crecimiento en líquido para confirmar las interacciones físicas encontradas mediante el método de PCA.
- Estudiar la regulación transcripcional de los genes que codifican para las subunidades del complejo NAC.
- Investigar cuáles son las señales específicas que reconoce el complejo  $\alpha\beta_2$ -NAC.
- Determinar cuál es el destino de las proteínas mitocondriales en ausencia de los complejos  $\alpha\beta_1$ -NAC y  $\alpha\beta_2$ -NAC y qué respuestas celulares de estrés se desencadenan.
- Estudiar los requerimientos bioquímicos para la función de NAC durante la importación co-traduccionaI de proteínas a la mitocondria.

## 12. Referencias

---

- Beatrix, B., Sakai, H., & Wiedmann, M. (2000). The  $\alpha$  and  $\beta$  subunit of the nascent polypeptide-associated complex have distinct functions. *Journal of Biological Chemistry*, 275(48), 37838–37845. <http://doi.org/10.1074/jbc.M006368200>
- Bloss, T. a, Witze, E. S., & Rothman, J. H. (2003). Suppression of CED-3-independent apoptosis by mitochondrial betaNAC in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 424(6952), 1066–1071. <http://doi.org/10.1038/nature01920>
- Bohnert, M., Pfanner, N., & van der Laan, M. (2007). A dynamic machinery for import of mitochondrial precursor proteins. *FEBS Letters*, 581(15), 2802–2810. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.03.004>
- Bohnert, M., Pfanner, N., & van der Laan, M. (2015). Mitochondrial machineries for insertion of membrane proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 33, 92–102. <http://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.07.013>
- Chacinska, A., Koehler, C. M., Milenkovic, D., Lithgow, T., & Pfanner, N. (2009). Importing Mitochondrial Proteins: Machineries and Mechanisms. *Cell*, 138(4), 628–644. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.005>
- Deng, Jian Min ; Behringer, R. (1995). An insertional mutation in the BTF3 transcription factor gene leads to an early postimplantation lethality in mice. *Transgenic Research*, 4.
- Dudek, J., Rehling, P., & van der Laan, M. (2013). Mitochondrial protein import: Common principles and physiological networks. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833(2), 274–285. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.05.028>
- Ellenrieder, L., Martensson, C. U., & Becker, T. (2015). Biogenesis of mitochondrial outer membrane proteins, problems and diseases. *Biological Chemistry*, 396(11), 1199–1213. <http://doi.org/10.1515/hsz-2015-0170>
- Freschi, L., Torres-Quiroz, F., Dube, A. K., & Landry, C. R. (2013). qPCA: a scalable assay to measure the perturbation of protein-protein interactions in living cells. *Mol Biosyst*, 9(1), 36–43. <http://doi.org/10.1039/c2mb25265a>
- Fujiki, M., & Verner, K. (1993). Coupling of cytosolic protein synthesis and mitochondrial protein import in yeast. Evidence for cotranslational import in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 268(3), 1914–1920.

