



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio de la ruta de importación de proteínas mitocondriales  
mediada por  $\alpha\beta'$ -NAC y Sam37 en *Saccharomyces cerevisiae*

PRESENTA:

**M. en C. José Carlos Ponce Rojas**

TUTOR PRINCIPAL

Dra. María Soledad Funes Argüello  
Instituto de Fisiología Celular

COMITÉ TUTORAL

Dra. Xóchitl Pérez Martínez  
Instituto de Fisiología Celular  
Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco  
Facultad de Medicina

Ciudad de México. Mayo, 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.

## RECONOCIMIENTOS

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

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

Dra. Xóchitl Pérez Martínez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco	Facultad de Medicina, UNAM
Dra. María Soledad Funes Argüello	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Al Dr. Alexander de Luna Fors del Laboratorio de Sistemas Genéticos del LANGEBIO, CINVESTAV, Irapuato. Por su ayuda en el análisis de datos y discusión de resultados.

Este trabajo constituye parte del proyecto de investigación apoyado por los donativos 105631 y 237344 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), así como por los donativos IN215810, IA200813 e IN202715 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA, UNAM).

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada para realizar los estudios de doctorado (número de becario 240128).

Se agradece al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado, por su apoyo económico que facilitó la asistencia a diversos congresos nacionales a lo largo de programa de estudios del doctorado.

Se agradece al programa de apoyo a proyectos de investigación e innovación tecnológica (PAPIIT), por la beca otorgada para la obtención del grado (Clave de proyecto IN202715).

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 secuenciación de plásmidos.

# Índice

---

Abreviaturas	5
Abstract	7
Resumen	8
1. Introducción	9
1.1 Generalidades del transporte intracelular de proteínas	9
1.1.2 Mecanismos postraduccionales y cotraduccionales de transporte de proteínas	11
1.2 Generalidades del transporte de proteínas mitocondriales	12
1.2.1 Principales tipos de secuencias de localización mitocondrial	13
1.2.2 Mecanismos de distribución intramitocondrial de proteínas	15
1.2.3 Proteínas y factores necesarios para que un precursor proteico de mitocondria llegue al complejo TOM	19
1.3 El complejo NAC (Nascent Polypeptide Associated Complex)	21
1.4 El papel de Sam37 en la inserción de barriles- $\beta$ a la membrana externa mitocondrial	25
2. Planteamiento del problema	29
3. Hipótesis	30
4. Objetivos	31
4.1 Objetivo general	31
4.2 Objetivos particulares	31
5. Materiales y Métodos	32
5.1 Generación de lasmutantes en <i>S. cerevisiae</i> por recombinación homóloga	32
5.1.1 Amplificación por PCR de los módulos de resistencia a antibióticos y auxotrofia	32
5.1.2 Generación de mutantes de levadura mediante transformación por choque térmico	33
5.1.3 Confirmación por PCR de las mutantes	34
5.2 Clonación del gen <i>SOD2</i>	34
5.3 Purificación de los plásmidos	36
5.4 Análisis de esporas al azar (Random Spore Analysis)	36
5.5 Extracción de proteínas totales	37
5.6 Electroforesis desnaturante de proteínas (SDS-PAGE)	38
5.7 Fraccionamiento celular	38
5.8 Electroforesis nativa (BN-PAGE)	39
5.9 Inmunorréplica tipo western blot	39
5.10 Ensayo de complementación de fragmentos proteicos	40
5.11 PCR cuantitativa en tiempo real	41
6. Resultados	42
6.1 NAC no es esencial en <i>S. cerevisiae</i>	42
6.2 La eliminación de NAC y <i>SAM37</i> compromete el crecimiento en <i>S. cerevisiae</i>	44
6.3 La eliminación de $\alpha\beta'$ -NAC y <i>SAM37</i> afecta el fenotipo de crecimiento	48
6.4 La eliminación de $\alpha\beta'$ -NAC y Sam37 compromete la biogénesis de proteínas mitocondriales	51



6.5 El precursor de Sod2 se acumula en el citosol con la eliminación de $\alpha\beta'$ -NAC y Sam37	54
6.6 La acumulación de precursores mitocondriales ocurre desde etapas tempranas de su síntesis	55
6.7 Los defectos en la biogénesis de las proteínas mitocondriales en las mutantes de $\alpha\beta'$ -NAC y SAM37 no se deben a defectos del ensamblaje del complejo TOM	58
6.8 La sobreexpresión de TOM6 en las mutantes de estudio suprime los defectos de Tom40 mas no los de Oxa1	60
6.9 Existe una red de interacciones físicas entre diversos componentes de la maquinaria de importación de proteínas mitocondriales	62
6.10 SAM37 está relacionada con otras señales de biogénesis mitocondrial en el transporte de proteínas a la mitocondria	65
7. Discusión	68
7.1 $\alpha\beta'$ -NAC y SAM37 son importantes para la viabilidad celular en <i>S. cerevisiae</i>	68
7.2 $\alpha\beta'$ -NAC y SAM37 favorecen la biogénesis de proteínas mitocondriales	70
7.3 En ausencia de $\alpha\beta'$ -NAC y SAM37 se acumulan precursores mitocondriales en el citosol	74
7.4 NAC y Sam37 forman parte del sistema de biogénesis de proteínas a la mitocondria	75
7.5 Sam37 y el 3'UTR de los mRNAs son relevantes para la importación de Sod2	78
Comentarios Finales	79
8. Conclusiones	80
9. Apéndice I	81
9.1 Cepas de levadura utilizadas	81
9.2 Cepas de bacteria utilizadas	82
9.3 Medios de cultivo	82
9.4 Soluciones y amortiguadores	84
9.5 Oligonucleótidos utilizados para la clonación del gen SOD2	86
10. Bibliografía	87
11. Artículo Publicado	95

# Abreviaturas

---

Atp1	Subunidad de la ATPasa 1 (de las siglas en inglés de <i>ATP synthase Protein 1</i> )
Btt1	Proteína BTf 3 (de las siglas en inglés de <i>BTf Three</i> )
CCCP	Carbonilcianida m-clorofenilhidrazona
DHFR	Dihidrofolato Reductasa (de las siglas en inglés de <i>DiHidroFolate Reductase</i> )
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DO	Densidad óptica
Egd1	Potenciador de la unión de Gal4 a DNA 1 (de las siglas en inglés de <i>Enhancer of Gal1 DNA binding</i> )
Egd2	Potenciador de la unión de Gal4 a DNA 2 (de las siglas en inglés de <i>Enhancer of Gal1 DNA binding</i> )
Erv1	Proteína esencial para respiración y viabilidad 1 (de las siglas en inglés de <i>Essential for Respiration and Viability 1</i> )
Hog1	Proteína de respuesta a alta osmolaridad por glicerol (de las siglas en inglés de <i>High Osmolarity Glycerol Response protein 1</i> )
Hsp	Proteína de choque térmico (de las siglas en inglés de Heat Shock Protein)
Mdm38	Proteína de morfología y distribución mitocondrial 38 (de las siglas en inglés de <i>Mitochondrial Distribution and Morphology Protein 38</i> )
MIA	Ensambladora del espacio intermembranal (de las siglas en inglés de <i>Mitochondrial Intermembrane Space Import and Assembly</i> )
Mmf1	Factor de la matriz mitocondrial 1 (de las siglas en inglés de <i>Mitochondrial Matrix Factor 1</i> )
MPP	Peptidasa de procesamiento mitocondrial (de las siglas en inglés de <i>Mitochondrial Processing Peptidase</i> )
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
mt	Mitocondrial
mtHsp70	Proteína de choque térmico 70 mitocondrial (de las siglas en inglés de <i>mitochondrial Heat Shock Protein 70</i> )
MTS	Presecuencia mitocondrial (de las siglas en inglés de <i>Mitochondrial Targeting Signal</i> )
NAC	Complejo de Asociación a polipéptidos nacientes (de las siglas en inglés de <i>Nascent Polypeptide Associated Complex</i> )
Nsf1	Proteína similar a NifS 1 (de las siglas en inglés de <i>NifS-like Protein</i> )
Om14	Proteína de la membrana externa 14 (de las siglas en inglés de <i>Outer Membrane protein 14</i> )

ORF	Marco de lectura abierto (de las siglas en inglés de <i>Open Reading Frame</i> )
OXA1	Ensambladora de la Oxidasa (de las siglas en inglés de <i>Oxidase Assembly</i> )
PAM	Motor asociado a preproteínas (de las siglas en inglés de <i>Presequence translocase-Associated Motor</i> )
PMSF	Fluoruro de FenilMetilSulfonilo
POTRA	Dominio asociado de translocación de polipéptidos (de las siglas en inglés de <i>POlypeptide TRAnslocation Associated domain</i> )
RAC	Complejo Asociado a ribosomas (de las siglas en inglés de <i>Ribosome Associated Complex</i> )
RSA	Análisis de esporas al azar (de las siglas en inglés de <i>Random Spore Analysis</i> )
SAM	Maquinaria de entrega y ensamblaje (de las siglas en inglés de <i>Sorting and Assembly Machinery</i> )
SAM37	Proteína de entrega y ensamblaje 37 ( <i>Sorting and Assembly Machinery Protein 37</i> )
SGA	Rastreo de interacciones genéticas (de las siglas en inglés de <i>Syntetic Genetic Array</i> )
SGA	Rastreo de interacciones genéticas (de las siglas en inglés de <i>Synthetic Genetic Array</i> )
Sod2	Superóxido Dismutasa 2 (de las siglas en inglés de <i>Super Oxide Dismutase 2</i> )
TIM	Translocasa de la membrana interna (de las siglas en inglés de <i>Translocase of the Inner Membrane</i> )
TOM	Translocasa de la membrana externa (de las siglas en inglés de <i>Translocase of the Outer Membrane</i> )
UTR	Región no traducida (de las siglas en inglés de <i>UnTranslated Region</i> )
WT	Cepa silvestre (de las siglas en inglés de <i>Wild Type</i> )
$\Delta\Psi$	Potencial de membrana mitocondrial

# Abstract

---

Due to their endosymbiotic origin, mitochondria are organelles whose proteome is encoded by two independent genomes. Only a small fraction of the mitochondrial proteins are synthesized inside mitochondria (roughly 1%). In contrast, the vast majority is encoded in the nuclear genome and has to be synthesized by cytosolic ribosomes. Because of this, eukaryotic organisms have developed mechanisms that ensure the correct delivery of those proteins to the surface of the organelle. Many protein systems have been described which orchestrate mitochondrial protein biogenesis in a coordinated manner within mitochondria. However, little is known about the initial and cytosolic steps of mitochondrial import.

It has been suggested that the Nascent Polypeptide Associated Complex, a cytosolic heterodimeric chaperone, assists mitochondrial protein import. However, the molecular mechanisms that regulate the NAC-mediated cotranslational import are still not clear.

In this work we show that a particular NAC heterodimer formed by subunits  $\alpha$  and  $\beta'$  in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is specifically involved in the process of mitochondrial import and functionally cooperates with Sam37, an outer membrane subunit of the sorting and assembly machinery complex. Mutants in both components display growth defects, incorrectly accumulate precursor forms of mitochondrial proteins in the cytosol, and have an altered mitochondrial protein content. In addition,  $\alpha\beta'$ -NAC and Sam37 physically interact between them and also with Om14, another outer membrane protein previously reported to bind NAC.

Our results indicate that  $\alpha\beta'$ -NAC and Sam37 are relevant for mitochondrial protein biogenesis, probably Sam37 along with Om14 and other proteins at the outer membrane constitute a docking point for translationally active ribosomes during mitochondrial protein import. All these proteins act in parallel with other factors and signals responsible for the correct entrance of proteins into mitochondria

# Resumen

---

Debido a su origen endosimbiótico, las mitocondrias son organelos cuyo proteoma se encuentra codificado en dos genomas distintos. Por un lado el genoma nuclear, que codifica la mayor parte de las proteínas (hasta 99% en organismos como la levadura y el humano) y por el otro el genoma mitocondrial (que codifica para aproximadamente el 1% de las proteínas restantes). Debido a esto, los organismos eucariontes han desarrollado mecanismos que aseguran la importación de las proteínas mitocondriales sintetizadas en el citoplasma hacia el interior del organelo. Se han caracterizado diversos complejos proteicos en la mitocondria que distribuyen a las proteínas hacia su subcompartimento mitocondrial final una vez que ingresan al organelo. Sin embargo, no se ha esclarecido qué factores promueven las etapas iniciales del transporte, es decir, que facilitan la entrega de las proteínas a la membrana externa mitocondrial.

Se ha sugerido que la chaperona citosólica NAC (de las siglas en inglés de Nascent Polypeptide Associated Complex) participa en el transporte o importación de proteínas a la mitocondria. A pesar de que este proceso es esencial, la eliminación de NAC en *Saccharomyces cerevisiae* no acarrea algún fenotipo de crecimiento. Con la hipótesis de que NAC tiene una función redundante con otros genes, la búsqueda de interacciones genéticas a escala genómica permitió identificar a *SAM37* como una proteína cuyo papel funcional puede ser redundante al de NAC.

En este trabajo verificamos dicha interacción genética. Además definimos específicamente a los genes codificantes de NAC funcionalmente relacionados con *SAM37*. Nuestros resultados indican que tanto NAC como *Sam37* son relevantes para la biogénesis de las proteínas mitocondriales. Además, exploramos la conexión de estos dos factores con otras señales que participan en el proceso, en particular con señales en el mRNA. Nuestros datos sugieren que NAC y *Sam37* forman parte del sistema de biogénesis mitocondrial.

# 1. Introducción

---

## 1.1 Generalidades del transporte intracelular de proteínas

Las proteínas son biomoléculas cruciales para la homeostasis debido a que llevan a cabo todas las funciones que un organismo vivo requiere para sobrevivir. Así mismo, los procesos metabólicos en los que están involucradas no ocurren de manera azarosa. Se sabe que a nivel subcelular las proteínas llevan a cabo sus funciones en compartimentos específicos. Es por ello que existen mecanismos que aseguran una correcta distribución de las proteínas al sitio donde son requeridas.

Uno de los trabajos pioneros en esclarecer los mecanismos por los cuales las proteínas son transportadas a su destino fue el realizado por el Dr. George Palade, quien se dedicó al estudio de la síntesis de proteínas en los ribosomas y su transporte a través de lo que hoy llamamos la vía de secreción, que incluye al retículo endoplásmico, el transporte vesicular y finalmente la secreción de proteínas (Palade G.E. 1955; Palade G.E. 1956; Caro & Palade G.E. 1964). Su grupo observó mediante experimentos de pulso y caza en tejidos *in vitro* seguidos de microscopía electrónica y autoradiografía, que una fracción de los ribosomas citosólicos está asociada con la membrana del retículo endoplásmico (Palade G.E. 1955). En sus experimentos observaron que las proteínas avanzan a través de vesículas al aparato de Golgi para ser posteriormente secretadas (Caro & Palade G.E. 1964). Sin embargo, a pesar de que su trabajo sentó las bases para el estudio del transporte intracelular de las proteínas, no concluyó con precisión qué es lo que determina la localización de una proteína.

En años posteriores, el trabajo del Dr. Gunter Blobel (1999) demostró que las proteínas contienen regiones en la cadena de aminoácidos que funcionan como señal para guiarlas hacia su destino funcional (Figura 1). La herramienta esencial que se utilizó en esos experimentos fue un sistema de transporte de proteínas *in vitro* al retículo endoplásmico que incluía los componentes mínimos necesarios para realizarlo. Este sistema permitió que poco a poco y a lo

largo de las últimas décadas se fueran describiendo los componentes que favorecen el transporte de proteínas, tanto en el retículo endoplásmico como en el citoplasma.

En sus experimentos pudo identificar que las proteínas que llegan al retículo endoplásmico se sintetizan como precursores con un peso molecular que cambia cuando entran al organelo destino (Blöbel & Dobberstein 1975). Esto ocurre porque las proteínas pierden un segmento del extremo amino terminal que es editado por una proteasa localizada al interior del retículo endoplásmico (Jackson & Blöbel 1977). A esta porción N-terminal en los sustratos se le denominó "secuencia señal" o "presecuencia". Estudios posteriores mostraron que la presecuencia es un determinante crucial para la entrada de proteínas al retículo endoplásmico; es decir, es la señal que le indica a la célula la localización final de la proteína.

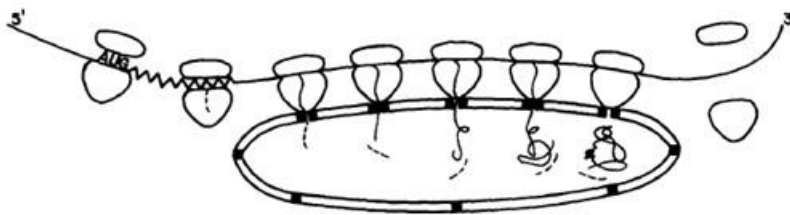


Figura 1. **Modelo de transporte cotraduccional de proteínas al retículo endoplásmico.** Los ribosomas del citoplasma se organizan en polisomas que sintetizan las proteínas codificadas por el mRNA (línea continua). La primera porción de la proteína sintetizada (líneas punteadas) actúa como secuencia señal que la dirige al retículo endoplásmico y que es editada por una proteasa cuando el sustrato ingresa al lumen del organelo. Tomado de Blobel, 1999.

En años subsecuentes, el estudio del transporte de proteínas se propagó a proteínas residentes de otros organelos. Hasta la fecha se han descrito sistemas específicos dedicados a transportar proteínas no sólo en los organelos de células eucariontes (núcleo, peroxisomas, mitocondrias, vía de secreción, lisosomas, etc.), sino también en células procariontes, en particular para el transporte de proteínas de secreción o de membrana (Yuh & Blobel 2001; Neupert & Herrmann 2007; Li & Chiu 2010; Park & Rapoport 2012; Mor et al. 2014; Kim & Hettema 2015).

## 1.1.2 Mecanismos postraduccionales y cotraduccionales del transporte de proteínas

Una de las interrogantes que surgió con los estudios antes descritos es si las proteínas se transportan a su destino mientras los ribosomas del citoplasma las sintetizan o esto sucede cuando su síntesis ha terminado. Los estudios del Dr. Palade indicaron que una fracción de los ribosomas citoplásmicos están asociados a la membrana del retículo endoplásmico (Palade G.E. 1955). Posteriormente se verificó que dichos ribosomas (o polisomas) sintetizan proteínas y se unen a un poro de translocación en la membrana del retículo (Blobel & Dofferstein 1975). Esta manera de transportar proteínas se denominó cotraduccionales, ya que la síntesis y el transporte suceden de manera acoplada (Blobel 1999).

Sin embargo, estudios posteriores indicaron que para proteínas de otros organelos e incluso una fracción de las del retículo endoplásmico, el transporte ocurre una vez que la proteína ha sido completamente sintetizada. Este mecanismo se denominó postraduccionales. En él se considera que las proteínas permanecen en un estado parcialmente desplegado asociadas a chaperonas, esto les permite conservar una conformación apropiada para ser translocadas a través de poros en la membrana de su compartimento blanco (Jackson & Blobel 1977).

Actualmente se aceptan ambos modelos para describir el transporte de las proteínas, sin embargo, la preferencia de uno u otro depende principalmente de las características de las proteínas que se transportan. Por ejemplo, se sabe que en el transporte hacia algunos organelos como el peroxisoma o el núcleo, las proteínas se transportan completamente plegadas e incluso asociadas en complejos oligoméricos (Kim & Hettema 2015). Las proteínas del núcleo atraviesan la envoltura nuclear con ayuda de chaperonas que reconocen señales no editables en la secuencia de sus sustratos y son capaces de llevarlas del citoplasma al núcleo a través del poro nuclear (Cook et al. 2007; Mor et al. 2014). En el transporte al peroxisoma también existen acarreadores localizados en el citoplasma y que unen a sustratos completamente plegados que luego los conducen hasta el poro de translocación de la



membrana del peroxisoma, cuya característica es ser dinámico y ensamblarse en el momento en que la proteína se va a translocar (Nagotu et al. 2012).

## 1.2 Generalidades del transporte de proteínas mitocondriales

Las mitocondrias son organelos originados por un evento endosimbiótico donde una  $\alpha$ -proteobacteria fue engullida por una arquea del grupo de Asgard (Sagan 1967; Zaremba-Niedzwiedzka et al. 2017). Una de las consecuencias de este suceso, fue la modificación del genoma de ambos organismos. Una porción de la  $\alpha$ -proteobacteria (posteriormente mitocondria) se eliminó totalmente, otra se retuvo en el interior y una más migró y se fusionó al genoma del hospedero (Burger et al. 2003). La porción que se retuvo se convirtió en el actual genoma mitocondrial y codifica para una pequeña porción del proteoma mitocondrial (en particular para las subunidades más hidrofóbicas de la cadena de transporte de electrones), además de ciertos tRNAs y rRNAs. Sin embargo, la mayor parte del proteoma mitocondrial está codificado en el genoma nuclear, es sintetizado por los ribosomas del citoplasma y posteriormente se lleva al interior del organelo (Neupert & Herrmann 2007).

El estudio de la importación de proteínas a la mitocondria también implicó el uso de experimentos con sistemas *in vitro*, donde se reconstituyeron los componentes necesarios para transportar a las proteínas al organelo (Harmey et al. 1977; Maccacchini et al. 1979). En estos trabajos se concluyó que el mecanismo podía ocurrir de modo postraducciona, dado que se logró el ingreso de una proteína totalmente sintetizada a mitocondrias aisladas aunque no con una eficiencia del 100% (Harmey et al. 1977). De manera paralela se reportó con el uso de microscopía electrónica la existencia de una porción de ribosomas (y polisomas) que, de manera análoga a lo que sucede en el retículo endoplásmico, se asocian a la membrana externa mitocondrial (Kellems 1974; Kellems et al. 1975). Esto hizo pensar que se podía acoplar la síntesis con el ingreso de las proteínas al organelo. En años posteriores los estudios de importación *in vivo* mostraron que el proceso ocurre en periodos muy cortos de tiempo (Ades

& Butow 1980). Con estos resultados se propuso que al menos un grupo de proteínas puede entrar de modo co-traducciona a la mitocondria.

El debate acerca del modo en que suceden las fases iniciales del transporte continuó, ganando más aceptación el modelo postraducciona fundamentalmente por las ventajas experimentales que permitían los sistemas experimentales de importación *in vitro*. Sin embargo, en años recientes se ha demostrado que el modelo co-traducciona es probablemente el más acertado para un número cada vez mayor de proteínas mitocondriales (Williams et al. 2014).

### 1.2.1 Principales tipos de secuencias de localización mitocondria

Las proteínas mitocondriales sintetizadas por los ribosomas citoplásmicos son entregadas a la membrana externa mitocondria donde son reconocidas por el poro de translocación TOM (de las siglas en inglés de Translocase of the Outer Membrane). Luego son distribuidas con ayuda de otras maquinarias hacia su destino final dentro del organelo (Chacinska et al. 2009).

Las proteínas mitocondriales contienen como en el caso de las del retículo endoplásmico antes mencionadas, secuencias señal que le indican su destino final. Existen diversos tipos de secuencias señal de localización mitocondria. A continuación se mencionaran algunos de los casos más representativos (Figura 2):

a) Las presencuencias o MTS (de las siglas en inglés de Matrix Targeting Signal). Son señales localizadas en el extremo amino terminal de la proteína. Presentan una estructura de  $\alpha$ -hélice anfipática con una cara de aminoácidos cargados positivamente (Heijne G 1986). Esta secuencia es editable, de tal manera que la proteína se sintetiza como un precursor. Cuando alcanza la matriz mitocondria, una proteasa corta el péptido señal y produce la versión madura de la proteína. Las MTS guían a proteínas de la matriz mitocondria, así como algunas de la membrana interna.

b) Secuencias de anclaje hidrofóbico: Son segmentos hidrofóbicos presentes en las proteínas de la membrana interna. Estas proteínas pueden tener también una MTS que les ayuda a ser translocadas a través de las membranas externa e interna, sin embargo el segmento hidrofóbico detiene el transporte y provoca que la proteína se libere lateralmente en la membrana interna dejando al resto de aminoácidos orientados hacia el espacio intermembranal (Adrian et al. 1986).

c) Secuencias bipartitas: también son la combinación de una MTS con una señal interna hidrofóbica encontradas simultáneamente en una misma proteína. Sin embargo, en este caso existe un segundo sitio de edición seguido del segmento hidrofóbico. Esto provoca que la proteína sea editada liberando el producto final en el espacio intermembranal (Glick et al. 1992), mientras que el segmento transmembranal es degradado por proteasas presentes en la membrana mitocondrial interna.

d) Secuencias internas: son segmentos cortos (aproximadamente 10 aminoácidos) a lo largo de la cadena de aminoácidos de la proteína. Se encuentran en las proteínas con más de un cruce transmembranal localizadas la membrana interna mitocondrial. A diferencia de las presencuencias, estas señales no son editables. Se encuentran en proteínas que funcionan como acarreadores de metabolitos (Pfanner et al. 1987; Pfanner & Neupert 1987).

e) Motivos de residuos de cisteína: están presentes en un grupo de proteínas del espacio intermembranal. Las cisteínas son reconocidas y oxidadas generando puentes disulfuro, con lo cual se promueve el plegamiento y retención de la proteína blanco (Chatzi & Tokatlidis 2013).

f) Señales  $\beta$ : para el caso de las proteínas de la membrana externa pero que tienen una estructura de barril- $\beta$ . Están localizadas en el extremo C-terminal de las proteínas blanco (Kutik et al. 2008; Stroud 2014).

Es importante resaltar que a pesar de la gran variedad de secuencias señal descritas, aún hay casos de proteínas mitocondriales donde no se ha logrado identificar secuencia señal de ningún tipo.

