



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Identificación de señales de localización reconocidas por el complejo
NAC durante la importación de proteínas a la mitocondria
en *Saccharomyces cerevisiae*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Maria Clara Avendaño Monsalve

TUTORA PRINCIPAL

Dra. María Soledad Funes Argüello
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. María Imelda López Villaseñor
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

Dr. Diego González Halphen
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Ciudad de México. Mayo, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Reconocimientos

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

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

Dra. María Soledad Funes Argüello	Instituto de Fisiología Celular
Dra. María Imelda López Villaseñor	Instituto de Investigaciones Biomédicas
Dr. Diego González Halphen	Instituto de Fisiología Celular

Este trabajo fue financiado por:

Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-DGAPA, UNAM) IN208921, IN207518 e IN202715.

Programa de Ciencia de Frontera 2019, modalidad Grupo, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México). Proyecto 58550.

Programa de Investigación Científica Básica 2014, Fondo Sectorial de Investigación para la Educación del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (SEP-CONACyT, México). Proyecto 237344.

Al Consejo Nacional de Tecnología CONACyT por la beca (464718) otorgada durante el desarrollo de este trabajo.

Al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación de la República de Colombia por ser beneficiaria de la Convocatoria No. 885 "Doctorados en el Exterior".

Al Programa de Maestría y Doctorado de Ciencias Bioquímicas de la UNAM, en especial a Julio Ignacio Palacio Ordoñez y a la M. en C. Norma Trejo Medina.

Al Posgrado de la UNAM. En especial a su ex-coordinadora la Dra. Patricia Dávila Aranda y a tu todo su equipo que, durante la pandemia generada por el SARS-COV-2, estuvieron pendientes de los alumnos que nos encontrábamos por fuera del país.

Al Programa de Apoyo a los estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo económico para asistir al XX Congreso de Bioenergética y Biomembranas y a la *Gordon Research Conference Mitochondria and Chloroplasts* 2018.

Al Dr. José Carlos Ponce Rojas por sus discusiones, ideas valiosas e importantes aportes que siempre ayudaron a enriquecer el trabajo.

A la Dra. Ariann Elizabeth Mendoza Martínez por toda la ayuda técnica, organizacional y emocional; su participación fue fundamental para el desarrollo de este trabajo.

Al laboratorio del Dr. Diego González Halphen del Instituto de Fisiología Celular, en especial a Q.B.P. Miriam Vásquez Acevedo y al M. en C. Felipe Nieto por su invaluable ayuda durante todo el desarrollo de este trabajo.

Al laboratorio del Dr. Roberto Coria del Instituto de Fisiología Celular, en especial a Dra. Laura Kawasaki y a la M. en C. Diana María García por su ayuda en la implementación de técnicas de biología molecular, plásmidos y reactivos.

Al laboratorio del Dr. Antonio Peña Díaz del Instituto de Fisiología Celular, en especial a Dra. Norma Sánchez y M. en C. Francisco Padilla, por la donación de reactivos y facilitar el uso de equipos.

Al laboratorio de la Dra. Xochitl Pérez Martínez del Instituto de Fisiología Celular, en especial a Dra. Yolanda Camacho Villasana, por la donación de reactivos, cepas y anticuerpos.

Al laboratorio del Dr. Francisco Torres Quiroz del Instituto de Fisiología Celular, en especial a Dra. Paola Moreno Álvarez y al Dr. Emilio Espinoza Simón, por la donación de reactivos y anticuerpos.

A la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, especialmente a la Biol. Guadalupe Códiz Huerta, por la secuenciación de todos los plásmidos realizados en este trabajo.

A la Unidad de Imagenología del Instituto de Fisiología Celular, en especial a la Dra. Ruth Rincón Heredia por la ayuda técnica brindada en la adquisición de las imágenes y el análisis de estas.

A la unidad de Bioinformática y uso de la información del Instituto de Fisiología Celular, es especial al Dr. Augusto Cesar Poot por el diseño y ejecución de un código para el análisis de las imágenes de microscopía adquiridas para este trabajo.

A la Unidad de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular, en especial al Biól. Gerardo Coello Coutiño, a Manuel Barbosa y a Ivette Arciniega. A Aurey y Manuel del Taller.

Al honorable jurado de esta tesis Dra. Xóchitl Pérez, Dr. Manuel Gutiérrez, Dr. Óscar Flores, Dr. Alejandro Fernández y Dr. Leonardo Peraza por su tiempo y excelentes comentarios.

Agradecimientos

Hoy presento esta tesis ante todos los mexicanos como lo único que tengo para mostrar mi infinito agradecimiento con todos ustedes por permitirme formarme como maestra y doctora en Ciencias. En mi país, estudiar un posgrado es muy costoso; así que la oportunidad que México me ofreció es enorme, oportunidad que se fue transformando en un crecimiento personal inimaginable. Ahora bien, después de vivir siete años aquí, hoy soy más que una estudiante extranjera; hoy soy una mujer colombo-mexicana.

Al laboratorio 204 sur y a todos sus miembros pasados y actuales. Tal vez no lo saben, pero todos ustedes fueron mi familia durante el tiempo que pasé allí. Gracias por tantas sonrisas, por las comidas, por el apoyo genuino y por el interés hacia mis tradiciones y mi acento. En ese lugar aprendí a clonar, a correr geles de proteínas, a purificar mitocondrias, a hacer observaciones en el microscopio, a amar la levadura, entre otras cosas más. A los miembros por venir, les quiero decir que disfruten cada momento mientras aprenden muchísimo. Por ser el lugar donde aprendí a trabajar con mitocondrias y me enamoré, el laboratorio y todos sus miembros tendrán siempre un lugar importante en mi corazón.

Varias personas me ayudaron en el proceso de acoplarme y de sentirme cómoda en mi aventura de vivir en otro país: Fernando y Fabiola, Don Efrén y su familia, don Hugo y la señora Diana y Blanca. Sus consejos y compañía fueron fundamentales para que no me rindiera. Raymond, José Luis y Roberto, quienes me hicieron sentir como en casa y se preocuparon por integrarme, al invitarme a sus salidas y tertulias, les digo que tiene una familia en Colombia esperándolos para retribuir un poco de lo que yo he recibido de ustedes.

En el camino, muchas veces me sentí sola; sin embargo, siempre hubo alguien que me preguntó ¿Cómo has estado? Gracias a Caro y Erika, me encanta tener hermanas mayores. A todas las integrantes del grupo desparche: Pao, Ledys, Xiomara, Marisol y Juliana, mil gracias, me hicieron la pandemia. Gracias a Luisa, que nos venimos apoyando desde la universidad. Mary Carmen, gracias por todos los consejos precisos en los momentos indicados. Marlene, gracias por esperarme para ver Betty la fea, para despejarnos de todo lo vivido día a día. A Vicky, nos debemos un brindis por esas amistades que nacen en la distancia. Escribiendo esto, me di cuenta de que todas son mujeres ¡Qué viva la sororidad!

A todo el parche colombiano, que bacano que llegaran en un momento en donde tanta falta me hacía tener a alguien que entendiera mis chistes y referencias, personas con quien añorar la tierra; y claro, con quien comer y hacer empanadas. Felipe y Erika, continúen llevando la bandera y todo lo mejor de nuestro país por el mundo.

Durante todos estos años extrañé demasiado a mi familia, que grandiosa familia en la que nací. De todos siempre llevo algo conmigo, pero a uno de ellos, quiero darle

una mención especial: mi abuelo. El primer hombre feminista que conocí, porque al estar rodeado de mujeres, nunca ha subestimado a ninguna de nosotras y siempre nos apoya para ser mujeres independientes. Sé que es difícil entender mi decisión de irme, pero en ocasiones, es necesario partir para crecer; y eso no significa que no los ame o no los extrañe. Estamos unidos por lazos de sangre que son innegables.

Mi corazón siente la obligación de mencionar a varias personas muy importantes en este viaje; estas personas, conocieron lo peor de mí y por eso, conocieron y recibieron lo mejor de mí. Gracias por elegir quedarse a pesar de los malos momentos:

Dra. Soledad, ha sido un honor y un orgullo ser su estudiante. Siento mucha admiración por alguien que sabe escuchar y pone al ser humano por encima de todo. No tengo palabras para expresar mi agradecimiento y cariño hacia usted. GRACIAS POR DEJARME SER.

Carlos, amor mío. Gracias por darte el tiempo de conocerme como nadie jamás lo había hecho. Nuestra historia simplemente ha sido real y eso es lo más valioso que tenemos. Prometo que vienen mejores momentos y muchas más sonrisas juntos. GRACIAS POR AMAR MI COLOMBIANIDAD.

Mami, gracias por darme las herramientas que me permitieron convertirme en quién soy y luego, dejarme volar... hoy me siento orgullosa de decir que me parezco a ti. GRACIAS POR AMARME COMO LO HACES.

Hay una historia, mas allá de las mitocondrias y NAC, que merece ser contada... lo haré cuando esté lista. ¿Quién lo sabe? Tal vez, a alguien podría ayudarlo.

Tabla de Contenido

Resumen	10
Abstract	11
Lista de tablas	12
Lista de figuras	12
Abreviaturas	14
Introducción	15
Modelo post-traducciona l vs co-traducciona l	16
Generalidades de las rutas de transporte de proteínas	18
El retículo endoplásmico y la vía de secreción	19
Peroxisoma	20
Núcleo	21
Cloroplasto	22
Ruta de transporte de proteínas a la mitocondria	22
Señales de localización mitocondria l	22
Complejos proteicos que participan en la biogénesis mitocondria l	24
Rutas de importación de proteínas a la mitocondria	27
Chaperonas moleculares en el plegamiento de proteínas	28
Chaperonas Hsp	29
Chaperonas asociadas al ribosoma	31
El complejo NAC (Nascent-polypeptide Associated Complex)	32
NAC y el transporte de proteínas a la mitocondria	34
Otras funciones de NAC	35
Respuestas celulares derivadas de fallas en el proceso de importación de proteínas a la mitocondria en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudio	37
Antecedentes directos	39
Planteamiento del problema	42
Pregunta de Investigación	43
Hipótesis	43
Objetivos	44
Objetivo general	
Objetivos específicos	
Resultados	45
Parte I. ¿Cuál es la región que reconoce $\alpha\beta_2$ -NAC en algunas proteínas mitocondria les durante los primeros pasos de la importación de proteínas a la mitocondria?	
El crecimiento de la triple mutante $\Delta\alpha\beta_2\Delta\text{sam37}$ está disminuido al compararlo con la cepa silvestre	45

El N-terminal de Oxa1 contiene información importante para el reconocimiento de $\alpha\beta_2$ -NAC	46
La cinética de importación <i>in vivo</i> de Oxa1 ¹⁻⁵⁰ -GFP está retrasada en la triple mutante $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$	52
Los primeros 10 aminoácidos de Oxa1 son importantes para el reconocimiento de $\alpha\beta_2$ -NAC	54
Un grupo de aminoácidos positivos en la MTS de Oxa1 es importante para el reconocimiento de $\alpha\beta_2$ -NAC	57
Un subconjunto de alrededor de 200 proteínas mitocondriales presenta un grupo de aminoácidos positivos en su extremo N-terminal en <i>S. cerevisiae</i>	58
La importación de la proteína mitocondrial Fumarasa 1 también depende del complejo $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37	60
Parte II. ¿La ausencia del complejo $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37 genera acumulación de proteínas mal dirigidas a la mitocondria?	
Los genes individuales <i>EGD1</i> , <i>EGD2</i> y <i>BTT1</i> no tienen interacción genética con <i>MSP1</i> o <i>CIS1</i>	62
La eliminación simultánea de los genes <i>EGD1</i> , <i>BTT1</i> y <i>MSP1</i> no genera un fenotipo de crecimiento diferente al de la cepa silvestre	64
El fenotipo de crecimiento de la cuádruple mutante $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37\Delta msp1$ es similar al de la triple mutante $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$	68
Discusión	74
Modelo final	65
Conclusiones	75
Perspectivas	76
Materiales y métodos	78
Mantenimiento y manipulación de cepas de levadura	78
Mantenimiento y manipulación de cepas de bacteria	78
Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> DH5 α	78
Transformación de bacteriana	79
Análisis de crecimiento por diluciones seriadas	79
Transformación de levadura	79
Extracción de ADN total de levadura	80
Extracción de ADN plasmídico de bacteria (Método de laboratorio)	81
Extracción de ADN plasmídico de bacteria (Método con kit comercial)	81
Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR	82
Electroforesis en gel de agarosa	84
Generación de mutantes nulas	84
Clonación por el método tradicional	85
Extracción de proteína total	87
Cuantificación de proteínas	87
Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes	
SDS-PAGE e Inmunorreplica tipo Western-blot	88
Fraccionamiento celular	89

Ensayo de digestión con Proteinasa K	90
Preparación de células permeabilizadas o semi-intactas de levadura.	90
Importación en células permeabilizadas o semi-intactas	91
Visualización de células por microscopía confocal	91
Rastreo de interacciones genéticas (RSA)	92
Curva de crecimiento	92
Análisis estadístico	93
Apéndice 1. Cepas	94
Apéndice 2. Medios de cultivo	97
Apéndice 3. Soluciones y amortiguadores	100
Apéndice 4. Oligonucléotidos	105
Apéndice 5. Plásmidos	106
Apéndice 6. Anticuerpos	107
Apéndice 7. Tabla	108
Referencias	109
Anexo I. Artículos de investigación.	125
Anexo II. Artículos de divulgación científica.	125

Resumen

La importación de proteínas a la mitocondria es un proceso fundamental para la célula. En este proceso, una serie de complejos proteicos se encargan de reconocer y dirigir a los precursores mitocondriales a los diferentes compartimentos de este organelo. Sin embargo, los primeros pasos (reconocimiento y transporte) no se han estudiado con detalle. Tradicionalmente, se ha aceptado que las proteínas se sintetizan por completo -y posteriormente- son llevadas por chaperonas hasta la periferia mitocondrial. Este modelo se conoce como post-traducciona. Así mismo, diferentes estudios indican que en algunas proteínas mitocondriales la síntesis y la importación son procesos acoplados, sugiriendo un modelo co-traducciona.

La chaperona citosólica NAC desempeña un papel importante dentro del modelo co-traducciona de importación de proteínas a la mitocondria ya que se une al túnel de salida del ribosoma e interacciona con péptidos nacientes evitando: i) la unión de otras chaperonas ribosomales al mismo sitio, lo cual las llevaría a un destino incorrecto y ii) la adquisición de una conformación incorrecta. Adicionalmente, diversos estudios sugieren una relación directa entre NAC y el transporte de proteínas a la mitocondria. En un estudio previo de nuestro grupo de investigación, describimos la interacción genética y física entre el complejo $\alpha\beta_2$ -NAC y la proteína de la membrana externa mitocondrial Sam37 en *Saccharomyces cerevisiae*. Esta relación es importante para la importación de algunas proteínas mitocondriales como Oxa1, Nfs1, Tom40 y Sod2.

En el presente trabajo nos preguntamos cuál es la región en un grupo de proteínas mitocondriales que es reconocida por $\alpha\beta_2$ -NAC durante los primeros pasos de la importación de proteínas a la mitocondria. Para esto se construyeron diferentes quimeras en donde se fusionó a la GFP el extremo N-terminal (MTS) de Oxa1 y Mdm38 (dos proteínas de la membrana interna mitocondrial) y se usaron técnicas de bioquímica y microscopía confocal para evaluar el destino de las proteínas quiméricas. Oxa1 es una proteína de la membrana interna mitocondrial cuya importación es dependiente de $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37. Por el contrario, Mdm38 no lo es. De manera general, encontramos que la presencia de un grupo de aminoácidos con carga positiva en la MTS de la proteína mitocondrial es importante para dictaminar que ésta requiere una importación mediada por el complejo $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37, probablemente en forma co-traducciona. Hasta el momento, no se había descrito una señal que indique el tipo de importación que sigue una proteína mitocondrial, resaltando lo complejo y regulado que es el proceso de transporte de proteínas en la célula.

Abstract

Mitochondrial protein import is an essential process for the cell. In this process the mitochondrial precursors are targeted to mitochondria and imported by different mitochondrial complexes. The function of these complexes is the distribution and insertion of proteins within the mitochondrial subcompartments. However, the early cytosolic steps (targeting and trafficking) are not studied in detail. In general, it is accepted that mitochondrial proteins are synthesized in the cytosol and then are transported by chaperones to the mitochondrial periphery, this model is called posttranslational. On the other hand, different studies support that for some mitochondrial proteins the translation and import are coupled processes, suggesting a co-translational mechanism.

The cytosolic chaperone NAC plays an important role in the co-translational model during the mitochondrial protein import for diverse reasons: NAC binds to the ribosomal exit tunnel and interacts with nascent peptides, in this way NAC avoids other ribosomal chaperones to bind simultaneously to the ribosome and prevents misfolding and mistargeting. Some investigations suggest a direct role of NAC during mitochondrial protein transport. In a previous study done by our research group, we described the genetic and physical interaction between $\alpha\beta_2$ -NAC and the mitochondrial outer membrane protein Sam37 in *Saccharomyces cerevisiae*; this interplay is important for the import of some mitochondrial proteins such as Oxa1, Nfs1, Tom40 and Sod2.

In this work, we wonder which is the recognition signal identified region in some mitochondrial proteins that is recognized by $\alpha\beta_2$ -NAC during the early steps of mitochondrial import. To answer this question we constructed different chimeras, fusing GFP to the N-terminal region (MTS) of Oxa1 and Mdm38 and used biochemical techniques and confocal microscopy in order to analyze the destination of the chimeric proteins. Oxa1 is a mitochondrial inner membrane protein whose import depends of $\alpha\beta_2$ -NAC and Sam37; in contrast Mdm38 does not depend of this complex. In general, we found that a cluster of positive amino acids in the MTS of mitochondrial protein is important to dictate that the proteins require a co-translational import mediated by $\alpha\beta_2$ -NAC and Sam37.

Lista de tablas

Tabla 1. Proteínas mitocondriales con una alta probabilidad de importación dependiente de $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37

Lista de figuras

Figura 1. Modelos propuestos de importación de proteínas a la mitocondria

Figura 2. Rutas de transporte de proteínas en la célula eucarionte

Figura 3. Señales de localización mitocondrial

Figura 4. Rutas y complejos que se encargan de la importación de las proteínas mitocondriales

Figura 5. Chaperonas moleculares que actúan en el citosol

Figura 6. El complejo NAC en *Saccharomyces cerevisiae*

Figura 7. Respuestas celulares a fallas en los sistemas de importación de proteínas a la mitocondria

Figura 8. El complejo $\alpha\beta_2$ -NAC tiene interacción genética con SAM37

Figura 9. GFP sin una señal de localización mitocondrial tiene localización citosólica

Figura 10. El N-terminal de Oxa1 es importante para su reconocimiento por $\alpha\beta_2$ -NAC durante la importación de proteínas a la mitocondria

Figura 11. La localización mitocondrial de las proteínas Mdm38¹⁻⁵⁰-GFP y Mdm38¹⁴⁵-GFP es independiente del complejo $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37

Figura 12. La proteína quimérica NcSu9¹⁻⁶⁹-GFP se localiza en la mitocondria independientemente de $\alpha\beta_2$ -NAC y SAM37.

Figura 13. La importación *in vivo* de Oxa1¹⁻⁵⁰-GFP está retrasada en la mutante carente de $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37

Figura 14. Los primeros 10 aminoácidos de Oxa1 contienen información importante para el reconocimiento de $\alpha\beta_2$ -NAC

Figura 15. La presencia de un grupo de aminoácidos positivos en la MTS de Oxa1 está relacionada con la función de $\alpha\beta_2$ -NAC

Figura 16. La importación de Fum1 a la mitocondria es dependiente del complejo $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37.