- Fünfschilling, U., & Rospert, S. (1999). Nascent polypeptide-associated complex stimulates protein import into yeast mitochondria. *Molecular Biology of the Cell*, 10(10), 3289–3299. <http://doi.org/10.1091/mbc.10.10.3289>
- Garcia, M., Darzacq, X., Delaveau, T., Jourden, L., Singer, R. H., & Jacq, C. (2007). Mitochondria-associated Yeast mRNAs and the Biogenesis of Molecular Complexes. *Molecular Biology of the Cell*, 11118, 362–368.
- 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(1–3), 213–216. [http://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02528-0](http://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02528-0)
- Gietz, R. D., & Schiestl, R. H. (2007). Frozen competent yeast cells that can be transformed with high efficiency using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nature Protocols*, 2(1), 1–4. <http://doi.org/10.1038/nprot.2007.17>
- Gietz, R. D., & Woods, R. A. (2002). Yeast Transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG Method. *Methods in Enzymology*, 350(4), 87–96. [http://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)50957-5](http://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)50957-5)
- Goldstein, A. L., & McCusker, J. H. (1999). Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae* - Goldstein - 1999 - Yeast - Wiley Online Library. *Yeast (Chichester, England)*, 15(14), 1541–1553. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199910\)15:14<1541::AID-YEA476>3.0.CO;2-K](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199910)15:14<1541::AID-YEA476>3.0.CO;2-K)
- Hewitt, V. L., Gabriel, K., & Traven, A. (2014). The ins and outs of the intermembrane space: Diverse mechanisms and evolutionary rewiring of mitochondrial protein import routes. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1840(4), 1246–1253. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.08.013>
- Hin Yan Tong, A., & Boone, C. (2007). High-Throughput Strain Construction and Systematic Synthetic Lethal Screening in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Molecular Biology*, 36, 1–19. [http://doi.org/10.1016/S0076-6879\(10\)70007-0](http://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)70007-0)
- Höhr, A. I. C., Straub, S. P., Warscheid, B., Becker, T., & Wiedemann, N. (2015). Biochimica et Biophysica Acta Assembly of  $\beta$ -barrel proteins in the mitochondrial outer membrane. *BBA - Molecular Cell Research*, 1853(1), 74–88. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.10.006>
- Kellems, R. E., Allison, V. F., & Butow, R. A. (1975). Cytoplasmic type 80S ribosomes associated with yeast mitochondria. IV. Attachment of ribosomes to the outer membrane of isolated mitochondria. *Journal of Cell Biology*, 65(1), 1–14. <http://doi.org/10.1083/jcb.65.1.1>
- Knox, C., Sass, E., Neupert, W., & Pines, O. (1998). Import into mitochondria, folding and retrograde movement of fumarase in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 273(40), 25587–25593. <http://doi.org/10.1074/jbc.273.40.25587>
- Lesnik, C., Cohen, Y., Atir-Lande, A., Schuldiner, M., & Arava, Y. (2014). OM14 is

- a mitochondrial receptor for cytosolic ribosomes that supports co-translational import into mitochondria. *Nature Communications*, 5, 5711. <http://doi.org/10.1038/ncomms6711>
- Luk, E., Carroll, M., Baker, M., & Culotta, V. C. (2003). Manganese activation of superoxide dismutase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* requires MTM1, a member of the mitochondrial carrier family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(18), 10353–10357. <http://doi.org/10.1073/pnas.1632471100>
- MacKenzie, J. A., & Payne, R. M. (2004). Ribosomes Specifically Bind to Mammalian Mitochondria via Protease-sensitive Proteins on the Outer Membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 279(11), 9803–9810. <http://doi.org/10.1074/jbc.M307167200>
- Margulis, L. (1971). The Origin of Plant Animal Cells and. *American Scientist*, 59(2), 230–235.
- Markesich, D. C., Gajewski, K. M., Nazimiec, M. E., & Beckingham, K. (2000). bicaudal encodes the *Drosophila* beta NAC homolog, a component of the ribosomal translational machinery\*. *Development (Cambridge, England)*, 127(3), 559–572.
- Martin Gamerding, Marie Anne Hanebuth, Tancred Frickey, E. D. (2015). The principle of antagonism ensures protein targeting specificity at the endoplasmic reticulum. *Science*, 348(6231), 201–207. <http://doi.org/10.1126/science.aaa5335>
- Michnick, S. W. (2003). Protein fragment complementation strategies for biochemical network mapping. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(6), 610–617. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2003.10.014>
- Michnick, S. W., Ear, P. H., Landry, C., Malleshaiah, M. K., & Messier, V. (2010). A toolkit of protein-fragment complementation assays for studying and dissecting large-scale and dynamic protein-protein interactions in living cells. *Methods in Enzymology* (2nd ed., Vol. 470). Elsevier Inc. [http://doi.org/10.1016/S0076-6879\(10\)70014-8](http://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)70014-8)
- Morell, M., Ventura, S., & Avilés, F. X. (2009). Protein complementation assays: Approaches for the in vivo analysis of protein interactions. *FEBS Letters*, 583(11), 1684–1691. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.03.002>
- Mukhopadhyay, A., Ni, L., & Weiner, H. (2004). A co-translational model to explain the in vivo import of proteins into HeLa cell mitochondria. *The Biochemical Journal*, 382(Pt 1), 385–392. <http://doi.org/10.1042/BJ20040065>
- Nagai, K., Oubridge, C., Kuglstatter, A., Menichelli, E., Isel, C., & Jovine, L. (2003). Structure, function and evolution of the signal recognition particle. TL - 22. *The EMBO Journal*, 22 VN-r(14), 3479–3485. <http://doi.org/10.1093/emboj/cdg337>