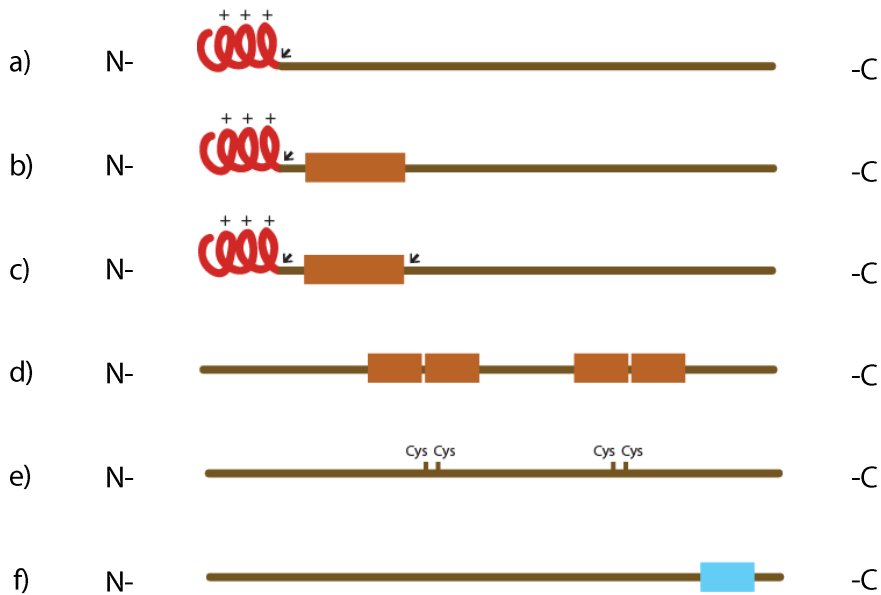


Figura 2. **Principales tipos de secuencias señal de proteínas mitocondriales.** Se muestran diversas secuencias señal donde cada una corresponde al inciso descrito en el texto. Las secuencias pueden ser editables (MTS, espirales rojas) o formar parte de la cadena de aminoácidos de la proteína (secuencias internas, cajas café indican regiones hidrofóbicas y la caja azul señales  $\beta$ ). Las flechas negras indican sitios de corte de la proteína. Las secuencias señal pueden estar localizadas en distintos sitios a lo largo de la proteína sustrato. N-extremo amino; C-extremo carboxilo de la proteína. Ver detalles en el texto.

## 1.2.2 Mecanismos de distribución intramitocondrial de proteínas

Ya sea considerando el modelo postraducciona l o el cotraducciona l, la mayor parte de las proteínas mitocondriales son entregadas al poro de translocación TOM en la membrana externa. Luego, de manera coordinada con otros complejos las proteínas, se distribuyen dentro de la mitocondria (Figura 3).

Como se mencionó, el punto de entrada es el complejo TOM. Este complejo se compone de ocho subunidades. Las proteínas Tom5, Tom6 y Tom7 son subunidades pequeñas importantes para la estabilidad de TOM (Kassenbrock et al. 1993; Hönlinger et al. 1996). Las proteínas Tom20 y Tom22 actúan como receptores capaces de unir proteínas con secuencia señal del tipo MTS (Lithgow et al. 1994); Tom70 y Tom71 son receptores que unen proteínas con secuencias señal internas (Hines et al. 1990). Aunque los receptores mencionados se unen a tipos específicos de proteínas, está reportado que pueden ser funcionalmente redundantes. Por último está Tom40 que conforma el poro de translocación y que adopta una estructura de

barril- $\beta$  (Rapaport & Neupert 1999). Existe un debate sobre la disposición de los poros y la estequiometría del complejo TOM totalmente ensamblado. Hasta ahora la información estructural más clara indica que el complejo TOM funcional se compone de tres poros (Shiota et al. 2015). Una vez que las proteínas son reconocidas por alguno de los receptores de TOM, se unen y translocan a través del poro Tom40. Luego son distribuidas de manera coordinada con la ayuda de otros complejos a su subcompartimento mitocondrial final. Es importante mencionar que algunas proteínas de la membrana externa ingresan de manera independiente a TOM.

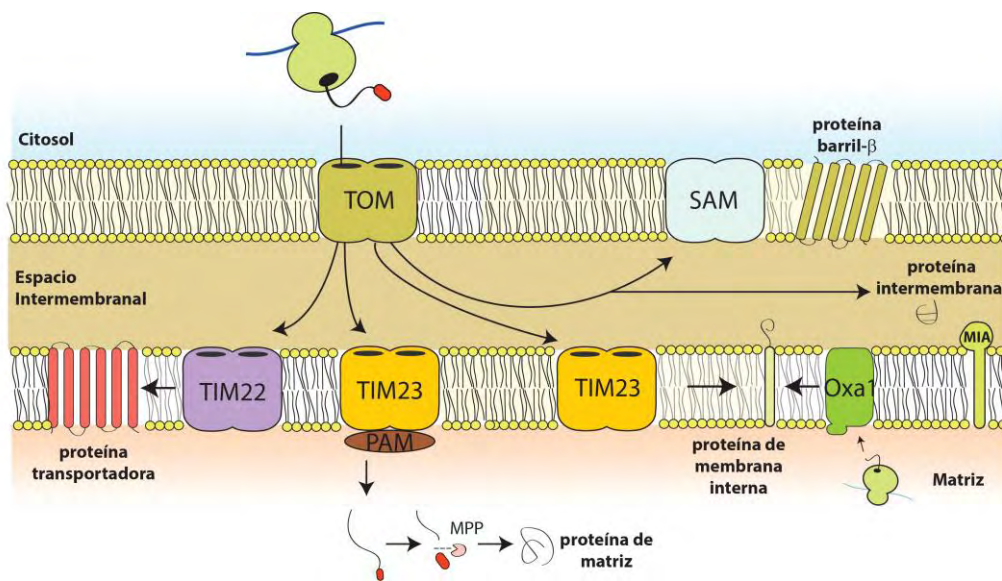


Figura 3. **Rutas de transporte de las proteínas mitocondriales.** Las proteínas son sintetizadas por los ribosomas del citoplasma y luego son entregadas al complejo TOM en la membrana externa mitocondrial. Con la ayuda de diferentes complejos proteicos, la proteína es guiada hacia el subcompartimento mitocondrial requerido. Ver detalles en el texto. TOM: Translocasa de la membrana externa; TIM: Translocasa de la membrana interna; PAM: Motor asociado a preproteínas; TIM22: Translocasa de la membrana interna 22; SAM: Maquinaria de entrega y ensamblaje; Oxa1: Ensambladora de la oxidasa 1; MIA: Ensambladora del espacio intermembranal; MPP: Proteasa de edición de MTS.

La ruta para proteínas de la matriz mitocondrial o de membrana interna (con un cruce transmembranal) continúa con la participación de TIM23 (de las siglas en inglés de Translocase of the Inner Membrane). TIM23 es un complejo localizado en la membrana interna y se compone de cuatro subunidades: Tim23, que es la proteína que forma el poro de translocación

en la membrana interna mitocondrial; Tim50, que es el receptor de proteínas que han cruzado el complejo TOM; Tim17, involucrada en la liberación lateral de proteínas con cruces transmembranales y Tim21, importante para la asociación de TIM23 con complejos respiratorios o con TOM (Dekker et al. 1993; Kübrich et al. 1994; Truscott et al. 2001).

TIM23 opera de dos maneras dependiendo del destino final de la proteína sustrato. Cuando se tiene una proteína de la matriz mitocondrial, TIM23 se asocia a otro complejo denominado PAM (de las siglas en inglés de Presequence translocase Associated Motor) recibiendo a las proteínas que van a llegar a la matriz mitocondrial. PAM está conformado por diversas proteínas, entre ellas la chaperona de la matriz mitocondrial Ssc1 (o mtHsp70). La función de PAM es promover la translocación de la proteína a través de la membrana interna hasta alcanzar la matriz mitocondrial, de manera dependiente de ATP. En general, se considera que los sustratos de la ruta TOM-TIM/PAM presentan una presecuencia del tipo MTS que es editada por la proteasa MPP de la matriz. Además de los componentes mencionados, estas proteínas dependen del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ) para importarse exitosamente, esto debido a que el  $\Delta\Psi$  genera un efecto electroforético sobre la proteína sustrato y en particular sobre su MTS (cargada positivamente). Tim50 es la proteína que recibe a los sustratos inmediatamente después de TOM en el espacio intermembranal. Luego con la ayuda del poro Tim23 y de Tim17, la proteína es liberada en la membrana interna. Como se mencionó, Tim21 acerca los complejos respiratorios a TIM, lo que ocasiona que el  $\Delta\Psi$  se favorezca en la cercanía del complejo, lo cual se traduce en una translocación más eficiente. Se ha propuesto que durante la importación por esta vía, TOM y TIM son capaces de asociarse donde las membranas interna y externa entran en estrecha cercanía (Sirrenberg et al. 1996).

Cuando el destino final es la membrana interna, TIM23 actúa sin asociación con PAM. En este caso las proteínas contienen secuencias señales bipartitas. Así, la MTS promueve que la proteína cruce la membrana interna y alcance la matriz. Sin embargo, la señal hidrofóbica en su cadena de aminoácidos detiene la translocación y promueve la liberación lateral de la cadena polipeptídica en la membrana.

Si la proteína tiene más de un cruce transmembranal su importación ocurre vía TIM22 (aunque esta función la puede llevar a cabo también TIM23). Este complejo contiene tres

subunidades: Tim22, que forma el poro de translocación, Tim54, que actúa como receptor e interacciona con las chaperonas pequeñas del espacio intermembranal que guían al sustrato hasta TIM22, y Tim18 cuya función es importante durante la biogénesis del complejo. Las proteínas ingresan vía TOM, se asocian a chaperonas del espacio intermembranal (Tim8, Tim9, Tim10, Tim12 y Tim13) para luego ser entregadas a TIM22. Se plantea que Tim54 es la proteína que recibe a los sustratos. Una vez que cruzan la membrana interna, las proteínas son liberadas lateralmente en la membrana interna. Como se mencionó, los acarreadores de metabolitos pertenecen a este grupo de proteínas (Sirrenberg et al. 1996; Kovermann et al. 2002; Rehling et al. 2003).

Existe otra vía para insertar proteínas de la membrana interna con más de un cruce transmembranal. Este mecanismo opera con ayuda de la proteína Oxa1, una insertasa embebida en la membrana interna de la mitocondria. Los sustratos de esta vía atraviesan la membrana externa por TOM, la membrana interna por TIM23 hasta alcanzar la matriz y luego son entregados a Oxa1 quien facilita su inserción. Además de insertar proteínas que llegan desde el citoplasma, Oxa1 se encarga de insertar las proteínas codificadas en el genoma mitocondrial (en su mayoría proteínas hidrofóbicas de los complejos respiratorios). Oxa1 tiene afinidad por los ribosomas de la mitocondria y se une a ellos cuando sintetizan proteínas. De esta manera se considera que la inserción de las proteínas codificadas en el genoma mitocondrial ocurre de modo cotraduccional.

Las proteínas solubles que llegan al espacio intermembranal, pueden seguir una de dos rutas. La primera es a través de TOM y TIM23. Como se mencionó antes, existen proteínas con secuencias bipartitas pero que además contienen un segundo sitio de edición enseguida del cruce transmembranal. Esto libera una proteína de peso molecular menor en el espacio intermembranal, ya que pierde la secuencia señal en la matriz y por lo tanto el dominio transmembranal que se queda embebido en la membrana interna, donde posteriormente es degradado por proteasas localizadas en la misma membrana.

La segunda vía involucra al complejo MIA, que ayuda a la entrada de proteínas con residuos de cisteína en la cadena de aminoácidos. Esta ruta opera para proteínas de peso molecular menor a 40 kDa, que cruzan la membrana externa por TOM y son recibidas en el

espacio intermembranal por Mia40 mediante la formación de enlaces disulfuro entre las cisteínas presentes en Mia40 y las cisteínas del sustrato (que se encuentran generalmente en motivos CX<sub>3</sub>C, CX<sub>9</sub>C u otros) (Chadzi & Tokatlidis 2013). La interacción con Mia40 también asiste al plegamiento de las proteínas sustrato facilitando la oxidación intramolecular de las cisteínas o la incorporación de iones metálicos que las estabilizan. Mia40 se reduce al momento que el sustrato es oxidado y posteriormente los electrones son cedidos a la proteína Erv1 que finalmente los canaliza a la cadena respiratoria, dejando tanto a Mia40 como a Erv1 listas para una nueva ronda de reacciones redox (Chatzi & Tokatlidis 2013).

Finalmente las proteínas de la membrana externa con estructura de barril- $\beta$  ingresan inicialmente a través de TOM, posteriormente se unen a las chaperonas del espacio intermembranal y son entregadas a otro complejo localizado en la membrana externa denominado SAM (de las siglas en inglés de Sorting and Assembly Machinery), que las ayuda a insertarse en la membrana externa mitocondrial (Wiedemann et. al. 2003).

### 1.2.3 Proteínas y factores necesarios para que un precursor proteico de mitocondria llegue al complejo TOM

En la literatura se han descrito diversos factores importantes para llevar a cabo una importación de proteínas exitosa. Existen puntos a considerar como el  $\Delta\Psi$ . Experimentos de importación *in vivo* e *in vitro* han demostrado que el abatimiento del  $\Delta\Psi$ , evita la entrada adecuada de precursores al organelo, principalmente de aquellos que contienen una MTS en su secuencia (Reid & Schatz. 1982).

Por otro lado se ha encontrado que existen señales en el mRNA que desempeñan un papel importante para la biogénesis de las proteínas. Esto no sólo ocurre para las proteínas mitocondriales, se sabe que en muchos casos el mRNA tiene señales intrínsecas que favorecen su localización en zonas específicas dentro de una célula, lo cual enriquece la producción local de la proteína que codifica en el subcompartimento celular que le corresponde (Marc et al. 2002; Margeot et al. 2002). En años recientes estudios masivos de microarreglos así como de



microscopía confocal han revelado que ciertos mRNAs codificantes de proteínas mitocondriales tienen una tendencia a localizarse de manera cercana al organelo. Además se ha podido identificar que el extremo 3'UTR (de las siglas en inglés de UnTranslated Region) es importante para esta localización (Gadir et al. 2011). Mutaciones donde se altera la secuencia del segmento o donde éste se elimina provocan que el mRNA ya no se localice adecuadamente (Figura 4). Estudios de microscopía electrónica realizados en la década de los años setenta fueron el primer indicio de la asociación de ribosomas e incluso polisomas con la membrana externa mitocondrial, sugiriendo que la importación ocurría de manera co-traduccional como en el retículo endoplásmico (Butow 1972; Kellems 1974).

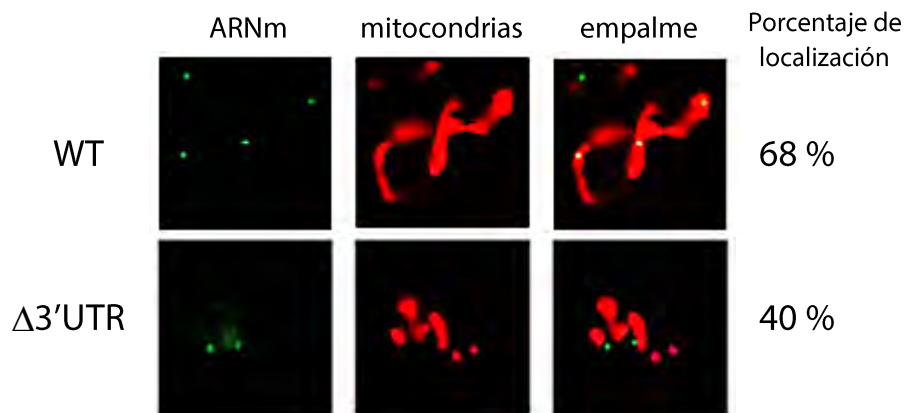


Figura 4. **El extremo 3'UTR de diversos mRNAs es importante para una localización de cercana a la mitocondria.** Se observa la localización del mRNA de *OXA1* en verde, las mitocondrias en rojo y la colocalización de las dos estructuras en presencia o ausencia del 3'UTR. La ausencia del 3'UTR reduce el porcentaje de colocalización entre ambas estructuras. Modificado de Gadir, 2011. El porcentaje de localización indica cuantos de los gránulos de mRNA están situados en el área de las mitocondrias.

Por otro lado, se ha propuesto que diversas proteínas del citoplasma también asisten la entrega de proteínas a la mitocondria. En los mamíferos, las chaperonas del tipo Hsp70 y Hsp90 (por las siglas en inglés de Heat Shock Protein 70 y 90, respectivamente) promueven la importación de proteínas como el transportador de fosfatos (PiC) y el transportador de péptidos (PT), al entregarlas al receptor Tom70 del complejo TOM (Young et al. 2003). En las levaduras las Hsp70 también parecen favorecer el proceso. Se ha reportado que las Hsp70 del tipo Ssa y Ssb facilitan la entrada de proteínas a la mitocondria (Deshaies 1988; Gautschi et al.

2001; Gautschi et al. 2002). En el mismo organismo, el complejo RAC (de las siglas en inglés de Ribosome Associated Complex) formado por las proteínas Ssz1 (Hsp70) y Zuo1 (Hsp40) se une al túnel de salida ribosomal y promueve el transporte. En particular mediante experimentos de importación *in vitro* se ha observado que este complejo promueve la importación de la malato deshidrogenasa (Mdh1) (Gautschi et al. 2001; Gautschi et al. 2002).

Además de RAC, se ha propuesto que otro complejo de asociación a ribosomas es importante para la importación de proteínas mitocondriales. Dicho complejo es denominado NAC (de las siglas en inglés de Nascent Polypeptide Associated Complex) (George et al. 1998; Fünfschilling & Rospert 1999; George et al. 2002).

### 1.3 El complejo NAC (Nascent Polypeptide Associated Complex)

El complejo de asociación a polipéptidos nacientes (NAC) es un heterodímero conformado por una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$  (Wiedmann et al. 1994). Al igual que RAC, NAC puede asociarse al ribosoma, uniéndose cerca del túnel de salida ribosomal por medio del extremo amino terminal de su subunidad  $\beta$  (Wegrzyn et al. 2006)(Figura 5). Se ha descrito que así puede asociarse a polipéptidos que el ribosoma está sintetizando y actuar como chaperona citosólica protegiéndolos de degradación por proteasas del citoplasma (Wang et al. 1995).

Se ha resuelto la estructura tridimensional del complejo NAC de arqueas y de humano (Spreter et al. 2005; Wang et al. 2010). En ambos casos se observó que NAC adopta una estructura de barril- $\beta$  aplanado, confirmando que ambas subunidades tienen un plegamiento similar. Cabe aclarar que en arqueas en el complejo NAC identificado es un homodímero de la subunidad  $\alpha$ .

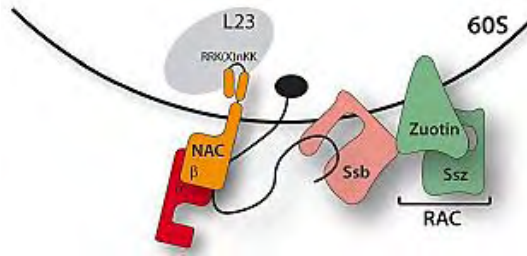


Figura 5. **NAC es una chaperona citosólica que se une a péptidos nascentes cerca del túnel de salida ribosomal.** A través de su subunidad  $\beta$ , el complejo NAC se ancla al ribosoma en la proteína L23. Las dos subunidades de NAC (rojo y naranja) pueden asociarse con la proteína nascente. Se muestra también la asociación del complejo Ssb-RAC (rosa y verde) con ribosomas y cadenas nascentes. Tomado de Koplín, 2010.

En las levaduras, el modelo de estudio para este trabajo, existen tres genes que codifican para las subunidades de NAC. El gen *EGD1* codifica para la subunidad  $\beta$  y el gen *BTT1* la subunidad  $\beta'$  (Hu & Ronne 1994). Por otro lado el gen *EGD2* codifica para la subunidad  $\alpha$  (Shi et al. 1995) (Tabla I). Así pues se ha demostrado que en levadura existen dos versiones de NAC: el heterodímero  $\alpha\beta$  y el  $\alpha\beta'$  (Reimann et al. 1999).

Tabla I. Genes que codifican para las subunidades de NAC en levadura		
Nombre	Subunidad	Peso Molecular (kDa)
<i>EGD1</i>	$\beta$	17
<i>BTT1</i>	$\beta'$	16.6
<i>EGD2</i>	$\alpha$	18.7

Sin embargo, también se ha especulado la posibilidad de que NAC forme homodímeros ( $\alpha\alpha$ ,  $\beta\beta$  ó  $\beta'\beta'$ ) (Spreter et al. 2005; Wang et al. 2010; Alamo et al. 2011; Ott et al. 2015). Esto se ha observado en experimentos de copurificación *in vitro*; sin embargo, *in vivo* el complejo siempre está presente como heterodímero. También se sugiere que el heterodímero predominante es el  $\alpha\beta$ , ya que la subunidad  $\beta$  tiene una expresión 100 veces mayor que la  $\beta'$ .

Se considera que la subunidad  $\alpha$  tiene un nivel de expresión similar al de  $\beta$  (Reimann et al. 1999).

Las subunidades de NAC tienen papeles compartidos y otros específicos. Tanto las subunidades  $\beta$  como la  $\alpha$  pueden asociarse con los péptidos nacientes. Sin embargo, la asociación de NAC a los ribosomas está mediada específicamente por las subunidades  $\beta$ , en un dominio presente en el extremo amino terminal de ambas proteínas (Wegrzyn et al. 2006). Mutantes de este segmento son incapaces de asociarse a los ribosomas. La subunidad  $\alpha$  por su lado, tiene un dominio UBA (de las siglas en inglés de Ubiquitin Binding Domain) en su segmento C-terminal. Aunque no se ha aclarado su función, se ha propuesto que este dominio puede mediar la ubiquitinación de NAC y modular así su vida media. También se ha especulado en que tenga relevancia en la degradación de proteínas defectuosas recién sintetizadas (Panasenko et al. 2006; Panasenko et al. 2009).

El NAC tiene diversas funciones atribuidas, que a continuación se mencionan:

i) Protege a los polipéptidos nacientes de degradación por proteasas del citoplasma. Esto se ha concluido a partir de experimentos *in vitro*, donde se incubó a proteínas nacientes con proteasas (Wang et al. 1995). El resultado demostró que en ausencia de NAC, las proteasas ganan más accesibilidad al sustrato.

ii) Evita la entrada errónea de proteínas del citoplasma (u otro destino) al retículo endoplásmico (RE). Es decir, actúa junto con SRP (que une proteínas con péptido señal de entrada al RE y las guía hasta la superficie de este organelo) como un punto de control, coordinando el tráfico de proteínas hacia el RE (Lauring et al. 1995). Recientemente se observó en *Caenorhabditis elegans* que la ausencia de NAC puede derivar en una entrada al RE de proteínas dirigidas a la mitocondria. Esto puede provocar la activación de una respuesta de estrés en ambos organelos (Garmendinger 2015).

iii) Promueve la biogénesis de proteínas ribosomales evitando su agregación, por lo tanto también promueve la biogénesis de ribosomas citoplásmicos (Koplin et al. 2010).

iv) Actúa como factor de transcripción controlando la expresión de genes nucleares. Este es un papel en el que estrictamente actúan las subunidades individuales y no como dímeros. Este rol no ha sido aclarado completamente y tampoco ha sido posible probar totalmente que *in vivo* las subunidades de NAC actúan de manera independiente (Moreau et al. 1998; Yotov et al. 1998).

iv) Facilita la entrada de proteínas a la mitocondria. En la levadura se ha observado en experimentos de importación *in vitro* que NAC promueve el transporte de proteínas como la malato deshidrogenasa (Mdh1) así como de proteínas de fusión reporteras de importación mitocondrial. Además, *in vivo* también se ha observado que ayuda al transporte de la Mdh1, de la fumarasa (Fum1) y del factor de mantenimiento mitocondrial 1 (Mmf1) (George et al. 1998; Fünfschilling & Rospert 1999; George et al. 2002).

Con respecto a la función de NAC en la entrada de proteínas a la mitocondria se planteó la existencia de un receptor para este complejo en la membrana externa mitocondrial. Recientemente se describió que el complejo  $\alpha\beta$ -NAC interacciona físicamente con la proteína de la membrana externa mitocondrial Om14. Esta proteína actúa como un receptor de NAC en las fases iniciales del transporte de proteínas. Se observó que mutantes de *om14* muestran defectos en la importación *in vitro* de la Mdh1. La presencia de  $\alpha\beta$ -NAC en las reacciones de importación es capaz de compensar este fenómeno. Sin embargo *in vivo*, dobles mutantes carentes tanto de  $\alpha\beta$  NAC como de *OM14* muestran un fenotipo silvestre de crecimiento, incluso en medio respiratorio (Lesnik et al. 2014).

La relevancia funcional de NAC se ve reflejada especialmente en ratones, nemátodos y moscas, ya que la eliminación de cualquiera de los genes que codifican para sus subunidades provoca un fenotipo letal y todos esos organismos modelo mueren en etapas embrionarias del desarrollo (Deng & Behringer 1995; Markesich et al. 2000; Bloss et al. 2003). Sin embargo, en *S. cerevisiae* ocurre un fenómeno diferente, ya que incluso la eliminación de los tres genes simultáneamente no provoca un defecto en el crecimiento y ni afecta la viabilidad de las células (Reinmann et. al. 1999). Es otras palabras, la función de NAC es dispensable en esta levadura a pesar de que ciertas funciones como el transporte de proteínas a la mitocondria es un proceso esencial.

Una explicación para esto sería que la función de NAC esté compartida con otros genes, de tal forma que en su ausencia, otras proteínas puedan llevar a cabo las funciones que NAC desempeña. Con esta hipótesis y para identificar genes cuya función es redundante a la de NAC, en nuestro laboratorio realizamos previamente rastreos de interacciones genéticas a escala genómica (Ponce-Rojas JC 2012). Es decir, una búsqueda de genes que al ser eliminados simultáneamente con los de NAC, provocaran un fenotipo deletéreo en la levadura. Dentro de los resultados, se encontró que el gen *SAM37* tiene una interacción genética negativa con los genes *EGD1* y *BTT1*. Este resultado sugirió que la proteína Sam37 podría estar relacionada con NAC en el transporte de proteínas a la mitocondria.

## 1.4 El papel de Sam37 en la inserción de barriles- $\beta$ a la membrana externa mitocondrial

Como se mencionó, las mitocondrias contienen proteínas con estructura de barril  $\beta$  en la membrana externa (Pfanner et al. 2004). Para alcanzar su destino, este tipo de proteínas ingresan a través de TOM y llegan al espacio intermembranal, ahí se asocian a chaperonas pequeñas (Tim9 y Tim10) que las entregan al complejo SAM para ser incorporadas en la membrana externa (Figura 6).

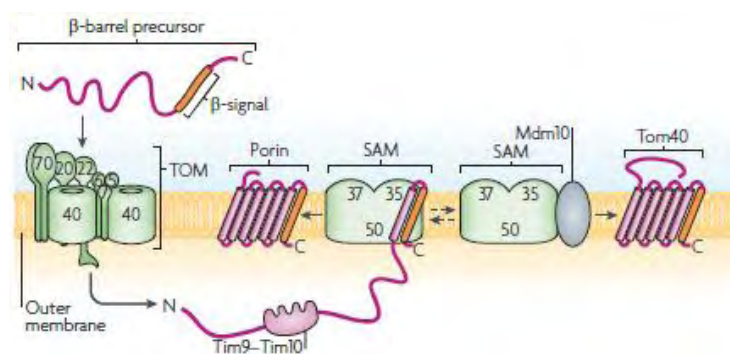


Figura 6. **Ruta de biogénesis de barriles- $\beta$  a la mitocondria.** El complejo SAM recibe proteínas con señales  $\beta$  una vez que han ingresado a la mitocondria a través de TOM y que están asociadas con chaperonas pequeñas del espacio intermembranal (Tim9-Tim10). Los barriles se insertan y liberan en la membrana externa mitocondrial. Se muestran las dos versiones de SAM presentes en *S. cerevisiae*. Tomado de Schmidt et al. 2010.