Figura 17. No hay interacción genética entre *MSP1* o *CIS1* con los genes que codifican para las subunidades del complejo NAC

Figura 18. *MSP1* y *CIS1* no tienen interacción genética con los genes que codifican para las subunidades del complejo NAC

Figura 19. No hay interacción genética entre *MSP1* o *CIS1* y combinaciones de dobles mutantes de los genes que codifican para NAC

Figura 20. *MSP1* y *CIS1* no tienen interacción genética con los genes que codifican para las subunidades del complejo NAC

Figura 21. No existe interacción genética entre *MSP1*, y el complejo $\alpha\beta_2$ -NAC y SAM37

Figura 22. Modelo Final

Abreviaturas

ADP, Adenosín difosfato

ADN_{mt}, Ácido desorribunocleico mitocondrial

ARN, Ácido ribunocleico

ARN_t, Ácido ribunocleico de transferencia

ARN_r, Ácido ribunocleico ribosomal

ATP, Adenosín trifosfato

GFP, Proteína verde fluorescente, de las siglas en inglés *Green Fluorescent Protein*

Hsp, Proteína de respuesta a choque térmico, de las siglas en inglés *Heat Shock Protein*

MTS, Secuencia de localización mitocondrial, de las siglas en inglés *Mitochondrial Targeting Sequence*

NAC, Complejo de asociación a polipéptidos nacientes, de las siglas en inglés *Nascent polypeptide Associated Complex*

RSA, Análisis de esporas al azar, de las siglas en inglés *Random Synthetic Assay*

SAM, Maquinarias de distribución y ensamblaje, de las siglas en inglés *Sorting and Assembly Machinery*

SGA, Rastreo de interacciones genéticas, de las siglas en inglés *Synthetic Genetic Array*

SRP, Partícula de reconocimiento señal, de las siglas en inglés *Signal Recognition Particle*

TOM, Translocasa de la membrana externa, de las siglas en inglés *Translocase of Outer Membrane*

TIM23, Translocasa de la membrana interna de 23kDa, de las siglas en inglés *Translocase of Inner Membrane 23*

TIM22, Translocasa de la membrana interna de 22kDa, de las siglas en inglés *Translocase of Inner Membrane 22*

UPR, Respuesta a proteínas mal plegadas, de las siglas en inglés *Unfolded Protein Response*.

Introducción

Las células eucariontes son estructuras biológicas caracterizadas por presentar organelos delimitados por al menos una membrana proteo-lipídica. Esta compartimentalización intracelular le ha permitido a este tipo de células regular en forma eficiente diversos procesos metabólicos, en función de sus requerimientos fisiológicos. [1], [2].

En muchos casos, estas funciones son realizadas por proteínas organelares que son inicialmente sintetizadas por ribosomas, y enviadas al compartimento subcelular donde desarrollarán su función particular. Por lo tanto, uno de los desafíos de la célula es asegurar la localización específica de estas proteínas para garantizar su correcto funcionamiento. Para esto, las proteínas poseen secuencias específicas en la cadena polipeptídica que indican, el sitio celular en donde van a realizar su función [2]. Estas señales son específicas para cada organelo. De esta forma, la célula se asegura que las proteínas lleguen al destino correcto. Adicionalmente, el ARNm contiene señales en su secuencia, específicamente en el 3'UTR, que indican que su traducción debe ser realizada en lugares específicos de la célula [3]. Estas señales han sido descritas para proteínas mitocondriales [4].

En este trabajo, se estudió específicamente el caso de las mitocondrias; organelos especializados en procesos para la producción de energía, el metabolismo aerobio, la señalización celular, y la síntesis de centros Fe-S. No cabe duda que las funciones mitocondriales son relevantes para la célula. Organelos como las mitocondrias y cloroplastos tienen un origen endosimbionte [5]; este evento explica por qué el proteoma de las mitocondrias (y también el de los cloroplastos) tiene dos orígenes genéticos. Es decir, está codificado por dos genomas diferentes: el nuclear y el mitocondrial [6].

Alrededor del 99% del proteoma mitocondrial, se encuentra codificado en el genoma nuclear [6], por lo que una vez que las proteínas mitocondriales son sintetizadas deben ser llevadas hasta la periferia mitocondrial, allí serán distribuidas al interior por una serie de complejos proteicos que se describirán más adelante. Sin embargo, aún se desconocen muchos de los mecanismos por los cuáles las proteínas mitocondriales son reconocidas en el citosol y llevadas hasta este organelo. Por esta razón, estudiar los primeros pasos, reconocimiento y direccionamiento hacia el organelo, durante la importación de proteínas mitocondriales conlleva a realizar aportes importantes en el campo de la biología celular.

En primer lugar, expondremos los dos modelos que explican el sistema de entrega de proteínas, seguido de una corta explicación de las diferentes vías de transporte celular, dando una visión detallada para el caso de la mitocondria. Posteriormente, veremos las chaperonas que participan en el transporte de proteínas y, por último, expondremos las respuestas celulares que existen cuando hay una falla en los mecanismos de importación de proteínas a la mitocondria.

Modelo post-traducciona vs Modelo co-traducciona

Como se mencionó, las proteínas deben ser sintetizadas y posteriormente llevadas hasta el organelo en donde van a desarrollar su función. Sin embargo, esto no siempre es así de sencillo; ya que, en algunas ocasiones, el ribosoma se dirige hasta la periferia del organelo para hacer la traducción, y al mismo tiempo, sucede la importación de dicha proteína; es decir, la traducción y la importación suceden de forma simultánea. Por lo tanto, existen dos modelos que explican cómo sucede el transporte de proteínas en la célula.

El modelo post-traducciona -como su nombre lo indica- considera que la proteína es sintetizada por completo y posteriormente, es llevada hasta el organelo en donde debe realizar su función. Frecuentemente, este tipo de sistema requiere el uso de chaperonas (las cuales serán mencionadas más adelante) para mantener a la cadena peptídica en un estado competente para la importación. Es decir, sin adquirir su conformación nativa pero tampoco agregada (Figura 1, lado derecho) [7].

En cambio, el modelo co-traducciona propone que la proteína es sintetizada al mismo tiempo que es importada al organelo, es decir, la traducción y la importación están acopladas. Este modelo, por su parte, requiere del reconocimiento temprano del péptido naciente para que la maquinaria traduccional sea dirigida hasta la superficie de este organelo (Figura 1, lado izquierdo) [7].

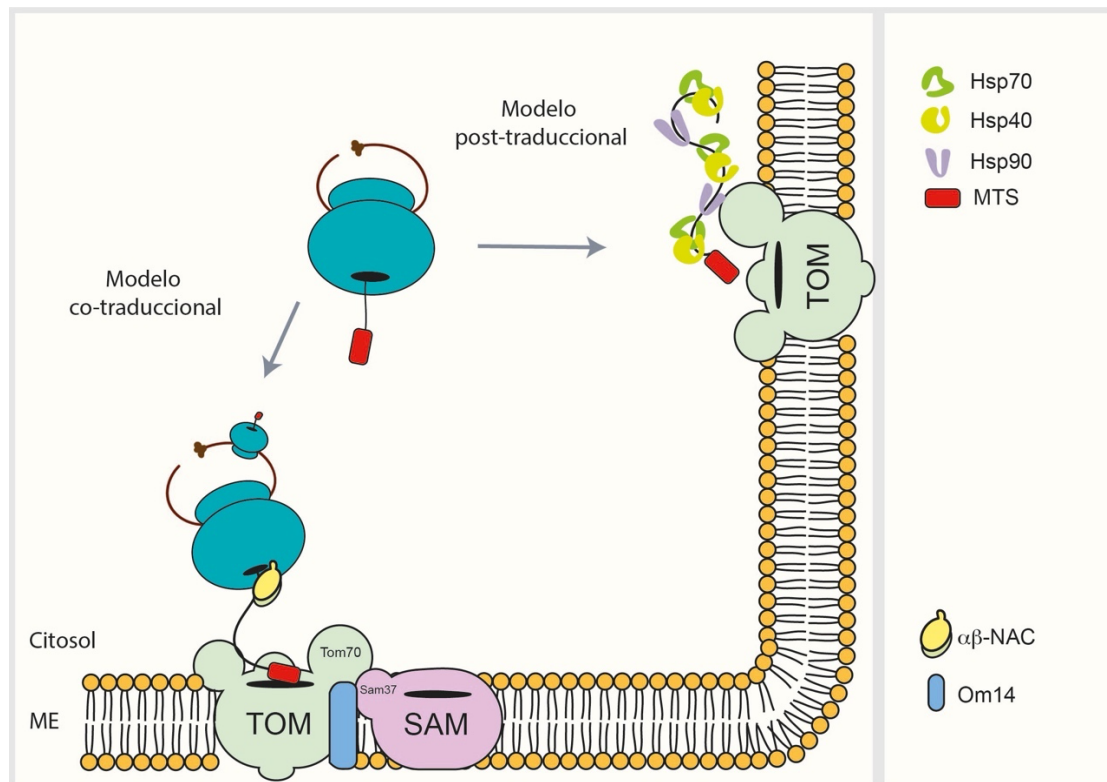


Figura 1. Modelos propuestos de importación de proteínas a la mitocondria. Dos modelos explican cómo son los primeros pasos del transporte de proteínas a la mitocondria. En la parte superior, el modelo post-traducciona l propone que la proteína es importada por completo y posteriormente es llevada a la mitocondria con ayuda de chaperonas (como las proteínas de respuesta a choque térmico). En la parte inferior, el modelo co-traducciona l explica que la traducción y la importación suceden de forma acoplada; en el caso específico de la mitocondria, se ha reportado la participación del complejo NAC y de algunas proteínas de la membrana externa como Om14 y Sam37. Modificado de [8].

Ambos modelos se encuentran bien descritos para el caso del retículo endoplásmico; sin embargo, para el caso específico de la mitocondria hay un debate al respecto [9], [10]. Desde un inicio, el transporte de proteínas a la mitocondria se ha estudiado usando sistemas de importación *in vitro*, en el cual, se realiza la síntesis de la proteína y posteriormente, se pone en contacto con mitocondrias completas que fueron previamente aisladas. Este sistema sugirió que el proteoma mitocondrial podría seguir un modelo post-traducciona l. Sin embargo, solo algunas de las proteínas estudiadas hasta el momento requieren que las reacciones de traducción e importación *in vitro* sean acopladas para que la importación sea exitosa, en este caso, se denomina traducción acoplada a la importación. Lo anterior plantea un gran interrogante, y abre un campo de investigación, ya que hay pocos experimentos *in vivo* que apoyen el modelo co-traducciona l. Además, son pocas las proteínas mitocondriales que se han estudiado hasta el momento y para las cuales se conozca de manera detallada el mecanismo de importación.

Hay diferentes evidencias que apoyan el modelo co-traducciona l durante el transporte de proteínas a la mitocondria, todos estos estudios fueron desarrollados en *Saccharomyces cerevisiae*. Una de las primeras evidencias, desarrolladas por el grupo del Dr. Kellems en la década de 1970, es la observación, mediante microscopía electrónica, de ribosomas citosólicos adosados a la membrana externa mitocondrial [11], [12]. Dichas observaciones fueron confirmadas mediante criomicroscopía electrónica (CRYO-EM), pudiendo visualizar, polisomas completos en la periferia mitocondrial [13]. Estudios más recientes apoyan dichas observaciones, ya que mediante la técnica de “*ribosome-profiling*” se identificó un grupo de ARNm que codifican para proteínas mitocondriales, se encuentran asociados con ribosomas adosados a la membrana externa mitocondrial [14]. Esta técnica se basa en la purificación de ribosomas en condiciones definidas; seguido de una digestión con RNasa y la secuenciación del ARNm que se protegió de dicha digestión; de esta manera es posible conocer los ARNm que están siendo traducidos [14][15].

Otra evidencia que apoya la existencia de la importación co-traducciona l es que, para algunas proteínas, las reacciones de traducción y de importación deben, acoplarse en experimentos *in vitro*. Es decir, para que la translocación al interior de la mitocondria se lleve a cabo es necesaria la adición de mitocondrias aisladas al tubo de reacción en donde se realiza la traducción. Sin duda alguna, el caso más estudiado es el de la fumarasa (Fum1) [16]–[18]; aunque también se ha estudiado el caso de la superóxido dismutasa (Sod2) [19].

La última evidencia, es la observación de ARNm de algunas proteínas mitocondriales en la periferia de este organelo; los casos más estudiados son *ATP2* y *OXA1* [20]–[23]. Es importante mencionar que la mayoría de los ARNm encontrados en estos estudios tienen un origen procariótico, es decir, estaban presentes en la α -proteobacteria que dio origen a las mitocondrias actuales [20]. Lo anterior sugiere que las proteínas mitocondriales que tienen un origen procariótico siguen un transporte co-traducciona l; por lo tanto, aunque hay proteínas mitocondriales que se importan correctamente en sistemas *in vitro*, no necesariamente significa que suceda de esa forma *in vivo*, como es el caso de *Oxa1*.

Generalidades de las rutas de transporte de proteínas

Dependiendo del organelo en donde las proteínas realizan su función, éstas llevan señales que se reconocen como parte de una ruta de transporte particular. Adicionalmente, pueden necesitar de receptores y de complejos proteicos en la membrana blanco que permitan la translocación hacia el interior del organelo. La figura 2 esquematiza algunas de las señales y las rutas que pueden seguir las proteínas dentro de la célula.

Es importante mencionar, que algunas proteínas pueden tener más de una localización subcelular, fenómeno que se ha denominado localización dual [24].

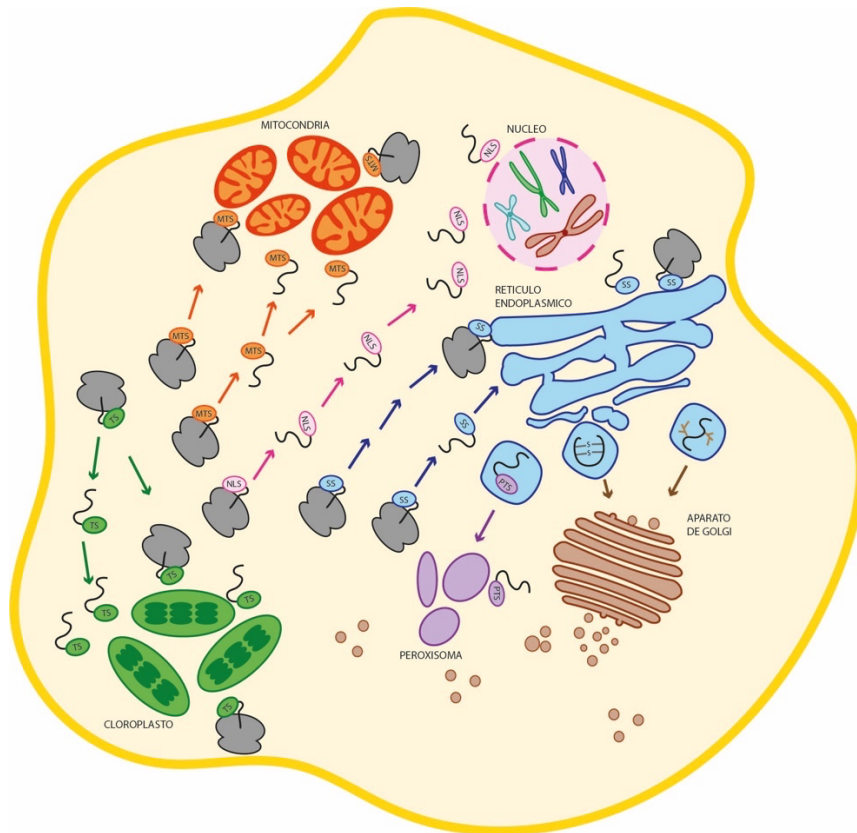


Figura 2. Rutas de transporte de proteínas en la célula eucariote. Las proteínas contienen señales que las dirigen hasta el organelo en donde llevan a cabo su función. MTS, señal de localización mitocondrial; NLS, señal de localización nuclear; SS, secuencia señal de retículo endoplásmico; PTS, señal de localización peroxisoma; TS, secuencia de tránsito. Para más detalle ver sección Generalidades de la rutas de transporte de proteínas. Figura modificada de [25]

El retículo endoplásmico y la vía de secreción

La ruta de transporte hacia retículo endoplásmico es quizás la más estudiada, pues desde muy temprano en la década de los 50, se realizaron estudios para entender este proceso. En el año de 1955 el grupo del Dr. Palade observó ribosomas citosólicos adosados en la membrana del retículo endoplásmico; así como también que las proteínas viajan en vesículas provenientes del aparato de Golgi para ser secretadas [26]–[29]. Posteriormente, el Dr. Blobel propuso y comprobó la teoría de la secuencia señal, que expone que las proteínas del retículo endoplásmico poseen una secuencia de aminoácidos que actúan como señal, para que las proteínas hasta sean llevadas hasta este organelo [30]–[32].

Actualmente, se sabe que la secuencia señal o SS, es una región en la cadena polipeptídica de alrededor de 10-15 aminoácidos hidrofóbicos presentes en el extremo N-terminal de las proteínas del retículo endoplásmico [32]. Esta señal es reconocida por un complejo riboproteico llamado partícula de reconocimiento de

señal o SRP (de las siglas en inglés de *Signal Recognition Particule*) que se une al ribosoma una vez la señal es expuesta; y su función es dirigir a la maquinaria traduccional hasta la membrana del retículo endoplásmico (modelo co-traduccional) en donde interacciona con su receptor. Posteriormente, la proteína es llevada al lumen del retículo endoplásmico por un translocón dependiente de SRP, formado por Sec61 y proteínas accesorias [33], [34]. Adicionalmente, algunas proteínas del retículo endoplásmico siguen una ruta independiente de SRP o post-traduccional. En la ruta independiente de SRP, Sec61 se asocia con otras proteínas para formar un translocón, el complejo SEC [34]. Recientemente, se describió que las proteínas Snd1, Snd2 y Snd3, participan en la ruta de transporte independiente de SRP [35]. Para las proteínas con un conformación Tail-Anchored, el ingreso es mediado con el complejo GET (de las siglas en inglés de *Golgi To ER trafficking deficiencies*) [36]. Es importante mencionar, que la secuencia señal es eliminada por una proteína llamada peptidasa de señal (SP, de las siglas en inglés de *Signal Peptidase*) [33]; adicionalmente, las proteínas pueden sufrir otras modificaciones como la N-glicosilación o la formación de puentes disulfuro, entre otras [37].

Algunas proteínas deben seguir su ruta de transporte ya sea hacia el aparato de Golgi y posteriormente a la membrana plasmática o incluso, a otras células; este proceso es llamado transporte vesicular. Las vesículas están constituidas de una bicapa lipídica formadas de manera azarosa a partir de la membrana del retículo endoplásmico, en un proceso llamado "*bulk flow*" [38], [39]. Hasta el momento, no se conoce una señal específica para la vía de secreción, como las descritas para los demás organelos; sin embargo, el retículo endoplásmico es quién se encarga de asegurar la fidelidad de este transporte [40]. Es importante hacer hincapié en que estas proteínas son transportadas en forma plegada.

Peroxisoma

El estudio de la ruta de transporte del peroxisoma es relativamente reciente. Las proteínas peroxisomales tienen una secuencia señal llamada Señal de reconocimiento peroxisomal o PTS (de las siglas en inglés *Peroxisomal Targeting Sequence*), la cual es muy variable, pero en consenso, está formada por aminoácidos básicos y puede estar presente en el extremo N-terminal o C-terminal de la proteína [41], [42].