- Neupert, W. (2015). A perspective on transport of proteins into mitochondria: A myriad of open questions. *Journal of Molecular Biology*, 427(6), 1135–1158. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.02.001>
- Pelletier, J. N., Campbell-Valois, F. X., & Michnick, S. W. (1998). Oligomerization domain-directed reassembly of active dihydrofolate reductase from rationally designed fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(21), 12141–12146. <http://doi.org/10.1073/pnas.95.21.12141>
- Ponce-Rojas, J. Carlos; Yañez-Falcón, A. Roberto; Jaimes-Miranda, Fabiola; Garay, Erika; DeLuna, Alexander; Funes, S. (2016). Specific interplay between NAC and Sam37 mediates early stages of mitochondrial protein import. *FEBS*, *enviado*.
- Ponce Rojas, J. C. (2012). *Mapeo de las interacciones genéticas del complejo NAC y su relevancia durante el proceso co-traducciona l de importación de proteínas a la mitocondria*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Reimann, B., Bradsher, J., Franke, J., Hartmann, E., Wiedmann, M., Prehn, S., & Wiedmann, B. (1999). Initial characterization of the nascent polypeptide-associated complex in yeast. *Yeast*, 15(5), 397–407. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19990330\)15:5<397::AID-YEA384>3.0.CO;2-U](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19990330)15:5<397::AID-YEA384>3.0.CO;2-U)
- Schulz, C., Schendzielorz, A., & Rehling, P. (2014). Unlocking the presequence import pathway. *Trends in Cell Biology*, (Box 1), 1–11. <http://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.12.001>
- Shiota, T., Imai, K., Qiu, J., Hewitt, V. L., Tan, K., Shen, H., ... Endo, T. (2015). Molecular architecture of the active mitochondrial protein gate. *Science Reports*, 349(6255), 1544–1548. <http://doi.org/10.5061/dryad.10278>
- Stiller, S. B., Höpker, J., Oeljeklaus, S., Schütze, C., Schrempp, S. G., Vent-Schmidt, J., ... Wiedemann, N. (2016). Mitochondrial OXA Translocase Plays a Major Role in Biogenesis of Inner-Membrane Proteins. *Cell Metabolism*, 23(5), 901–908. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.04.005>
- Tarassov, K., Messier, V., Landry, C. R., Radinovic, S., Serna Molina, M. M., Shames, I., ... Shames, I. (2008). An in vivo map of the yeast protein interactome. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5882), 1465–70. <http://doi.org/10.1126/science.1153878>
- Tuena, M., & Vázquez, M. (2002). *Mitocondria. Una mirada a la evolución de los conceptos básicos y modernos*. México D.F: Editorial Prado.
- Winzeler, E. A., Shoemaker, D. D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., ... Davis, R. W. (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science (New York, N.Y.)*, 285(5429), 901–906. <http://doi.org/10.1126/science.285.5429.901>
- Yañez Falcón, R. (2014). *Estudio del papel de NAC y Sam37 en la importación co-*

*traduccional de la proteína mitocondrial Mmf1 en Saccharomyces cerevisiae.*  
Universidad Nacional Autónoma de México.

Young, J. C., Hoogenraad, N. J., & Hartl, F. U. (2003). Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell*, 112(1), 41–50. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01250-3](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01250-3)

Zhang, Y., Berndt, U., Gölz, H., Tais, A., Oellerer, S., Wölfle, T., ... Rospert, S. (2012). NAC functions as a modulator of SRP during the early steps of protein targeting to the endoplasmic reticulum. *Molecular Biology of the Cell*, 23(16), 3027–40. <http://doi.org/10.1091/mbc.E12-02-0112>

# Apéndice I. Oligonucleótidos

---

## a) Oligonucleótidos mutante *OM14*

Nombre	Secuencia 5'-3'
OM14F-Del	ACAATTAGAAACATAACATCTACCTCCAGCATCTCATAATCCAG CTGAAGCTTCGTACGC
OM14R-Del	TGTGTGAGTGTGTGAAAGGATGTTATTAATAGTATGTTATCGA TGAATTCGAGCTCGTT
OM14F-CH- Sacl	GGGGAGCTCGTTGCTTATCCGCTTTCTCG
OM14R-CH	GGCTAGCGTTACTGTCGTG