El complejo SAM está constituido por tres subunidades. La primera es Sam50, subunidad esencial y que adopta una estructura de barril- $\beta$  (Kozjak et al. 2003). Esta subunidad tiene un origen procarionte y su ortólogo en bacterias es la proteína BamA que también está involucrada en la inserción de barriles- $\beta$  en la membrana externa de bacterias Gram negativas (Gentle et al. 2004; Stroud et al. 2010). También tiene un ortólogo en cloroplastos y en este caso es la proteína Toc75 (Li & Chiu 2010; Paila et al. 2015). Se ha propuesto que Sam50 puede formar un poro a través del cual los barriles- $\beta$  son insertados en la membrana. Sam50 participaría también asistiendo el plegamiento y posterior liberación lateral de las proteínas sustrato. Sin embargo, este modelo no ha sido comprobado, por lo cual el mecanismo exacto mediante el que los barriles- $\beta$  se liberan en la membrana externa sigue sin esclarecerse (Kozjak et al. 2003; Kutik et al. 2008; Ott et al. 2012). Sam50 tiene un dominio denominado POTRA (de las siglas en inglés de POlypeptide TRansport Associated). Este tipo de dominios han sido reportados como responsables del reconocimiento de señales en sustratos de esta vía (BamA tiene 5 dominios POTRA y Toc75 tiene 3 dominios POTRA) (Stroud et al. 2011).

En los humanos, la disminución en la expresión de Sam50 provoca una disminución en los niveles de Tom40, sin embargo esto no afecta el contenido de otras proteínas mitocondriales. Tampoco afecta la morfología mitocondrial. Además, la baja de expresión de Tom40 directamente tampoco repercute en los niveles de otras proteínas mitocondriales (Ott et al. 2012).

La segunda subunidad de SAM es Sam35, una proteína esencial cuya función no ha sido aclarada completamente, sin embargo se ha propuesto que participa en el reconocimiento de la secuencia señal de los precursores cuando llegan al espacio intermembranal. Se sabe que una mutante termosensible de Sam35 provoca una mayor expresión de las otras dos subunidades de SAM, lo cual podría funcionar como un mecanismo compensatorio (Waizenegger et al. 2004).

Finalmente está la subunidad Sam37 que es la única no esencial del complejo SAM. Sam37 es una proteína asociada a la membrana externa y se ha propuesto que ayuda a estabilizar a SAM. Sam37 fue descrita por primera vez en una serie de experimentos que buscaban mutantes de levadura que no pudieran crecer en medio respiratorio a altas

temperaturas. Luego se demostró que es una proteína de la membrana externa y que tiene un dominio soluble expuesto al citoplasma (Gratzner et al. 1995). Se observó que la mutación simultánea de *SAM37* y de los genes *TOM70* o *TOM20* (receptores del complejo TOM) provoca un fenotipo letal. Además, se especuló la posibilidad de que Sam37 se uniera físicamente con Tom70. Estos dos últimos datos sugirieron que Sam37 podría ser un receptor adicional que reconoce y asiste la translocación de proteínas a la mitocondria. Mediante experimentos de importación *in vitro*, se probó que Sam37 es importante para la translocación de proteínas como el citocromo  $c_1$  (Cyc1) y el acarreador de nucleótidos (Aac1). Además, se piensa que facilita el paso de liberación de los precursores para insertarse en la membrana externa (Stojanovski et al. 2007). Recientemente se reportó que el proceso de inserción de barriles- $\beta$  en la membrana externa ocurre gracias a un acoplamiento transitorio entre TOM y SAM y se ha demostrado que esta asociación es dependiente de Sam37 (Wenz et al. 2015).

Trabajos posteriores mostraron que Sam37 estaba implicada en la biogénesis de los barriles- $\beta$  en la membrana externa mitocondrial. Se encontró que forma un complejo con las proteínas Sam35 y Sam50, de un peso molecular aproximado de 210 kDa. Al igual que las mutantes termosensibles de Sam35 y Sam50, mutantes nulas de Sam37 únicamente presentan defectos en la biogénesis de barriles- $\beta$ , algunos ejemplos son Tom40, VDAC (porina) y Mdm10 (Wiedemann et al. 2003).

Otros efectos encontrados son que las mutantes nulas de *SAM37* presentan un crecimiento disminuido con respecto a una cepa silvestre. Como se mencionó, el efecto es más intenso a medida que se aumenta la temperatura de crecimiento. Además, las cepas muestran una morfología mitocondrial anormal a medida que se aumenta la temperatura de crecimiento, formándose mitocondrias aglomeradas en vez de la red característica de la cepa silvestre (Meisinger et al. 2004).

Por otro lado, se ha observado que existe una versión alternativa de SAM en las levaduras. Ésta involucra las tres subunidades mencionadas junto a Mdm10, otra proteína de la membrana externa. Esta versión de SAM es menos abundante y se ha visto únicamente involucrada en el transporte y ensamblaje de Tom40. Se ha establecido que la asociación de



Mdm10 con SAM es débil, de tal manera que su estabilidad depende de la fuerza iónica (Meisinger et al. 2004).

## 2. Planteamiento del problema

---

La función mitocondrial desempeña un papel fundamental en la homeostasis de los organismos eucariontes, desde la producción de energía, el metabolismo de lípidos y aminoácidos, hasta la participación en vías de señalización y en la producción de cofactores como los centros hierro-azufre. Aunque existen organismos que pueden prescindir de algunas de las funciones mitocondriales, otras participan en procesos celulares necesarios para la viabilidad celular. Esto hace que los mecanismos de biogénesis mitocondrial, en particular la importación de proteínas mitocondriales sea un proceso esencial.

Se ha reportado que cualquier alteración en este proceso puede resultar en un fenotipo letal. Por ello la descripción y caracterización de los factores que promueven el transporte toma crucial importancia. Si bien se conocen los complejos proteicos dentro de la mitocondria que facilitan la importación de proteínas, no se conocen con detalle aquellos que participan en las fases tempranas del proceso, antes de que éstas lleguen a la superficie del organelo.

NAC es una chaperona heterodimérica citosólica que promueve el transporte de proteínas a la mitocondria, sin embargo, los detalles de su función no se conocen. Es notable que a pesar de la relevancia de la importación de proteínas a la mitocondria para la sobrevivencia celular, NAC sea dispensable en *S. cerevisiae*.

En nuestro laboratorio identificamos que el gen *SAM37* presenta interacción genética negativa con NAC, lo que nos llevó a pensar que ambos son componentes del sistema de importación. Esta posible relación funcional no se ha explorado hasta ahora. Tampoco se sabe si las subunidades de NAC son igualmente relevantes o si hay alguna más importante para la importación.

Profundizar en la comprensión de la función de NAC y Sam37 ayudará a esclarecer los mecanismos que rigen el transporte de proteínas a la mitocondria.

### 3. Hipótesis

---

NAC es una chaperona del citosol que facilita la importación co-traducciona de proteínas a la mitocondria y lo hace de manera conjunta con Sam37 en *Saccharomyces cerevisiae*. La eliminación de ambos factores afectará la importación de proteínas y su ensamblaje en los diferentes compartimentos del organelo, lo cual se reflejará en el fenotipo de crecimiento de las cepas mutantes de dichos genes.

## 4. Objetivos

---

### 4.1 Objetivo general

Determinar si NAC y Sam37 participan en conjunto durante el reconocimiento temprano de proteínas mitocondriales.

### 4.2 Objetivos particulares

1. Establecer las interacciones genéticas entre los genes que codifican para las subunidades de NAC con *SAM37*.
2. Estudiar el impacto de la función de NAC y *SAM37* para el contenido de proteínas en la mitocondria.
3. Estudiar el impacto de la función de NAC y *SAM37* en el ensamblaje de complejos proteicos
4. Determinar si el complejo  $\alpha\beta'$ -NAC y Sam37 interaccionan físicamente.
5. Explorar el papel de  $\alpha\beta'$ -NAC y Sam37 con otras señales de biogénesis mitocondrial, esto es el segmento 3'UTR de los mRNAs codificantes de proteínas mitocondriales.

## 5. Materiales y Métodos

---

### 5.1 Generación de las mutantes en *S. cerevisiae* por recombinación homóloga

#### 5.1.1 Amplificación por PCR de los módulos de resistencia a antibióticos y auxotrofia

Para la generación de las cepas mutantes utilizadas en este trabajo, se realizaron reacciones de PCR para amplificar marcadores de selección por antibióticos o por auxotrofia a partir de los plásmidos de la colección de EUROSCARF: pAG32, pAG25, pAG60 y pFa6A (Goldstein & McCusker 1999).

Se diseñaron oligonucleótidos con una longitud de 60 nt que contenían: a) 20 nucleótidos presentes en todos los plásmidos mencionados y que permiten amplificar el módulo de resistencia deseado y b) 40 nucleótidos que son idénticos a las regiones flanqueantes del ORF de *S. cerevisiae* que se quiere interrumpir o eliminar (Ponce-Rojas JC 2012).

En cada reacción se utilizaron los siguientes componentes: 20 pmol de cada oligonucleótido, 100 ng del DNA molde, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2.5 U de TaqPol (Fermentas) y 200 μM de dNTPs (Fermentas), en reacciones de 50 μl como volumen final.

Las reacciones de PCR se realizaron siguiendo el siguiente programa:

5 min	95°C (desnaturalización inicial)	
1 min	95°C (desnaturalización)	30x
1 min	50°C (alineamiento)	
2 min	72°C (elongación)	
8 min	72°C (elongación final)	

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5%.

## 5.1.2 Generación de mutantes de levadura mediante transformación por choque térmico

Todas las cepas utilizadas en este trabajo tienen como cepa parental a la cepa Y8205 (Tong & Boone 2007). Las cepas mutantes utilizadas fueron generadas por el método de recombinación homóloga por  $\text{CH}_3\text{COOLi}/\text{DNA}$  acarreador/polietilenglicol desarrollado para levaduras (Gietz, 2002).

Brevemente, las células se crecieron en medio rico con glucosa como fuente de carbono y se incubaron 24 h. Posteriormente se diluyeron los cultivos hasta una  $\text{DO}_{600}=0.3$  y se incubaron hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento ( $\text{DO}_{600} = 1$ ). En este punto se tomaron 1.5 mL de cultivo y se colectaron las células centrifugando a  $8,609\times g$  por 2 min. La pastilla celular se resuspendió en 1 mL de acetato de litio 0.1 M y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Las células se centrifugaron nuevamente a  $8,609\times g$  por 2 min y se agregaron los siguientes componentes en este orden:

240  $\mu\text{L}$  de polietilenglicol 3350 al 50% w/v

36  $\mu\text{L}$  de acetato de litio 1 M

10  $\mu\text{L}$  de DNA de esperma de salmón (10 mg/ml)

DNA (5  $\mu\text{L}$  cuando se utilizó plásmido o 45  $\mu\text{L}$  cuando fue un casete de selección)

$\text{H}_2\text{O}$  (69  $\mu\text{L}$  cuando se utilizó plásmido o 29  $\mu\text{L}$  cuando fue un casete de selección)

La pastilla celular se resuspendió agitando por vortex y la suspensión se incubó durante 45 min a  $42^\circ\text{C}$ . Posteriormente las células se centrifugaron a  $8,609\times g$  por 2 min; finalmente se resuspendieron en 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  estéril y se sembraron en el medio de selección adecuado.

### 5.1.3 Confirmación por PCR de las mutantes

Una vez obtenidas las mutantes de interés, se procedió a confirmarlas mediante PCR de colonia. Para ello se diseñaron pares de oligonucleótidos que pudieran alinearse por un lado en la región promotora y en la región codificante del ORF eliminado, y por otro lado un par que se uniera en la región promotora y en el ORF del marcador usado para realizar la transformación (Ponce-Rojas JC 2012). De esta manera se esperaba amplificación únicamente al usar oligonucleótidos que permitieran amplificar el casete de resistencia.

Las reacciones de PCR se realizaron siguiendo el siguiente programa:

10 min	95°C (desnaturalización inicial)	30x
1 min	95°C (desnaturalización)	
1 min	55°C (alineamiento)	
2:15 min	72°C (elongación)	
5 min	72°C (elongación final)	

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5%.

## 5.2 Clonación del gen *SOD2*

Con el fin de analizar el contenido de Sod2 en cada una de las cepas de estudio, se decidió clonar el gen *SOD2* en un plásmido añadiendo 3 etiquetas de hemaglutinina en su extremo C-terminal.

En una primera reacción de PCR se amplificó el promotor (300 nucleótidos río arriba del inicio del ORF) y el ORF del gen (Ver apéndice I). El oligonucleótido sentido contenía un sitio de corte por *NotI* y el antisentido contenía la secuencia codificante de una etiqueta de hemaglutinina. Una vez terminada la reacción, el producto se purificó y se utilizó como molde para realizar una segunda reacción de PCR, donde se utilizó el mismo oligonucleótido sentido pero con un antisentido diferente, que contenía una porción de la secuencia de la primera HA

y añade dos etiquetas adicionales, además este oligonucleótido tiene el sitio de corte por la enzima de restricción *BamHI*. De esta manera el producto final tiene los siguientes elementos: sitio *NotI*-ORF-3HA-sitio *BamHI*.

En otra reacción de PCR se amplificó el terminador de *SOD2*, utilizando un oligonucleótido sentido que se une a la región inmediata al 3'UTR del ORF de *SOD2* y que tiene el sitio de corte de la enzima *BamHI* y un antisentido que tiene el sitio de corte *XhoI*.

Todos los productos de PCR se purificaron utilizando el sistema comercial Expin Combo GP, de GeneAll siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor.

Los productos se digirieron por 16 horas a 37 °C con las enzimas de restricción siguientes:

Promotor+ORF: *NotI* y *BamHI*

Terminador: *BamHI* y *XhoI*

Simultáneamente se digirió el plásmido pGEM4 en dos reacciones con las mismas enzimas de restricción. El DNA de cada una de las tres digestiones se purificó con el sistema mencionado y finalmente se realizaron dos reacciones de ligación, cada una destinada a clonar cada inserto de manera independiente en el plásmido pGEM4 utilizando la enzima T4 DNA ligasa (New England Biolabs) durante 16 horas a 16°C. Las construcciones fueron verificadas por digestión con las enzimas de restricción adecuadas.

Después se realizó una digestión de los dos plásmidos generados en el paso anterior: pGEMT4-*SOD2* (promotor+ORF) y pGEM4 *SOD2* (terminador) y del plásmido pRS316, que es un plásmido de expresión en levadura.

Los productos de las digestiones fueron purificados y finalmente se realizó una reacción de ligación donde se colocaron los tres componentes simultáneamente. La reacción se incubó a 16°C durante 16 horas. Las construcciones fueron verificadas por digestión con enzimas de restricción *NotI/BamHI* y *NotI/XhoI* y mediante secuenciación en la unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular (UNAM).



Para la subclonación del gen *SOD2* sin el terminador del gen (extremo 3'UTR), se realizó una digestión del plásmido anterior y del plásmido pRS316 con las enzimas de restricción NotI y BamHI. Finalmente se preparó una reacción de ligación con los productos de DNA purificados con la enzima T4 DNA ligase de NEB, durante 16 horas a 16°C.

### 5.3 Purificación de los plásmidos

Tanto los plásmidos utilizados para amplificar los casetes de resistencia, como los plásmidos construidos en nuestro laboratorio, se purificaron a partir de cultivos líquidos de bacterias DH5 $\alpha$  transformadas con el plásmido de interés, en medio líquido LB con ampicilina (100  $\mu$ g/ $\mu$ L).

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

### 5.4 Análisis de esporas al azar (Random Spore Analysis)

Las cepas  $\Delta\alpha$  y  $\Delta\beta\Delta\beta'$  (*MAT $\alpha$* ) se crecieron en medio líquido con glucosa como fuente de carbono. Se tomó una porción del cultivo y se sembró en césped en cajas de medio sólido con glucosa. El mismo procedimiento se aplicó para las cepas de la colección BY4741 (*MATa*) que se utilizaron ( $\Delta$ *ho*,  $\Delta$ *sam37*,  $\Delta$ *tom70*,  $\Delta$ *ubp14*,  $\Delta$ *tom70*).

El césped de la cepa  $\Delta\alpha$  o  $\Delta\beta\Delta\beta'$  se replicó en una caja nueva. A continuación el césped de cada cepa presa se replicó encima. Las cajas se incubaron a 30°C durante 1 día (cruza). Las diploides resultantes se replicaron en medio de selección de dobles mutantes (cruzas con  $\Delta\alpha$ -NAC) o triples mutantes (cruzas con  $\Delta\beta\Delta\beta'$ -NAC) y se incubaron durante 2 días a 30°C.

Las células diploides se replicaron en medio de esporulación (con bajo contenido de fuente de carbono y nitrógeno). Se incubaron a 22°C durante 8 días para permitir la generación de esporas.

Luego de este tiempo, se preparó una suspensión de células con 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> y una porción de células de las cajas de esporulación. A continuación se sembraron en cajas que permitían seleccionar el crecimiento de: i) células haploides (SC-His/Arg/lys+can+thial), ii) células resistentes a una u otra mutación de las cepas iniciales (SC-His/Arg/lys+can+thial+higromicina; SC-His/Arg/lys+can+thial+geneticina; SC-His/Arg/lys/Ura+can+thial+geneticina; SC-His/Arg/lys/Ura+can+thial+higromicina), o iii) células dobles (para el caso del RSA con la cepa  $\Delta\alpha$ : SC-His/Arg/lys/+can+thial+higromicina+geneticina) o triples mutantes (para el caso del RSA con la cepa  $\Delta\beta\beta'$ : SC-His/Arg/lys/Ura+can+thial+higromicina+geneticina).

Las cajas se incubaron durante 2 días y se evaluó el fenotipo de crecimiento.

## 5.5 Extracción de proteínas totales

Se prepararon cultivos en medio líquido sintético con galactosa como fuente de carbono hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento. En este punto se tomó el volumen adecuado para tener 2 DO<sub>600</sub> de cada cultivo. Las células se colectaron y lavaron con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. La pastilla se resuspendió en 250  $\mu$ L de Tris 50 mM pH = 8. Luego se añadieron 50  $\mu$ L de solución de extracción (Rödel Mix) (0.3 N hidróxido de sodio, 176 mM 2-mercaptoetanol y 3.5 mM de PMSF) y se incubaron en hielo durante 10 min. Las proteínas se precipitaron añadiendo ácido tricloroacético a una concentración final de 12%. Las muestras se centrifugaron por 30 min a 18,000xg. A continuación se lavaron con 1 mL de acetona y se repitió el paso de centrifugación. La pastilla se resuspendió en 100  $\mu$ L de amortiguador Laemmli (Tris-HCl 60 mM pH = 6.8, glicerol 10%, SDS 2%, 2-ME 5%, azul de bromofenol 0.02%).

## 5.6 Electroforesis desnaturalizante de proteínas (SDS-PAGE)

Se cargaron 0.15 DO<sub>600</sub> de cada muestra de proteínas en geles desnaturalizantes a una concentración de 17.5% de acrilamida y 0.2% de bis-acrilamida. Los geles se corrieron a 30 mAmp por gel, durante 2 horas y 20 minutos, utilizando amortiguador de corrida (ver apéndice I, sección 9.4).

## 5.7 Fraccionamiento celular

Fracciones crudas de mitocondrias fueron preparadas de acuerdo al protocolo de Hermann, 1994. Brevemente, las células fueron crecidas en medio rico con galactosa como fuente de carbono hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento (DO<sub>600</sub> = 1-1.5). Las células se colectaron por centrifugación a 3900xg durante 5 min. Posteriormente se lavaron con H<sub>2</sub>Odd y repitió el paso de centrifugación. Las pastilla celular se resuspendió en 20 mL de amortiguador MP1 y se incubó en agitación a 230 rpm durante 10 min a 30°C. Las células se centrifugaron a 3900xg durante 5 min y se resuspendieron en amortiguador MP2. Se incubaron durante 1 hora en agitación a 230 rpm. Los esferoplastos resultantes se centrifugaron a 3900xg durante 5 min y luego se resuspendieron en amortiguador de homogeneización. Se dieron 30 ciclos con un homogeneizador de presión. El debris celular y los núcleos fueron descartados centrifugando a 3900xg por 5 min. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 13,362xg por 10 min. La pastilla se resuspendió en amortiguador SH (para consultar los componentes de cada amortiguador consultar el apéndice I, sección 9.4), y se denominó mitocondrias crudas, mientras que el sobrenadante se recuperó y se denominó citosol.

## 5.8 Electroforesis nativa (BN-PAGE)

Para el análisis de complejos proteicos se utilizaron geles nativos en gradiente de poliacrilamida (5 al 13%)(Wittig 2006).

Se determinó el contenido de proteína de las muestras mitocondriales por el método de Bradford con el sistema comercial QuickStart Reagent Bradford de Sigma, siguiendo las instrucciones del proveedor. Se tomaron 250  $\mu\text{g}$  de cada muestra y se colectaron por centrifugación a 13,362xg por 2 minutos. Luego se resuspendieron suavemente en 250  $\mu\text{L}$  de amortiguador de lavado. Se centrifugaron nuevamente y se repitió el lavado. La mitocondrias se homogeneizaron en 45  $\mu\text{L}$  de amortiguador de muestra. Se agregaron 5  $\mu\text{L}$  de digitonina al 10% y se incubaron en hielo por 30 minutos.

Las muestras se centrifugaron por 12 minutos a 16,168xg a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se añadieron 2.5  $\mu\text{L}$  de solución de Coomassie Serva G250 al 5%. Finalmente se cargaron 100  $\mu\text{g}$  de cada muestra en los geles.

La corrida se llevó a cabo primero por 22 minutos a 15 mA, utilizando amortiguador del ánodo en el compartimento externo de la cámara de corrida y amortiguador del cátodo con Coomassie al 0.02% en el compartimento interno (esto es aproximadamente un tercio del gel).

Posteriormente el amortiguador del cátodo se cambió por amortiguador del cátodo al 0.002% y se corrió el gel a 7 mA hasta que el frente de corrida saliera. El gel fue transferido a membranas de PVDF por dos horas a 380 mA con amortiguador de transferencia de proteínas (para consultar los componentes de cada amortiguador consultar el apéndice I, sección 9.4)

## 5.9 Inmunorréplica tipo western blot

Después de la electroforesis desnaturante o nativa, las proteínas fueron transferidas de los geles a membranas de PVDF o nitrocelulosa, mediante electrotransferencia vertical en buffer de transferencia. Las membranas de los geles desnaturantes fueron teñidas con rojo

de Ponceau para verificar la presencia de proteínas y la carga de las mismas. Posteriormente se destiñeron con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> y se incubaron una hora o toda la noche con solución de bloqueo (TBS+leche 5%). Las membranas de los geles nativos fueron lavadas con metanol al 100% para eliminar el exceso de colorante Coomassie ServaG250 antes de ser bloqueadas (para consultar los componentes de cada amortiguador consultar el apéndice I, sección 9.4).

Las membranas según fuera el caso, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente, durante dos horas o toda la noche. Posteriormente las membranas se sometieron un ciclo de 3 lavados con el siguiente orden:

1. TBS+tween 20 al 0.1 % por 10 min
2. TBS por 10 min
3. TBS por 10 min

Luego las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario AntiRabbit IgG HRP, a una dilución 1:3000, durante 2 horas a 4°C. Se repitió el ciclo de lavados descrito arriba y se añadió el sustrato Immobilon de Millipore para el revelado de la señal de las proteínas de interés por quimioluminiscencia.

En el caso del anticuerpo  $\alpha$ -HA (utilizado contra las proteínas Sod2 y Mmf1 etiquetadas), la incubación se llevó a cabo durante 2 horas. Luego se lavó según lo descrito arriba y se procedió a revelar directamente, ya que el anticuerpo primario está acoplado a la peroxidasa de rábano.

## 5.10 Ensayo de complementación de fragmentos proteicos

Las secuencias codificantes de los fragmentos [1,2] y [3] de la Dihidrofolato reductasa (DHFR) fueron amplificadas mediante PCR y añadidos en el genoma (mediante recombinación homóloga) justo antes del codón de paro de cada uno de los marcos de lectura abierto de los genes de interés. El segmento [1,2] de la DHFR fue añadido a la región codificante de *SAM37*, *OM14* y *TOM70* en cepas haploides de sexo *MAT $\alpha$* . El segmento [3] se añadió a la región

codificante de *EGD1*, *BTT1*, *EGD2*, *OM14* y *SAM37* en cepas haploides de sexo *MATa*. A continuación se realizaron cruces entre las cepas haploides para obtener diploides que tuvieran los dos fragmentos de la DHFR (Avenidaño-Monsalve M.Clara 2017).

Posteriormente, diluciones seriadas de cultivos en fase exponencial de crecimiento de cada diploide fueron depositadas en placas de medio sólido utilizando agar noble (BioShop, Burlington ON, Canadá) suplementadas con metotrexato [200 mg/mL] (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). Las cepas fueron incubadas a 30°C por 3, 5 o 7 días.

## 5.11 PCR cuantitativa en tiempo real

Las cepas de interés transformadas con el plásmido pGAL1-*SOD2*, fueron inoculadas en medios de cultivo sintético sin uracilo y con galactosa como fuente de carbono. Cuando los cultivos llegaron a la fase exponencial de crecimiento, se realizó la extracción de RNA total utilizando Trizol (Ambion, Foster City, CA, USA) siguiendo las recomendaciones del proveedor. El método involucra el rompimiento de las células con mortero en presencia de nitrógeno líquido.

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando a) cDNA sintetizado usando el kit PhotoScript First Strand cDNA Synthesis (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) y SYBR Green como fluoróforo; b) RNA como molde con las reacciones Kapa Sybr Fast One-Step qTR-PCR (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA).

Los datos de cuatro experimentos individuales se analizaron de acuerdo con el protocolo  $\Delta\Delta C_t$ . El gen *ACT1* fue usado como gen control de expresión constitutiva.