La ruta de transporte de las proteínas peroxisomales puede ser de dos tipos, post-traduccional o en vesículas. En esta última, las proteínas deben llegar al retículo endoplásmico y posteriormente, ser transportadas hasta el peroxisoma por medio de vesículas, aunque en el proceso se requieren algunas proteínas del peroxisoma como Pex3 y Pex16. Este proceso se lleva a cabo cuando hay una formación *de novo* de peroxisomas [43].

Para el caso específico de las proteínas que siguen una ruta post-traducciona, la señal PTS es reconocida por el receptor Pex5; este receptor lleva a la proteína hasta la membrana del peroxisoma, en donde un grupo de proteínas membranales permiten la translocación de las proteínas peroxisomales hasta el lumen y posteriormente, Pex5 regresa al citosol para cumplir nuevamente con su función [41], [43].

Núcleo

Diferentes tipos de moléculas deben pasar a través del complejo de poro nuclear o NPC (por las siglas en inglés de *Nuclear Pore Complex*). Este complejo está formado por tres anillos: citoplásmico, central y nucleoplásmico; que permite la entrada y la salida de moléculas que son necesarias para la función del núcleo. Las moléculas que tienen un peso molecular inferior a 40 kDa lo hacen por difusión pasiva [44], [45].

Las proteínas del núcleo son sintetizadas en el citosol por ribosomas libres y posteriormente son importadas al interior del núcleo, dependiendo de su función se pueden mantenerse en este compartimento o incluso regresar al citosol; por esta razón, las proteínas del núcleo tienen dos señales: una de importación y otra de exportación. La señal de localización nuclear o NLS (por las siglas en inglés de *Nuclear Localization Sequence*) es la señal de importación que puede ser de dos tipos: la primera, es una región de 7-10 aminoácidos con carga positiva como lisina y arginina; la segunda, es una señal bipartita de dos grupos de aminoácidos con carga positiva unidos por una región conectora con prolina y tirosina. La señal de exportación nuclear o NES (por las siglas en inglés de *Nuclear Exportation Sequence*) es la señal que permite a las proteínas salir del núcleo y se caracteriza por ser una región rica en el aminoácido leucina [45], [46]. Es importante mencionar que ambas señales son susceptibles a sufrir modificaciones como fosforilación, metilación, acetilación, entre otras. Estas modificaciones permiten regular la entrada y salida de las proteínas al enmascarar dichas señales y, de esta forma, la célula se asegura de que las proteínas nucleolares estén en el lugar correcto en el momento indicado.

Las proteínas que se encargan de llevar a cabo la importación se llaman importinas. La Importina α es la encargada del reconocimiento de la proteína mediante la unión a la NLS, formándose un complejo que, una vez en el núcleo, se disocia por la acción de otra proteína denominada Ran-GTPasa. Este proceso requiere la hidrólisis de GTP [45], [47].

Cloroplasto

Las proteínas del cloroplasto, al igual que las mitocondriales, se encuentran en su mayoría codificadas en el genoma nuclear, por lo que son sintetizadas por ribosomas libres en el citosol y, posteriormente son llevadas a la membrana del cloroplasto por chaperonas que las mantienen en un estado competente para la importación. Al igual que las proteínas de otros organelos, las proteínas del cloroplasto tienen una señal en el extremo N-terminal denominada secuencia de tránsito o TS (por las siglas en inglés de *Transit Sequence*), que se caracteriza por la presencia de aminoácidos fosforilables (serinas y treoninas) [42], [48], [49].

En la membrana del cloroplasto hay un complejo proteico llamado poro de translocación en la envoltura externa del cloroplasto o TOC (por las siglas en inglés de *Translocon at the Outer Envelope of Chloroplast*), el cual tiene dos receptores, Toc159 y Toc34, que se unen a la proteína en un proceso que requiere la hidrólisis de GTP y ATP, y se encargan de pasar la proteína al poro central Toc75. La importación hasta el estroma del cloroplasto implica la formación de un supercomplejo, formado por el complejo TOC-TIC (por las siglas en inglés de *Translocon at the Inner Envelope of Chloroplast*). Una vez que la proteína llega al estroma, la TS es eliminada por una peptidasa [48].

Ruta de transporte de proteínas a la mitocondria

Las mitocondrias son organelos que poseen una doble membrana; por lo tanto, existen cuatro subcompartimentos hasta dónde pueden llegar las proteínas: la membrana externa u OM (por las siglas en inglés de *Outer Membrane*), la membrana interna o IM (por las siglas en inglés de *Inner Membrane*), el espacio intermembranal o IMS (por las siglas en inglés de *Inter Membrane Space*) y la matriz mitocondrial. Así pues, existen rutas de importación para cada uno de los subcompartimentos mitocondriales.

Por otro lado, las mitocondrias también poseen su propio material genético que codifica para proteínas de la cadena transportadora de electrones, subunidades de la ATPasa, algunos ARN de transferencia ARNt y ARN ribosomales ARNr, entre otros; aunque el número de genes y el tamaño del genoma varía entre especies [50]. Lo anterior implica una ruta de importación para las proteínas que son sintetizadas en la matriz mitocondrial.

Señales de localización mitocondrial

Las señales de localización mitocondrial se denominan presecuencias y varían de acuerdo con la proteína y el subcompartimento en donde se localizan. Un resumen de las señales y sus características se muestran en figura 3.

- i. Señal de localización mitocondrial o MTS (por las siglas en inglés de Mitochondrial Targeting Sequence). Está presente en el extremo N-terminal de las proteínas de la matriz mitocondrial; se caracteriza por ser una α -hélice anfipática de longitud variable [51]. La MTS es una señal editable, es decir, es eliminada por una proteasa de la matriz mitocondrial o MPP (por las siglas en inglés de Mitochondrial Processing Peptidase) [52]; esto significa que la proteína se sintetiza como un precursor que al ser editado se convierte en la versión madura de menor peso molecular. Adicionalmente, se ha descrito que la proteasa de la matriz Oct1 puede realizar cortes previos a la acción de MPP que favorecen la edición [53].
- ii. Señales de anclaje hidrofóbico. Estas señales son características de las proteínas de la membrana interna; está constituida por una MTS seguida de un cruce transmembranal o TM (por las siglas en inglés de Trans Membrane domain). Este último actúa como señal que indica que la proteína debe ser insertada en la membrana interna [54]. En este caso, la MTS también es editada.
- iii. Señales bipartitas. Estas señales también están formadas por una MTS seguida de un cruce transmembranal; sin embargo, poseen dos sitios de corte, uno después de la MTS y otro después del cruce transmembranal, realizado por la proteasa de la membrana interna IMP, lo que genera que la proteína se libere en el espacio intermembranal [53]–[55].
- iv. Múltiples señales hidrofóbicas internas. Otras proteínas de la membrana interna, como los transportadores de metabolitos, las poseen. Se encuentran a lo largo de toda la cadena polipeptídica como segmentos hidrofóbicos cortos (aproximadamente 10 aminoácidos). Esta señal no es editable [56], [57].
- v. Motivos de cisteína. Señales presentes en las proteínas del espacio intermembranal, se caracterizan por tener motivos de cisteína que al ser oxidados forman un puente disulfuro, promoviendo su plegamiento y evitando que la proteína regrese al citosol [58], [59]. Los motivos pueden ser CX₃C o CX₉C.
- vi. Señales β . Señal específica para las proteínas barriles- β de la membrana externa, se encuentran en el extremo C-terminal de la proteína blanco [60].

Es importante mencionar que, a pesar de la variedad en las señales de localización mitocondrial, aún hay proteínas para las cuales no se han encontrado ningún tipo de secuencia señal. Algunos ejemplos son los activadores traduccionales Pet309 y Mss51 que tienen localización mitocondrial [61]–[63]. Para las proteínas con localización dual como algunas aminoacil-tRNA sintetasas y la proteína de mamíferos Argonauta 2 Ago2, no se ha descrito una señal de localización mitocondrial [64].







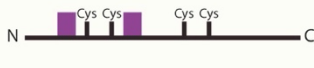
Tipo de señal	Maquinarias	Destino
Secuencias señal editables (Presecuencias α-hélices anfífilas) 	TOM TIM23 PAM	Matriz
Ancla hidrofóbica Señal de transferencia detenida 	TOM TIM23	Membrana interna Espacio intermembranal
Señal bipartita 	TOM TIM23	Espacio intermembranal
Señales no editables		
Señal tipo presecuencia no editable 	TOM TIM23	Membrana interna
Señales internas hidrofóbicas 	TOM TIM22	Membrana interna
Señal β 	TOM SAM	Membrana externa
Señales de retención en el espacio intermembranal ITS / MISS 	TOM TIM 9/10 Mia40	Espacio intermembranal

Figura 3. Señales de localización mitocondrial. Diferentes señales presentes en los precursores mitocondriales los dirigen hasta la mitocondria dependiendo del sub-compartimento mitocondrial donde realizan su función. N, extremo N-terminal; C, extremo C-terminal; +++, región positiva de las MTS. Más detalles en el texto, modificado de [65].

Complejos proteicos que participan en la importación de proteínas mitocondriales Tanto en la membrana externa como en la interna de la mitocondria, hay diferentes complejos que se encargan de la translocación e inserción (en el caso de las proteínas de membrana) de las proteínas mitocondriales, independientemente del genoma en donde se encuentran codificadas. Los complejos proteicos están detallados en el cuadro inferior de la figura4.

- i. El complejo TOM. Es la puerta de entrada para la mayoría de las proteínas mitocondriales; el complejo Poro de Translocación de la Membrana Externa o TOM (por las siglas en inglés de *Translocase of Outer Membrane*) está formado por 7 subunidades: un poro central Tom40, que es un barril β [66]; los receptores Tom20, Tom22 y Tom70, los cuales están insertados en la membrana externa mediante un cruce transmembranal [67]–[69], y tres proteínas que le dan estabilidad al complejo, Tom5, Tom6 y Tom7 [70]–[72]. Los receptores Tom20 y Tom70 tienen afinidad por MTSs y señales internas respectivamente, mientras que Tom22 es el receptor central, ya que recibe las proteínas de Tom20 y Tom70 para ayudar a su paso hacia el espacio intermembranal [73]. Es importante mencionar que Tom70 tiene un homólogo, Tom71 [74]. Recientemente, se han realizado estudios estructurales para determinar la conformación del complejo TOM, encontrando que hay poblaciones que varían entre trímeros y dímeros del

- poro central Tom40, siempre acompañado de Tom22, Tom20, Tom6, Tom5 y Tom7 [75]–[78]. La ausencia de Tom70 en estas observaciones se debe al uso de detergente necesario para el aislamiento del complejo, ya que este puede romper la interacción entre Tom70 y el resto del complejo.
- ii. El complejo TIM23. El complejo Poro de Translocación de la Membrana Interna (por sus siglas en inglés *Translocase of Inner Membrane*) es el encargado de llevar a las proteínas hasta la matriz mitocondrial o liberarlas en la membrana interna para su posterior inserción. El complejo está formado por las subunidades centrales: Tim23 y Tim17 que forman el poro de translocación [79]–[81] y Tim50, es el receptor de los precursores provenientes del complejo TOM [82]. Tim 21, por su lado, participa en la interacción con el complejo TOM para facilitar el transporte [83], así como con los complejos III y IV de la cadena respiratoria, interacción transitoria que facilita la inserción de algunas proteínas directamente en estos complejos [84], [85]. La subunidad Mgr2 es la compuerta lateral del complejo, cuando se reconoce una señal de anclaje hidrofóbico (señal de liberación lateral en la membrana) [86]; aunque el proceso no se conoce a detalle, se sabe que la presencia de un cruce transmembranal detiene la translocación en un mecanismo que se llama “*stop-transfer*”, permitiendo así la liberación de la proteína en la bicapa lipídica [54], [86]. Por el contrario, si la proteína contiene una señal tipo MTS es entregada al complejo PAM (detallado a continuación). Es importante mencionar que el proceso de translocación en la membrana interna depende del potencial de membrana mitocondrial $\Delta\Psi$ [6].
 - iii. El complejo PAM. El complejo Motor Asociado al poro de translocación de la Presecuencia o PAM (por las siglas en inglés de *Presequence-translocase Associated Motor*) se encuentra asociado al complejo TIM para llevar hasta la matriz mitocondrial todas las proteínas con MTS. Está formado por: la chaperona Hsp70 mitocondrial o mtHsp70, que junto con Tim44 forman el motor central del complejo [87], [88], las chaperonas J, Pam18 y Pam16, que actúan como andamiaje para mtHsp70 [89], [90], el intercambiador de nucleótidos Mge1 [91] y Pam17 [92]. Este complejo requiere la hidrólisis de ATP por parte de mtHsp70, para conducir la translocación de la proteína hasta la matriz [93].
 - iv. El complejo TIM22. Este complejo es similar a TIM23, pero su función es insertar a los transportadores de metabolitos en la membrana interna. Al igual que en los otros casos, está formado por las siguientes subunidades: Tim22, que forma el poro del complejo [94]. Tim54, que es el receptor [95], y se une al complejo de chaperonas Tim9-Tim10-Tim12. Estas últimas reciben a la proteína proveniente del complejo TOM [96], [97]. Al igual que

- TIM23, TIM22 requiere del potencial de membrana para la translocación de las proteínas.
- v. El complejo SAM/TOB. El complejo SAM (por las siglas en inglés de *Sorting and Assembly*), se encuentra en la membrana externa de la mitocondria y se encarga de la inserción de las proteínas barriles β en dicha membrana [98]. Está formado por tres subunidades: Sam50, un barril β que es el poro central del complejo y que tiene un dominio POTRA que reconoce las señales β en las proteínas blanco [99]; Sam35 y Sam37, son proteínas asociadas a la membrana externa con dominios hidrofílicos expuestos hacia el citosol [100]–[102]. Requiere de la ayuda de las chaperonas pequeñas del espacio intermembranal: el complejo Tim9-Tim10.
 - vi. El complejo MIA. MIA (por las siglas en inglés de *Mitochondrial Intermembrane space Assembly machinery*) es un complejo del espacio intermembranal de la mitocondria que favorece el plegamiento de las proteínas de este compartimento y evita la translocación inversa hacia el citosol. La proteína central de este complejo es Mia40, que al recibir a la proteína forma puentes disulfuro, evitando su regreso al citosol [103], [104]. Erv1 se encarga de la re-oxidación de Mia40 para que esté lista para otro ciclo de importación [105], [106]. Los electrones obtenidos en los ciclos de oxidación-reducción durante la formación de los puentes disulfuro son entregados a la cadena transportadora de electrones [105].
 - vii. El complejo MIM. Este complejo formado por las subunidades Mim1 [107] y Mim2 [108], participa en la inserción de proteínas llamadas “*signal-anchored*” en la membrana externa mitocondrial, es decir, proteínas que son ancladas a la membrana mediante un segmento hidrofóbico que se encuentra en el extremo N-terminal de la misma [109]. Se ha descrito que cuando la proteína solo tiene un cruce, éste actúa como señal que permite la acción de MIM; sin embargo, cuando la proteína importada tiene más de un cruce, es necesario el paso a través de TOM y, posteriormente, MIM las recibe desde el espacio intermembranal [6].
 - viii. La proteína de la membrana interna Oxa1. Oxa1 es una proteína de la membrana interna mitocondrial que se encarga de la inserción en esta membrana desde la matriz mitocondrial de proteínas que vienen tanto del citosol como de las que son sintetizadas directamente en la matriz mitocondrial [110]. Oxa1 es un homólogo de YidC y Alb3, proteínas presente en bacterias y en las membranas tilacoidales, respectivamente; lo cual indica que su función está conservada desde bacterias hasta animales y plantas [111], [112].

Rutas de importación de proteínas a la mitocondria.

Las diferentes rutas de importación varían según el destino final o el subcompartimento mitocondrial en donde la proteína realiza su función y son mediadas por los diferentes complejos descritos en la sección anterior [6], [113], [114]. En la figura 4 se esquematizan las rutas que serán descritas a continuación:

- i. Proteínas de la membrana externa. Las proteínas de la membrana externa mitocondrial son de dos tipos: Barril β y las formadas por α -hélices. Los barriles β deben pasar a través del complejo TOM hasta el espacio intermembranal, donde son recibidas por las chaperonas Tim9-Tim10, quienes llevan a la proteína hasta el complejo SAM, que mediante su dominio POTRA, reconoce la señal β e inserta a los barriles en la membrana. Para el caso de las proteínas formadas por α -hélices, se requiere del complejo MIM para su inserción en la membrana.
- ii. Proteínas del espacio intermembranal. Estas proteínas deben pasar inicialmente por el complejo TOM, y en el espacio intermembranal son ayudadas por el complejo MIA, quien se encarga de su ubicación y plegamiento. Algunas otras proteínas, como aquellas con señales bipartitas, deben pasar por TOM y posteriormente, por el complejo TIM; antes de ser liberadas en la matriz, su MTS es eliminada por proteasas, así como también el cruce transmembranal, dejándolas libres en el espacio intermembranal de la mitocondria.
- iii. Proteínas de la membrana interna. Existen rutas diferentes para llegar hasta este subcompartimento cuando las proteínas son sintetizadas en el citosol. La primera de ellas es para las proteínas cuya función es transportar sustratos de la matriz al espacio intermembranal y viceversa; en este caso, deben pasar en primer lugar por TOM y posteriormente, son ayudadas por chaperonas Tim9-Tim10-Tim12 que las llevan hasta TIM22, quien se encarga de su inserción en la membrana. La segunda, implica el paso por TOM-TIM23 en donde el proceso es detenido al detectar la presencia de un cruce transmembranal en la cadena polipeptídica, esto conlleva a la liberación lateral de la proteína en la bicapa lipídica. Un grupo de proteínas de la membrana interna son transportadas a través de TIM23 hasta la matriz, en donde son reconocidas por Oxa1 e insertadas en la membrana. Además, si la proteína es codificada en el genoma mitocondrial, su importación en la membrana interna es de tipo co-traducciona l y es mediada por Oxa1.
- iv. Proteínas de la matriz mitocondrial. Estas proteínas contienen una MTS y siguen una ruta mediada por los complejos TOM-TIM23-PAM. Una vez la proteína llega a la matriz, su MTS es eliminada por la proteasa MPP.