## b) Oligonucleótidos clonación

Nombre	Secuencia 5'-3'
Beta1F-ORF- Xbal	GCGTCTAGATCATAATGCCAATTGACCAAG
Beta1 Rev+1HA	AGCATAATCTGGAACATCATATGGATATTCGACGTCAGCATCAAAG
AlphaF-ORF- Xbal	GCGTCTAGAATGTCTGCTATCCCAGAAAAC
AlphaR-1HA	AGCATAATCTGGAACATCATATGGATATTTAGACAAGGACATGATAG C
Beta2F-ORF- Xbal	GCGTCTAGAAACATCAAATGCCTGTAGATC
Beta2R-1HA	AGCATAATCTGGAACATCATATGGATAGCTATTCATCACTTGTTGTTT TG

OM14-F-XbaI	GCGTCTAGAATGTCTGCAACTGCTAAACAC
OM14-HisR-BamHI	GCGGGATCCTTAATGGTGATGATGGTGATGATGGTGATGATGTTTCT TGTCGTATCTGGAGTAG
SAM37F	CGCTCTAGAATGGTTAAAGGTAGTGTGCA
SAM37R-His	GCGGGATCCTTAATGTGATGATGGTGATGATGGTGATGATGTATGTA TTTACAGGCTAAATTAT
TOM70F	GCGTCTAGAATGAAGAGCTTCATTACAAGG
TOM70R-His	GCGGGATCCTTAATGGTGATGATGGTGATGATGGTGATGATGCATTA AACCCCTGTTCCGG

c) Oligonucleótidos PCA-DHFR

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>
SAM37-DHFR-F	AGCAAGGAAACGTTGTGATGTCATTATATAATTTAGCCTGTAAAT ACATAggcgggtggcggatcaggaggc
SAM37-DHFR-R	TTGAAAAATGAACTTAAAGACACCTTTCTGCATTATTTTGTTTATT TTTAttcgacactggatggcggcgtag
SAM37-DHFR-Ch	TTCCCTATTGAATTATGTTGACGTT
TOM70-DHFR-F	CTAAAAAGATTCAAGAACTTTAGCTAAATTACGCGAACAGGGT TTAATGggcgggtggcggatcaggaggc
TOM70-DHFR-R	TTACTTAGTTTTTGTCTTCTCCTAAAAGTTTTTAAGTTTATGTTTA CTGTttcgacactggatggcggcgtag
TOM70-DHFR-Ch	CTGTTTACTATCACCGCGGC
OM14-DHFR-F	CGCTGGACGGTATAATTTCAAAGAAATACTACTCCAGATACGAC AAGAAAggcgggtggcggatcaggaggc
OM14-DHFR-R	TAAAGTGTGTGAGTGTGTGAGTGTGTGAAAGGATGTTATTAAT AGTATGttcgacactggatggcggcgtag
OM14-	GGTTAAATAGTGCATCAGCAG

DHFR-Ch	
EGD1-DHFR-F	AAGCTATTCCAGAGTTAGTTGAAGGTCAAACCTTTTGATGCTGAC GTCGAAggcggtggcggatcaggaggc
EGD1-DHFR-R	AACAAAATATGTGTTTTTTTTATTTAACGTTAAAATTAAGATTAAG TTATttcgacactggatggcggcgtag
EGD1-DHFR-Ch	GGTCGGTGTCCAAGTTGCTG
EGD2-DHFR-F	TGAAAGCTCACAATGGTGACTTAGTCAACGCTATCATGTCCTTG TCTAAAggcggtggcggatcaggaggc
EGD2-DHFR-R	ATTTTGC GTTAGAATAACTACGTACCCCTATATAATATATTTTTAT ATCAttcgacactggatggcggcgtag
EGD2-DHFR-Ch	GGTGAAGCTAAGGTTGACAAC
BTT1-DHFR-F	ACCAGCTGGGCGACAGATGCAGCGAGACAAAACAACAAGTGAT GAATAGCggcggtggcggatcaggaggc
BTT1-DHFR-R	CGACATTCGCCACTAGCTATAACGTTTACTGGCAATTATTATGAA CTATGttcgacactggatggcggcgtag
BTT1-DHFR-Ch	ATGGCAAGGTTTTACATTTTAACAG