## 6. Resultados

---

### 6.1 NAC no es esencial en *S. cerevisiae*

NAC es un complejo heterodimérico del citoplasma que se compone de una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$ . En *S. cerevisiae* el gen que codifica para la subunidad  $\beta$  está duplicado, por lo tanto existen dos parálogos que codifican dos subunidades  $\beta$  diferentes: *EGD1* que codifica para la subunidad conocida como  $\beta$  y *BTT1* que codifica para la subunidad  $\beta'$ . Esto hace que en una cepa silvestre existan dos complejos NAC ensamblados: el  $\alpha\beta$  y  $\alpha\beta'$  (Reimann et al. 1999; Wiedmann et al. 1994). Con el fin de evaluar el fenotipo de crecimiento, previamente en nuestro laboratorio generamos mutantes nulas sencillas de cada gen de NAC (Ponce-Rojas JC 2012). Observamos que la eliminación de los genes codificantes de NAC no acarrea problemas en la viabilidad de la levadura.

Para tener una visión detallada del impacto de cada subunidad y de cada heterodímero sobre la viabilidad de *S. cerevisiae*, generamos por recombinación homóloga una colección mayor de mutantes que abarcara todas las combinaciones posibles entre los genes codificantes para NAC. Luego evaluamos el fenotipo de crecimiento mediante diluciones seriadas de cultivos en fase exponencial de crecimiento en placas de medio sólido, utilizando fuentes de carbono fermentables y respiratorias (Figura 7). En este análisis fue posible confirmar que ninguna de las subunidades de NAC es esencial para la viabilidad de la levadura en condiciones estándar de laboratorio ya que la eliminación de uno, dos o los tres genes que codifican para NAC no altera el crecimiento. Este resultado es consistente en cualquiera de las fuentes de carbono utilizadas, así como a las diferentes temperaturas de incubación de crecimiento a las que se realizó el ensayo (Figura 7).

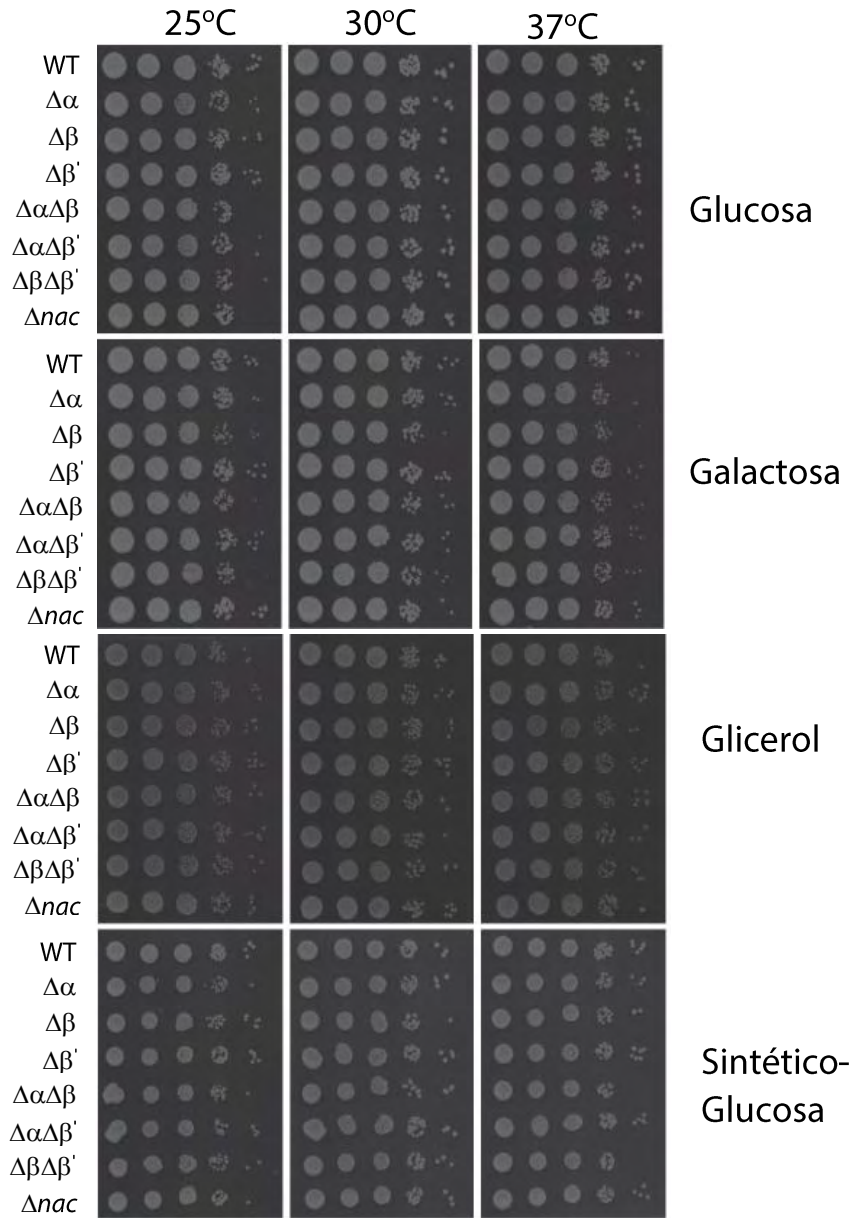


Figura 7. **NAC no es esencial en *S. cerevisiae***. Se prepararon cultivos en fase exponencial de cada cepa indicada y se realizaron diluciones seriadas (1:10) que fueron depositadas en cajas con medio sólido con las fuentes de carbono indicadas. Las cajas fueron incubadas por 1.5 (glucosa), 2 (galactosa) o 3 días (glicerol y sintético glucosa).



## 6.2 La eliminación simultánea de NAC y *SAM37* compromete el crecimiento en *S. cerevisiae*

El resultado anterior indica que NAC no es esencial en *S. cerevisiae*. Partiendo del hecho de que el transporte de proteínas mitocondriales es un proceso esencial, es sorprendente que la función de NAC sea dispensable para la levadura. Una explicación para esto es que en la levadura existen proteínas o complejos proteicos cuya función sostiene los procesos celulares en los que NAC está involucrado. Por ello, previamente en nuestro laboratorio realizamos rastreos de interacciones genéticas a escala genómica, esto es, rastreos sistemáticos de mutantes nulos de genes que al ser eliminados de manera simultánea con los genes codificantes de NAC, afecten la viabilidad del organismo (Ponce-Rojas JC 2012). Identificar estos genes permitiría encontrar factores que cooperen con NAC en la importación de proteínas a la mitocondria.

Este tipo de experimentos se denominan SGA (de las siglas en inglés de Synthetic Genetic Array) y consisten en efectuar cruza entre una mutante carnada haploide (para nuestro caso una mutante  $\Delta\alpha$  o  $\Delta\beta\Delta\beta'$ ) y cada una de las cepas de la colección de mutantes presa haploides (4700 mutantes aproximadamente) para cada uno de los genes no esenciales de la levadura (Tong & Boone 2007; Baryshnikova et al. 2010). De estas cruza se obtienen células diploides, las células son inducidas a esporular para generar nuevas células haploides. Con el uso de los marcadores de selección que se utilizaron para interrumpir los genes de interés y marcadores de selección de sexo, se puede seleccionar genotipos específicos y evaluar su fenotipo de crecimiento, esto es cepas con los genes silvestres, mutantes sencillas o mutantes dobles. Al final se compara el crecimiento de las mutantes sencillas con el de las mutantes dobles. Los resultados que se obtienen en estos experimentos son: a) la doble mutante crece de forma similar a las mutantes individuales, lo que indica que los genes no tienen relación alguna; b) la doble mutante crece mejor que las mutantes individuales, lo que se denomina como una interacción genética positiva (donde una de las mutaciones alivia los efectos provocados por la otra) y c) la doble mutante crece peor que las mutantes individuales. Este

último resultado puede ser de dos tipos: parcial, es decir donde el crecimiento está afectado en cierta medida; o letal, donde la doble mutación provoca la muerte del organismo.

Los resultados de dos rastreos masivos realizados indicaron interacciones genéticas previamente reportadas por otros grupos (Costanzo, 2010). Sin embargo, detectamos interacciones genéticas adicionales de importancia para nuestro trabajo. Dos de estos resultados fueron con los genes *TOM71* y *SAM37* (Ponce-Rojas JC 2012). Ambos se mencionaron en la introducción y se ha reportado que codifican para receptores que facilitan la entrada de proteínas a la mitocondria. Para ambos casos el resultado fue una interacción negativa. Esto hizo pensar en la posibilidad de que NAC actuara de algún modo en conexión con los productos proteicos de dichos genes durante la biogénesis mitocondrial.

Los resultados de los rastreos masivos se comprobaron utilizando la técnica conocida como análisis de esporas al azar o RSA (de las siglas en inglés de Random Spore Analysis), que consiste en reproducir los pasos descritos para un SGA utilizando una muestra de mayor tamaño para cada una de las cruza, obteniendo un resultado mucho más robusto (Figura 8 y 9).

El gen *SAM37* fue elegido para continuar el estudio porque su rol en el transporte de proteínas a la mitocondria no ha sido dilucidado completamente. Tampoco se había reportado su relación con NAC en el proceso de importación de proteínas. Al realizar el RSA confirmamos la interacción genética negativa tanto con *EGD2* como con *EGD1* y *BTT1* (Figura 8 y 9). Se puede apreciar que las colonias de las dobles mutantes crecen en menor medida comparadas con las mutantes individuales.

Una de las características de una cepa  $\Delta sam37$  es la presencia de defectos de crecimiento a medida que se aumenta la temperatura de incubación, en el caso extremo se ha reportado que es incapaz de crecer a partir de 37°C (Wiedemann, 2003). Debido a esto, era necesario probar que la temperatura no estuviera contribuyendo en la interacción genética observada. Por ello realizamos el mismo experimento pero a 25°C, una temperatura permisiva reportada para una cepa  $\Delta sam37$  en ciertos fondos genéticos (Wiedemann, 2003). Se observa que la interacción genética se mantiene también a 25°C lo que indica que el fenotipo

observado es independiente de la temperatura de incubación de las cepas (Figura 8 y Figura 9).

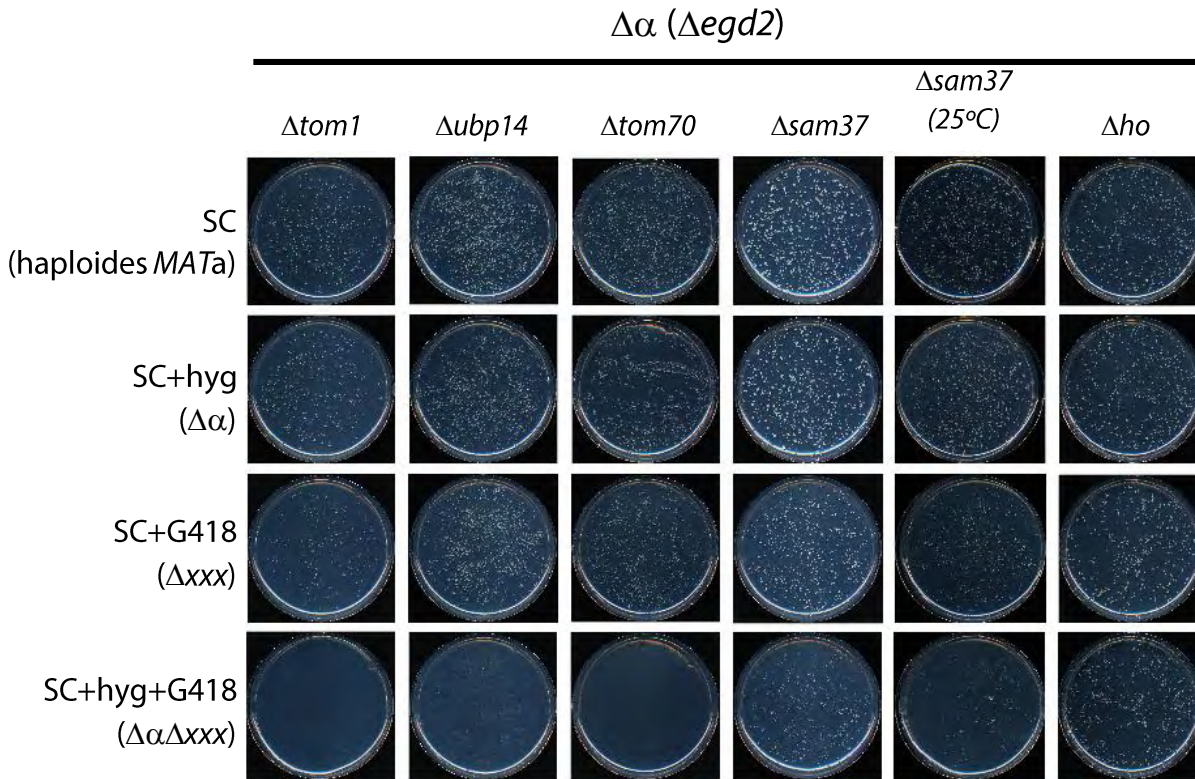


Figura 8. **Confirmación de las interacciones genéticas del gen *EGD2* ( $\alpha$ -NAC).** Después de cruzar la cepa carnada ( $\Delta\alpha$ ) con las diferentes cepas indicadas ( $\Delta xxx$ ), las células diploides obtenidas fueron inducidas a esporular para generar nuevas células haploides. En las placas de medio sólido se depositó dicha progenie en medio sin selección (SC), medios que permiten observar el fenotipo de crecimiento de las cepas que portan una de las dos mutaciones (SC+hyg o SC+G418) o medio que permite el crecimiento únicamente de las dobles mutantes (SC+hyg+G418). Se determina si existe interacción genética al comparar el crecimiento de las mutantes individuales con el de la doble mutante.

Adicionalmente a *SAM37*, en los experimentos de RSA también buscamos confirmar el resultado con *TOM71*. Sin embargo no encontramos interacción genética en cualquiera de las dos cepas mutantes de NAC utilizadas (resultado no mostrado). Esto indica que el resultado fue un falso positivo o la interacción genética es de baja intensidad.

Previamente había sido reportada la interacción letal de *TOM70* (el parálogo de *TOM71*) con el gen *EGD2* (Costanzo et al. 2010). Nosotros no pudimos obtener el resultado en los análisis de SGA debido a que no disponíamos de la cepa  $\Delta tom70$  en la colección de mutantes. Por ello

generamos la cepa  $\Delta tom70$  y la añadimos a nuestros experimentos de RSA. El resultado confirmó la interacción genética letal con  $EGD2$  (Figura 8). Este efecto es específico ya que realizar el experimento con la mutante  $\Delta\beta\Delta\beta'$  no genera problemas en el fenotipo de crecimiento (Figura 9). Como controles positivos, evaluamos la interacción genética negativa de los genes NAC con  $TOM1$  y  $UBP14$ , reportadas previamente (Costanzo et al. 2010). El resultado se reprodujo como se esperaba. Finalmente en ambos experimentos utilizamos como control negativo una cepa mutante  $\Delta ho$ , que no tiene relación alguna con NAC. La mutante nula de dicho gen no presenta interacción genética con NAC (Figuras 8 y 9).

$\Delta\beta\Delta\beta'$  ( $\Delta egd1\Delta btt1$ )

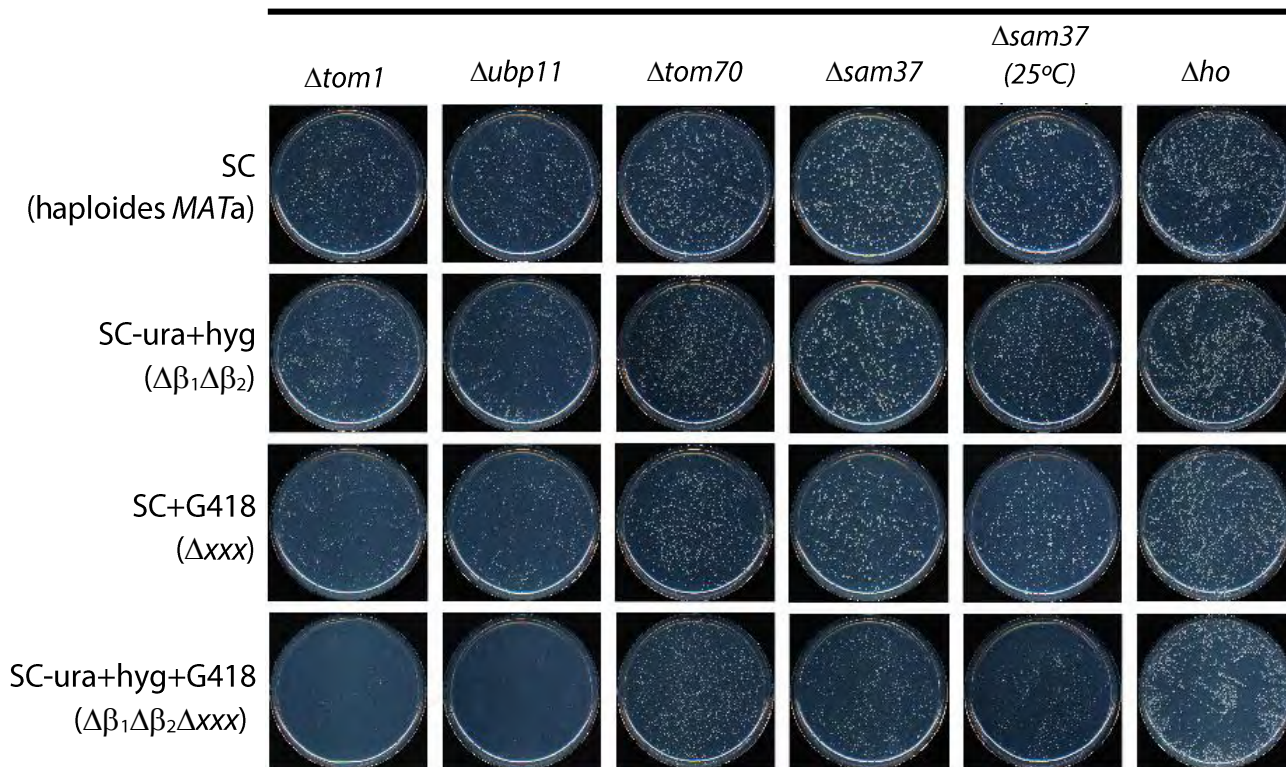


Figura 9. **Confirmación de las interacciones genéticas de los genes  $EGD1(\beta\text{-NAC})$  y  $BTT1(\beta'\text{-NAC})$ .** Después de cruzar la cepa carnada ( $\Delta\beta\Delta\beta'$ ) con las diferentes cepas indicadas ( $\Delta xxx$ ), las células diploides obtenidas fueron inducidas a esporular para generar nuevas células haploides. En las placas de medio sólido se depositó la progenie en medio sin selección (SC), medios que seleccionan el crecimiento de las cepas con la mutación en  $sam37$  (SC+G418) o en  $\beta'\text{-NAC}$  (SC-ura+hyg) o que permiten evaluar el crecimiento únicamente de las triples mutantes (SC-ura+hyg+G418). Se determina si existe interacción genética al comparar el crecimiento de las mutantes en  $sam37$  o  $\beta'\text{-NAC}$  con el de las triples mutantes.

### 6.3 La eliminación de $\alpha\beta'$ -NAC y *SAM37* afecta el fenotipo de crecimiento

Hasta este punto, confirmamos la interacción genética entre los genes de NAC y *SAM37*. Sin embargo la limitante al utilizar una cepa doble mutante  $\Delta\beta\Delta\beta'$  en uno de los RSA, es la incapacidad de definir si la interacción genética ocurre con *EGD1* ( $\beta$ ), con *BTT1* ( $\beta'$ ) o con ambos genes. También quedaba pendiente definir si el fenotipo de crecimiento es el mismo cuando se utilizan mutantes dobles de NAC que eliminen los dos complejos ensamblados con *SAM37*. Por ello generamos una segunda colección de mutantes de NAC y *SAM37* que involucren todas las combinaciones posibles. Se analizó el fenotipo de crecimiento de las cepas generadas mediante el análisis de diluciones seriadas de cultivos en fase exponencial de crecimiento en cajas de medio sólido (Figura 10).

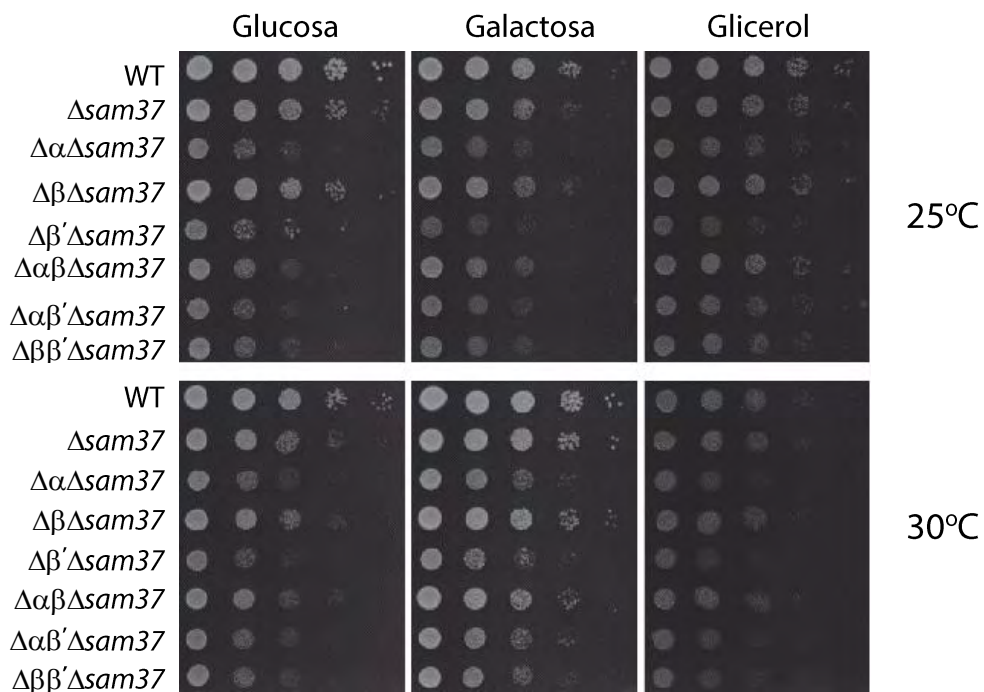


Figura 10. **La eliminación simultánea de  $\alpha$ -NAC,  $\beta'$ -NAC o ambas y *SAM37* afecta el crecimiento en *S. cerevisiae*.** Diferentes mutantes de los genes codificantes para NAC y *SAM37* fueron generadas por recombinación homóloga. Diluciones seriadas de cultivos en fase logarítmica de cada cepa fueron depositadas en placas de medio sólido. Se analizó el fenotipo de crecimiento en medio fermentable (glucosa, galactosa) y respiratorio (glicerol) y a 25 y 30°C.



Nuevamente observamos un crecimiento disminuido en la mutante  $\Delta sam37$ . Esto ocurre en todas las condiciones probadas; es decir, en medio fermentable o respiratorio y en las dos temperaturas de crecimiento: 25 y 30°C. El resultado confirma lo que se había observado por otros grupos previamente en otros fondos genéticos de levadura (Wiedemann 2003; Dukanovic et al. 2009); esto es, aun con la disminución en la temperatura de incubación a 25°C, la mutante  $\Delta sam37$  crece en menor medida que la cepa silvestre.

Se aprecia que el fenotipo de crecimiento de la mutante  $\Delta sam37$  empeora con la eliminación simultánea de  $\alpha$ -,  $\beta'$ - o  $\alpha\beta'$ -NAC. Dado que el crecimiento de la cepa  $\Delta\beta\Delta sam37$  es similar al de la mutante  $\Delta sam37$  sencilla, concluimos que la interacción genética solo ocurre entre  $SAM37$  con  $EGD2$  y  $SAM37$  con  $BTT1$ . Nuevamente, el resultado es independiente de la fuente de carbono utilizada y de la temperatura de crecimiento a la que se realice el experimento (Figura 10).

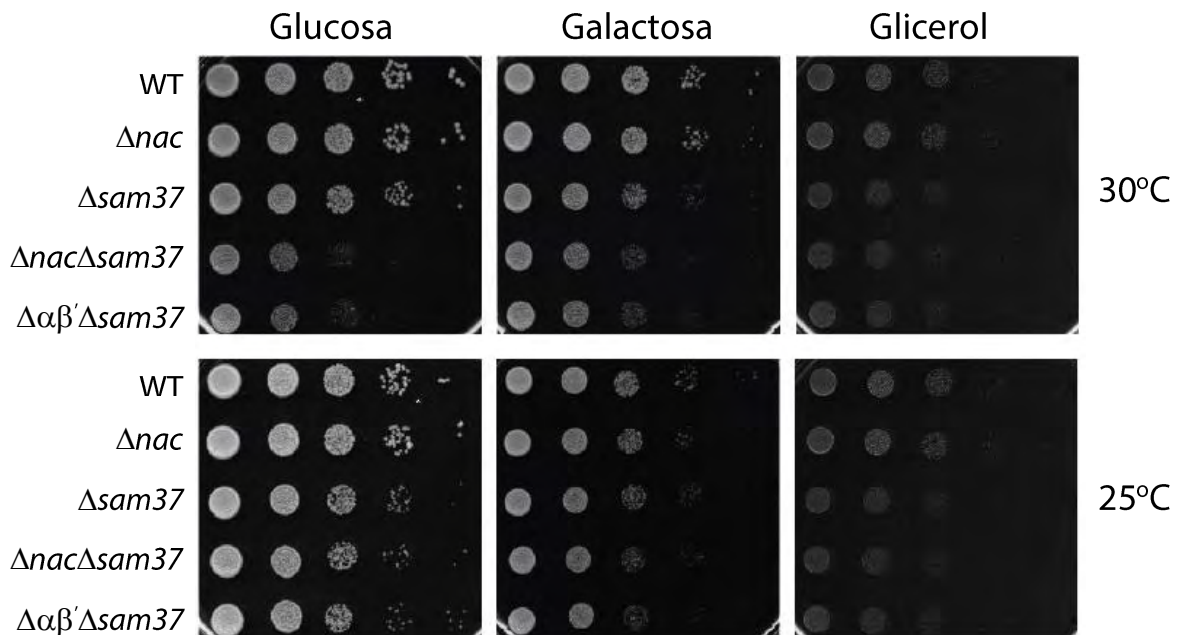


Figura 11. La cepa mutante  $\Delta nac\Delta sam37$  presenta el mismo crecimiento que una cepa  $\Delta\alpha\beta'\Delta sam37$ . Se prepararon cultivos en fase exponencial de cada cepa indicada y prepararon diluciones seriales 1:10 que fueron depositadas en cajas de medio sólido con las fuentes de carbono indicadas. Las cajas fueron incubadas por 1.5 (glucosa), 2 (galactosa) o 3 días (glicerol) y a 25 y 30°C.