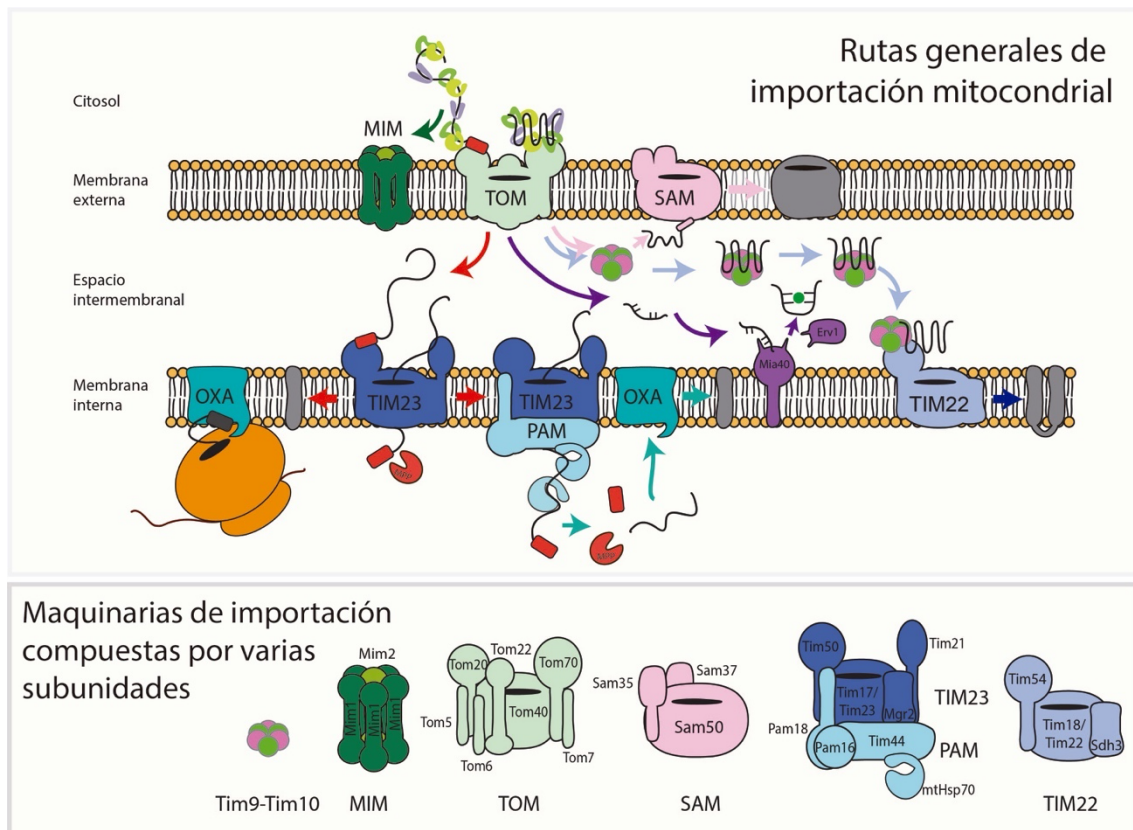


Figura 4. Rutas y complejos que se encargan de la importación de las proteínas mitocondriales. En el cuadro superior se esquematizan las rutas de importación mitocondrial: proteínas de la membrana externa con topología de cruces transmembranales (flechas verdes oscuras), proteínas de la membrana externa con topología de barril-β (flechas rosadas claras), proteínas del espacio intermembranal (flechas púrpuras), proteínas de la membrana interna que son transportadores (flechas lilas), proteínas de la membrana interna o de la matriz (flechas rojas). En el cuadro inferior se muestran a detalle las subunidades de los complejos de importación mitocondriales. Tomado de [65].

Chaperonas Moleculares en el Plegamiento de Proteínas

Adquirir la conformación tridimensional de una proteína es un proceso complejo que depende de diferentes factores, como la secuencia de aminoácidos, las interacciones inter- e intramoleculares y la energía que se requiere para el plegamiento [115]. Las chaperonas son proteínas que asisten el plegamiento de otras proteínas para evitar que adquieran conformaciones incorrectas o incluso lleguen a ser agregados proteicos [115], [116].

Muchas chaperonas son fundamentales en el proceso de transporte de las proteínas mitocondriales tanto en el modelo post-traduccional como en el co-traduccional, aunque de diferentes maneras. En la figura 5 se resumen las chaperonas que actúan en el citosol durante el proceso de plegamiento de proteínas.

Chaperonas Hsp

Las proteínas Hsp (por las siglas en inglés de *Heat Shock Protein*) son tal vez las chaperonas por excelencia de la célula. Su nombre deriva de que su expresión es aumentada cuando las células son expuestas a condiciones de estrés, específicamente cambios en la temperatura o estrés, ya que, estos pueden ocasionar daños en la estructura de las proteínas. Su principal función radica en el plegamiento *de novo* de proteínas recién sintetizadas, pero participan en otros procesos como son puntos de control de calidad, translocación de proteínas, replegamiento correcto de proteínas mal plegadas y desagregación [115]. Inicialmente, fueron clasificadas según su peso molecular.

- i. Hsp70s. Estas chaperonas están presentes en todos los dominios de la vida. Tienen un amplio espectro de acción, aunque su principal función es asistir el plegamiento *de novo* de las proteínas recién sintetizadas [115]–[118]. Poseen como mínimo dos de los siguientes dominios en su estructura: dominio de unión a nucleótidos o NBD (por las siglas en inglés de *Nucleotide Binding Domain*), dominio de tapa helicoidal o SBD α (por las siglas en inglés de *Substrate Binding Domain α*), dominio de unión a sustrato o SBD β (por las siglas en inglés de *Substrate Binding Domain β*) y un dominio C-terminal que es desordenado; en este último, se encuentra un motivo conservado EEVD (Glu-Glu-Val-Asp), importante para la interacción con cofactores u otras chaperonas [118]. El mecanismo consiste en la unión de la Hsp70 a un grupo de aminoácidos hidrofóbicos (alrededor de 5-7) para evitar la formación de interacciones incorrectas entre los otros dominios de la proteína [117], [118]. Este proceso es dependiente de ATP; para lo cual se necesita una Hsp40 (ver siguiente sección), que favorece la hidrólisis de ATP, y un intercambiador de nucleótidos o NEF (por las siglas en inglés de *Nucleotide Exchange Factor*) que, como su nombre lo indica, intercambia ATP por ADP facilitando así la liberación de la proteína y permitiendo un nuevo ciclo [118], [119]. Una vez la proteína es liberada, ésta puede seguir dos caminos: plegarse de forma espontánea o ser transferida a una Hsp90.

En la levadura *S. cerevisiae*, hay cuatro Hsp70 libres en el citosol (Ssa1, Ssa2, Ssa3 y Ssa4) [120], las cuales han sido relacionadas con el transporte post-traducciona l de proteínas a la mitocondria. En primer lugar, diferentes Hsp70 son importantes para la importación de diferentes sustratos hidrofóbicos, como el acarreador de fosfatos ADP/ATP de levadura, el transportador mitocondrial de péptidos de mamífero y el reportero de Cyb₂⁽¹⁻⁸⁷⁾-DHFR [121], [122]. Lo anterior es importante ya que se ha observado que Tom70 puede interactuar con los motivos EEVD de Hsp70 o Hsp90 a través de sus dominios TPR, manteniendo así los sustratos en un estado

competente para su importación [122]–[124]. Adicionalmente, una mutante sensible a temperatura de *SSA1* de levadura, acumula precursores de Atp2, carboxipeptidasa Y y factor α ; lo que sugiere que Ssa1 participa en el proceso del correcto direccionamiento de las proteínas mitocondriales y del retículo endoplásmico [125].

- ii. Hsp40s. Estas chaperonas son cofactores esenciales en el funcionamiento de las Hsp70, ya que facilitan la hidrólisis de ATP. También son llamadas proteína J o JDP (por las siglas en inglés de *J Domain Protein*); pueden tener 4 dominios: un dominio J ubicado en el N-terminal, una región rica en glicinas y fenilalaninas G/F, un dominio de unión a la proteína y un dominio de dimerización, los dos últimos ubicados en el C-terminal; sin embargo, el dominio J es suficiente para realizar la función [118], [126].

Algunas de las diferentes Hsp40 en la célula son Sti1, Ydj1, Xdj1 y Djp1. Adicionalmente, se ha visto que pueden promover la importación de proteínas mitocondriales sin asociarse con Hsp70 o Hsp90. Un ejemplo de lo anterior es la interacción física entre Xdj1 con Tom22 para favorecer la importación de precursores hidrofóbicos como Oxa1 [127]. Djp1, por su parte, interacciona con Tom70 para promover el direccionamiento hacia Mim1 en la membrana externa mitocondrial [127], [128]. Otras Hsp40, junto con Hsp70, favorecen la entrega de proteínas tipo barril β al poro de translocación TOM [129].

- iii. Hsp90s. Estas chaperonas actúan después de las Hsp70 facilitando los últimos pasos del plegamiento, de forma dependiente de ATP, para que las proteínas adquieran su estructura nativa. Están presentes en todos los reinos de la naturaleza y están formadas por tres dominios: un dominio N-terminal en el cuál se da la unión a ATP, un dominio intermedio o MD (por las siglas en inglés de *Middle Domain*) en donde sucede la unión a la proteína sustrato y un dominio C-terminal, el cual permite la dimerización y lleva el dominio MEEVD (Met-Glu-Glu-Val-Asp) que permite la interacción con otras chaperonas como Sti1 y Cdc37 [119], [130].
- iv. Chaperoninas o Hsp60. Son grandes complejos proteicos en forma de cilindro en donde encapsulan a la proteína sustrato para favorecer su plegamiento, en ciclos de unión y liberación que dependen de la hidrólisis de ATP [115], [116]. Consisten en dos anillos concéntricos formados por 7-9 unidades, dependiendo de la especie. Existen dos grupos de chaperoninas. Las del grupo I contienen 7 unidades por anillo además de tener una tapa; ejemplos son GroEL-GroES, la Hsp60-Hsp10 mitocondrial y la Cpn60-

Cpn10/Cpn20 del cloroplasto. Las del grupo II tienen 8-9 subunidades por anillo y no tienen tapa; ejemplos de éstas son el termosoma en arqueas y TRlcC/CCT en eucariontes [131], [132]. Un estudio reciente, sugiere que TRlcC/CCT promueve la importación de proteínas mitocondriales debido a que se une a precursores mitocondriales de forma co-traducciona l y en sitios diferentes a la unión de Ssb [133].

Chaperonas asociadas al ribosoma

Como su nombre lo indica, son chaperonas que se encuentran asociadas al ribosoma para prevenir que las cadenas nascentes adquieran conformaciones incorrectas al formar interacciones desfavorables al exponerse dominios hidrofóbicos [115]. Sin embargo, su acción se restringe hasta que emerge un dominio completo del túnel de salida del ribosoma. Estas chaperonas son fundamentales en el proceso de importación co-traducciona l en la membrana plasmática bacteriana, el retículo endoplásmico y la mitocondria.

- i. Trigger Factor. Es la única chaperona bacteriana asociada al ribosoma, interacciona con la subunidad grande del ribosoma y al mismo tiempo, con la mayoría de las proteínas citosólicas y de la vía de secreción bacteriana. Cuando el péptido se libera de la chaperona *Trigger Factor* puede terminar su plegamiento de forma espontánea o puede ser transferido a DnaK (Hsp70 bacteriana) o a GroEL para finalizar el plegamiento de las cadenas nascentes. Esta chaperona se une a su sustrato al exponerse los primeros 60 aminoácidos, reconoce específicamente grupos de 8 residuos preferentemente básicos o aromáticos. Su acción es independiente de ATP [115], [134].
- ii. RAC/Ssb. El Complejo Asociado a Ribosomas o RAC (por las siglas en inglés de *Ribosome Associated Complex*) es un grupo de chaperonas Hsp70 que, como su nombre lo indica, se encuentra asociado al ribosoma. En levadura, está formado por un heterodímero: Ssz1, una Hsp70 y, Zuo1, una proteína J o Hsp40 que es la encargada de interaccionar con el ribosoma. RAC, a su vez, es el compañero con dominio J de Ssb, la Hsp70 que está asociado al ribosoma y que está codificada por dos isoformas *SSB1/SSB2* [115], [120], [135]. Ssb es capaz de unirse a un amplio número de proteínas, específicamente a aminoácidos con cargas positivas y grupos hidrofóbicos [136]. Recientemente, se encontró que Ssz1 se une antes al péptido nascente antes de transferirlo a Ssb, probando su actividad de chaperona [137].
- iii. Partícula de Reconocimiento Señal. SRP (por las siglas en inglés de *Signal Recognition Particle*) es una ribo-nucleoproteína que participa en el

reconocimiento de proteínas del retículo endoplásmico en eucariontes y de la membrana plasmática en procariontes [33], [138]. En el caso específico de células eucariontes reconoce la secuencia señal de proteínas del retículo endoplásmico y dirige al ribosoma hasta la membrana de este organelo en donde interacciona con su receptor y la proteína nascente se entrega a SEC61 [33]. SRP está formada por 6 subunidades de diferentes pesos moleculares y un 7S RNA [139]. La subunidad Srp54 es la que se une a la secuencia señal del péptido nascente y, posteriormente, interacciona con su receptor en la membrana. Ambos tienen un dominio de unión a GTP, cuya hidrólisis facilita la entrega del sustrato al translocón dependiente de SRP y la liberación de SRP de su receptor, para iniciar un nuevo ciclo [33], [138].

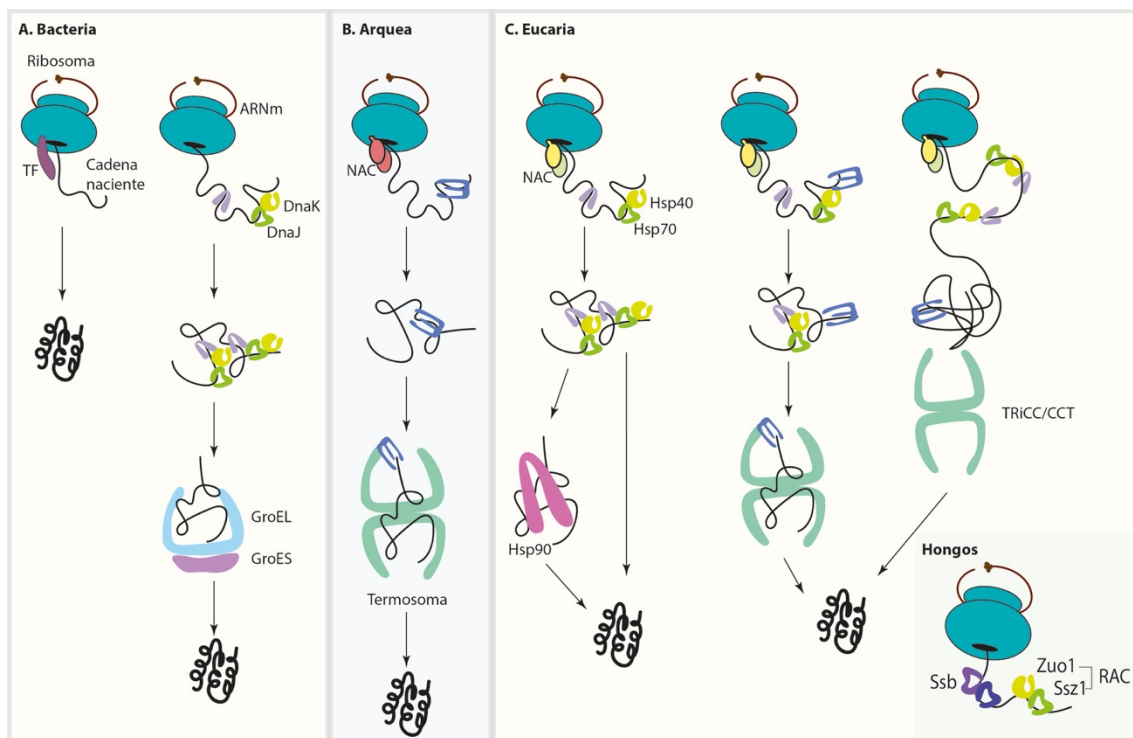


Figura 5. Chaperonas moleculares que actúan en el citosol. A. Bacteria B. Arquea y C. Eucaria. Trigger Factor (TF) y NAC son chaperonas que se unen al ribosoma para asistir a los péptidos nacientes de una manera co-traduccion. A las cadenas nacientes más largas se les unen chaperonas de la familia Hsp (DnaK o Hsp70, según el dominio de la vida) junto con su respectivo intercambiador de nucleótidos (DnaJ o Hsp40). Péptidos parcialmente plegados pueden ser transferidos a chaperoninas (GroEL-GroES, Termosoma o TriC/CCT según el dominio). Hsp90 pueden recibir sustratos provenientes de Hsp70 para finalizar el plegamieto. En hongos, existe un complejo adicional que se une al ribosoma RAC. Modificado de [115].

El complejo NAC (Nascent polypeptide-Associated Complex)

El Complejo de Asociación a polipéptidos Nacientes o NAC (por las siglas en inglés de *Nascent polypeptide-Associated Complex*) es un heterodímero formado por las subunidades α y β . Este complejo se descubrió el 1994 en un sistema de reticulocitos de bovino, mostrando que se asocia con ribosomas, además de

entrecruzar con diferentes cadenas nacientes con o sin secuencia señal [140]; por lo que se propuso que NAC ayuda en la especificidad del transporte de proteínas hacia el retículo endoplásmico [140], [141]. En adición a lo anterior, se ha planteado a NAC como una chaperona que asiste el plegamiento co-traduccional al evitar que los péptidos nacientes adquieran una conformación incorrecta [142].

Posteriores investigaciones mostraron que NAC evita que las cadenas nacientes que no poseen secuencia señal se dirijan a los sistemas de endomembranas; dicho de otra manera, NAC es un regulador negativo del transporte de proteínas al retículo endoplásmico evitando la unión del ribosoma con el translocón dependiente de SRP en la membrana de este organelo [143]–[147]. Sin embargo, como NAC y SRP son capaces de unirse a las cadenas nacientes y están presentes en el túnel de salida del ribosoma, no se sabe exactamente qué pasa cuando la cadena polipeptídica que se está traduciendo contiene una secuencia señal; se ha propuesto que en este caso NAC se aleja del ribosoma para permitir la llegada de SRP y, así, guiar al péptido naciente hasta el retículo endoplásmico [147], [148].

Adicionalmente, se han realizado diferentes investigaciones para conocer exactamente con cuáles proteínas ribosomales interacciona NAC. Una de estas investigaciones muestra que NAC interacciona con la proteína del túnel de salida uL23, misma proteína a la cual se une *Trigger Factor* en bacterias [149]. Pech et al. (2010), probaron que la subunidad β de NAC interactúa con la proteína eL31, mientras que la subunidad α interacciona con eL27 [150]. Recientemente, se llevó a cabo un estudio para esclarecer con más detalle el modo de acción de NAC en el ribosoma; mostrando que el extremo N-terminal de la subunidad β es capaz de introducirse en el túnel de salida donde interacciona con el péptido naciente y, a medida que este sale del túnel empuja a β -NAC hacia el exterior en donde interacciona con las proteínas uL22 y eL31; por otro lado, la subunidad α se une a las proteínas uL23 y uL29, este descubrimiento fue realizado mediante entrecruzamientos marcando la subunidad grande 60S de ribosomas de levadura y complejo NAC de *C. elegans* expresado de forma recombinante [151].

En la levadura *S. cerevisiae* las subunidades que constituyen al complejo NAC están codificadas por tres genes (Figura 6): *EDG2*, que codifica para la subunidad α ; *EGD1* y *BTT1*, que codifican para las subunidades β_1 y β_2 , respectivamente [152]–[154]. Por lo tanto, en este organismo se pueden formar dos complejos NAC diferentes: el complejo $\alpha\beta_1$ -NAC y el complejo $\alpha\beta_2$ -NAC [155]. Sin embargo, se sabe que la expresión de las subunidades β es diferente ($\beta_1:\beta_2=100:1$) y por lo tanto se ha planteado que el heterodímero más abundante es el $\alpha\beta_1$ -NAC [146], [156], [157]. Es importante resaltar que la eliminación de los tres genes que codifican para el complejo NAC no provoca un fenotipo diferente al de una cepa silvestre en

levadura. Por el contrario, en otros organismos como *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* y *Mus musculus*, la eliminación de al menos uno de los genes causa un fenotipo letal en etapas tempranas del desarrollo [158]–[160]. Esta diferencia en los fenotipos sugiere que en *S. cerevisiae* pueden existir proteínas con una función redundante a NAC.