# Apéndice II. Medios de Cultivo

---

## a) Medios Generales

- YPD: Extracto de levadura 1%, glucosa 2%, peptona 2%. Para medios sólidos, añadir agar 2%.
- YPG: Extracto de levadura 1%, glicerol 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%.
- LB+ Ampicilina: 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, peptona 20 g, agar 20 g, glucosa (40%) 50 mL, G418 200 µg/µl.
- YPD+Higromicina (para 1 L): Extracto de Levadura 10 g, peptona 20 g, agar 20 g, glucosa (40%) 50 mL, Higromicina B 200 µg/µl.
- SD-Ura (para 1 L): Yeast Nitrogen Base (YNB) 1.7g. Sulfato de Magnesio MgSO<sub>4</sub> 5g, glucosa (40%) 50mL, adenina 20mg, triptófano 100mg, histidina 100mg, leucina 100mg, lisina 100mg y metionina 100mg. Para medio sólido añadir agar 20g.
- SD-Leu (para 1 L): Yeast Nitrogen Base (YNB) 1.7g. Sulfato de Magnesio MgSO<sub>4</sub> 5g, glucosa (40%) 50mL, adenina 20mg, triptófano 100mg, histidina 100mg, uracilo 20mg, lisina 100mg y metionina 100mg. Para medio sólido añadir agar 20g.
- SD-Ura-Leu (para 1 L): Yeast Nitrogen Base (YNB) 1.7g. Sulfato de Magnesio MgSO<sub>4</sub> 5g, glucosa (40%) 50mL, adenina 20mg, triptófano 100mg, histidina 100mg, lisina 100mg y metionina 100mg. Para medio sólido añadir agar 20g.
- SRaf-Ura (para 1 L): Yeast Nitrogen Base (YNB) 1.7g. Sulfato de Magnesio MgSO<sub>4</sub> 5g, rafinosa (40%) 50mL, adenina 20mg, triptófano 100mg, histidina 100mg, leucina 100mg, lisina 100mg y metionina 100mg.

- SRaf-Leu (para 1 L): Yeast Nitrogen Base (YNB) 1.7g. Sulfato de Magnesio MgSO<sub>4</sub> 5g, glucosa (40%) 50mL, adenina 20mg, triptófano 100mg, histidina 100mg, uracilo 20mg, lisina 100mg y metionina 100mg.
- SRaf-Ura-Leu (para 1 L): Yeast Nitrogen Base (YNB) 1.7g. Sulfato de Magnesio MgSO<sub>4</sub> 5g, glucosa (40%) 50mL, adenina 20mg, triptófano 100mg, histidina 100mg, lisina 100mg y metionina 100mg. Para medio sólido añadir agar 20g.

#### b) Medios de Cultivo RSA

- 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 4 mL.
- SD-His/Arg/Lys+can/tial+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 µl sulfato de canavanina, 500 µL tialisina, G418 4 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 µL sulfato de canavanina (50 mg/L), 500 µL tialisina (50 mg/l), G418 1 mL, higromicina B 4 mL .
- 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.