Adicionalmente se generó y analizó el crecimiento de una mutante cuádruple  $\Delta nac\Delta sam37$ . El fundamento detrás es que en la mutante  $\Delta\alpha\beta'\Delta sam37$ , puede existir aún la subunidad  $\beta$  libre en el citosol, que podría ser causante de los efectos que estamos observando. El resultado (Figura 11) indica que la cuádruple mutante  $\Delta nac\Delta sam37$  presenta un crecimiento similar al de la cepa  $\Delta\alpha\beta'\Delta sam37$ . Es decir, los efectos observados son debidos a la ausencia específica de  $\alpha\beta'$ -NAC y *SAM37*.

Para mostrar que la relación genética observada se debe exclusivamente a la eliminación de los genes de interés, realizamos un experimento control en el que complementamos a las cepas con un plásmido que permite expresar ectópicamente a *SAM37* (Figura 12). La sobreexpresión de *SAM37* restablece casi por completo el fenotipo de crecimiento de las cepas  $\Delta sam37$  y  $\Delta\beta'\Delta sam37$ .

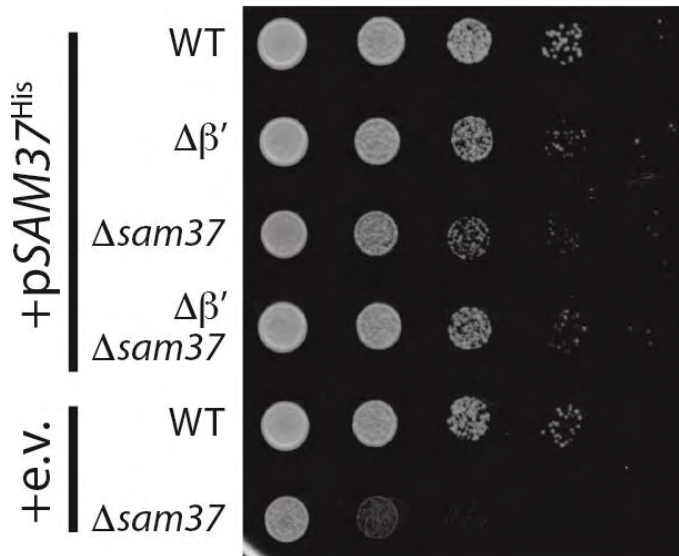


Figura 12. ***SAM37* recupera el crecimiento de las cepas mutantes  $\Delta sam37$  y  $\Delta\beta'\Delta sam37$ .** Diluciones seriadas de cultivos en fase exponencial de crecimiento de las cepas mencionadas en la figura, fueron depositadas en cajas de medio sólido con glucosa como fuente de carbono. Las cajas fueron incubadas durante 3 días a 30°C. e.v.: plásmido vacío.

## 6.4 La eliminación de $\alpha\beta'$ -NAC y Sam37 compromete la biogénesis de proteínas mitocondriales

Hasta ahora los resultados presentados indican que existe una relación genética entre  $\alpha\beta'$ -NAC y SAM37. Dado que nuestra hipótesis propone que la importación de las proteínas a la mitocondria es el proceso celular en el que ambos factores participan, decidimos evaluar los niveles basales de las proteínas mitocondriales presentes en extractos celulares totales. En total analizamos ocho proteínas localizadas en diferentes subcompartimentos mitocondriales en las mutantes de NAC y SAM37. Como proteínas de la membrana externa se analizaron a Tom20 y Tom40. Utilizamos a Oxa1 y Mdm38 como proteínas integrales de la membrana interna. Finalmente se probaron cuatro proteínas de la matriz mitocondrial: Atp1, Nfs1, Sod2 y la mtHsp70. Como control de carga se utilizó a la proteína citosólica Hog1. El experimento fue realizado tanto a 25 (Figura 13) como a 30°C (Figura 14).

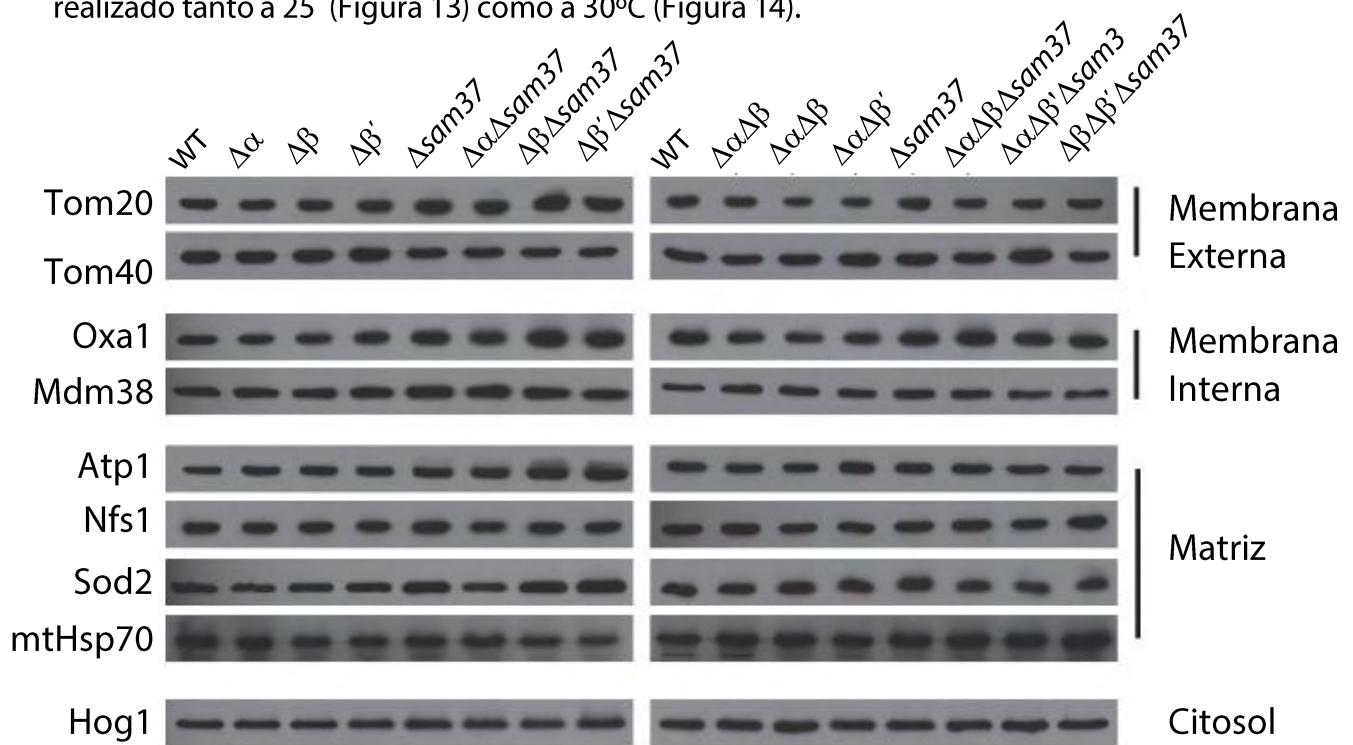


Figura 13. **NAC y Sam37 son dispensables para la biogénesis de proteínas mitocondriales a 25°C.**

Se prepararon cultivos líquidos de cada cepa indicada a 25°C. Cuando las cepas alcanzaron una  $\text{DO}_{600} = 1$ , se realizó un extracto de proteínas totales. Se cargaron 0.2  $\text{DO}_{600}$  de proteína total en geles desnaturizantes, cada proteína se analizó por inmunodetección con anticuerpos específicos.



Los niveles basales de todas las proteínas analizadas provenientes de cultivos a 25°C son similares a los de la cepa silvestre (Figura 13). Sin embargo, al realizar el experimento a 30°C observamos una disminución en algunas proteínas mitocondriales: Tom40, Oxa1, Atp1, Nfs1 y Sod2 (Figura 14). En Tom40 se aprecia que existe una disminución en la cantidad de proteína en la mutante  $\Delta sam37$  tal y como se había reportado previamente (Wiedemann, 2003; Dukanovic et al. 2009). Sin embargo, la disminución de Tom40 es mayor si además de *SAM37* también se eliminan  $\alpha$ ,  $\beta'$ -NAC o ambas. Este efecto también sucede para Oxa1, Atp1 y Nfs1.

El efecto es específico para las mutantes que involucran la eliminación de las subunidades de  $\alpha\beta'$ -NAC, ya que en la mutante  $\Delta\beta\Delta sam37$  no existen alteraciones en el nivel basal de las proteínas con respecto a la cepa  $\Delta sam37$  sencilla (Figura 14). Se observa esto mismo en la mutante  $\Delta\alpha\Delta\beta\Delta sam37$ .

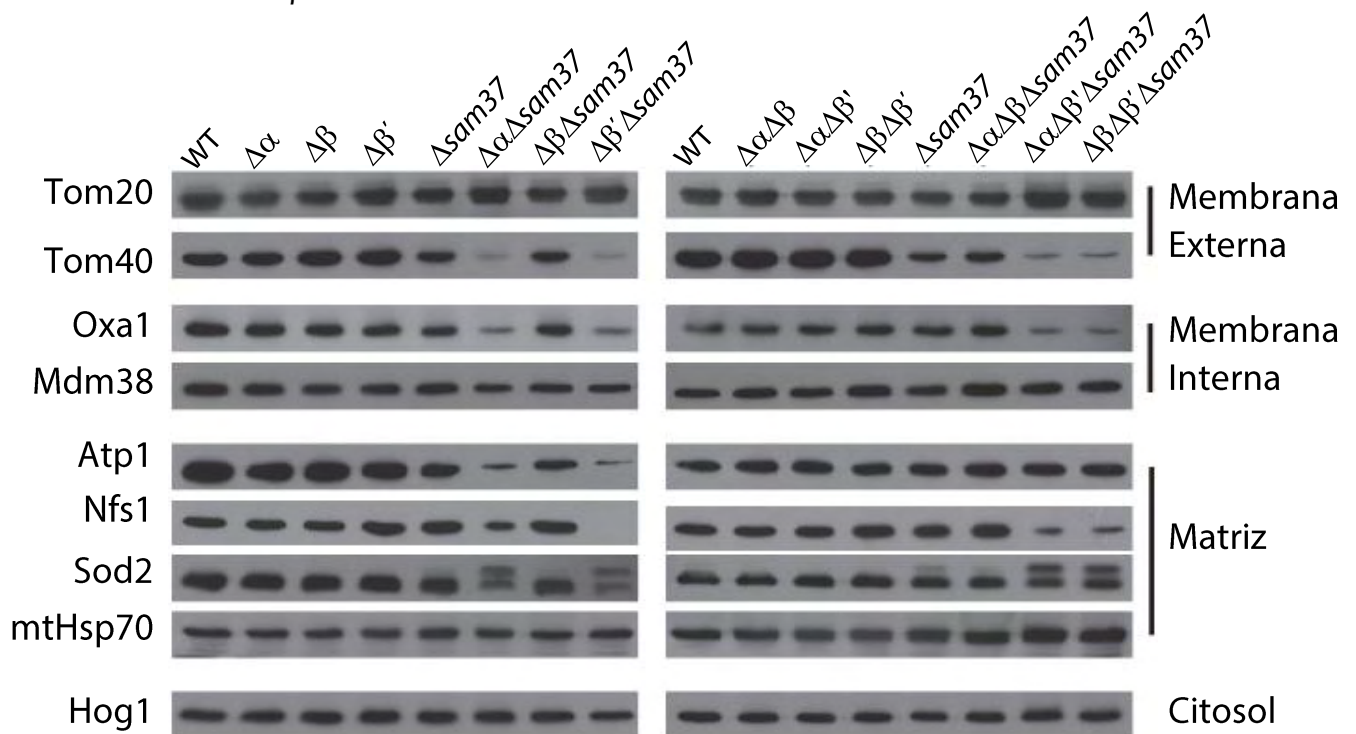


Figura 14. **NAC y Sam37 son importantes para la biogénesis de ciertas proteínas mitocondriales a 30°C.** Se prepararon cultivos líquidos de cada cepa indicada a 30°C. Cuando las cepas alcanzaron una  $DO_{600} = 1$ , se realizó un extracto de proteínas totales. Se cargaron 0.2  $DO_{600}$  de proteína total en geles desnaturizantes, cada proteína se analizó por inmunodetección con anticuerpos específicos.

Estos resultados concuerdan con el fenotipo observado en el crecimiento de las mutantes, siendo las de crecimiento más lento aquellas cuyo contenido basal de estas proteínas está comprometido (Figura 10).

De manera paralela analizamos el nivel basal de algunas proteínas mitocondriales en la cuádruple mutante  $\Delta nac\Delta sam37$ , nuevamente para descartar efectos indirectos debido a la presencia de  $\beta$ -NAC libre en nuestras cepas de interés (Figura 15).

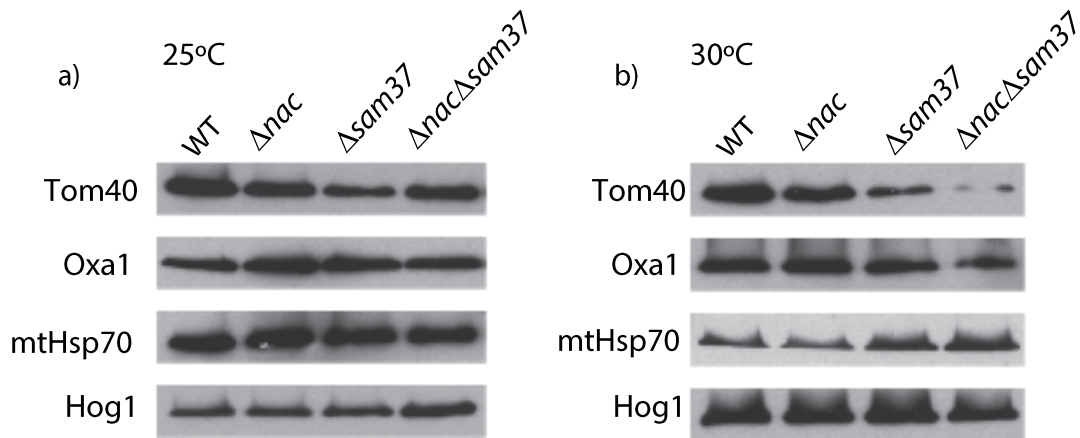


Figura 15. **La mutante cuádruple  $\Delta nac\Delta sam37$  presenta un contenido mitocondrial alterado.** Se prepararon cultivos líquidos de cada cepa indicada a a) 25 y b) 30°C. Cuando las cepas alcanzaron una  $DO_{600} = 1$ , se realizó un extracto de proteínas totales. Se cargaron 0.2  $DO_{600}$  de proteína total en geles desnaturizantes, cada proteína se analizó por inmunodetección con anticuerpos específicos.

Observamos que la tendencia es la misma. El contenido de proteínas no cambia cuando el experimento se realiza a 25°C (Figura 15a), sin embargo, sí se afecta cuando las cepas son incubadas a 30°C (Figura 15a). El resultado sugiere nuevamente que la presencia de la subunidad  $\beta$ -NAC en ausencia de  $\alpha\beta'$  no influye en los resultados obtenidos.

Es importante señalar que en el caso particular de Sod2, no solo observamos un contenido disminuido de la proteína; adicionalmente observamos la aparición de una proteína de alto peso molecular que correlaciona con el peso esperado para la proteína precursora, es decir, la proteína que aún conserva su MTS (secuencia señal). Es probable que en este caso la proteína no esté logrando ingresar al organelo y se quede en el citoplasma conservando su presecuencia. Otra opción sería que la peptidasa de la matriz mitocondrial que se encarga de

procesar las MTSs se encuentre afectada, pero esta segunda posibilidad parece poco probable, debido a que el resto de las proteínas con presecuencia como Oxa1 y Mdm38, sí se encuentran correctamente procesadas.

Nuestros resultados en conjunto resaltan el papel funcional de  $\alpha\beta'$ -NAC y Sam37 en la importación de proteínas a la mitocondria. Estos resultados permiten explicar el fenotipo de crecimiento observado, relacionándolo con un posible defecto en el transporte de proteínas mitocondriales.

## 6.5 El precursor de Sod2 se acumula en el citosol con la eliminación de $\alpha\beta'$ -NAC y Sam37

Se mencionó que la biogénesis de Sod2 está afectada en nuestras mutantes al grado de acumular la forma precursora de la proteína (pSod2). Dado que la importación de Sod2 a la mitocondria sucede estrictamente de modo cotraduccional, una posibilidad es que pSod2 se quede en el citosol y no logre entrar a la mitocondria. Se ha probado antes que el precursor de Sod2 se acumula en el citosol bajo ciertas condiciones experimentales (Luk et. al. 2005). Por ello, para probar si este era el caso se realizó un fraccionamiento celular separando las mitocondrias del citosol (Figura 16).

Observamos que la versión madura de la proteína (mSod2) está presente únicamente en la fracción mitocondrial. Por otro lado, pSod2 sólo está presente en el sobrenadante posmitocondrial (citosol) lo que confirma la hipótesis de que Sod2 no logra entrar a la mitocondria y se queda fuera del organelo (Figura 16). Es importante enfatizar que las mutantes en las que se acumula pSod2 corresponden a las mutantes que presentan los defectos de crecimiento más notorios y los niveles basales de proteínas alterados.

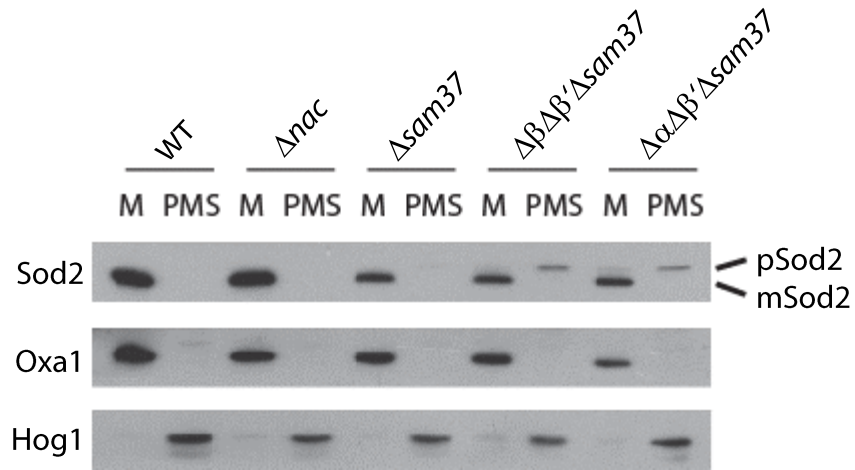


Figura 16. **En ausencia de  $\alpha$  y  $\beta'$  NAC la versión precursora de Sod2 (pSod2) se acumula en el citosol.** Se prepararon cultivos de cada cepa indicada a 30°C. Cuando las cepas alcanzaron una  $DO_{600} = 1$ , se realizó un fraccionamiento celular por centrifugación diferencial. Se cargaron 0.2  $DO_{600}$  de cada muestra en geles desnaturalizantes, siendo M la fracción mitocondrial y PMS: el sobrenadante posmitocondrial. La membrana de PVDF obtenida fue decorada con anticuerpos específicos contra HA (Sod2), mtHsp70: control de fracción mitocondrial y Hog1: control de fracción citosólica.

## 6.6 La acumulación de precursores mitocondriales ocurre desde etapas tempranas de su síntesis

La acumulación de pSod2 en el citoplasma en ausencia de  $\alpha\beta'$ -NAC y SAM37 indica que estos componentes están involucrados en la regulación de la entrada de proteínas a la mitocondria. Esto podría deberse a que exista un problema en la eficiencia de entrega de pSod2 a la mitocondria o, alternativamente, a que al expresar *SOD2* desde un plásmido, a pesar de estar regulado por su propio promotor, se produzca un exceso de precursor que esté saturando las maquinarias de importación, como el complejo TOM en la membrana externa. Para distinguir entre estas dos posibilidades, decidimos evaluar la importación de Sod2 mediante una cinética de síntesis de la proteína. Para ello subclonamos el ORF del gen junto a su extremo 3'UTR en un plásmido regulado por el promotor *GAL1* (inducible con galactosa). El plásmido construido se utilizó para transformar las cepas mutantes analizadas en este trabajo y el nivel basal de proteína fue analizado a diferentes tiempos después de inducir la expresión de Sod2 (Figura 17).

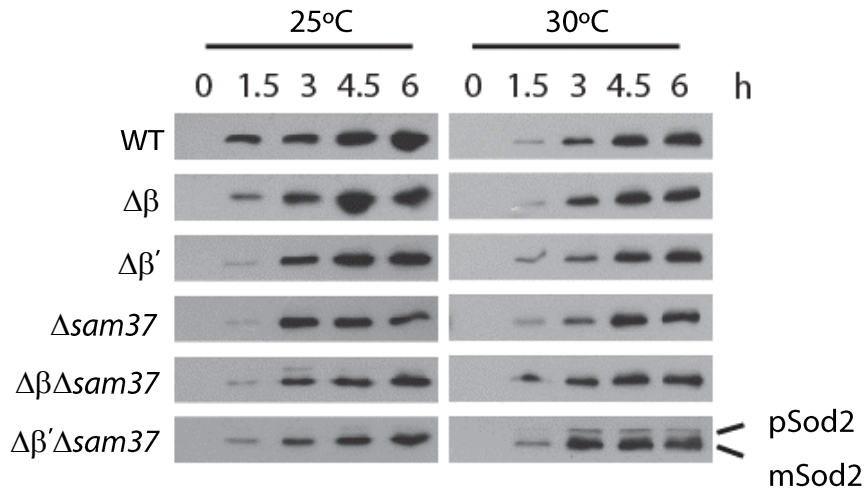


Figura 17. **En ausencia de  $\beta'$ -NAC y SAM37 a acumulación de pSod2 ocurre simultáneamente con la síntesis de la proteína.** Se prepararon cultivos de cada cepa indicada a 25 y 30°C transformadas con un plásmido que permite expresar de manera regulada la proteína Sod2-2HA. Cuando las cepas alcanzaron una  $DO_{600}=1$ , se realizó la inducción del inductor de la expresión de Sod2-2HA (galactosa) y se incubaron las cepas durante los tiempos indicados en la figura. En cada tiempo se realizó extracción de proteínas totales. Se cargaron 0.2  $DO_{600}$  de proteína total en geles desnaturizantes. Cada proteína se analizó por inmunodetección con anticuerpos específicos.

Como en los casos anteriores, el experimento se llevó a cabo tanto a 25 como a 30°C. El resultado indica que la acumulación de pSod2 solamente ocurre a 30°C y que empieza desde momentos tempranos de su síntesis (Figura 17,  $t=1.5$  y 3 h). Esto sucede únicamente para la mutante  $\Delta\beta'\Delta sam37$ , la cual fue una de las cepas que acumuló pSod2 cuando se evaluaron los niveles basales de proteínas (Figura 12). A 25°C se observa que no hay acumulación de pSod2 incluso en la mutante  $\Delta\beta'\Delta sam37$ .

A continuación decidimos evaluar si los efectos que estamos observando son específicos para Sod2. Por ello se realizó un experimento similar pero ahora con otra proteína reportada como sustrato de NAC: la proteína mitocondrial Mmf1 (George, 2002). Como en el caso anterior, el gen se clonó en un plásmido de expresión regulada y se realizó la cinética de síntesis de la proteína en las cepas de levadura (Figura 18).

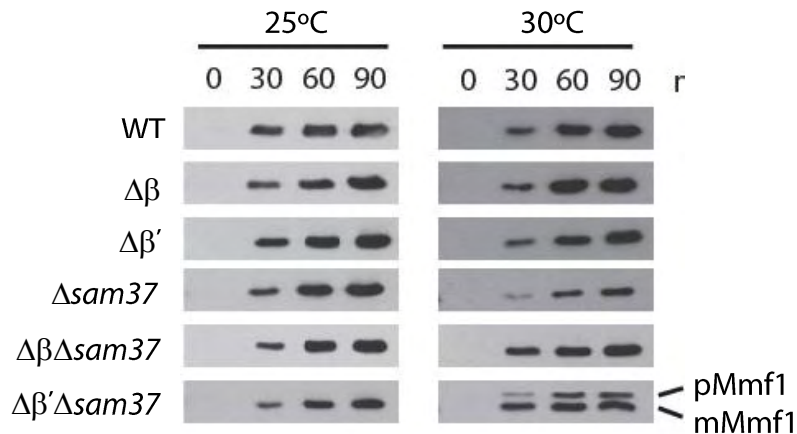


Figura 18. **La acumulación de pMmf1 ocurre desde fases tempranas de la síntesis de la proteína.** El experimento se realizó como se describe en la figura 17 con las siguientes modificaciones: a) se indujo la expresión de Mmf1-3HA, b) los tiempos de inducción se redujeron a los indicados en la figura. En cada tiempo se preparó un extracto de proteínas totales, de los cuales se cargaron 0.2 DO<sub>600</sub> en geles desnaturizantes seguido de electrotransferencia e inmunodetección con anticuerpos específicos. pMmf1: Mmf1 versión precursora; mMmf1: versión madura.

Observamos que Mmf1 también se acumula en su forma precursora desde las fases tempranas de su síntesis. Nuevamente esto sólo ocurre cuando la temperatura de crecimiento es de 30°C. Esto indica que los defectos observados antes no son específicos de Sod2, sino que es un defecto presente en proteínas sustrato del complejo NAC.

También analizamos la localización de las dos versiones de Mmf1. El resultado indica que pMmf1 está localizada en el sobrenadante posmitocondrial (citósol) tal y como ocurre con Sod2, mientras que mMmf1 permanece en la mitocondria (Figura 19). Con esto concluimos que la ausencia de  $\alpha\beta'$ -NAC y Sam37 provoca una acumulación de precursores mitocondriales en el citósol.