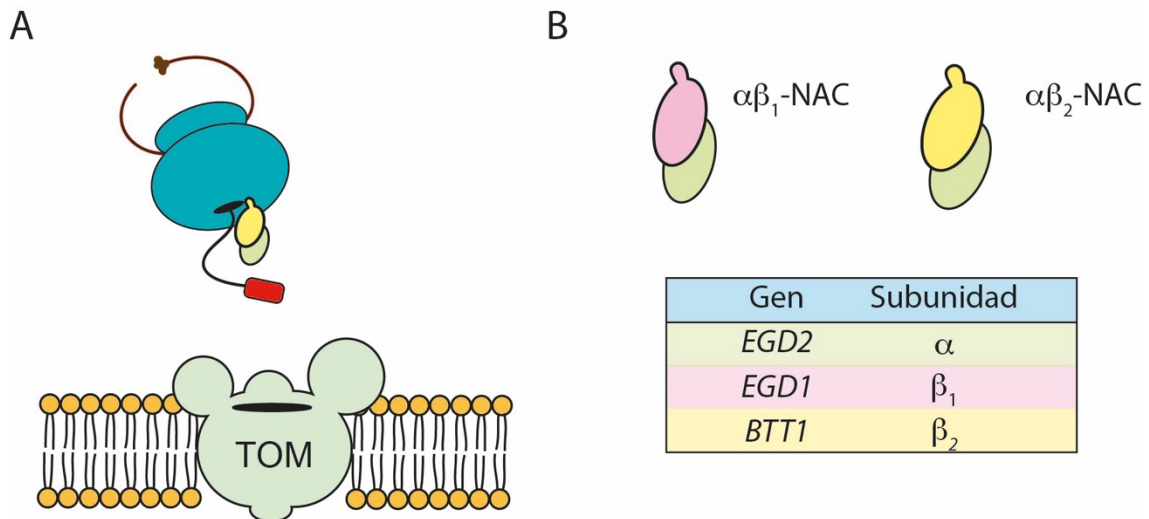


Figura 6. El complejo NAC en Saccharomyces cerevisiae. A. NAC se une al túnel de salida del ribosoma a través de la subunidad β . *B.* El complejo NAC es un heterodímero formado por las subunidades α y β , en *S. cerevisiae* hay dos posibles complejos NAC $\alpha\beta_1$ -NAC y $\alpha\beta_2$ -NAC producto de la duplicación del gen que codifica para la subunidad β .

NAC y el transporte de proteínas a la mitocondria

Algunos de los estudios mencionados, llevaron a pensar que NAC favorece la especificidad de SRP al evitar que proteínas mitocondriales sean reconocidas erróneamente como residentes del retículo endoplásmico [141], [143], [144]. Algunos estudios recientes han sugerido que NAC participa en el transporte cotraduccional de proteínas a la mitocondria [161], [162]; de una manera análoga a como funciona SRP con las proteínas del retículo endoplásmico y de la vía de secreción.

Los primeros estudios fueron realizados por el grupo del Dr. Lithgow, en donde observaron que NAC está asociado con ribosomas que se encuentran en la periferia de la mitocondria; adicionalmente, una doble mutante de las subunidades α y β_1 ($\Delta egd1\Delta egd2$) tiene menor cantidad de ribosomas adosados a la mitocondria y en esta misma mutante, los niveles basales de algunas proteínas mitocondriales Fum1, Mdh1 y Mmf1 están disminuidos comparados con los niveles de la cepa silvestre [163]. En un estudio independiente, se observó que NAC favorece la importación de Mdh1 en una forma dependiente a la expresión de NAC [164].

En otra investigación, se analizó mediante microarreglos los ARNm que estaban siendo traducidos por ribosomas que unen a los complejos $\alpha\beta_1$ -NAC o $\alpha\beta_2$ -NAC, encontrándolo siguiente: $\alpha\beta_1$ -NAC se une a ribosomas que traducen enzimas, mientras que el complejo $\alpha\beta_2$ -NAC se une al ribosoma que traduce proteínas mitocondriales y proteínas del ribosoma citosólico y mitocondrial [161].

Otros estudios en *C. elegans* probaron que la ausencia de NAC ocasiona que proteínas del retículo endoplásmico se vayan de manera errónea a la mitocondria y, al mismo tiempo, proteínas mitocondriales se dirijan al retículo endoplásmico, generando un incremento en la expresión de algunos genes, como los que codifican para chaperonas mitocondriales y genes relacionados con la Respuesta a Proteínas mal Plegadas o UPR (de las siglas en inglés, Unfolded Protein Response) [162].

Otras funciones de NAC

Al complejo NAC se le han adjudicado algunas otras funciones, como participar en la proteostasis celular. En *C. elegans* se ha observado que NAC está presente en agregados proteicos cuando se induce un estrés térmico a larvas adultas [165]. Otro estudio en este mismo organismo mostró que el complejo NAC es capaz de suprimir la agregación de proteínas, particularmente de aquellas que tienen una sección de poli-glutaminas en su cadena de aminoácidos, las cuales se sabe que causan enfermedades neuro-degenerativas en humanos [166]. Por otro lado, el complejo NAC es importante en la degradación de agregados proteicos mediante autofagia [167].

Respuestas celulares derivadas a fallas en el proceso de importación de proteínas a la mitocondria en *S. cerevisiae*

El amplio conocimiento que se tiene de los sistemas de importación de proteínas a la mitocondria respondió los interrogantes de cómo son importadas e insertadas las proteínas mitocondriales y se determinó la importancia de algunas subunidades de dichos complejos, puesto que su ausencia causa un fenotipo letal en levadura [6]. Recientemente, se ha dirigido la atención hacia otros interrogantes que podemos agrupar en la siguiente pregunta: ¿Cuáles son las respuestas celulares cuando los sistemas de reconocimiento, direccionamiento o importación fallan o no funcionan correctamente? Diferentes estudios han dado algunas respuestas a esta interesante pregunta. De manera general, alteraciones en los complejos encargados de la importación de proteínas mitocondriales, especialmente aquellas que afectan al complejo TOM, ocasionan cambios transcripcionales en la célula: genes que codifican para chaperonas y subunidades del proteosoma son activados y genes que codifican para la cadena transportadora de electrones y síntesis de ATP son

reprimidos; de esta forma, la célula puede lidiar con el estrés generado por la ausencia de proteínas mitocondriales desarrollando su función [168].

La identificación de respuestas a alteraciones específicas ha sido clave para entender de forma precisa la regulación y los sistemas de control de calidad que poseen las mitocondrias, algunas de ellas se describen a continuación y se resumen en la figura 7.

- i. Msp1, una AAA-ATPasa presente en la membrana externa mitocondrial y en el retículo endoplásmico, es protagonista al ser capaz de extraer e identificar a proteínas que fueron mal localizadas o están atascadas en el complejo TOM. En la respuesta mitoCPR (de las siglas en inglés *mitochondria Compromised Protein-import Response*), Msp1 y Cis1 trabajan en conjunto para identificar proteínas mitocondriales con una señal bipartita que se atorán en la puerta de entrada TOM debido a cambios en el potencial de membrana ($\Delta\Psi$) [169], [170]. Así mismo, Msp1 reconoce proteínas con topología TA (de las siglas en inglés *Tail Anchored*, son aquellas proteínas que tienen un cruce transmembranal en el extremo C-terminal) que fueron localizadas erróneamente en la membrana externa mitocondrial, y las redirige al retículo endoplásmico, donde Cdc48 las marca con ubiquitina para su posterior degradación [171], [172].
- ii. La acumulación de precursores mitocondriales en el citosol causada por alteraciones en Mia40 ocasiona una reprogramación traduccional y un incremento en la actividad del proteosoma, estos resultados se agrupan en las respuestas llamadas UPRam y mPOS (de las siglas en inglés *Unfolded Protein Response activated by mistargeting of proteins* y *mitochondrial Precursor Over-accumulation Stress*, respectivamente) [173], [174].
- iii. Ubx2 es una proteína con localización dual, en mitocondria y en retículo endoplásmico. La respuesta mTAD (de las siglas en inglés *mitochondrial protein Translocation-Associated Degradation*.) describe que Ubx2 reconoce precursores que bloquean el poro de translocación de TOM y recluta a Cdc48, que es capaz de retirar a la proteína atascada para su degradación [175]. Por otro lado, esta proteína puede detectar proteínas que sufrieron daños ocasionados por variaciones en temperatura y, por lo tanto, no fueron correctamente llevadas a la mitocondria; estas proteínas son reconocidas por chaperonas de la familia SSA y Sis1 para que el sistema Doa1-Ufd1-Npl4 con ayuda de Ubx2 las dirija a degradación mediante el marcaje por ubiquitinación [176].

Las fallas en los sistemas de transporte e importación de proteínas mitocondriales tienen como consecuencia principal la localización incorrecta de las mismas. Un estudio reciente muestra que los precursores mitocondriales pueden tener cinco destinos cuando hay alteraciones en el potencial de membrana: mitocondria, núcleo, retículo endoplásmico, citosol y degradación por el proteosoma [177]. Sin dudas, el caso más comprendido es el del retículo endoplásmico, pues se sabe que la inserción de precursores mitocondriales es dependiente del sistema GET [178] y que despierta la respuesta a proteínas mal plegadas o UPR [162], lo que facilita su estudio. Se ha propuesto que la chaperona presente en la membrana del retículo endoplásmico Djpl1 puede reconocer a proteínas que llegan erróneamente al retículo y re-dirigirlas a la mitocondria, esta ruta se llamó ER-SURF (de las siglas en inglés *Endoplasmic Reticulum SURFace retrieval pathway*) [179].

Otras proteínas del retículo endoplásmico que están involucradas en el proceso de identificar precursores mitocondriales mal localizados, como es el caso de Ema19 y Spf1. Ema19 es una proteína que promueve la degradación de precursores que llegaron erróneamente al retículo [180]. Por su lado, la P5a-ATPasa Spf1 puede extraer precursores que erróneamente se insertaron en la membrana del retículo, sacando o extrayendo el cruce transmembranal por el cual se insertaron [181].

Estos últimos estudios corroboran la estrecha relación que existe en el transporte de proteínas que tienen como destino final mitocondrias o retículo endoplásmico. Con respecto a esto, se ha encontrado que fallas en la función de MPP ocasionan una edición incorrecta de los precursores y, por lo tanto, un mal plegamiento de los mismos, despertando una respuesta temprana a proteínas mal plegadas en la mitocondria; esta respuesta depende del factor de transcripción Rox1, el cual se importa a la mitocondria y se une al ADNmt permitiendo una correcta comunicación núcleo-mitocondria [182].

***Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudio**

El nombre científico de la levadura con la que se hace el pan, la cerveza y el vino es típicamente *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levadura es un modelo de estudio que ha sido utilizado por numerosos investigadores en todo el mundo. Lo anterior debido a que es un organismo unicelular de rápido crecimiento; es de fácil y económico mantenimiento en condiciones de laboratorio; puede ser manipulado genéticamente con relativa facilidad; sus genomas nuclear y mitocondrial fueron secuenciados y anotados hace ya varias décadas; y existen colecciones de mutantes en donde los genes no esenciales se han eliminado o manipulado.

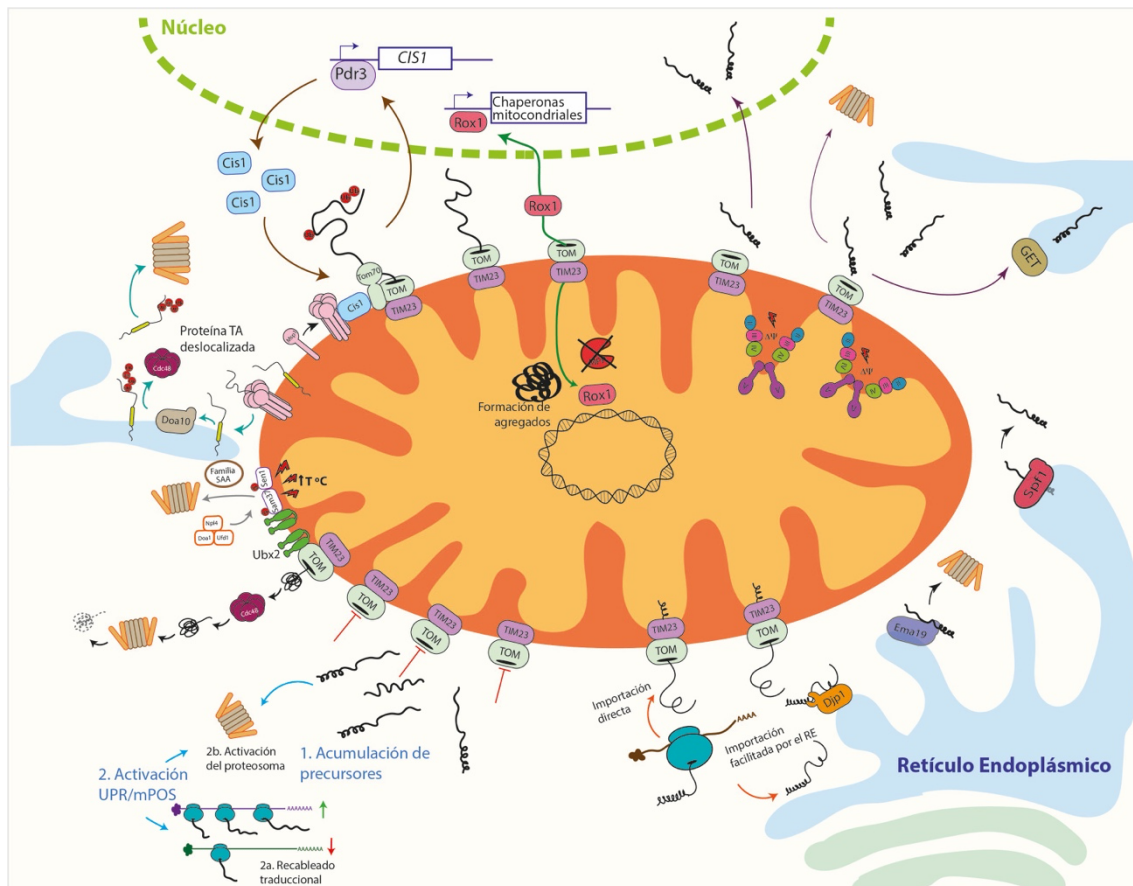


Figura 7. Respuestas celulares a fallas en los sistemas de importación de proteínas a la mitocondria. La proteína Msp1 (rosa) es capaz de retirar de la membrana externa mitocondrial proteínas atascadas en TOM con una señal bipartita (flechas café), en este proceso es reclutada por Cis1 (azul claro); adicionalmente, reconoce a proteínas con una topología TA que fueron erróneamente localizadas en mitocondria, las pasa al retículo endoplásmico donde serán marcadas para su posterior degradación (flechas turquesa). Ubx2 (verde limón) detecta cambios en proteínas mitocondriales causados por aumentos en la temperatura (flechas grises); así mismo, ayuda cuando el complejo TOM se encuentra taponado con precursores, recluta a Cdc48 (vino tinto) para su marcaje con ubiquitina (flechas negras). Alteraciones en la importación causadas por daños en la proteína Mia40 generan un cambio transcripcional que ayuda a contener con la acumulación de precursores en el citosol (flechas azules). Proteínas mitocondriales mal localizadas en el retículo endoplásmico, pueden ser re-dirigidas por la proteína Djp1 (naranja) en una ruta llamada ER-SURF (flechas naranjas); otras proteínas como Ema19 (morado) y Spf1 (rojo cereza) pueden degradar o retirar de este organelo al precursor mitocondrial. Fallas en la importación causadas por alteraciones en el potencial de membrana $\Delta\Psi$ ocasionan que los precursores mitocondriales tomen los siguientes destinos: núcleo, retículo endoplásmico, citosol, degradación o mitocondria (flechas moradas). Rox1 es un factor de transcripción que participa en la UPR^{mt} temprana, se une a los genes que codifican para chaperonas mitocondriales y se une al ADN^{mt} para evitar la expresión de genes OXPHOS, esto sucede cuando hay fallas en MPP (rojo).

Sin embargo, es importante mencionar otras características que son muy importantes y que normalmente no se mencionan. A pesar de que, en la sección anterior, se mencionó que la levadura es de fácil manipulación genética; en algunos casos esto no es verdad. Un ejemplo de esto es la generación de mutantes dobles, triples o cuádruples.

En la levadura ocurre con frecuencia que hay varias proteínas con función redundante; es decir, cuando se elimina una, la otra puede suplir su función. Por esta razón, es bastante frecuente que, al eliminar un gen, no haya fenotipo alguno. Otra posibilidad radica en que la eliminación de un gen no resulte en un fenotipo obvio. En ambos casos, *S. cerevisiae* presenta posibilidades de manipulación genética que permiten la elucidación de procesos relacionados con cada gen (por ejemplo, la generación de mutantes condicionales).

Antecedentes directos

La biogénesis de las proteínas mitocondriales es un proceso fundamental para el funcionamiento de la célula. Sin embargo, aún no se comprenden del todo los primeros pasos de la identificación y transporte de proteínas mitocondriales y, en particular, cuáles son los factores que actúan a nivel co-traducciona para robustecer el reconocimiento de proteínas mitocondriales en el citosol. Varios estudios han aportado evidencia sólida del papel del complejo $\alpha\beta_2$ -NAC en la importación de proteínas a la mitocondria, pero aún no se comprende con detalle cuál es la señal de reconocimiento por esta chaperona ribosomal [10], [161]–[163].

La relevancia de la función del complejo NAC se evidencia en el hecho de que la eliminación de cualquiera de los genes que codifican para sus subunidades es de tipo letal en algunos organismos modelo [158]–[160] situación que no sucede en levadura [183]. Por lo tanto, si NAC participa en el proceso de importación de proteínas a la mitocondria, deberían existir proteínas con una función redundante a NAC en *S. cerevisiae*. Para responder esta pregunta, en nuestro grupo de trabajo se realizó un análisis a escala genómica para identificar interacciones genéticas de los genes que codifican para las subunidades del complejo NAC en *S. cerevisiae* y de esta manera, encontrar candidatos que puedan suplir la función de este complejo [183]. De los genes identificados, *SAM37* llamó particularmente la atención ya que se encuentra en la membrana externa mitocondrial y tiene un dominio citosólico, lo que la hace una buena candidata para ser un posible receptor de NAC. *SAM37* codifica para una proteína con el mismo nombre *Sam37*, una subunidad del complejo SAM.

Posteriormente, al evaluar con mayor precisión las interacciones genéticas encontradas en el análisis genómico, se precisó una interacción sintético-negativa entre los genes de *SAM37*, *EGD2* y *BTT1*, pero no con *EGD1*. Es decir, entre *SAM37* y los genes que codifican para α y β_2 , pero no β . Adicionalmente, se evaluaron los niveles basales de algunas proteínas mitocondriales, hallando que en las mutantes $\Delta\alpha\Delta sam37$, $\Delta\beta_2\Delta sam37$, $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$ hay una disminución en la cantidad de las proteínas mitocondriales *Tom40*, *Sod2*, *Nfs1* y *Oxa1*; indicándonos que el complejo $\alpha\beta_2$ -NAC y *Sam37* participan en la importación de estas proteínas. Este efecto no se observó para las mutantes $\Delta\beta_1\Delta sam37$, $\Delta\alpha\beta_1\Delta sam37$.

Adicionalmente, al analizar la cinética de inducción de las proteínas *Sod2* y *Mmf1*, se observa la presencia de la versión precursora de ambas proteínas en la mutante $\Delta\beta_2\Delta sam37$, situación que no sucede en la cepa silvestre [184], [185]. La presencia de la versión precursora de estas dos proteínas indica que la ausencia de función de *BTT1* y *SAM37* afecta la entrega de precursores al complejo TOM,

posiblemente porque el transporte es menos eficiente y no se da el reconocimiento adecuado de los receptores de TOM. También se observó que la proteína Sam37 interacciona físicamente con el complejo $\alpha\beta_2$ -NAC, proponiendo a esta proteína de la membrana externa como el receptor de $\alpha\beta_2$ -NAC [183], [184], [186], [187].