### c) Medios para PCA-DHFR

- YPD+Clonat (para 1 L): Extracto de Levadura 10 g, peptona 20 g, agar 20 g, glucosa (40%) 50 mL, cloNAT 1 mL.
- YPD+Higromicina (para 1 L): Extracto de Levadura 10 g, peptona 20 g, agar 20 g, glucosa (40%) 50 mL, Higromicina B 4 mL.
- YPD+Clonat+Higromicina (para 1 L): Extracto de Levadura 10 g, peptona 20 g, agar 20 g, glucosa (40%) 50 mL, cloNAT 1 mL, Higromicina B 4mL.
- SD-Lys-Met (para 1 L): Yeast Nitrogen Base (YNB) 1.7g. Sulfato de Magnesio MgSO<sub>4</sub> 5g, glucosa (40%) 50mL, adenina 20mg, uracilo 20mg, triptófano 100mg, histidina 100mg, leucina 100mg. Para medio sólido añadir agar 20g.
- SD-Met/Lys/Ade+MTX: YNB 0.669%, glucosa 2%, Agar noble 4%, suplemento de aminoácidos 1X, metotrexato (MTX) 200µg/mL
- SD-Met/Lys/Ade+DMSO: YNB 0.669%, glucosa 2%, Agar noble 4%, suplemento de aminoácidos 1X, DMSO 2mL .
- SLactato-Met/Lys/Ade+MTX: YNB 0.669%, glucosa 2%, Agar noble 4%, suplemento de aminoácidos 1X, metotrexato (MTX) 200µg/mL
- SLactato-Met/Lys/Ade+DMSO: YNB 0.669%, glucosa 2%, Agar noble 4%, suplemento de aminoácidos 1X, DMSO 2mL.

- Suplemento de aminoácidos 10X (para 1L): arginina 0.2g, asparagina 1g, ácido glutámico monosódico 1g, histidina 0.2g, leucina 0.6g, fenilalanina 0.5g, serina 3.75g, treonina 2g, triptófano 0.4g, tirosina 0.3g, uracilo 0.2g, valina 1.5g.

d) Antibióticos, (Soluciones Madre)

- Ampicilina (SIGMA): 100mg/mL
- Geneticina (G418, Invitrogen): 50mg/mL
- Higromicina B (hyg, Invitrogen): 50mg/mL
- Nourseotricina (cloNAT, Werner BioAgents): 100mg/mL

## Apéndice III. 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): CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K 1 M 1.35 mL, MnCl<sub>2</sub> 1 M 2.25 mL, RbCl 1 M 4.5 mL, CaCl<sub>2</sub> 1 mM 0.45 mL, Glicerol 100% 5.4 mL, agua desionizada 31 mL.
- TfbII (Para 5 mL): MOPS 1 M 50 mL, CaCl<sub>2</sub> 1 mM 375 mL, RbCl 1M 50 mL, Glicerol 100% 600 mL, agua desionizada 3.93 mL.
- TAE 50X: Tris 242 g/L, ácido acético glacial 57.1 ml/L, EDTA 0.5 M pH=8 100mL/L.
- Amortiguador de Extracción: 185 µL de NaOH 10N, 74 µL de β - mercaptoetanol, 100µL de PMSF 200mM y 641 µL de H<sub>2</sub>O
- Amortiguador de Corrida 1X: glicina 385mM, Tris base 50mM pH 8.4, SDS 0.1% w/v.
- Amortiguador de Carga LAE 4X: SDS 8%, glicerol 40%, β-mercaptoetanol 20%, azul de bromofenol 0.08% y Tris-HCl pH 6.8 0.240M
- Amortiguador de Transferencia: Glicina 192mM, Tris 25.76mM, SDS 0.1% w/v, metanol 20% v/v
- Amortiguador TBS: Tris-HCl pH 7.4 100mM, NaCl 150mM
- Amortiguador TBS-Tween: Tris-HCl pH 7.4 100mM, NaCl 150mM, Tween 20 0.1%
- Amortiguador de Bloqueo: Tris-HCl pH 7.2 25mM, NaCl 150mM, Tween 20 0.05%
- Amortiguador de Bloqueo+BSA: Tris-HCl pH 7.2 25mM, NaCl 150mM, Tween 20 0.05%, BSA 25mg/mL
- Amortiguador de Zymoliasa: Sorbitol 1.2 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.4) 20 mM, Zymoliasa 5mg/g de peso húmedo
- Amortiguador de Lisis: Tris HCl pH 8 20mM, KCl 140mM, Nikkol 0.1% w/v, Digitonina 0.5% w/v, Coctel de inhibidores de proteasas 0.1%, 20 U/mL DNasa

- Amortiguador de Lavado: Digitonina 0.1% w/v, Tris HCl pH 7 50mM, Acetato de Potasio 250mM, Nikkol 0.1% w/v,  $\beta$ -Mercaptoetanol 5mM, Coctel de inhibidores de proteasas 0.1%, 0.2 U/mL RNasa
- Amortiguador de Elución: Amortiguador LAE 4X, Imidazol 150mM