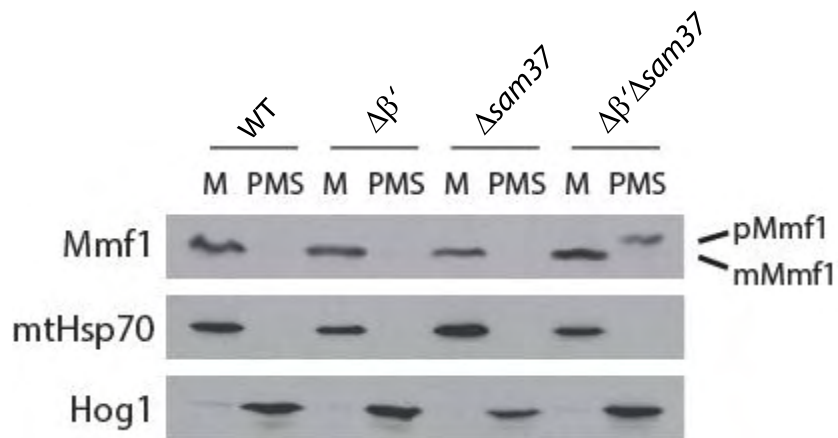


Figura 19. **En ausencia de  $\beta'$ -NAC y SAM37 la versión precursora de Mmf1 (pMmf1) se acumula en el citosol.** Se prepararon cultivos de cada cepa indicada a 30°C. Cuando las cepas llegaron a una  $DO_{600}=1$ , se realizó un fraccionamiento celular por centrifugación diferencial. Se cargaron 0.2  $DO_{600}$  de cada muestra en geles desnaturalizantes, siendo M la fracción mitocondrial y PMS: el sobrenadante posmitocondrial. La membrana de PVDF fue decorada con anticuerpos específicos contra HA (Mmf1), mtHsp70: control de fracción mitocondrial y Hog1: control de fracción citosólica.

## 6.7 Los defectos en la biogénesis de las proteínas mitocondriales en las mutantes de $\alpha\beta'$ -NAC y SAM37 no se deben a defectos del ensamblaje del complejo TOM

Se ha reportado que en una cepa  $\Delta sam37$  la biogénesis de barriles- $\beta$  esta alterada. Uno de los sustratos de esta vía es Tom40, el poro central para la translocación de proteínas a la mitocondria del complejo TOM. Era importante determinar que en nuestras mutantes había complejo TOM ensamblado que llevara a cabo la importación de proteínas mitocondriales.

De esta manera analizamos el nivel basal de complejo TOM mediante la purificación de las mitocondrias y la solubilización de sus membranas con digitonina, seguido de separación de los complejos proteicos mediante electroforesis nativa, electrotransferencia e inmunodetección. Como en los casos anteriores, el experimento se realizó tanto a 25 como a 30°C (Figura 20).

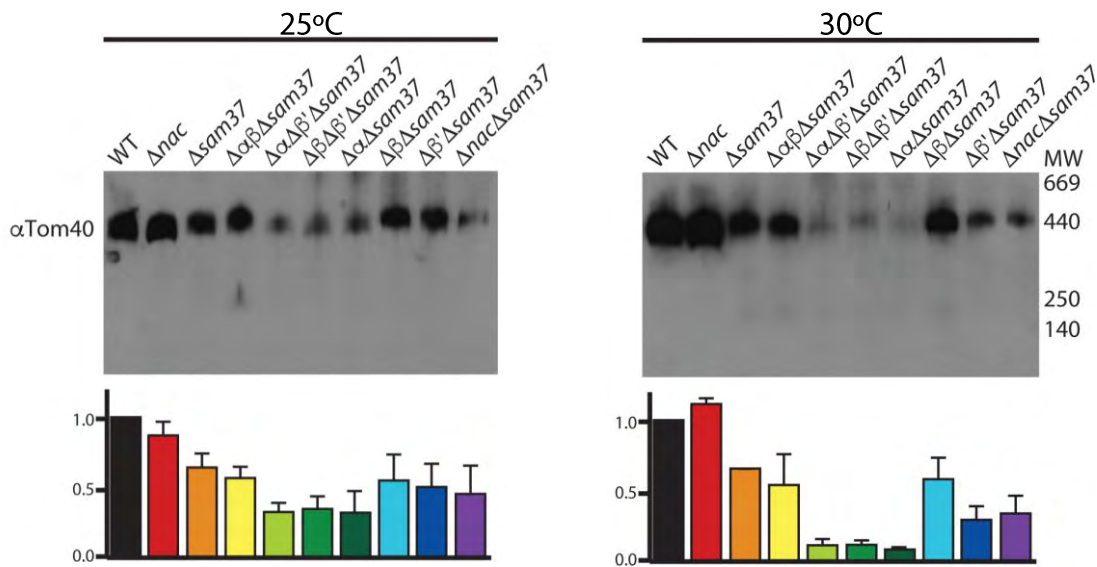


Figura 20. **La eliminación simultánea de  $\alpha\beta'$ -NAC y SAM37 compromete la biogénesis de TOM.** Se prepararon cultivos de cada cepa indicada tanto a 25 como a 30°C. Cuando las cepas alcanzaron una  $DO_{600} = 1$ , se realizó purificación de las mitocondrias. Cantidades equivalentes de mitocondrias solubilizadas con digitonina (al 10 %) fueron cargadas en geles azules nativos. Los complejos proteicos fueron electrotransferidos a membranas de PVDF y posteriormente las membranas se decoraron con un anticuerpo específico contra la proteína Tom40. Las gráficas representan la cuantificación de las señales obtenidas en tres experimentos independientes, se muestra la desviación estándar en cada caso. Las señales de cada experimento se normalizaron con la señal observada en la cepa silvestre (negro).

Lo primero que se observa es que la cantidad de complejo TOM no se afecta con la eliminación de NAC (barras rojas). Como se esperaba, en el caso de la mutante sencilla  $\Delta sam37$  el nivel de complejo TOM disminuye moderadamente, tal como se había reportado previamente y en ambas temperaturas (barras naranjas). Este efecto se agrava con la eliminación simultánea de los genes que codifican para el complejo  $\alpha\beta'$ -NAC (barras verdes) independientemente de la temperatura. Esto indica que la baja cantidad de TOM no es la razón por la que se generan los problemas antes observados en los niveles basales de proteínas mitocondriales. En otras palabras, si la disminución de TOM fuera la causa de los efectos en las mutantes carentes de  $\alpha\beta'$ -NAC y SAM37, entonces a 25°C también deberíamos encontrar una disminución en la cantidad de proteínas mitocondriales. Dado que esto no ocurre, pensamos que existe una función directa de Sam37 y  $\alpha\beta'$ -NAC en el transporte de proteínas a la mitocondria. Este resultado junto al presentado en la cinética de procesamiento de Sod2 y



Mmf1 sugieren que la cantidad de TOM existente en nuestras mutantes es suficiente para sostener la importación.

Finalmente, la eliminación de  $\beta$ -NAC junto con *SAM37* no provoca una gran alteración en el nivel de TOM. Esto indica nuevamente que la relación de Sam37 es específica con  $\alpha\beta$ -NAC.

## 6.8 La sobreexpresión de *TOM6* en las mutantes de estudio suprime los defectos de Tom40 mas no los de Oxa1

Otra estrategia para determinar si la disminución del complejo TOM observado en las mutantes carentes de  $\alpha\beta$ -NAC y *SAM37* está relacionado con los fenotipos observados, fue realizar un experimento de sobreexpresión de *TOM6*. Se ha reportado que *TOM6* es un supresor parcial (en alto número de copia) de la eliminación de *SAM37* (Dukanovic, 2007). Por ello, transformamos nuestras cepas con un plásmido que permite expresar a *TOM6* bajo el control de un promotor fuerte y en alto número de copias (Figura 21).

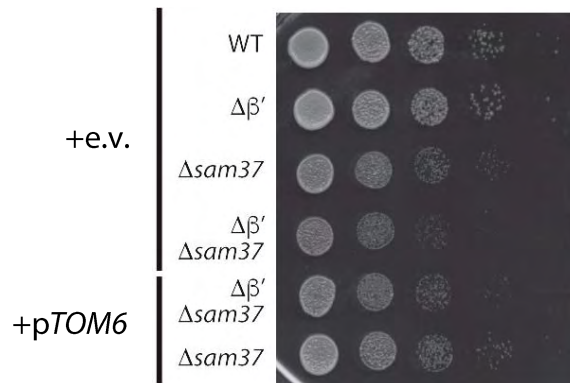


Figura 21. **La sobre-expresión ectópica de *TOM6* suprime el fenotipo de crecimiento de las mutantes nulas de *sam37*.** Las cepas indicadas fueron transformadas con el plásmido pRS426-TOM6 (Dukanovic, 2007). Posteriormente, diluciones seriadas de cultivos en fase logarítmica de crecimiento fueron depositados en cajas de medio sólido con glucosa como fuente de carbono. Las cepas fueron incubadas por 2 días a 30°C. +e.v.: vector vacío.

De manera inicial, evaluamos el crecimiento de las cepas mediante diluciones seriadas en medio sólido. Observamos que la sobreexpresión de *TOM6* rescata parcialmente el crecimiento en las dos cepas transformadas, la mutante  $\Delta sam37$  y la  $\Delta\beta'\Delta sam37$  (Figura 21).

Posteriormente se analizó el contenido basal de proteínas mitocondriales en extractos totales de proteínas. Tal como se había descrito (Dukanovic, 2007), la mutante  $\Delta sam37$  recupera la cantidad de la proteína Tom40 (Figura 22). Observamos que esta recuperación ocurre también para la mutante  $\Delta\beta'\Delta sam37$ . De modo contrastante, el nivel basal de Oxa1 en la mutante  $\Delta\beta'\Delta sam37$  permanece reducido a pesar de la sobreexpresión de *TOM6* (Figura 22).

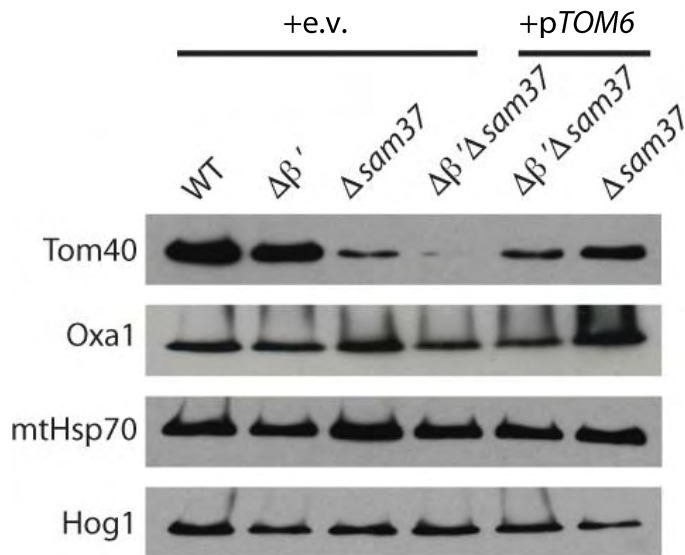


Figura 22. **La expresión ectópica de *TOM6* restablece el contenido basal de Tom40 pero no el de *Oxa1*.** Se prepararon cultivos en fase exponencial de crecimiento de cada cepa indicada. Luego se realizó la precipitación de las proteínas totales. 0.2 DO<sub>600</sub> de proteína se cargaron en geles desnaturizantes, seguido de electrotransferencia e inmunodetección con anticuerpos específicos.

Además de los dos aspectos mencionados antes, decidimos evaluar también el contenido de complejo TOM. Por ello purificamos mitocondrias, solubilizamos sus membranas y realizamos electroforesis nativa de sus proteínas seguida de inmunodetección (Figura 23). El resultado indica que el contenido de complejo TOM se recupera en ambas mutantes tras la sobreexpresión de *TOM6*, siendo de modo más sutil en la cepa  $\Delta\beta'\Delta sam37$ . Esto indica

nuevamente que TOM no es directamente el responsable de los fenotipos observados antes. Es decir, a pesar de que recuperamos la cantidad de TOM con la sobreexpresión de *TOM6*, la cantidad de Oxa1 permanece reducida, apuntando a la participación directa de  $\alpha\beta$ -NAC y Sam37 en la biogénesis de la proteína Oxa1.

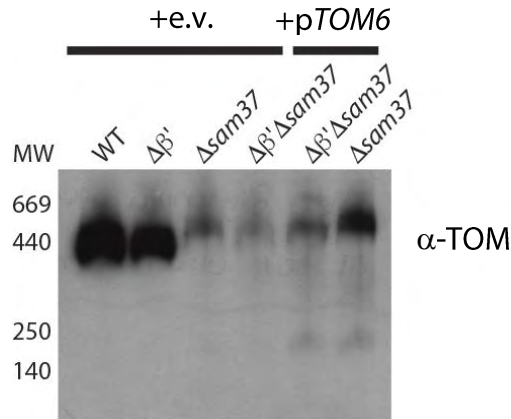


Figura 23. **La sobreexpresión de *TOM6* reestablece parcialmente los niveles estacionarios del complejo TOM.** Se prepararon cultivos de cada cepa indicada a 25°C y a 30°C. Cuando las cepas alcanzaron una  $DO_{600} = 1$ , se purificaron mitocondrias y se solubilizaron sus membranas con digitonina. Se cargaron 100  $\mu\text{g}$  de proteína en geles nativos, seguido de electrotransferencia e inmunodetección con anticuerpos específicos.

## 6.9 Existe una red de interacciones físicas entre diversos componentes de la maquinaria de importación de proteínas mitocondriales

Hasta ahora nuestros resultados indican que NAC y Sam37 actúan de manera coordinada para mediar el transporte de proteínas a la mitocondria, una incógnita era si estos dos componentes interaccionan físicamente. Para ello se realizó un experimento de complementación de fragmentos proteicos o PCA (de las siglas en inglés de Protein fragment Complementation Assay). El experimento aprovecha la posibilidad de dividir a la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) en dos fragmentos y posteriormente reconstituirla a su forma activa en el interior de las células. La secuencia del gen que codifica para cada segmento de la DHFR es fusionada a los extremos 3' de los genes blanco (que codifican para las proteínas cuyas interacciones se quieren probar), justo antes del codón de paro del marco de lectura abierto. Esto se hace por separado en dos cepas de sexo opuesto de levadura. Luego, estas cepas se

cruzan con el objetivo de tener cepas diploides que son crecidas en medio sintético que contiene metotrexato. Si las proteínas en estudio interaccionan físicamente, la DHFR es reconstituida y el metotrexato se metaboliza permitiendo a la cepa crecer en el medio de selección. Estos experimentos fueron realizados con Maria Clara Avendaño Monsalve, como parte de su trabajo de tesis de maestría en el posgrado en Ciencias Bioquímicas.

En un primer experimento, analizamos la interacción física de cada subunidad de NAC con Sam37 (Figura 24). Se aprecia que Sam37 interacciona específicamente con las subunidades  $\alpha$ - y  $\beta'$ -NAC y no con la subunidad  $\beta$ -NAC. El resultado indica que existen contactos entre el complejo  $\alpha\beta'$ -NAC y Sam37, que facilitan y sostienen el transporte de proteínas a la mitocondria.

Como control positivo del experimento utilizamos al par  $\beta$ -NAC/Om14. Se ha reportado que Om14 es el receptor del complejo  $\alpha\beta$ -NAC en la membrana externa mitocondrial (Lesnik, 2014). Como control negativo evaluamos el par Egd1/Tom70, en cuyo caso no encontramos crecimiento.

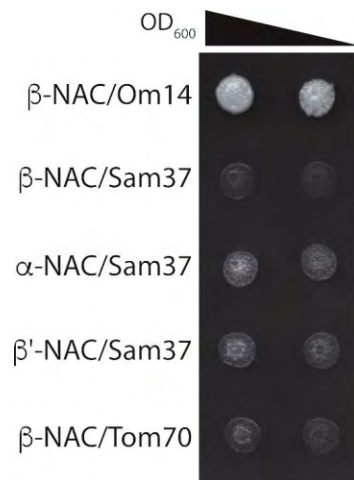


Figura 24. **Sam37 interacciona específicamente con  $\alpha$  y  $\beta'$ -NAC.** Cepas diploides que expresan los pares de proteínas indicados fusionados con dominios de DHFR fueron crecidas hasta alcanza I fase exponencial de crecimiento. 1 o 2 DO<sub>600</sub> de cultivo se depositaron en placas de medio sintético sólido con glucosa como fuente de carbono y metotrexato. Las cajas se incubaron a 30°C durante 5 días. Om14: proteína de la membrana externa 14.

El hecho de que tanto  $\alpha$ - como  $\beta$ -NAC interaccionan con Om14 (Lesnik et. al. 2014) hizo pensar en la posibilidad de que  $\beta'$ -NAC también lo hiciera. En la descripción original de Om14 como receptor de  $\alpha\beta$ -NAC no se consideró a la subunidad  $\beta'$ -NAC, por lo que el segundo PCA realizado tuvo como objetivo probar esta idea. Apreciamos que  $\beta'$ -NAC también interacciona físicamente con Om14 (Figura 25). Es decir, es probable que ambos complejos NAC tengan contacto físico con Om14, siendo el último un punto de anclaje común en la mitocondria.

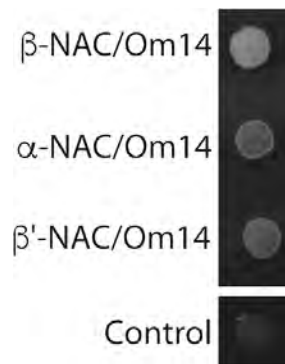


Figura 25. **Om14 interacciona con todas las subunidades de NAC.** Cepas diploides que expresan los pares de proteínas indicados, fueron crecidas hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento. 1  $DO_{600}$  de cultivo se depositó en placas de medio sintético sólido con glucosa como fuente de carbono y metotrexato. Las cajas se incubaron a 30°C durante 3 días. Control negativo: Egd1/Tom70.

Dado que Om14 reside en la membrana externa mitocondrial donde también se encuentra Sam37, una posibilidad era que Sam37 y Om14 se unieran e interaccionaran con  $\alpha\beta'$ -NAC. Además, el receptor Tom70 que presenta interacción genética letal con *EGD2* ( $\alpha$ -NAC) también se localiza en la misma membrana. Por ello el tercer PCA realizado tuvo como objetivo analizar las interacciones físicas entre estos tres componentes. El resultado indica que tanto Sam37 como Tom70 interaccionan físicamente con Om14, pero no entre ellas (Figura 26).

En conjunto todos estos resultados indican la existencia de una red de factores que de manera conjunta están implicados en el transporte de proteínas a la mitocondria.

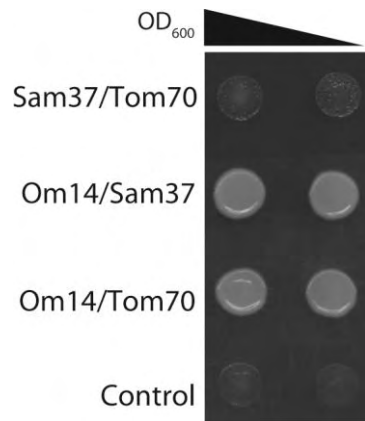


Figura 26. **Existen interacciones específicas entre diferentes proteínas de la membrana externa mitocondrial.** Cepas diploides que expresan los pares de proteínas indicados, fueron crecidas hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento. 1 o 2  $DO_{600}$  de cultivo se depositaron en placas de medio sólido con glucosa como fuente de carbono y metotrexato. Las cajas se incubaron a 30°C durante 3 días. Control negativo: Egd1/Tom70.

## 6.10 SAM37 está relacionada con otras señales de biogénesis mitocondrial en el transporte de proteínas a la mitocondria

Se mencionó que la MTS es la secuencia de las proteínas que guía su transporte a la mitocondria. Sin embargo, se ha observado que el segmento 3'UTR de los mRNAs codificantes de proteínas mitocondriales también es importante para el proceso. Esto es debido a que el 3'UTR ayuda a localizar los mRNAs de manera cercana a la mitocondria, con el fin de que la síntesis de las proteínas ocurra lo más cerca posible del organelo (Corral-Debrinski et al. 2000; Marc et al. 2002; Kaltimbacher et al. 2006; Gadir et al. 2011).

Nuestros datos hasta ahora indican que tanto  $\alpha\beta^1$ -NAC como Sam37 son componentes del sistema de transporte de proteínas mitocondriales. Eso significa que podrían estar participando paralelamente con otros componentes del sistema, como el 3'UTR de los mRNAs. Para analizar si existe alguna relación entre estos dos factores, generamos una variante del gen de *SOD2*, donde se eliminó la región 3'UTR. El gen modificado se clonó en un plásmido de expresión regulada por su promotor endógeno.

A continuación tanto el plásmido con la versión completa del gen (3'UTR) como el plásmido con la versión trunca ( $\Delta$ 3'UTR) se usaron para transformar por separado en algunas de las cepas de estudio. Luego se analizó el nivel de proteína basal de Sod2 tanto a 25 como a 30°C (Figura 27).

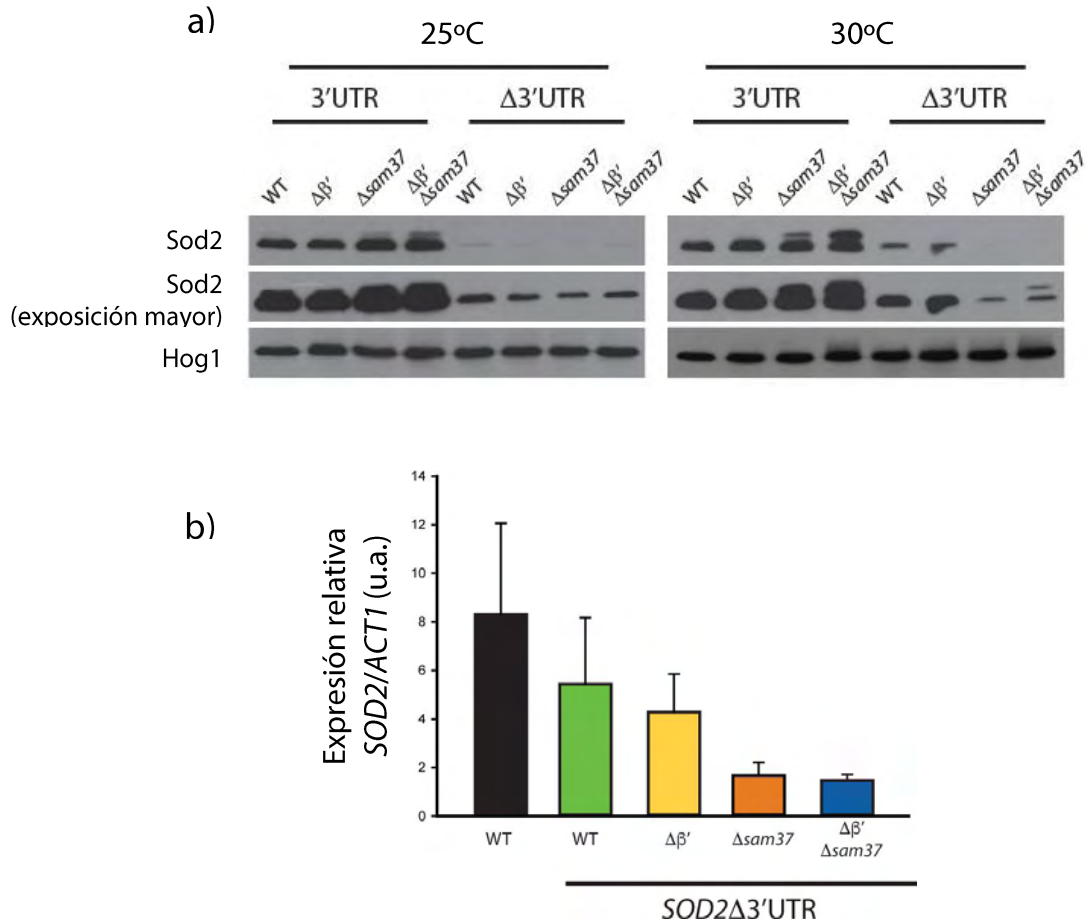


Figura 27. **La eliminación simultánea de SAM37 y el 3'UTR del mRNA de SOD2 afectan la biogénesis de Sod2.** Cepas que expresan la versión completa o sin el 3'UTR del gen de SOD2, se crecieron hasta fase exponencial de crecimiento. a) Se prepararon extractos totales de proteína y se cargaron en geles desnaturalizantes. Después de realizar la electrotransferencia de las proteínas, se realizó inmunodetección contra la etiqueta HA. Hog1 se utilizó como control de carga. b) cuantificación de mRNA de SOD2 con respecto al gen constitutivo ACT1, mediante PCR cuantitativa en tiempo real. La cuantificación corresponde únicamente al experimento realizado a 30°C.

Se observa que la eliminación del 3'UTR afecta por si sola la cantidad de Sod2 en mitocondria. Esto ocurre a las dos temperaturas a las que se realizó el experimento. La eliminación adicional de SAM37 provoca una mayor disminución de la cantidad de Sod2,

aunque el efecto ocurre solo a 30°C. La eliminación adicional de  $\beta$ '-NAC no causa una disminución mayor en la cantidad de Sod2, sin embargo si provoca la acumulación de pSod2 como se había visto antes, aun cuando la cantidad de proteína en este caso es muy baja. Dado que eliminar el 3'UTR de los mRNAs puede afectar su estabilidad, se realizó la cuantificación del mRNA de SOD2 (Figura 27 b). Observamos que el nivel de mRNA no es diferente en la cepa silvestre que expresa el gen completo o el gen sin el 3'UTR. Las mutantes de *SAM37* sí presentan una menor cantidad de mRNA. El resultado apunta hacia una función paralela entre el 3'UTR del mRNA de *SOD2* y *Sam37* como factores importantes para la biogénesis de *SOD2*.



## 7. Discusión

### 7.1 $\alpha\beta$ '-NAC y SAM37 son importantes para la viabilidad celular en *S. cerevisiae*

Una de las características más importantes de las células eucariontes es la presencia de los organelos (de Duve 2007). En el caso particular de las mitocondrias, como consecuencia de su origen endosimbiótico, las proteínas que utilizan para llevar a cabo sus funciones se encuentran codificadas tanto en el genoma nuclear como en el mitocondrial. Esto hizo necesario el desarrollo de maquinarias que ayuden a transportar a las proteínas sintetizadas en el citosol a su subcompartimento mitocondrial final (Chacinska et al. 2009; Schmidt et al. 2010). Se reportó en la literatura que la chaperona citosólica NAC asiste las fases iniciales del transporte de las proteínas que vienen desde fuera del organelo (Wiedmann et al. 1994; George et al. 1998; Fünfschilling & Rospert 1999; Lesnik et al. 2014).

Dado que las funciones mitocondriales son procesos celulares esenciales, la importación de proteínas a la mitocondria es también un proceso esencial e implica que cualquier anomalía este proceso repercute en la viabilidad de los organismos. Por tanto, la idea de que NAC es relevante durante la importación a la mitocondria es congruente con el fenotipo letal observado con la eliminación de al menos uno de los genes que codifican para sus subunidades en *Caenorhabditis elegans*, *Mus musculus* y *Drosophila melanogaster* (Deng & Behringer 1995; Markesich et al. 2000; Bloss et al. 2003). Sin embargo, en *S. cerevisiae* la eliminación de incluso los tres genes que codifican para las subunidades de NAC, no genera un fenotipo de crecimiento observable, lo que indica que NAC *per se* no es esencial en levadura (Reimann et al. 1999).