En conjunto, estos los trabajos proporcionan evidencia sólida de que específicamente el complejo $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37 participan en el transporte co-traducciona l de algunas proteínas mitocondriales hasta este organelo.

Planteamiento del problema

La importación de proteínas a la mitocondria es un proceso esencial en todos los organismos eucariontes. Por lo tanto, entender cómo son transportadas las proteínas mitocondriales es el primer paso en el estudio de enfermedades derivadas de la disfunción mitocondrial. Tradicionalmente, la biogénesis mitocondrial se ha estudiado en la levadura *S. cerevisiae*; por su metabolismo aerobio facultativo. Esta característica metabólica nos permite alterar la función de proteínas relacionadas con la mitocondria sin comprometer la viabilidad celular.

Actualmente se conoce bastante sobre los pasos de translocación e inserción de muchas proteínas mitocondriales por parte de los ya nombrados complejos de importación. Sin embargo, poco se sabe cómo se reconoce a las proteínas en el citosol y sobre los mecanismos mediante los cuales, son dirigidas a la mitocondria. Es decir, no se entiende cómo son reconocidas las señales de localización mitocondrial cuando emergen del túnel de salida del ribosoma; así como tampoco se conoce si hay un factor citosólico que las reconoce de manera análoga a como sucede para las proteínas del retículo endoplásmico que son importadas de forma co-traducciona. Respecto al último punto, se ha propuesto a la chaperona ribosomal NAC como dicho factor citosólico.

A pesar de las diferentes evidencias que existen del modelo co-traducciona de importación de proteínas mitocondriales, la información disponible acerca de la participación del complejo NAC en este modelo es insuficiente para entender a cabalidad cómo es el proceso de reconocimiento de las proteínas mitocondriales cuando emergen del túnel de salida ribosomal. En este orden de ideas, es evidente que la primera parte que se asoma de cualquier proteína cuando es sintetizada, es el extremo N-terminal, por lo cual, si una proteína mitocondrial requiere una importación de tipo traducciona y $\alpha\beta_2$ -NAC participa en este proceso, la señal reconocida por este complejo debería encontrarse en esta parte de la cadena polipeptídica nascente.

Estudiar con detalle los primeros pasos de cómo son reconocidas y dirigidas las proteínas mitocondriales hasta este organelo, nos permite comprender mejor la intrincada regulación que debe ejercer la célula para asegurarse que todas las proteínas lleguen a su destino y puedan realizar su función. Para el caso específico de las proteínas mitocondriales, conocer cuáles proteínas requieren una importación co-traducciona, en este caso, dependiente de $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37, nos permitirá conocer a un grupo de proteínas que podrían necesitar requerimientos adicionales en su transporte, como por evitar el medio acuoso del citosol o incluso, cumplir con necesidades metabólicas de la célula.

Pregunta de investigación

¿El complejo $\alpha\beta_2$ -NAC reconoce una región discreta en el extremo N-terminal de algunas proteínas mitocondriales?

Hipótesis

El complejo $\alpha\beta_2$ -NAC reconoce una región en el extremo N-terminal de algunas proteínas mitocondriales que siguen el modelo de importación co-traduccionaI de proteínas en *S. cerevisiae*.

Objetivo general

Identificar el motivo que el complejo $\alpha\beta_2$ -NAC reconoce sobre las proteínas mitocondriales en proceso de síntesis, de manera que favorezca el proceso co-traducciona l de importación de proteínas mitocondriales.

Objetivos específicos

- i. Identificar el papel que desempeña el extremo N-terminal de Oxa1 y Mdm38 para el reconocimiento por el complejo $\alpha\beta_2$ -NAC durante la importación co-traducciona l de proteínas a la mitocondria.
- ii. Determinar el efecto de la ausencia del complejo $\alpha\beta_2$ -NAC sobre la cinética de importación *in vivo* de proteínas mitocondriales.
- iii. Identificar una región específica en el extremo N-terminal de Oxa1 que sea clave en el reconocimiento por el complejo $\alpha\beta_2$ -NAC durante la importación co-traducciona l de proteínas a la mitocondria.
- iv. Valorar la participación de Msp1 en la respuesta celular ocasionada por el mal direccionamiento de proteínas mitocondriales derivado de la eliminación de los genes que codifican para el complejo $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37.

Resultados

Parte I. ¿Cuál es la región que reconoce $\alpha\beta_2$ -NAC en algunas proteínas mitocondriales durante los primeros pasos de la importación de proteínas a la mitocondria?

Poco se conoce sobre los elementos que actúan a nivel co-traduccional sobre el proceso de importación de proteínas a la mitocondria. En un estudio anterior realizado por nuestro grupo de investigación se probó que la chaperona citosólica $\alpha\beta_2$ -NAC y la proteína de membrana externa mitocondrial Sam37 trabajan en conjunto, facilitando la importación de algunas proteínas mitocondriales [184]. Como punto de partida para responder la pregunta de investigación, es razonable pensar que la región que primero se expone de los péptidos nacientes, en el túnel de salida del ribosoma, es su extremo N-terminal.

El crecimiento de la triple mutante $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$ está disminuido al compararlo con la cepa silvestre

Por razones metodológicas, fue necesario generar la triple mutante $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$ en el fondo BY4741, que es un fondo genético diferente al usado en estudios anteriores de nuestro grupo de trabajo [183], [184]. El fondo genético anterior Y8205, aunque es derivado de BY4741, fue modificado para realizar experimentos a escala genómica, por lo cual, tiene marcadores de auxotrofia, como URA3, que restringen el uso de ciertos plásmidos. Al cambiar de fondo, se hace necesario verificar que el crecimiento de dicha mutante es el mismo al previamente reportado. Para esto evaluamos el crecimiento por diluciones seriadas al sembrar las levaduras en medio rico, usando glucosa, galactosa o glicerol como fuentes de carbono, y a dos temperaturas diferentes, 30°C y 37°C. Los resultados pueden observarse en la figura 8.

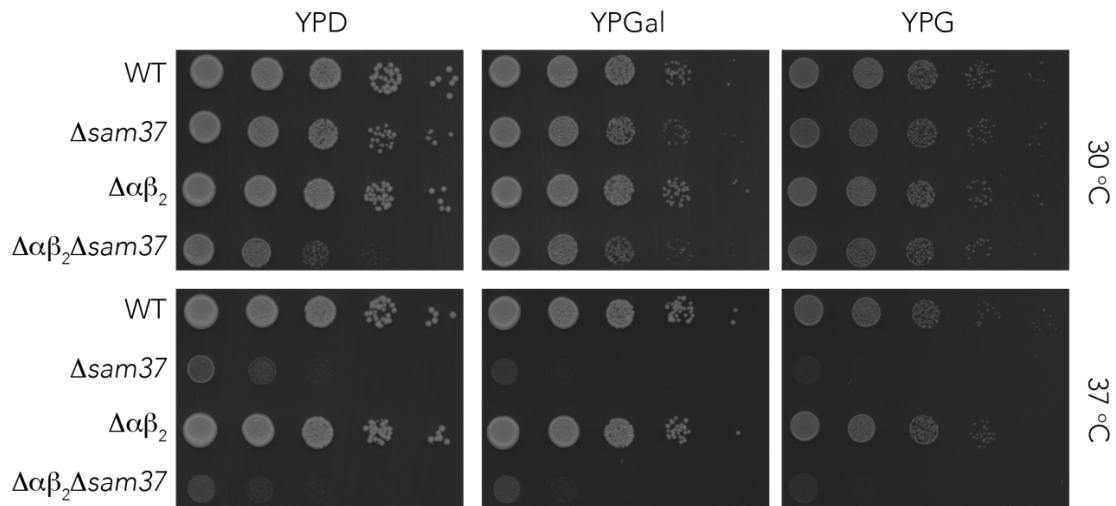


Figura 8. El complejo $\alpha\beta_2$ -NAC tiene interacción genética con SAM37. Las cepas indicadas se crecieron en medio rico YPD hasta alcanzar una $DO_{600}=1$, posteriormente se realizaron diluciones seriadas del cultivo y se sembraron gotas ($3.5 \mu\text{L}$) en medio rico YP sólido fresco usando glucosa (D), galactosa (Gal) o glicerol (G) como fuente de carbono. Las cajas se incubaron a 30°C y 37°C durante 2-3 días aproximadamente.

Es claro que el fenotipo de crecimiento de la triple mutante $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$ está alterado, ya que crece menos al compararla con la mutante sencilla de $\Delta sam37$ indicando la interacción genética entre los genes de NAC (*EGD2* y *BTT1*) y *SAM37*, reportada anteriormente por nuestro grupo [184]. Es importante hacer hincapié en: i) el fenotipo es más evidente en el medio que tiene glucosa (YPD), ii) la cepa $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$ no crece en ninguno de los medios a 37°C y iii) la mutante sencilla $\Delta sam37$ no crece a 37°C en los medios que tienen galactosa o glicerol como fuente de carbono.

El N-terminal de Oxa1 contiene información importante para el reconocimiento de $\alpha\beta_2$ -NAC

Con el objetivo de identificar una región presente en algunas proteínas mitocondriales que pudieran ser reconocida por el complejo $\alpha\beta_2$ -NAC, decidimos construir proteínas quiméricas en donde fusionamos a la GFP a diferentes regiones de dos proteínas: Oxa1 y Mdm38. Estas proteínas fueron elegidas por las características que tienen en común: ambas se localizan en la membrana interna mitocondrial, tienen señal de localización mitocondrial editable (MTS) y, como mínimo, poseen un cruce transmembranal [188], [189]. Sin embargo, se ha propuesto que Oxa1 utiliza el sistema co-traducciona l de importación de proteínas mediado por $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37, situación que no sucede para Mdm38 [184].

En el modelo co-traducciona l, se propone que la proteína es reconocida y antes de que sea sintetizada en su totalidad, se dirige a toda la maquinaria traduccional a la periferia de las mitocondrias, en donde se acoplan la traducción y la importación. Por lo tanto, es posible que la región que debe ser reconocida por el complejo $\alpha\beta_2$ -

NAC se encuentre en el extremo N-terminal del péptido naciente. Realizar construcciones que contengan el extremo N-terminal de una proteína mitocondrial, tiene sus restricciones, ya que estas proteínas llevan señales que las dirigen hasta este organelo; para evitar perder la localización mitocondrial de las proteínas seleccionadas, elegimos las regiones de la MTS; las cuales ya están definidas para ambos casos. Para Oxa1 comprende los aminoácidos 1-50 (Oxa1¹⁻⁵⁰) y para Mdm38 los aminoácidos 1-60 (Mdm38¹⁻⁶⁰); también consideramos la región desde la metionina inicial hasta donde finaliza el primer cruce transmembranal (Oxa1¹⁻¹⁴⁵ y Mdm38¹⁻¹⁶⁵), ya que dicha región puede contener información importante al ser una señal de localización mitocondrial. Adicionalmente, como control positivo realizamos la fusión entre GFP y la MTS de la subunidad 9 de la ATPasa de *Neurospora crassa*, ya que es una señal ampliamente utilizada y estudiada en los sistemas de importación de proteínas a la mitocondria [190].

Este sistema de proteínas de fusión con GFP nos permite tener dos aproximaciones diferentes para responder la pregunta: ¿contiene información importante el extremo N-terminal de Oxa1 para su reconocimiento por $\alpha\beta_2$ -NAC durante la importación co-traduccional de proteínas a la mitocondria? Por un lado, nos propusimos realizar fraccionamientos celulares mediante centrifugación diferencial para conocer la localización de las proteínas quiméricas en ausencia de $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37. Por otro lado, mediante microscopía de fluorescencia podemos conocer si las proteínas estudiadas se encuentran en mitocondria al usar un marcador fluorescente para este organelo.

A pesar de que la proteína GFP es ampliamente utilizada en la investigación científica, es importante en nuestro caso probar que la proteína GFP no se dirija por sí sola a la mitocondria; es decir, que las señales de localización mitocondrial utilizadas sí funcionaran correctamente. Como marcador de mitocondrias usamos la proteína mCherry fusionada con la MTS de Su9, mt-mCherry.

Para esto, clonamos a la GFP sin ninguna señal de localización mitocondrial en un plásmido de expresión en levadura. Al realizar un fraccionamiento celular, es claro que la GFP está en la fracción citosólica de la cepa silvestre y de la triple mutante $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$ (Figura 9A). Al observar las cepas que expresan esta construcción en un microscopio confocal, la señal verde se distribuye evidentemente en el citosol (Figura 9B). Así mismo, al co-expresar ambas proteínas fluorescentes GFP y mt-mCherry, la señal es observada en el citosol y mitocondria, respectivamente (Figura 9C y 9D).

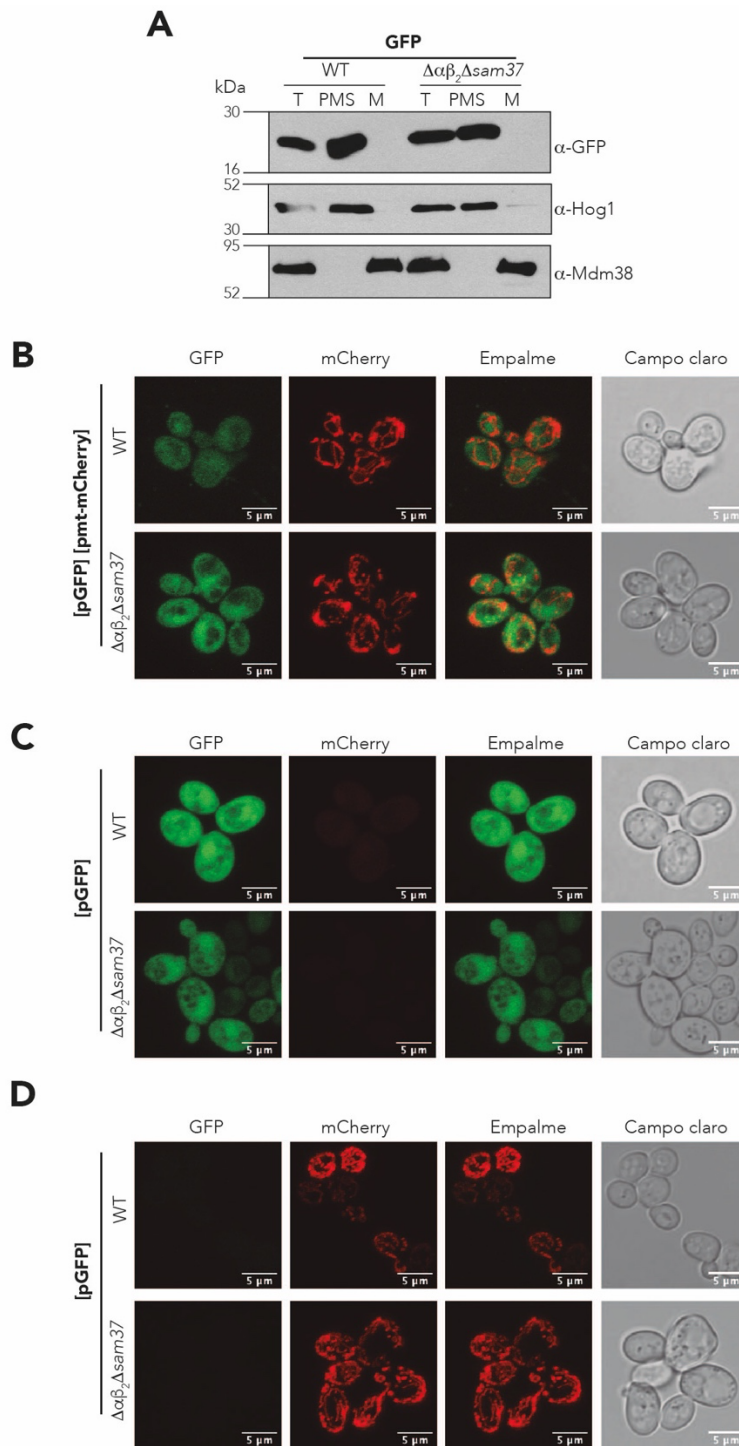


Figura 9. *GFP sin una señal de localización mitocondrial tiene localización citosólica.* **A.** Se purificaron mitocondrias de la cepa silvestre o la triple mutante $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$ que expresan GFP sin una señal de localización mitocondrial ssGFP. La presencia de GFP en la fracción mitocondrial o en el sobrenadante post-mitocondrial (PMS) se analizó mediante inmunorreplica western blot, α -Hog1 y α -Mdm38 fueron usados como marcadores de citosol y mitocondria, respectivamente. **B, C, D.** La localización de GFP y mt-mCherry, expresadas simultáneamente o de forma individual, fueron analizadas por microscopía confocal en las cepas indicadas.

De los resultados obtenidos, observamos que todas nuestras construcciones se encuentran en la fracción mitocondrial, ya sea por fraccionamiento celular o por

microscopía (Figuras 10 y 11). Observando con detalle, hay una diferencia significativa en la cantidad de Oxa1¹⁻⁵⁰-GFP en mitocondria en la cepa $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$ comparada con la cepa silvestre (Figura 10A); este fenotipo es similar con la quimera Oxa1¹⁻¹⁴⁵-GFP, aunque en este caso no hay diferencia significativa en la cantidad de proteína entre las dos cepas analizadas (Figura 10D). Con el objetivo de saber si las proteínas se encontraban al interior de la mitocondria o simplemente adosadas a la membrana mitocondrial, realizamos una digestión de mitocondrias crudas con proteinasa K (PK). Ambas construcciones Oxa1¹⁻⁵⁰-GFP y Oxa1¹⁻¹⁴⁵-GFP se protegen de la degradación, es decir, fueron importadas al interior de la mitocondria (Figura 10B y 10E). A partir de las observaciones al microscopio, se aprecia que la señal de Oxa1¹⁻⁵⁰-GFP y Oxa1¹⁻¹⁴⁵-GFP colocaliza con la señal de mt-mCherry (marcador de mitocondrias) en ambas cepas (Figura 10C y 10F), indicando que ambas construcciones se encuentran en la mitocondria.