Dos explicaciones posibles para este hecho son: a) La función que NAC desempeña en *S. cerevisiae* no es esencial para la viabilidad del organismo, o b) existen proteínas con una función redundante o suplente de NAC.

Considerando la segunda opción, previamente en nuestro laboratorio realizamos rastreos de interacciones genéticas con mutantes de los genes de NAC (Ponce-Rojas JC 2012). Estos experimentos nos indicaron diversos candidatos que podían ser explorados por tener relevancia para la biogénesis mitocondrial.

El primer objetivo del presente trabajo fue corroborar los resultados obtenidos en los experimentos de SGA. El método utilizado fue el de análisis de esporas al azar (Tong & Boone 2007). Este experimento es más confiable que el experimento inicial SGA dado que la muestra utilizada es de mayor tamaño (en el SGA se analiza el crecimiento de una colonia de levadura; en el RSA se analiza el crecimiento de cientos de colonias de levadura), en otras palabras, evita diversos errores experimentales acarreados en el SGA.

De los resultados obtenidos destacó el gen *SAM37*. Este gen en particular cumple con diversos requisitos para ser considerado importante para nuestro trabajo:

a) Codifica para una proteína asociada a la membrana externa mitocondrial y tiene un dominio soluble grande expuesto al citoplasma. Cuando Sam37 fue descubierta, se propuso como un receptor adicional en la membrana, dado que es importante para la importación *in vitro* de ciertas proteínas mitocondriales (Gratzer et al. 1995).

b) Comigra en gradientes de sacarosa con el receptor Tom70. Este resultado fue reportado en el mismo trabajo del punto anterior. Se especuló en la posibilidad de que las dos proteínas podrían estar en contacto directo. Dicha unión podría favorecer el reconocimiento temprano de precursores mitocondriales alterando el espectro de proteínas a las que tanto Sam37 como Tom70 se pueden unir (Gratzer et al. 1995).

c) Sam37 participa junto al complejo SAM en la inserción de barriles- $\beta$  en la membrana externa mitocondrial (Wiedemann, 2003; Kutik et al. 2008). Específicamente se ha mencionado que Sam37 es relevante para la liberación de los precursores de SAM en los pasos finales de la inserción de los barriles- $\beta$ . Recientemente se ha concluido que también es responsable de la interacción física transitoria que ocurre entre TOM y SAM en esta ruta de transporte (Qiu et al. 2013; Wenz et al. 2015).

e) Nuestro RSA corroboró inicialmente la interacción genética entre *SAM37* y *EGD2*, además de los genes *EGD1* o *BTT1*. Posteriormente con la generación de todas las combinaciones de mutantes de NAC y Sam37, seguida de los experimentos de crecimiento por diluciones seriadas pudimos definir que la interacción genética es específica de *EGD2* y *BTT1* con *SAM37*.

## 7.2 $\alpha\beta$ '-NAC y *SAM37* favorecen la biogénesis de proteínas mitocondriales

La hipótesis que planteamos propone que tanto NAC como Sam37 operan durante la importación de proteínas a la mitocondria. Por ello decidimos analizar el contenido basal de diversas proteínas mitocondriales. Por sus características algunas de ellas nos pueden dar mayor información sobre la función de NAC y Sam37 en la importación, por ejemplo la Superóxido Dismutasa 2 (Sod2). Ésta elección se basó en el hecho de que la Sod2 es una proteína mitocondrial cuya importación ocurre únicamente de modo co-traducciona (es decir su entrada al organelo ocurre estrictamente de manera paralela con la síntesis de la proteína). Esto se ha verificado mediante experimentos de importación *in vivo* (Luk et al. 2005). Dada la naturaleza de NAC por unirse a proteínas nacientes y al ribosoma simultáneamente, pensamos que Sod2 era una candidata a ser afectada en nuestras mutantes (Wiedmann et al. 1994; Lauring et al. 1995). Dicho de otro modo, NAC y Sam37 participan en conjunto durante la importación co-traducciona acoplando la síntesis de las proteínas con su entrada a la mitocondria.

Por otro lado, las demás proteínas que se estudiaron son transportadas a la mitocondria a través de diferentes rutas después de haber ingresado a través de TOM. Estas diferencias permitieron dilucidar si NAC y Sam37 participan en una ruta específica de transporte o si las proteínas transportadas deben tener características especiales que las hagan sustratos específicos de  $\alpha\beta$ '-NAC y Sam37. Por ejemplo, algunas proteínas son solubles y otras de membrana. Este criterio permitió definir si NAC y Sam37 tienen preferencia por unión a sustratos con una u otra característica fisicoquímica.

Las proteínas evaluadas fueron: Tom20 y Tom40 (de membrana externa); Oxa1 y Mdm38 (de membrana interna); Atp1, Sod2, mtHsp70 y Nsf1 (de la matriz mitocondrial). El

experimento reveló que en ciertas mutantes la biogénesis de algunas proteínas mitocondriales está comprometida, específicamente en las mutaciones de los genes codificantes de  $\alpha\beta'$ -NAC y Sam37 (Figura 14). Dicho efecto se detectó para Tom40, Oxa1, Sod2 y Nfs1. En contraste, Tom20, mtHsp70 y Mdm38 mantienen niveles basales equivalentes al de la cepa silvestre. Estos resultados indican varias cosas:

i)  $\alpha\beta'$ -NAC y Sam37 son importantes para la biogénesis de un grupo de proteínas mitocondriales. Es importante recalcar que la relevancia del complejo  $\alpha\beta'$ -NAC es mayor que  $\alpha\beta$ -NAC en el proceso, algo no descrito hasta ahora en la literatura. Esta idea toma fuerza por un reporte en el que se analizó qué complejos NAC se unen a ribosomas cargados con diferentes mRNA. Se apreció que el heterodímero  $\alpha\beta'$ -NAC y el homodímero  $\beta'\beta'$ -NAC se unen preferencialmente a ribosomas cargados con mRNAs que codifican para proteínas mitocondriales (del Álamo, 2011); mientras que el complejo  $\alpha\beta$ -NAC se une a ribosomas que sintetizan proteínas del citosol.

ii) la eliminación de  $\alpha\beta'$ -NAC y Sam37 no afecta todas las rutas de transporte de proteínas a la mitocondria. Por ejemplo Atp1, Sod2 y mtHsp70 son proteínas que siguen la vía de importación de proteínas con presecuencia (todas tienen MTS), esto implica que llegan a la matriz mitocondrial siguiendo la vía TOM-TIM23/PAM (Neupert & Herrmann 2007). Sin embargo, únicamente Atp1 y Sod2 están afectadas. En el caso de las dos proteínas de membrana interna, Oxa1 y Mdm38, se sabe que ambas utilizan la vía de TOM-TIM23/PAM o TOM/TIM23 respectivamente; pero sólo Oxa1 está afectada. Después de su paso por TIM, Oxa1 se lleva a la matriz mitocondrial donde es entregada a la Oxa1 preexistente que ayuda a insertarla. En el caso de Mdm38 se sabe que se libera lateralmente por TIM23 dado que tiene un cruce transmembranal. Todo esto sugiere que los problemas en la importación de una u otra proteína no dependen de una ruta de transporte específica.

iii) Debido a la función de Sam37 se esperaba observar una disminución en el contenido basal de Tom40, congruente con lo reportado previamente para otros fondos genéticos (Wiedemann 2003; Dukanovic et al. 2009). Este efecto se exacerbó con la eliminación de  $\alpha\beta'$ -

NAC. Esto nos indica que NAC está involucrado junto con Sam37 en la ruta de inserción de los barriles- $\beta$ .

iv) En el caso de Tom20 se sabe que su inserción en la membrana externa es independiente de TOM. Nuestros resultados indican que la inserción de Tom20 tampoco depende de la presencia de Sam37 y  $\alpha\beta'$ -NAC (Stojanovski et al. 2007; Becker et al. 2011).

Es importante resaltar que las cepas que muestran defectos en la biogénesis de proteínas mitocondriales son aquellas que presentan el fenotipo de crecimiento más afectado. Además, observamos que la función de ambos factores es de mayor importancia cuando las cepas son incubadas en una temperatura de 30°C, ya que si se realiza el experimento a 25°C el contenido de proteínas es similar al de la cepa silvestre. Esto puede deberse a que las proteínas tienen mayor estabilidad y su importación se ve favorecida con la disminución de la temperatura a tal grado que el papel de NAC y Sam37 se vuelve dispensable. Esto dependerá probablemente de las características fisicoquímicas de las proteínas que se estén evaluando.

Dado que el fenotipo de crecimiento de las cepas mutantes de  $\alpha\beta'$ -NAC y Sam37 no se restablece a 25°C aunque el contenido de proteínas mitocondriales es normal, es posible que otras proteínas mitocondriales estén afectadas; proteínas cuyas funciones sean cruciales y que su importación siga siendo inadecuada incluso con el descenso en la temperatura (condición que no evaluamos en este trabajo).

Un ejemplo de esto podría ser el complejo TOM, cuya biogénesis depende directamente del complejo SAM. Al afectar el principal complejo de translocación de la membrana externa, la biogénesis de otras proteínas mitocondriales podría ser resultado de las alteraciones del complejo TOM. Tal y como se había reportado para las mutantes carentes de SAM37 (Wiedemann et al. 2003; Meisinger et al. 2004), la eliminación simultánea de  $\alpha\beta'$ -NAC y Sam37 produce una disminución en la cantidad de complejo TOM, tanto a 25 como a 30°C. Sin embargo, a 25°C el contenido basal de las proteínas analizadas es normal. Es decir, es muy probable que la cantidad de complejo TOM sea suficiente para llevar a cabo la importación de proteínas de manera adecuada en todas las condiciones descritas en este trabajo. Además, la sobreexpresión de TOM6 restaura parcialmente los defectos en el ensamblaje de TOM causados

directamente por la eliminación de *SAM37* y aún en estas condiciones la cantidad de *Oxa1* se encuentra reducida en ausencia de  $\alpha\beta$ '-NAC. Todo esto apunta a que los defectos en la importación de proteínas mitocondriales específicas se deben a un efecto directo debido de la función de  $\alpha\beta$ '-NAC y *Sam37*, probablemente en la entrega de proteínas entrantes al complejo TOM. Dos puntos adicionales a considerar son: a) la baja de TOM haría disminuir todas las proteínas mitocondriales, sin embargo no todas las proteínas mitocondriales fueron afectadas con las mutaciones; y b) observamos que la sobreexpresión de *SOD2* y la acumulación de su precursor no se debe a la baja de TOM, sino a las mutaciones de NAC y *Sam37*. Es decir, el contenido de TOM en las mutantes es suficiente para importar los sustratos que deben ingresar al organelo. Finalmente, resultados publicados han mostrado que al inhibir al complejo SAM mediante la inactivación de *Sam35* y/o *Sam50*, sólo se afecta el ensamblaje del complejo TOM pero no el contenido basal de otras proteínas mitocondriales (Stojanovski et al. 2007; Kutik et al. 2008).

Gracias a la información reportadas hasta ahora en la literatura, se puede especular el papel específico que desempeña tanto *Sam37* como  $\alpha\beta$ '-NAC durante la inserción de barriles- $\beta$ . Se sabe que  $\alpha\beta$ '-NAC se une a los ribosomas y podría estar reconociendo al sustrato antes de llegar a la mitocondria. Por otro lado *Sam37* es importante una vez que el sustrato pasó por TOM y es reconocido por SAM. Es decir, *Sam37* pareciera participar en el momento exacto de la inserción del barril a la membrana externa mitocondrial. Esto separa la ruta en dos porciones: la entrega del sustrato y su inserción en la membrana externa. Los fenotipos observados podrían indicar que a 25°C sólo el paso de inserción está comprometido, dado que observamos un nivel basal de *Tom40* adecuado. Esto implica la función de *Sam37* únicamente en el contexto de su papel con el complejo SAM. Sin embargo, a 30°C está comprometida tanto la inserción como la entrega del sustrato, dado que en esta condición tanto el nivel de *Tom40* como del complejo TOM están disminuidos. Es decir, podemos considerar que  $\alpha\beta$ '-NAC y *Sam37* actúan de manera secuencial en el proceso y son relevantes a 30°C. El hecho de que hayamos encontrado interacción física entre ambos, así como que *Sam37* media la interacción física del TOM con SAM (Qiu et al. 2013; Wenz et al. 2015), nos hace pensar en un modelo co-traducciona l que asegura la entrega inmediata del barril- $\beta$  luego de empezar a ser sintetizado

por el ribosoma a la membrana externa con TOM, siendo entregado enseguida a SAM con ayuda de las chaperonas pequeñas del espacio intermembranal.

Finalmente se puede considerar un papel de Sam37 pre-unido al complejo TOM y SAM simultáneamente, o de manera independiente que facilita en última instancia la llegada de un sustrato a la mitocondria.

### 7.3 En ausencia de $\alpha\beta'$ -NAC y SAM37 se acumulan precursores mitocondriales en el citosol

Cuando se analizó el nivel basal de Sod2 se observó una banda de peso molecular mayor que el peso estimado de la proteína madura; y que se considera la versión precursora de Sod2 (pSod2). Se ha descrito que los desacoplantes del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ), provocan que pSod2 se acumule en el citosol. Cuando después de unos minutos se agrega un agente que restablece el  $\Delta\Psi$ , la poza de pSod2 es incapaz de ingresar a la mitocondria. Estos experimentos han demostrado que la importación de la proteína es estrictamente co-traduccional. Cuando no logra entrar a la mitocondria, Sod2 se queda fuera del organelo y por lo tanto no se edita la MTS (Luk et al. 2005).

Para confirmar que la acumulación de pSod2 en las mutantes de este trabajo se debía a una acumulación similar, realizamos un fraccionamiento celular separando las mitocondrias del citosol. El resultado demostró que efectivamente, pSod2 se acumula afuera de la mitocondria (PMS) y que no es degradada por proteasas del citoplasma. En otras palabras, el resultado fortalece la hipótesis de que  $\alpha\beta'$ -NAC y Sam37 son relevantes para la importación co-traduccional de proteínas a la mitocondria.

Los efectos observados podrían explicarse si se asume que en nuestras mutantes la capacidad de importar proteínas es menor, es decir que el sistema no es capaz de transportar adecuadamente la cantidad de proteína que se está produciendo. Para verificar si este es el caso, se subclonó a SOD2 en un plásmido de expresión regulada para analizar el transporte de la proteína desde momentos tempranos de su síntesis. Se prepararon cultivos de nuestras

mutantes transformadas con el plásmido y se indujo la producción de Sod2. Luego se colectaron muestras a diferentes tiempos. El resultado muestra que pSod2 se acumula desde momentos tempranos de su síntesis, lo cual indica que aun cuando existe una baja cantidad de proteína producida, pSod2 se acumula de manera anormal en el citoplasma. Es decir, la eliminación de  $\alpha\beta$ '-NAC y Sam37 afecta pasos iniciales del proceso de importación, probablemente a nivel del reconocimiento de la proteína para su entrega al complejo TOM.

Para probar si la acumulación de proteínas de importación a la mitocondria depende de  $\alpha\beta$ '-NAC y Sam37, realizamos otra cinética de importación *in vivo* con otra proteína conocida por ser sustrato de NAC: el factor de mantenimiento mitocondrial 1 (Mmf1) (George et al. 2002). Para ello clonamos el gen *MMF1* (etiquetado con hemaglutinina para seguir a la proteína mediante inmunorreplica tipo western blot) en un plásmido de expresión regulada bajo el control de un promotor inducible por galactosa y transformamos nuestras mutantes. A continuación realizamos el mismo experimento que para Sod2 pero analizando tiempos más cortos de inducción con galactosa. El resultado muestra que para Mmf1 también ocurre acumulación de su forma precursora (pMmf1) desde tiempos tempranos de la síntesis de la proteína. Es importante mencionar que la mutante  $\Delta\beta\Delta sam37$  no presenta este comportamiento, lo que nuevamente refuerza la idea de que la relación funcional ocurre entre  $\alpha\beta$ '-NAC y Sam37.

## 7.4 NAC y Sam37 forman parte del sistema de biogénesis de proteínas a la mitocondria

Desde la década de los años setenta se sabe que una fracción de ribosomas citosólicos está asociada a la membrana externa mitocondrial (Kellems 1974; Kellems et al. 1975). Además, diversos grupos han propuesto la idea de que proteínas del citosol cooperan con proteínas mitocondriales durante el proceso de importación a la mitocondria. Por ejemplo, se han establecido relaciones funcionales entre chaperonas citoplásmicos del tipo Hsp70s y los receptores de TOM (Young et al. 2003; Fan et al. 2006). Sin embargo, los fenotipos observados



con la eliminación de esos factores no provoca un fenotipo tan severo como el reportado en este trabajo.

Nuestros experimentos de interacciones físicas nos proporcionan información valiosa sobre los contactos específicos que se generan entre diversos componentes del sistema. Sabemos que  $\alpha\beta$ '-NAC y Sam37 entran en contacto físicamente *in vivo*; también sabemos que  $\alpha\beta$ '-NAC al igual que  $\alpha\beta$ -NAC interaccionan con Om14; y que a su vez Om14 interacciona con Sam37 y con Tom70, pero Sam37 no interacciona directamente con Tom70. Esto podría indicar que el ribosoma que transporta una proteína mitocondrial y al cual está unido  $\alpha\beta$ '-NAC, se localiza muy cerca de Sam37 y por lo tanto al complejo SAM. Se ha reportado que las interacciones directas entre TOM y SAM facilitan el paso de substratos de tipo barril- $\beta$  desde el complejo TOM hacia el complejo SAM, nuestros resultados podrían indicar que la unión de estos dos complejos es importante también desde el lado citosólico para la entrega de proteínas entrantes al complejo TOM. La proteína Om14 podría establecer un puente entre SAM y TOM, explicando la comigración en gradientes de sacarosa reportada previamente para Tom70 y Sam37 (Gratzer et al. 1995) aunque Tom70 y Sam37 no interaccionen de manera directa. Otro escenario sería que Om14, Sam37 y Tom70 se encuentran formando un complejo receptor independiente de los complejos TOM y SAM pero que funcionaría para entregar proteínas nacientes al complejo TOM. Finalmente, podría ocurrir que Om14 se una a Tom70 o a Sam37, y que esto sea un primer paso de reconocimiento y diferenciación de la ruta de importación que debe seguir la proteína en proceso de síntesis.

Una de las preguntas entorno a la función de NAC, es si las subunidades que lo componen o los diferentes heterodímeros ensamblados tienen papeles específicos en la célula. El hecho de que observemos esta relación funcional entre Sam37 y  $\alpha\beta$ '-NAC sugiere que las funciones de los heterodímeros son específicas. Como se mencionó en la introducción, el complejo  $\alpha\beta$ -NAC se ha visto implicado principalmente como una chaperona del transporte de proteínas al RE, funcionando como un regulador que evita que proteínas citosólicas o de otros compartimentos ingresen erróneamente al RE (Wiedmann et al. 1994; Lauring et al. 1995; Möller et al. 1998; Gamerding 2015). En *C. elegans* se sabe que la eliminación de NAC provoca

una localización errónea de proteínas mitocondriales al RE y esto desencadena una respuesta de estrés en ambos compartimentos celulares (Gamerding 2015).

La idea que nos planteamos es que dada la duplicación del gen que codifica para la subunidad  $\beta$ -NAC en *S. cerevisiae*, es probable que la función de  $\alpha\beta'$  esté especializada en el transporte de proteínas a la mitocondria. Es decir, los complejos NAC en la levadura tienen roles específicos. Recientemente se reportó que el complejo  $\alpha\beta$ -NAC es el encargado de promover la biogénesis de proteínas ribosomales, una función explorada en trabajos anteriores (Koplin et al. 2010; Ott et al. 2015). Sin embargo esto no excluye por completo que  $\alpha\beta$ -NAC sea importante para el transporte de proteínas a la mitocondria. Sabemos que el repertorio de proteínas mitocondriales es de aproximadamente 1000 en la levadura. Es posible que  $\alpha\beta$ -NAC sea importante para algunas proteínas o tenga un papel secundario en el proceso de su importación. Recientemente se reportó que Om14 (localizada en la membrana externa mitocondrial) interactúa físicamente con las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de NAC (Lesnik et al. 2014). Sin embargo, la importancia de esta relación física para la importación no es tan clara como los efectos que nosotros encontramos en nuestro trabajo.

Nosotros proponemos que  $\alpha\beta'$ -NAC es el complejo prioritario para el transporte de proteínas a la mitocondria. El hecho de que su eliminación junto a Sam37 no provoque un fenotipo letal en levadura, así como el que la importación no se afecte completamente indica que el sistema es robusto y cuenta con diversos factores capaces de sostener el proceso. Incluso en una condición como ésta (en una mutante  $\Delta\alpha\Delta\beta'\Delta sam37$ ), la participación de  $\beta$ -NAC en el proceso sigue siendo cuestionable, debido a que en la mutante cuádruple  $\Delta nac\Delta sam37$  presenta las mismas características que una mutante  $\Delta\alpha\Delta\beta'\Delta sam37$ .

Con nuestros datos podemos enumerar diversos factores que actúan en el proceso y que lo hacen tan robusto: los receptores de TOM (Tom22, Tom20, Tom70 y Tom71), chaperonas citosólicas (Ssa, Ssb, Zuo1, Ssz1, (Gautschi y cols., 2001; Gautschi y cols., 2002; Young et al. 2003; Fan et al. 2006), NAC (Egd1, Edg2 y Btt1)(George et. al. 1998; Fünfschilling & Rospert 1999; George et. al. 2002), Sam37 (Gratzer et. al. 1995; Wiedemann et. al. 2003; Wenz et. al. 2015) y proteínas de unión a mRNA (Gadir et. al. 2011).

## 7.5 Sam37 y el 3'UTR de los mRNAs son relevantes para importación de Sod2

En secciones previas se mencionó que señales en el mRNA modulan también el proceso de importación de proteínas a la mitocondria, específicamente sus regiones 3'UTR. El modelo propuesto hasta ahora es que los mRNAs se asocian a la membrana externa mitocondrial, ayudando a acoplar la síntesis de la proteína con su entrada al organelo. En algunos casos se ha probado experimentalmente que la eliminación del 3'UTR compromete la biogénesis de las proteínas al deslocalizar el mRNA. También se ha propuesto la existencia de proteínas de unión a mRNA que puedan participar en el proceso, sin embargo éstas no se han identificado con certidumbre (Saint-Georges et al. 2008; Gadir et al. 2011).

El mRNA de *SOD2* se encuentra localizado en la cercanía de la mitocondria y como se mencionó anteriormente, el transporte de la proteína ocurre de modo únicamente cotraduccional. Con esto en mente planteamos la posibilidad de que  $\alpha\beta^1$ -NAC y Sam37 tuvieran alguna relación con la región 3'UTR durante la importación.

Para probar esta idea, subclonamos el gen de *SOD2* pero sin su extremo 3'UTR. A continuación se transformó en nuestras cepas de estudio y analizamos el nivel basal de proteína. Observamos que la eliminación del 3'UTR compromete la biogénesis de Sod2 considerablemente en todas las cepas utilizadas, incluso a las dos temperaturas diferentes. La eliminación simultánea de Sam37 agrava el efecto un poco más aunque únicamente a 30°C. La eliminación adicional de  $\beta^1$ -NAC no afectó el nivel de proteína, sin embargo si provocó una acumulación de pSod2 en el citoplasma aún con las cantidades tan bajas de proteína presente. Dado que existe un efecto aditivo en los efectos observados con la eliminación de *SAM37* y el 3'UTR del mRNA, es probable que éstos tengan una función cuya ausencia afecta de manera similar la biogénesis de Sod2.



## 8. Conclusiones

- i) Los genes *EGD2* y *BTT1* que codifican para el complejo  $\alpha\beta'$ -NAC, presentan interacción genética negativa con *SAM37*.
- ii) El complejo  $\alpha\beta'$ -NAC y la proteína de la membrana externa Sam37 participan en la ruta de biogénesis de diversas proteínas mitocondriales.
- iii)  $\alpha\beta'$ -NAC y Sam37 tienen un papel relevante durante la biogénesis del complejo TOM en *S. cerevisiae*.
- iv) Sam37 y el 3'UTR del mRNA de *SOD2* participan de manera simultánea y posiblemente a distintos niveles en la biogénesis de Sod2.
- v)  $\alpha\beta'$ -NAC y Sam37 interaccionan físicamente.
- vi)  $\alpha\beta'$ -NAC y Sam37 interaccionan físicamente con la proteína de la membrana externa mitocondrial Om14.
- vii) Om14 presenta interacción física tanto con Sam37 como con Tom70 en la membrana externa mitocondrial.
- viii) Existen diversas proteínas que de forma coordinada actúan durante el reconocimiento y entrega de proteínas a la mitocondria. Dichos factores están localizados tanto en el citosol como en la mitocondria.

## 9. Apéndice I

### 9.1 Cepas de levadura utilizadas

Nombre	Fondo genético	Genotipo	Referencia
<b>WT</b>	Y8205	<i>can1Δ::STE2pr-Sp_his5 lyp1Δ::STE3pr-LEU2 his3-1Δ leu2Δ ura3Δ</i>	Tong et al. 2007
<b>Δα</b>	Y8205	<i>egd2Δ414::hph</i>	Este trabajo
<b>Δβ</b>	Y8205	<i>egd1Δ0::hph</i>	Este trabajo
<b>Δβ'</b>	Y8205	<i>btt1Δ0::hph</i>	Este trabajo
<b>Δsam37</b>	BY4741	<i>sam37Δ0::kanMX4</i>	Winzeler et al. 1999
<b>ΔαΔβ</b>	Y8205	<i>egd1Δ0::hphΔsam37Δ0::kanMX4</i>	Este trabajo
<b>ΔαΔβ'</b>	Y8205	<i>btt1Δ0::hph sam37Δ0::kanMX4</i>	Este trabajo
<b>ΔβΔβ'</b>	Y8205	<i>egd1Δ0::hph egd2Δ414::kanMX4</i>	Este trabajo
<b>Δnac</b>	Y8205	<i>egd1Δ0::hph egd2Δ414::nat1 btt1Δ0::kanMX4</i>	Este trabajo
<b>ΔαΔsam37</b>	Y8205	<i>egd2Δ414::hph sam37Δ0::kanMX4</i>	Este trabajo
<b>ΔβΔsam37</b>	Y8205	<i>egd1Δ0::hph sam37Δ0::kanMX4</i>	Este trabajo
<b>Δβ'Δsam37</b>	Y8205	<i>btt1Δ0::hph sam37Δ0::kanMX4</i>	Este trabajo
<b>ΔαβΔsam37</b>	Y8205	<i>egd1Δ0::hph Δegd2::nat1 sam37Δ0::kanMX4</i>	Este trabajo
<b>Δαβ'Δsam37</b>	Y8205	<i>btt1Δ0::nat1 Δegd2::hph sam37Δ0::kanMX4</i>	Este trabajo
<b>Δββ'Δsam37</b>	Y8205	<i>egd1Δ0::hph Δbtt1::nat1 sam37Δ0::kanMX4</i>	Este trabajo

#### Colección de Euroscarf

La colección de mutantes sencillas utilizada fue construida por Winzeler y colaboradores (1999). El fondo genético es BY4741.

## 9.2 Cepas de bacteria utilizadas

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Promega)

F–  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK–, mK+) *phoA supE44*  
 $\lambda$ – *thi-1 gyrA96 relA1*

## 9.3 Medios de cultivo

**YPD:** Extracto de levadura 1%, glucosa 2%, peptona 2%. Para medios sólidos, añadir agar 2%.

**YPGal:** Extracto de levadura 1%, Bactopeptona 2%, Galactosa 2%.

**YPG:** Extracto de levadura 1%, Bactopeptona 2%, Glicerol 2%.

**YPD+G418+higromicina:** Extracto de levadura 1%, glucosa 2%, peptona 2%, G418 (100 mg/mL) 1 mL, higromicina B (50 mg/mL) 4 mL. Para medios sólidos, añadir agar 2%.

**LB:** NaCl 1%; bactotripton 1%; extracto de Levadura 0.5%. Para medios sólidos, añadir agar 2%.

**SD-ura+G418/higromicina (para 1 L):** 1.7 g base nitrogenada sin aminoácidos y sulfato de amonio, 1 g de ácido glutámico monosódico, 2 g suplemento de aminoácidos (*DropOut-Ura*), agar 20 g, glucosa (40%) 50 mL, G418 (100 mg/mL) 1 mL, higromicina B (50 mg/mL) 4 mL.

**Esporulación (para 1 L):** 10 g acetato de potasio, 1 g extracto de levadura, 0.5 g glucosa, 0.1 g de suplemento de aminoácidos para esporulación, agar 20 g.

**SC-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  $\mu$ L sulfato de canavanina (100 mg/mL), 500  $\mu$ L tialisina (100 mg/mL).

**SC-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 (100 mg/mL), 500 µL tialisina (100 mg/mL), G418 (100 mg/mL) 1 mL.

**SC-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 (100 mg/L), 500 µL tialisina (100 mg/l), G418 (100 mg/mL), 1 mL, higromicina B (50 mg/mL) 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 (100 mg/L), 500 µL tialisina (100 mg/L), G418 (100 mg/mL) 1 mL, higromicina B (50 mg/mL) 4 mL.

**SD-His/Arg/Lys/Ura+can/tial/G418/higromicina (para 1 L):** 1.7 g base nitrogenada sin aminoácidos y sulfato de amonio, 1 g de ácido glutámico monosódico, 2 g suplemento de aminoácidos (*DropOut-His/Arg/Lys/Ura*), agar 20 g, glucosa (40%) 50 mL, 500 µL sulfato de canavanina (100 mg/mL), 500 µL tialisina (100 mg/mL), G418 (100 mg/mL) 1 mL, higromicina (50 mg/mL) 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.



## 9.4 Soluciones y amortiguadores

### *Soluciones para fraccionamiento celular*

**Amortiguador MP1:** Tris 100 mM, ditioneitol 10 mM, pH 11.

**Amortiguador MP2:** Sorbitol 1.2 M,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20 mM, Zymoliasa 3mg/g de peso húmedo.

**Amortiguador de homogeneización:** Sorbitol 0.6 M, Tris 10 mM pH 7.4, EDTA 1 mM, albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos 0.2%, PMSF 1 mM.

**Amortiguador SH:** Sorbitol 0.6 M, Hepes 20 mM, pH=7.4.

### *Soluciones para geles nativos*

**Amortiguador de Gel 3x:** Ácido aminocapróico 1.5 M, Bis-Tris 150 mM, pH=7 con HCl.

**Amortiguador de Lavado:** Sorbitol 250 mM, Bis-Tris 50 mM, pH=7 con HCl.

**Amortiguador de Muestra:** Ácido aminocapróico 750 mM, Bis Tris 50 mM, pH=7 con HCl.

**Amortiguador del cátodo 0.02%:** Tricina 50 mM, Bis-Tris 15 mM, CoomassieSeraG 0.02%.

**Amortiguador del cátodo 0.002%:** Tricina 50 mM, Bis-Tris 15 mM, CoomassieSeraG 0.002%

**Amortiguador del ánodo:** Bis-Tris 50 mM pH=7 con HCl

**CoomassieSeraG:** Azul de CoomassieSeraG 250 5%, disuelto en buffer de muestra.

Para la realización de los geles se prepararon tres tubos con los siguientes componentes:

	Tubo 1 (acrilamida 5%)	Tubo 2 (acrilamida 13%)	Tubo 3 (acrilamida 4%)
Acrilamida 35%/ Bis-acrilamida (1.08%)	0.706 mL	1.85 mL	0.173 mL
Buffer de Gel 3x	1.69 mL	1.69 mL	0.5 mL
Glicerol 80%	0.32 mL	1.28 mL	-
Agua	2.304 mL	0.209 mL	0.812 mL
Persulfato de amonio 10%	13.5 $\mu$ L	13.5 $\mu$ L	8 $\mu$ L
TEMED	4.9 $\mu$ L	4.9 $\mu$ L	2.25 $\mu$ L

La solución de los tubos 1 y 2 se vertió en vidrios separados por 1.5 mm de espesor, con ayuda de un gradintero de la marca Hoeffer, con capacidad para 50 mL. Se dejó polimerizar el gel durante 1 hora. A continuación se añadió el AMPS y TEMED a la solución del tubo 3 y se vertió sobre el gel anterior. Se colocó un peine para 10 pozos y se dejó polimerizar por 30 minutos.

### *Soluciones para geles desnaturalizantes*

**Solución de extracción (Rödel Mix):** NaOH 10 N, PMSF 20 mM,  $\beta$ -ME 7.4%.

**Laemmli 1x:** Tris-HCl 60 mM pH 6.8, glicerol 10%, SDS 2%.

**Amortiguador de corrida de proteínas:** Glicina 385 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8.4, SDS 0.1%.

**Solución de bloqueo:** TBS, leche en polvo sin grasa Nestlé Svelty 5%.

**Solución de Ponceau:** Ácido Acético 1%, rojo de Ponceau 1%.

**TBS:** NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.5.

**TBS+Tween 20 al 0.1%:** NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.5, Tween 20 0.1%.

## *Soluciones para geles de ácidos nucleicos*

**TAE 50X:** Tris 242 g/L, ácido acético glacial 57.1 ml/L, EDTA 0.5 M pH=8 100mL/L.

**Amortiguador de carga 6X:** 0.25% azul de bromofenol, 0.25% xileno cianol, 30% glicerol.

## 9.5 Oligonucleótidos utilizados para la clonación del gen *SOD2*

Nombre	Secuencia (5' a 3')	Tm
Sod2Fw-NotI	<b>GGGGCGGCCGCTGCACGTGTAGTATTCTACTTG</b>	52
Sod2Rv-HA	<b>AGCATAATCTGGAACATCATATGGATA GATCTTGCCAGCATCGAATC</b>	55
HA-2X-BamHI	<b>GCGGGATCCTCGCTTTAAGCATAATCTGGAACATCATATGGATA AGCATAATCTGGAACATCATATGGATAAGCATAATCTGGAAC</b>	51
Sod2TerF-BamHI	<b>GCGGGATCCAGATTCGATGCTGGCAAG</b>	53
Sod2TerR-XhoI	<b>GCGCTCGAGCAAGAACAATTGGTTCTCTGC</b>	51
Sod ORFf- XbaI	<b>GAGTCTATACTAAAAACGTACCAGGATG</b>	55

# 10. Bibliografía

- Ades, I.Z. & Butow, R.A., 1980. The Transport of Proteins into Yeast Mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, 255(20), pp.9925–9935.
- Adrian, G.S. et al., 1986. Sequences required for delivery and localization of the ADP/ATP translocator to the mitochondrial inner membrane. *Mol. Cell. Biol.* 6(2), pp.626–634.
- Alamo, M. et al., 2011. Defining the Specificity of Cotranslationally Acting Chaperones by Systematic Analysis of mRNAs Associated with Ribosome-Nascent Chain Complexes. *PLOS Biology*, 9(7), pp. 1-23.
- Avendaño-Monsalve M.Clara, 2017. Interacciones genéticas y físicas entre el complejo NAC y la proteína Sam37 durante la importación de proteínas a la mitocondria. Tesis de Maestría en el posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM.
- Baryshnikova, A. et al., 2010. Synthetic Genetic Array (SGA) Analysis in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods in enzymology*, 2nd ed., Elsevier inc, pp 145-179.
- Becker, T. et al., 2011. The mitochondrial import protein Mim1 promotes biogenesis of multispansing outer membrane proteins. *Journal of Cell Biology*, 194(3), pp.387–395.
- Blobel, G., 1999. Protein Targeting. *Nobel Lecture*, p.244-287.
- Blobel, G. & Dofferstein, B., 1975. Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane bound ribosomes of murine myeloma. *Journal of Cell Biology*, 67(3), pp.835–851.
- 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), pp.1066–1071.
- Burger, G., Gray, M.W. & Lang, B.F., 2003. Mitochondrial genomes: Anything goes. *Trends in Genetics*, 19(12), pp.709–716.

- Butow, A., 1972. Cytoplasmic-type 80 S Ribosomes with Yeast Mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, 247(24), pp.8043–8050.
- Caro L, & Palade, G., 1964. Protein synthesis, storage and discharge in the pancreatic exocrine cell. An Autoradiographic Study. *The Journal of Cell Biology*, 20(9)473-495.
- Chacinska, A. et al., 2009. Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell*, 138(4), pp.628–44.
- Chatzi, A. & Tokatlidis, K., 2013. The Mitochondrial Intermembrane Space: A Hub for Oxidative Folding Linked to Protein Biogenesis. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(1), pp.54-62.
- Cook A et. al., 2007. Structural Biology of the nucleocytoplasmic transport. *Annu. Rev. Biochem.*, 76, pp. 647-671.
- Corral-Debrinski, M., Blugeon, C. & Jacq, C., 2000. In yeast, the 3' untranslated region or the presequence of *ATM1* is required for the exclusive localization of its mRNA to the vicinity of mitochondria. *Molecular and cellular biology*, 20(21), pp.7881–7892.
- Costanzo, M. et al., 2010. The genetic landscape of a cell. *Science*, 327(5964), pp.425–431.
- Dekker, P.J.T. et al., 1993. Identification of MIM23, a putative component of the protein import machinery of the mitochondrial inner membrane. *FEBS Letters*, 330(1), pp.66–70.
- Deng, J.M. & Behringer, R.R., 1995. An insertional mutation in the *BTF3* transcription factor gene leads to an early postimplantation lethality in mice. *Transgenic research*, 4(4), pp.264–9.
- Deshaies, R.J., 1988. A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature*, 332(6167):800-805.
- Dukanovic, J. et al., 2009. Genetic and functional interactions between the mitochondrial outer membrane proteins Tom6 and Sam37. *Molecular and cellular biology*, 29(22), pp.5975–88.
- de Duve, C., 2007. Essay - The origin of eukaryotes: a reappraisal. *Nature Reviews Genetics*, 8(5), pp.395–403.

- Fan, A.C.Y., Bhangoo, M.K. & Young, J.C., 2006. Hsp90 Functions in the Targeting and Outer Membrane Translocation Steps of Tom70-mediated Mitochondrial Import. *Journal of Biological Chemistry*, 281(44), pp.33313–33324.
- Fünfschilling, U. & Rospert, S., 1999. Nascent polypeptide-associated complex stimulates protein import into yeast mitochondria. *Molecular biology of the cell*, 10(10), pp.3289–3299.
- Gadir, N. et al., 2011. Localization of mRNAs coding for mitochondrial proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*, 17(8), pp.1551–1565.
- Gamerding, M., Anne Hanebuth, M., Tancred Frickey, E.D., 2015. The principle of antagonism ensures protein targeting specificity at the endoplasmic reticulum. *Science*, 348(6231), pp.201–207.
- Gautschi, M et. al. 2001. RAC, a stable ribosome associated complex in yeast formed by the Dnak-DnaJ homologs Ssz1p and zootin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(7), pp.3762-3767.
- Gautschi, M et. al. 2002. A functional triad on the yeast ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(7), pp.4209-4214.
- Gentle, I. et al., 2004. The Omp85 family of proteins is essential for outer membrane biogenesis in mitochondria and bacteria. *Journal of Cell Biology*, 164(1), pp.19–24.
- George, R. et al., 1998. The yeast nascent polypeptide-associated complex initiates protein targeting to mitochondria in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(5), pp.2296–2301.
- George, R. et al., 2002. The nascent polypeptide-associated complex (NAC) promotes interaction of ribosomes with the mitochondrial surface in vivo. *FEBS Letters*, 516(1–3), pp.213–216.
- Gietz, R.D., & Woods, R.A. 2002. Transformation of yeast by lithium acetate/stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in Enzymology*, 350:87-96

- Glick, B.S. et al., 1992. Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism. *Cell*, 69(5), pp.809–822.
- Goldstein, A.L. & McCusker, J.H., 1999. Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 15(14), pp.1541–1553.
- Gratzer, S. et al., 1995. Mas37p, a novel receptor subunit for protein import into mitochondria. *The Journal of cell biology*, 129(1), pp.25–34.
- Harmey, M.A. et al., 1977. Transport of cytoplasmically synthesized proteins into the mitochondria in a cell free system from *Neurospora crassa*. *Eur J Biochem*, 81(3), pp.533–544.
- Heijne, G. Von, 1986. Mitochondrial targeting form amphiphilic helices. *The EMBO Journal*, 5(6), pp.1335–1342.
- Hines, V. et al., 1990. Protein import into yeast mitochondria is accelerated by the outer membrane protein MAS70. *The EMBO Journal*, 9(10), pp.3191–3200.
- Hönlinger, A. et al., 1996. Tom7 modulates the dynamics of the mitochondrial outer membrane translocase and plays a pathway-related role in protein import. *The EMBO Journal*, 15(9), pp.2125–37.
- Hu, G.Z. & Ronne, H., 1994. Yeast BTF3 protein is encoded by duplicated genes and inhibits the expression of some genes *in vivo*. *Nucleic Acids Res*, 22(14), pp.2740–2743.
- Jackson, R.C. & Blobel, G., 1977. Post-translational cleavage of presecretory proteins with an extract of rough microsomes from dog pancreas containing signal peptidase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), pp.5598–602.
- Jan, C.H., Williams, C.C. & Weissman, J.S., 2014. Principles of ER cotranslational translocation revealed by proximity-specific ribosome profiling. *Science*, 346(6210), p.1257521.
- Palade, G., 1955. A small particulate component of the cytoplasm. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*.1(1), pp. 59-80.

- Kaltimbacher, V. et al., 2006. mRNA localization to the mitochondrial surface allows the efficient translocation inside the organelle of a nuclear recoded *ATP6* protein. *RNA*, 12(7), pp.1408–1417.
- Kassenbrock, C.K., Cao, W. & Douglas, M.G., 1993. Genetic and biochemical characterization of ISP6, a small mitochondrial outer membrane protein associated with the protein translocation complex. *The EMBO Journal*, 12(8), pp.3023–3034.
- 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), pp.1–14.
- Kellems, R.O.D.E., 1974. Cytoplasmic with Yeast Type 80 S Ribosomes Mitochondria Associated. *Journal of Biological Chemistry*, (10), pp.3304–3306.
- Kim, P.K. & Hettema, E.H., 2015. Multiple pathways for protein transport to peroxisomes. *Journal of Molecular Biology*, 427(6), pp.1176–1190.
- Koplin, A. et al., 2010. A dual function for chaperones SSB–RAC and the NAC nascent polypeptide–associated complex on ribosomes. *The Journal of Cell Biology*, 189(1), pp. 57–68.
- Kovermann, P. et al., 2002. Tim22, the essential core of the mitochondrial protein insertion complex, forms a voltage-activated and signal-gated channel. *Molecular Cell*, 9(2), pp.363–373.
- Kozjak, V. et al., 2003. An essential role of Sam50 in the protein sorting and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 278(49), pp.48520–48523.
- Kübrich, M. et al., 1994. The polytopic mitochondrial inner membrane proteins MIM17 and MIM23 operate at the same preprotein import site. *FEBS Letters*, 349(2), pp.222–228.
- Kutik, S. et al., 2008. Dissecting Membrane Insertion of Mitochondrial  $\beta$ -Barrel Proteins. *Cell*, 132(6), pp.1011–1024.



- Lauring, B. et al., 1995. Nascent polypeptide-associated complex protein prevents mistargeting of nascent chains to the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(June), pp.5411–5416.
- Lesnik, C. et al., 2014. OM14 is a mitochondrial receptor for cytosolic ribosomes that supports co-translational import into mitochondria. *Nature communications*, 5, pp. 1-10.
- Li, H. & Chiu, C.-C., 2010. Protein transport into chloroplasts. *Annual review of plant biology*, 61, pp.157–180.
- Lithgow, T. et al., 1994. The mitochondrial outer membrane protein Mas22p is essential for protein import and viability of yeast. , 91, pp.11973–11977.
- Luk, E. et al., 2005. Manganese activation of superoxide dismutase 2 in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 280(24), pp.22715–20.
- Maccacchini, M.L. et al., 1979. Import of proteins into mitochondria: precursor forms of the extramitochondrially made F1-ATPase subunits in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(1), pp.343–7.
- Marc, P. et al., 2002. Genome-wide analysis of mRNAs targeted to yeast mitochondria. *EMBO Reports*, 3(2), pp.159–164.
- Margeot, A., Blugeon, C. & Vialette, Â., 2002. In *Saccharomyces cerevisiae*, *ATP2* mRNA sorting to the vicinity of mitochondria is essential for respiratory function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 21(24), pp.6893–6904.
- Markesich, D.C. et al., 2000. bicaudal encodes the *Drosophila* beta NAC homolog, a component of the ribosomal translational machinery. *Development*, 127(3), pp.559–572.
- Meisinger, C. et al., 2004. The mitochondrial morphology protein Mdm10 functions in assembly of the preprotein translocase of the outer membrane. *Developmental cell*, 7(1),
- Möller, I. et al., 1998. A general mechanism for regulation of access to the translocon: competition for a membrane attachment site on ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(23), pp.13425–13430.

- Mor, A., White, M.A. & Fontoura, B.M.A., 2014. Nuclear trafficking in health and disease. *Current Opinion in Cell Biology*, 28(1), pp.28–35.
- Moreau, a et al., 1998. Bone-specific expression of the alpha chain of the nascent polypeptide-associated complex, a coactivator potentiating c-Jun-mediated transcription. *Molecular and cellular biology*, 18(3), pp.1312–1321.
- Nagotu, S. et al., 2012. Molecular basis of peroxisomal biogenesis disorders caused by defects in peroxisomal matrix protein import. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1822(9), pp.1326–1336.
- Neupert, W. & Herrmann, J.M., 2007. Translocation of proteins into mitochondria. *Annual review of biochemistry*, 76, pp.723–749.
- Ott, C. et al., 2012. Sam50 Functions in Mitochondrial Intermembrane Space Bridging and Biogenesis of Respiratory Complexes. *Molecular and Cellular Biology*, 32(6), pp.1173–1188.
- Ott, A.-K. et al., 2015. Functional Dissection of the Nascent Polypeptide-Associated Complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plos One*, 10(11), p.e0143457.
- Paila, Y.D., Richardson, L.G.L. & Schnell, D.J., 2015. New insights into the mechanism of chloroplast protein import and its integration with protein quality control, organelle biogenesis and development. *Journal of Molecular Biology*, 427(5), pp.1038–1060.
- Palade, G.E., 1955. A small particulate component of the cytoplasm. *Journal of Biophysical and Biochemical cytology*, 1(1), pp. 59-79.
- Palade, G.E., 1956. The Endoplasmic Reticulum. *Journal of Biophysical and Biochemical cytology*, 2(4), pp. 85-114.
- Panasenko, O. et al., 2006. The Yeast Ccr4-Not Complex Controls Ubiquitination of the Nascent-associated Polypeptide (NAC-EGD) Complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(42), pp.31389–31398.
- Panasenko, O., David, F.P.A. & Collart, M.A., 2009. Ribosome Association and Stability of the Nascent Polypeptide-Associated Complex Is Dependent Upon Its Own Ubiquitination.

- Genetics*, 460, pp.447–460.
- Park, E. & Rapoport, T. a., 2012. Mechanisms of Sec61/SecY-Mediated Protein Translocation Across Membranes. *Annual Review of Biophysics*, 41(1), pp.21–40.
- Pfanner, N. et al., 1987. The carboxyl-terminal two-thirds of the ADP/ATP carrier polypeptide contains sufficient information to direct translocation into mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 262(31), pp.14851–14854.
- Pfanner, N. & Neupert, W., 1987. Distinct steps in the import of ADP/ATP carrier into mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 262(16), pp.7528–7536.
- Pfanner, N. et al., 2004. Assembling the mitochondrial outer membrane. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 11(11), pp.1044–1048.
- Ponce Rojas, JC., 2012. Mapeo de las interacciones genéticas del complejo NAC y su relevancia durante el proceso cotraduccional de importación de proteínas. Tesis de Maestría en el posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM.
- Qiu, J. et al., 2013. Coupling of mitochondrial import and export translocases by receptor-mediated supercomplex formation. *Cell*, 154(3), pp.596–608.
- Rapaport, D. & Neupert, W., 1999. Biogenesis of Tom40, core component of the TOM complex of the of Mitochondria. *The Journal of Cell Biology*, 146(2), pp.321–331.
- Rehling, P. et al., 2003. Protein insertion into the mitochondrial inner membrane by a twin-pore translocase. *Science*, 299(5613), pp.1747–1751.
- Reid, G. & Schatz G., 1982. Import of proteins into mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, 257(21), pp.13062–13067.
- Reimann, B. et al., 1999. Initial characterization of the nascent polypeptide-associated complex in yeast. *Yeast*, 15(5), pp.397–407.
- Sagan, L, 1967. On the Origin of Mitosing Cells. *Journal of Theoretical Biology*, 14, pp.225–274.
- Saint-Georges, Y. et al., 2008. Yeast mitochondrial biogenesis: A role for the PUF RNA-binding

- protein puf3p in mRNA localization. *PLoS ONE*, 3(6), pp. 1-12.
- Schmidt, O., Pfanner, N. & Meisinger, C., 2010. Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(9), pp.655–667.
- Shi, X., Parthun, M.R. & Jaehning, J.A., 1995. The yeast EGD2 gene encodes a homologue of the  $\alpha$ NAC subunit of the human nascent-polypeptide-associated complex. *Gene*, 165(2), pp.199–202.
- Shiota, T. et al., 2015. Molecular architecture of the active mitochondrial protein gate. *Science reports*, 349(6255), pp.1544–1548.
- Sirrenberg, C. et al., 1996. Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22. *Nature*, 384(6609), pp.582–585.
- Spreter, T., Pech, M. & Beatrix, B., 2005. The Crystal Structure of Archaeal Nascent Polypeptide-associated Complex ( NAC ) Reveals a Unique Fold and the Presence of a Ubiquitin Associated Domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(16), pp.15849–15854.
- Stojanovski, D. et al., 2007. Alternative function for the mitochondrial SAM complex in biogenesis of  $\alpha$ -helical TOM proteins. *Journal of Cell Biology*, 179(5), pp.881–893.
- Stroud, D. a. et al., 2011. Biogenesis of mitochondrial  $\beta$  -barrel proteins: the POTRA domain is involved in precursor release from the SAM complex. *Molecular Biology of the Cell*, 22(16), pp.2823–2833.
- Tong, A.H.Y. & Boone, C., 2007. 16 High-Throughput Strain Construction and Systematic Synthetic Lethal Screening in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Microbiology*, 36, pp.369–707.
- Truscott, K.N. et al., 2001. A presequence- and voltage-sensitive channel of the mitochondrial preprotein translocase formed by Tim23. *Nature structural biology*, 8(12), pp.1074–1082.
- Waizenegger, T. et al., 2004. Tob38, a novel essential component in the biogenesis of beta-barrel proteins of mitochondria. *EMBO reports*, 5(7), pp.704–9.
- Wang, L. et al., 2010. Crystal structures of NAC domains of human nascent polypeptide-

- associated complex (NAC) and its  $\alpha$  NAC subunit. *Protein Cell*, 1(4), pp.406–416.
- Wang, S., Sakai, H. & Wiedmann, M., 1995. NAC covers ribosome-associated nascent chains thereby forming a protective environment for regions of nascent chains just emerging from the peptidyl transferase center. *Journal of Cell Biology*, 130(3), pp.519–528.
- Wegrzyn, R.D. et al., 2006. A Conserved Motif Is Prerequisite for the Interaction of NAC with Ribosomal Protein L23 and Nascent Chains. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(5), pp.2847–2857.
- Wenz, L.-S. et al., 2015. Sam37 is crucial for formation of the mitochondrial TOM-SAM supercomplex, thereby promoting  $\beta$ -barrel biogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 210(7), pp.1047–1054.
- Wiedemann N, et. al., 2003. Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature*, 424(July), pp.5–10.
- Wiedmann, B. et al., 1994. A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature*, 370(6489), pp.434–440.
- Williams, C.C., Jan, C.H. & Weissman, J.S., 2014. Targeting and plasticity of mitochondrial proteins revealed by proximity-specific ribosome profiling. *Science*, 346(6210), pp.748–51.
- Wittig, I., Braun, H.P., Schägger, H., 2006. Blue Native PAGE. *Nature Protocols*. 1(1), pp. 418-428.
- Yogev, O., Karniely, S. & Pines, O., 2007. Translation-coupled Translocation of Yeast Fumarase into Mitochondria *in vivo*. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(40), pp.29222–29229.
- Yotov, W. V, Moreau, A. & St-Arnaud, R., 1998. The Alpha Chain of the Nascent Polypeptide-Associated Complex Functions as a Transcriptional Coactivator. *Molecular and Cellular Biology*, 18(3), pp.1303–1311.
- 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), pp.41–50.
- Yuh, M.C. & Blobel, G., 2001. Karyopherins and nuclear import. *Current Opinion in Structural*

*Biology*, 11(6), pp.703–715.

Zaremba-Niedzwiedzka et al., 2017. Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity. *Nature*, pp. 1-9.