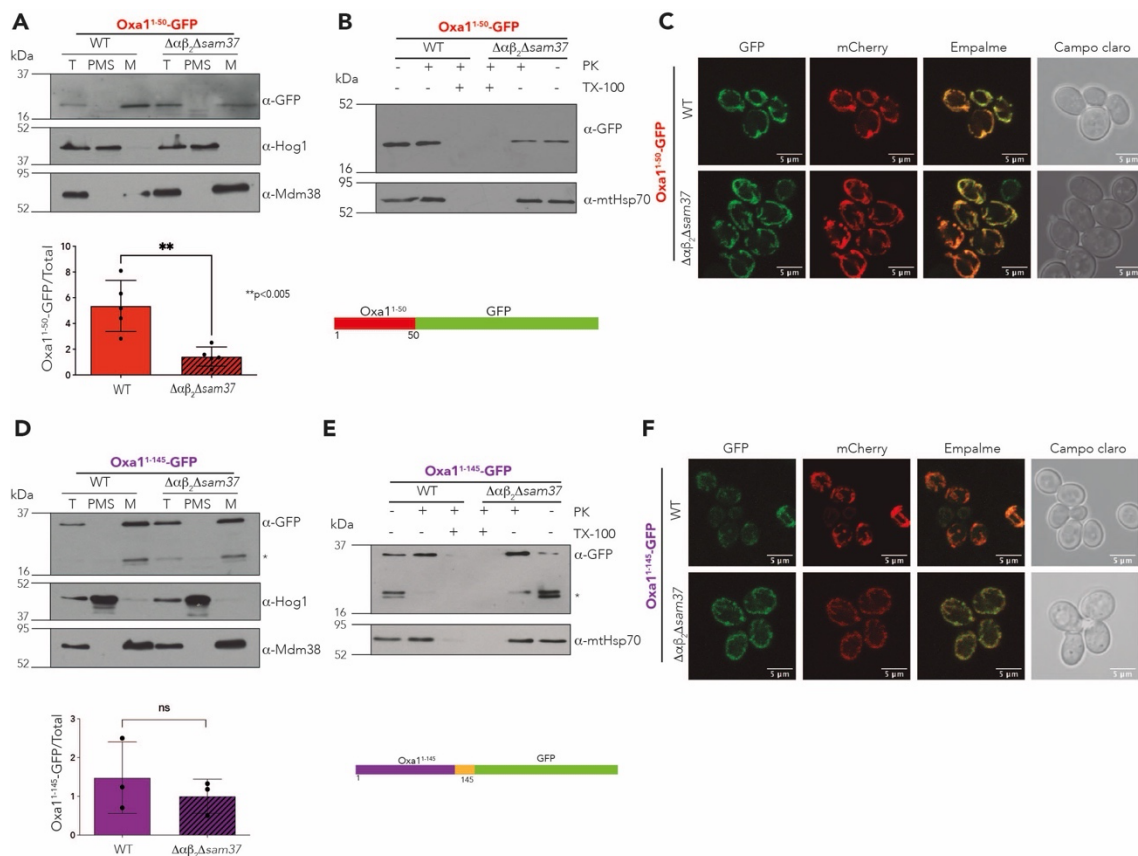


Figura 10. El N-terminal de Oxa1 es importante para su reconocimiento por $\alpha\beta_2$ -NAC durante la importación de proteínas a la mitocondria. **A, D.** Se purificaron mitocondrias de la cepa silvestre o triple mutante $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$ que expresan la construcción indicada. La presencia de la proteína quimérica en la fracción mitocondrial o en el sobrenadante post-mitocondrial (PMS) se analizó mediante inmunorreplica western blot, α -Hog1 y α -Mdm38 fueron usados como marcadores de citosol y mitocondria, respectivamente. La intensidad de la señal se cuantificó usando el programa ImageJ, la cantidad de proteína presente fue comparada con la fracción total (FT). **B, E.** Las mitocondrias aisladas de la cepa silvestre y $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$ se trataron con proteinasa K y Triton X-100 como se indica, la presencia o ausencia de la proteína quimérica dentro de la mitocondria fue analizada mediante inmunorreplica western blot, α -mtHsp70 se usó como control. **C, F.** La localización de las quimeras fue analizada por microscopía con focal en las cepas estudiadas, mt-

mCherry fue usado como marcador de mitocondrias. Se graficó el promedio \pm desviación estándar, *ns*= no significativo; *n*=3. *GFP libre.

Por otro lado, para los casos de Mdm38¹⁻⁶⁰-GFP y Mdm38¹⁻¹⁶⁵-GFP no se observan diferencias en cuanto a la cantidad de proteína presente entre la fracción mitocondrial de la cepa silvestre y la triple mutante $\Delta\alpha\beta_2\Delta\text{sam37}$ (Figura 11A y 11D). Así mismo, ambas construcciones se protegen de la acción de la PK en las dos cepas (Figura 11B y 11E), indicando que la importación de dichas construcciones es llevada a cabo de forma exitosa en ambas cepas, es decir, la importación es independiente de $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37. De las observaciones de microscopía, concluimos que tanto Mdm38¹⁻⁶⁰-GFP como Mdm38¹⁻¹⁶⁵-GFP se encuentran en la mitocondria de la cepa silvestre y la mutante del complejo $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37; ya que la señal de GFP y de mt-*mCherry* colocalizan (Figura 11C y 11F).

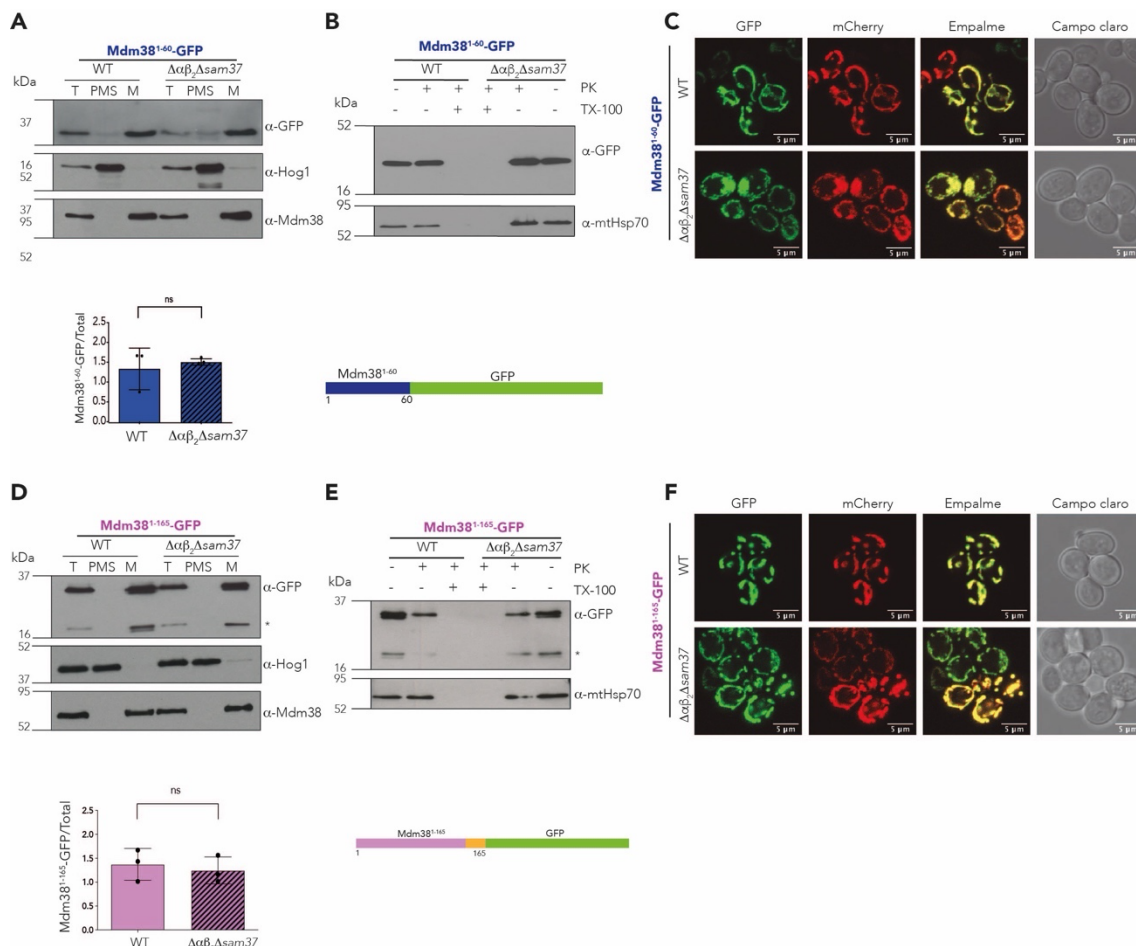


Figura 11. La localización mitocondrial de las proteínas Mdm38¹⁻⁵⁰-GFP y Mdm38¹⁴⁵-GFP es independiente del complejo $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37. **A, D.** Se purificaron mitocondrias de la cepa silvestre o triple mutante $\Delta\alpha\beta_2\Delta\text{sam37}$ que expresan la construcción indicada. La presencia de la proteína quimérica en la fracción mitocondrial o en el sobrenadante post-mitocondrial (PMS) se analizó mediante inmunorreplica western blot, α -Hog1 y α -Mdm38 fueron usados como marcadores de citosol y mitocondria, respectivamente. La intensidad de la señal se cuantificó usando el programa ImageJ, la cantidad de proteína presente fue comparada con la fracción total (FT). **B,**

E. Las mitocondrias aisladas de la cepa silvestre y $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$ se trataron con proteínasa K y Triton X-100 como se indica, la presencia o ausencia de la proteína quimérica dentro de la mitocondria fue analizada mediante inmunorréplica western blot, α -mtHsp70 se usó como control. **C, F.** La localización de las quimeras fue analizada por microscopía con focal en las cepas estudiadas, mt-mCherry fue usado como marcador de mitocondrias. Se graficó el promedio \pm desviación estándar, ns= no significativo; n=3. *GFP libre.

Como era de esperarse, la construcción que contiene la MTS de NcSu9 fusionada a GFP, se encuentra en la fracción mitocondrial de las dos cepas estudiadas (Figura 12A). Adicionalmente, no hay degradación de la señal de GFP cuando se hace el tratamiento con PK (Figura 12B), indicando que la construcción NcSu9¹⁻⁶⁹-GFP se encuentra al interior de la mitocondria. Así mismo, por microscopía se confirmó la localización mitocondrial de la construcción, puesto que las señales correspondientes a la GFP y mt-mCherry, se empalman en el mismo plano focal (Figura 12C).

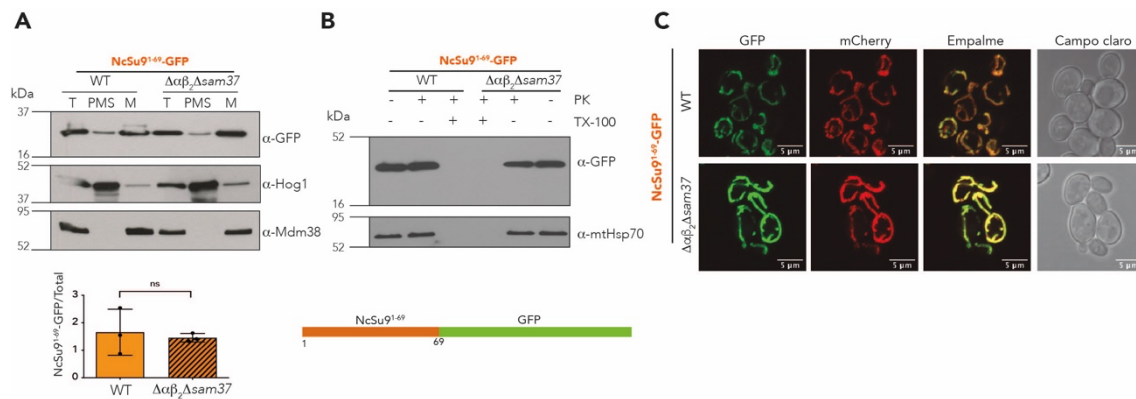


Figura 12. La proteína quimérica NcSu9¹⁻⁶⁹-GFP se localiza en la mitocondria independientemente de $\alpha\beta_2$ -NAC y SAM37. **A.** Se purificaron mitocondrias de la cepa silvestre o la triple mutante $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$ que expresan la construcción indicada. La presencia de la proteína quimérica en la fracción mitocondrial o en el sobrenadante post-mitocondrial (PMS) se analizó mediante inmunorréplica western blot, α -Hog1 y α -Mdm38 fueron usados como control de citosol y mitocondria respectivamente. La intensidad de señales se cuantificó usando el programa ImageJ, la cantidad de proteína presente fue comparada con la fracción total (FT). **B.** Las mitocondrias aisladas de la cepa silvestre y $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$ fueron tratadas con proteínasa K, la presencia o ausencia de la proteína quimérica dentro de la mitocondria fue analizada mediante inmunorréplica western blot, α -mtHsp70 se usó como control. **C.** La localización de la quimera fue analizada por microscopía confocal en las cepas estudiadas, mt-mCherry fue usado como marcador de mitocondrias. Se graficó el promedio \pm desviación estándar, ns= no significativo, n=3

Con estos primeros resultados, podemos inferir que la región N-terminal de Oxa1, específicamente los primeros 50 aminoácidos, contiene información para el reconocimiento del complejo $\alpha\beta_2$ -NAC en el túnel de salida del ribosoma. Lo anterior se debe a que hay una disminución en la cantidad de proteína en la fracción mitocondrial de la mutante $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$, situación que no sucede para Mdm38; sin embargo, Oxa1¹⁻⁵⁰-GFP es aún capaz de llegar a la mitocondria en ausencia de este complejo.

La cinética de importación *in vivo* de Oxa1¹⁻⁵⁰-GFP está retrasada en la triple mutante $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$

Un fraccionamiento celular o una micrografía en condiciones adecuadas permiten conocer la localización subcelular de las proteínas estudiadas en un momento específico. Por esta razón, se decidió llevar a cabo cinéticas de importación para conocer a detalle cómo se desarrolla la importación de nuestras quimeras en intervalos de tiempo definidos.

Tradicionalmente se utilizan sistemas de importación *in vitro*, en donde la proteína es sintetizada en un sistema de reticulocitos, al cual se le adiciona metionina marcada radioactivamente con S³⁵ y posteriormente, el producto de la reacción de traducción se pone en contacto con un aislado de mitocondrias puras o enriquecidas. La reacción se detiene al adicionar inhibidores de la cadena transportadora de electrones para disipar el potencial de membrana ($\Delta\Psi$) [6]. Sin embargo, este sistema no es apropiado para nuestro estudio, debido a que no podemos simular de forma correcta un citosol carente de $\alpha\beta_2$ -NAC. Por esta razón, decidimos utilizar un sistema de importación *in vivo* que usa células permeabilizadas [191] y un sistema inducible de expresión por galactosa; permitiéndonos seguir en tiempo real la importación de nuestras proteínas quiméricas [192].

Para esto, fue necesario cambiar el promotor de las construcciones estudiadas por el promotor *GAL1*. Así, al adicionar galactosa al amortiguador de importación, se inicia la transcripción y después la síntesis de la proteína. Para saber si la importación fue llevada a cabo, se adiciona al medio de reacción proteinasa K (PK), una proteasa que degrada todas las proteínas que se encuentran en el citosol. Esto incluye a Tom20, proteína mitocondrial de la membrana externa que tiene un dominio citosólico expuesto. Para ellos se incubaron las células durante 0, 20, 40 y 80 minutos después de añadir la galactosa.

En la figura 13, se observan las cinéticas de importación *in vivo* para las quimeras Oxa1¹⁻⁵⁰-GFP, Mdm38¹⁻⁶⁰-GFP y NcSu9¹⁻⁶⁹-GFP. Para el caso específico de Oxa1¹⁻⁵⁰-GFP, es claro que hay un retraso en la cinética de importación en la triple mutante $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$ al compararla con la cepa silvestre (Figura 13B), ya que en todos los tiempos registrados hay una menor cantidad de proteína. Situación diferente a lo registrado para Mdm38¹⁻⁶⁰-GFP donde las cinéticas son iguales en ambas cepas estudiadas (Figura 13C). Por último, algo inesperado sucede para NcSu9¹⁻⁶⁹-GFP, ya que la cinética de importación está disminuida en la mutante carente de $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37 (Figura 13D), puesto que hay menor cantidad de proteína importada en dicha mutante al compararla con la cepa silvestre.

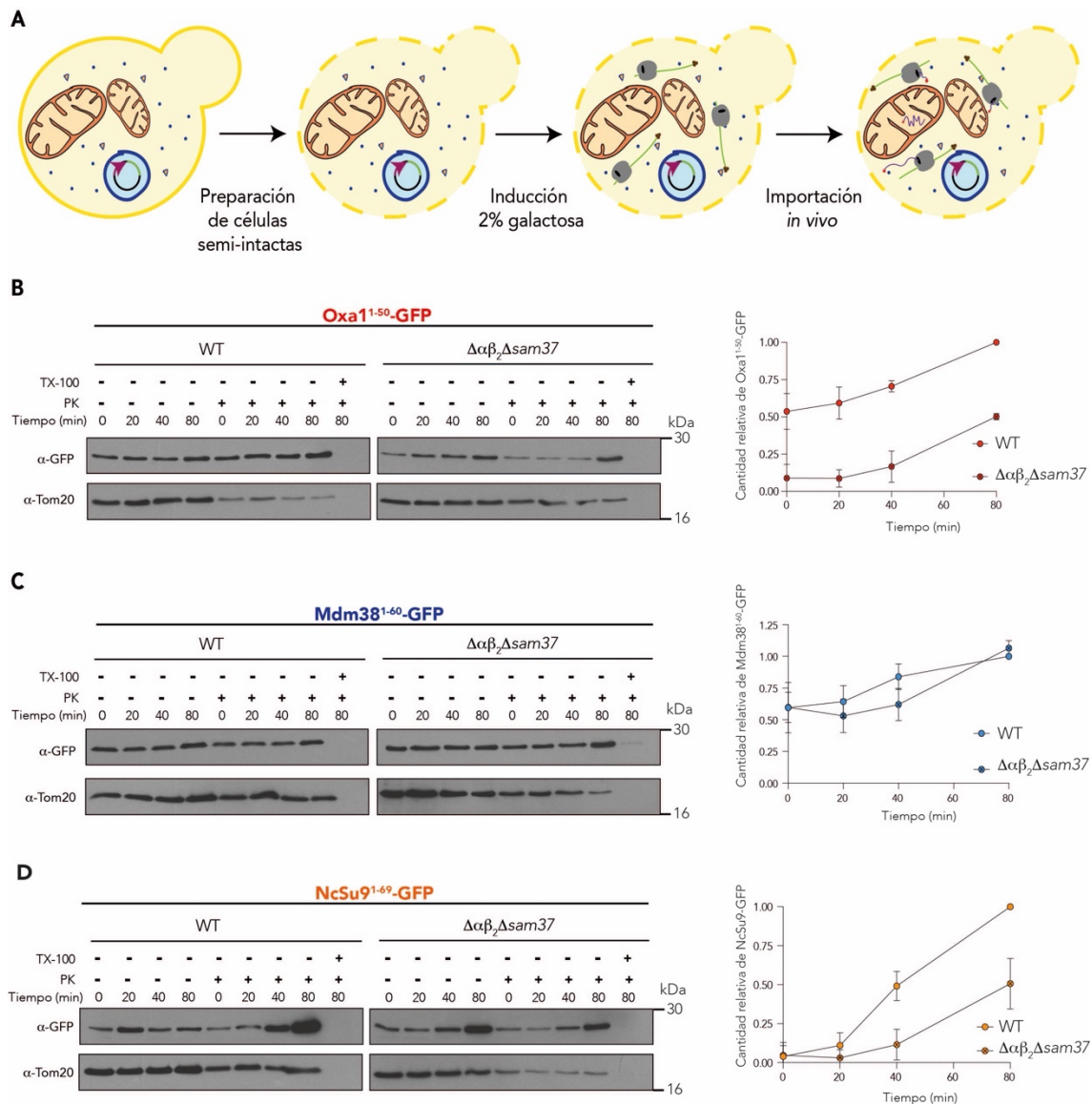


Figura 13. La importación in vivo de Oxa1¹⁻⁵⁰-GFP está retrasada en la mutante carente de $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37. **A.** Esquema representativo del sistema de importación in vivo. Células completas de las cepas indicadas, transformadas con los plásmidos que codifican para **B.** Oxa1¹⁻⁵⁰-GFP **C.** Mdm38¹⁻⁶⁰-GFP y **D.** NcSu9¹⁻⁶⁹-GFP, se crecieron en medio sintético con rafinosa (SD-Raf) y permeabilizadas con Zymolyasa para producir células semi-intactas [191]. Las células se transfirieron a un amortiguador de importación que contiene galactosa al 2% para inducir la expresión de las proteínas quiméricas y seguir la importación a los tiempos de 0, 20, 40 y 80 min. La reacción se detuvo con la adición de antimicina, valinomicina y oligomicina. Posteriormente, las muestras se trataron con proteinasa K (PK) y Tritón X-100 (TX-100). Las muestras fueron analizadas mediante inmunorreplica tipo western blot, Tom20 fue usada como control para la digestión de proteínas expuestas o presentes en el citosol. Para la cuantificación, la muestra de 80 min de la cepa WT se consideró como 1 (representando la cantidad máxima de proteína importada), las muestras de 0, 20, 40 y 80 min se analizaron como una fracción del valor de referencia, se graficó el promedio \pm desviación estándar, $n=3$.

Este resultado nos permite concluir lo siguiente: en la cepa $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$ hay un retraso en la cinética importación in vivo para las cepas que expresan las construcciones Oxa1¹⁻⁵⁰-GFP y NcSu9¹⁻⁶⁹-GFP. En el caso de la primera quimera, este resultado concuerda con lo visto en la Figura 10, puesto que explica el porqué

hay menor cantidad de proteína en la fracción mitocondrial debido a un retraso o alteración en su cinética de importación. Esto sugiere que la importación a la mitocondria de Oxa1¹⁻⁵⁰-GFP es dependiente del $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37 o de tipo cotraduccional. En el caso de la segunda, el que su cinética esté alterada en la triple mutante pero los niveles basales de proteína son iguales al compararlos con los de la cepa silvestre, podría indicar que a pesar de que en los tiempos iniciales de la síntesis hay un retraso, existe un mecanismo (diferente a el mediado por el complejo $\alpha\beta_2$ -NAC) capaz de dirigirla a la mitocondria. En definitiva, la importación de Mdm38¹⁻⁶⁰-GFP a la mitocondria no depende del complejo $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37 o, su importación es de tipo post-traduccional.

Los primeros diez aminoácidos de Oxa1 son importantes para el reconocimiento de $\alpha\beta_2$ -NAC

Se decidió generar combinaciones entre las MTS de Oxa1 y Mdm38 de diez en diez aminoácidos de forma creciente, con el objetivo de encontrar una región discreta presente en la secuencia señal de Oxa1 que permite el reconocimiento por parte del complejo $\alpha\beta_2$ -NAC. Lo anterior con la finalidad de discriminar con mayor precisión qué sección en la secuencia señal contiene información relevante para su reconocimiento por esta chaperona. Las construcciones generadas se esquematizan en la figura 14A.

Las construcciones se obtuvieron mediante PCR de fusión, se transformaron en la cepa silvestre y triple mutante $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$ y mediante ensayos de fraccionamiento celular, se determinó la fracción celular donde se encontraban las quimeras. De manera general, en todas las construcciones estudiadas, el nivel basal de la proteína en la fracción mitocondrial es igual en ambas cepas (Figura 14C-G). Lo anterior quiere decir, que ponerle los primeros diez aminoácidos de Mdm38 a Oxa1, construcción Mdm38¹⁻¹⁰Oxa1¹¹⁻⁵⁰-GFP, es suficiente para revertir el fenotipo observado; ya que el nivel basal de proteína que se encuentra en mitocondria es igual en la cepa silvestre y la mutante $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37 (Comparar paneles B y C de la figura 13). En conclusión, en los primeros diez aminoácidos de Oxa1 hay información relevante que dicta el tipo de importación que requiere la proteína mediada por $\alpha\beta_2$ -NAC.

Es importante resaltar un punto específico obtenido con este resultado. El primer aspecto es la observación del precursor de las quimeras Mdm38¹⁻³⁰Oxa1³¹⁻⁵⁰-GFP en la fracción citosólica de la cepa silvestre y triple mutante (Figura 14E); mientras que para las construcciones Mdm38¹⁻⁴⁰Oxa1⁴¹⁻⁵⁰-GFP y Mdm38¹⁻⁵⁰Oxa1⁴¹⁻⁵⁰-GFP, el precursor se observa en el citosol únicamente en la mutante $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$ (FIGURA 14F y 14G). Las lisinas son aminoácidos susceptibles de ser ubiquitinados, señal celular de degradación. En la MTS de Oxa1 hay varias lisinas que fueron

reemplazadas al realizar quimeras, lo que pudo enmascarar una posible señal de degradación para Oxa1; lo que explicaría por qué en ningún otro experimento, se observa su versión precursora. Otra explicación podría ser que la MTS de Mdm38 sature el sistema de translocación al presentar mucha afinidad por este. Para probar ambas hipótesis es necesario realizar más experimentos que se alejan del objetivo principal de este estudio.

Para confirmar la importancia de los primeros diez aminoácidos de Oxa1, en la importación dependiente del complejo $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37, realizamos la construcción Oxa1¹⁻¹⁰Mdm38¹¹⁻⁶⁰-GFP y evaluamos su localización mediante un fraccionamiento celular (Figura 14H); encontrando que el nivel basal de esta quimera se encuentra disminuido en la fracción mitocondrial de la cepa mutante $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$, resultado similar al obtenido con la construcción Oxa1¹⁻⁵⁰-GFP (comparar paneles B y H). En conclusión, los primeros 10 aminoácidos de Oxa1 son relevantes para la importación co-traducciona mediana por $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37

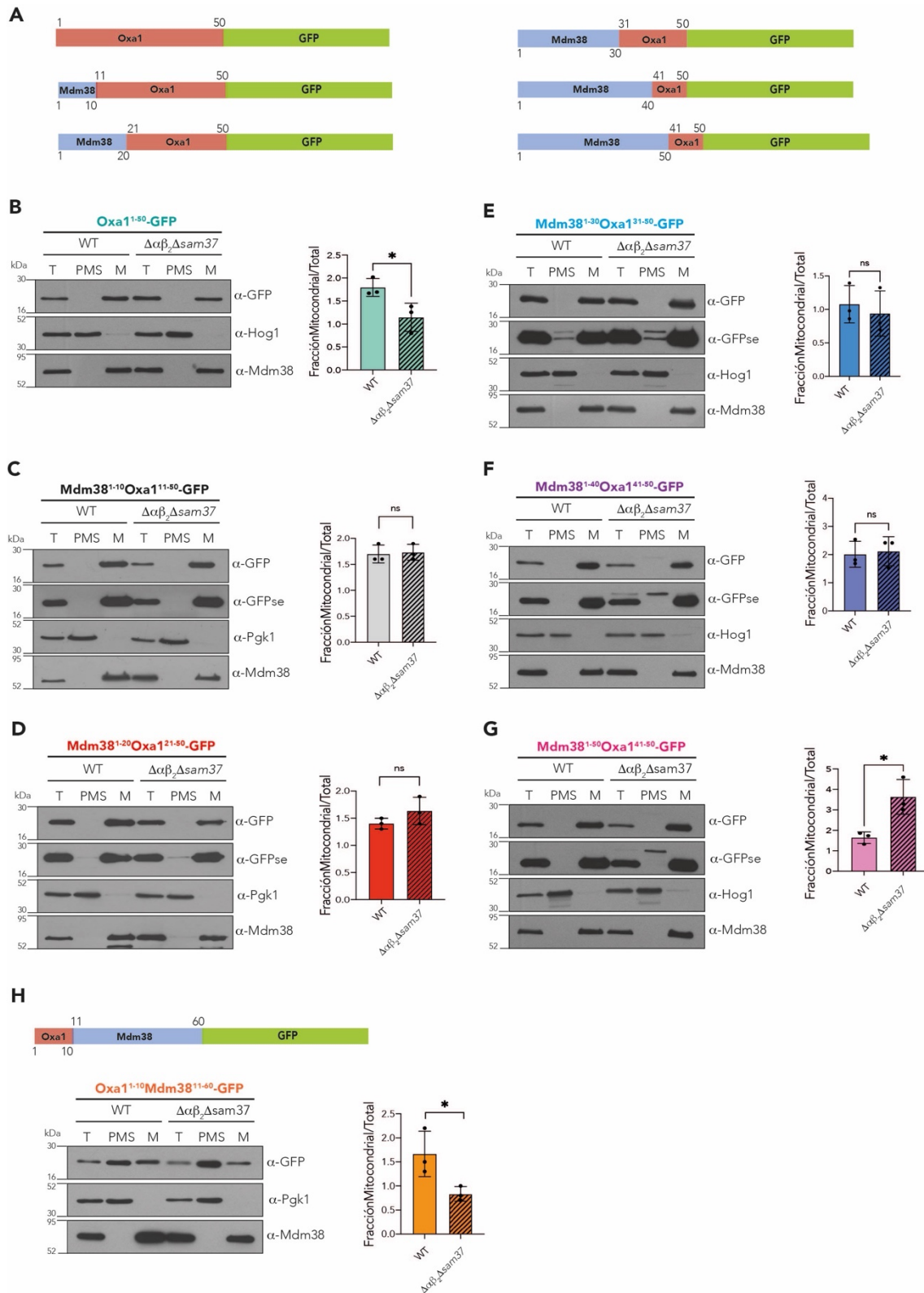


Figura 14. Los primeros diez aminoácidos de Oxa1 contienen información importante para el reconocimiento de $\alpha\beta_2$ -NAC. A. Representación esquemática de las proteínas usadas, las cajas rojas simbolizan la fracción de la MTS de Oxa1 y las cajas azules simbolizan la MTS de Mdm38. **B-H.** Se purificaron mitocondrias de la cepa silvestre o la triple mutante $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$ que expresan las construcciones indicadas. La presencia de las proteínas quiméricas en la fracción mitocondrial o en el sobrenadante post-mitocondrial (PMS) se analizó mediante inmunorreplica western blot, α -Hog1 o α -Pgk1 y α -Mdm38 fueron usados como marcadores de citosol y mitocondria respectivamente. La intensidad de señal se cuantificó usando el programa ImageJ, la cantidad de proteína presente

fue comparada con la fracción total (FT). Se graficó el promedio \pm desviación estándar, asterisco representa $p < 0.05$, ns= no significativo, $n=3$, se=sobre-exposición.

Un grupo de aminoácidos positivos en la MTS de Oxa1 es importante para el reconocimiento de $\alpha\beta_2$ -NAC

Hasta este momento sabíamos que los primeros diez aminoácidos de Oxa1 son importantes para dictaminar su importación dependiente de $\alpha\beta_2$ -NAC; sin embargo, no conocemos exactamente qué diferencias hay entre las MTS de Oxa1 y Mdm38, a pesar de que ambas son alfa-hélices anfipáticas y son capaces de dirigir a las proteínas hasta la mitocondria (al menos en una cepa silvestre). Por esta razón, realizamos un análisis *in silico* para indagar sobre posibles diferencias entre estas dos señales de localización mitocondrial. En primer lugar, encontramos que la MTS de Oxa1 tiene una carga neta mayor, es decir, la proporción de aminoácidos positivos es mayor. En segundo lugar, al realizar las “peep wheels”, una simulación de la distribución de los aminoácidos en una α -hélice, nos percatamos de que un grupo de aminoácidos con carga positiva (lisinas y argininas) en los primeros 18 aminoácidos de Oxa1 se alinea en unos de los lados de la α -hélice, situación no observada para Mdm38 (Figura 15A).

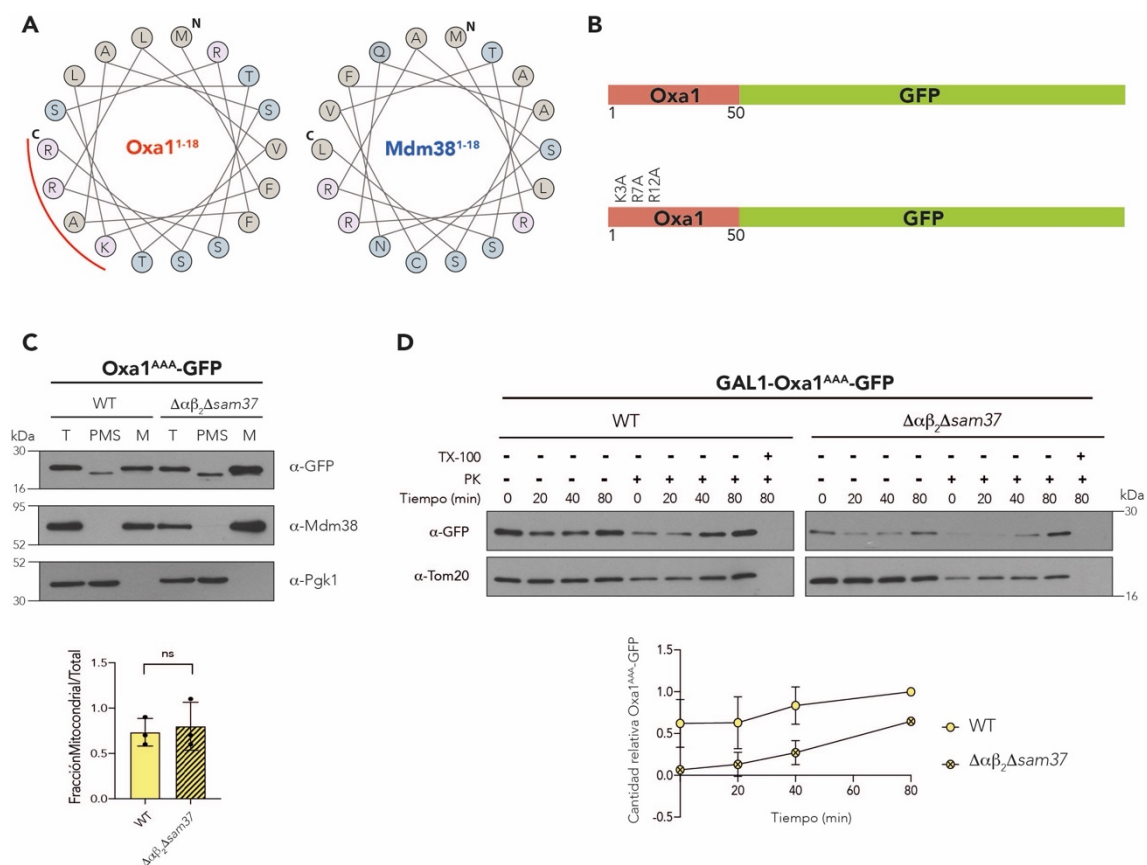


Figura 15. La presencia de un grupo de aminoácidos positivos en la MTS de Oxa1 está relacionada con la función de $\alpha\beta_2$ -NAC. **A.** “Peep Wheels” obtenidas usando HeliQuest [193] de la región 1-18 de Oxa1 y Mdm38; en rojo se marca el grupo de aminoácidos positivos en la MTS de Oxa1 **B.** Esquema representativo de los cambios realizados en la MTS de Oxa1; K3A, R7A y R12A. **C.** Mitocondrias purificadas de la cepa silvestre o de la triple mutante $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$ que expresan las

construcciones indicadas. La presencia de las proteínas quiméricas en la fracción mitocondrial o en el sobrenadante post-mitocondrial (PMS) se analizó mediante inmunorréplica western blot, α -Pgk1 y α -Mdm38 fueron usados como control de citosol y mitocondria respectivamente. **D.** Células completas de las cepas indicadas, que expresan Oxa1^{AAA}-GFP, se crecieron en medio sintético con rafinosa (SD-Raf) y fueron permeabilizadas con Zymolyasa para producir células semi-intactas [191]. Las células se transfirieron a un amortiguador de importación que contiene galactosa al 2% para inducir la expresión de las proteínas quiméricas y seguir la importación a los tiempos de 0, 20, 40 y 80 min. La reacción se detuvo con la adición de antimicina, valinomicina y oligomicina. Posteriormente, las muestras se trataron con proteinasa K (PK) y Tritón X-100 (TX-100). Las muestras fueron analizadas mediante inmunorréplica tipo western blot, Tom20 fue usada como control para la digestión de proteínas expuestas o presentes en el citosol. Se graficó el promedio \pm desviación estándar, ns= no significativo, n=3.

Estas dos diferencias nos llevaron a proponer la hipótesis de que los aminoácidos positivos tienen un papel relevante en el reconocimiento del complejo $\alpha\beta_2$ -NAC en algunas proteínas mitocondriales. Para responder esta pregunta, decidimos hacer una versión de Oxa1¹⁻⁵⁰-GFP en donde se cambiaron estos aminoácidos positivos por alaninas (mutaciones puntuales R3A, K8A y K12A); la nueva versión Oxa1^{AAA}-GFP se generó por mutagénesis sitio-dirigida hacia los codones que codifican a los aminoácidos mencionados de la MTS de Oxa1. Con esta nueva versión, realizamos un fraccionamiento celular para determinar la localización mitocondrial de Oxa1^{AAA}-GFP y evaluamos cómo es su importación *in vivo*.

De forma clara, la nueva versión Oxa1^{AAA}-GFP se encuentra en la fracción mitocondrial de la triple mutante a niveles comparables con los de la cepa silvestre (Figura 15C), indicando que el nivel basal de proteína en la fracción mitocondrial fue restablecido (comparar Figura 10 A con Figura 15C). Sin embargo, al observar la cinética de importación, ésta continúa alterada en la cepa mutante $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$ (Figura 15D), reflejando que los primeros pasos de la síntesis e importación de la proteína continúan afectados. Este resultado es interesante, debido a que los cambios realizados no generaron que la importación fuera independiente del complejo $\alpha\beta_2$ -NAC, pero sí que llegara exitosamente hasta la mitocondria, tal vez derivado de una acción de chaperonas Hsp70 y Hsp90.

Un subconjunto de alrededor de 200 proteínas mitocondriales presenta un grupo de aminoácidos positivos en su extremo N-terminal en *S. cerevisiae*

Con el objetivo de conocer si la presencia de un grupo de aminoácidos positivos en la región N-terminal de las proteínas mitocondriales es frecuente, decidimos realizar una búsqueda en bases de datos de dichos grupos en las proteínas que conforman el proteoma mitocondrial de *S. cerevisiae*. Inicialmente, consideramos los proteomas publicados en diversos estudios junto con la localización submitocondrial de las proteínas, así como si contienen o no una MTS [20]–[22]; decidimos, además, considerar los estudios que muestran que el mRNA de algunas proteínas mitocondriales se localiza en la periferia mitocondrial o que son traducidos por ribosomas asociados a la membrana externa mitocondrial,

información que consideramos relevante, ya que aporta evidencia positiva al modelo co-traducciona l de importación de proteínas a la mitocondria. Haciendo uso del programa en línea HeliQuest [193], herramienta que permite graficar la distribución de los aminoácidos a manera de alfa hélice en una “peep wheel”, así como calcular la carga neta, la hidrofobicidad y el momento hidrofóbico, identificamos las proteínas mitocondriales con un grupo de aminoácidos positivos en su extremo N-terminal. Se consideró como un grupo la presencia de tres o más aminoácidos positivos consecutivos en la “peep wheel”. El total de proteínas que presentan las características mencionadas es de 196 (Apéndice 7), proponiendo que su importación es dependiente de $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37. En la Tabla 1, se muestra un grupo selecto de 18 proteínas, las cuales tienen algún tipo de evidencia experimental, sobre su posible importación co-traducciona l. La recopilación de la información y el análisis de esta se hizo de forma manual.

Tabla 1. Proteínas mitocondriales con una alta probabilidad de que su importación dependa de $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37. MIM, membrana interna mitocondrial; AA, aminoácidos.

GEN	LOCALIZACION SUBMITOCONDRIAL	MTS	AA POSITIVOS	REFERENCIAS
ATP2	MIM	X	3	[14, 20, 21, 22]
ATP22	MIM	X	2	[14, 20]
CCP1	Espacio Intermembranal	X	3	[14, 20, 22]
CIR2	MIM	X	2	[14, 22]
COR1	MIM/Matriz	X	3	[14, 20, 22]
COX10	MIM	X	2	[14, 21, 22]
CYB2	Espacio Intermembranal	X	3	[14, 20, 21, 22]
DLD1	MIM	X	3	[14, 22]
FMP40	MIM		3	[14, 22]
FUM1	Matriz	X	3	[14, 17, 18, 20, 22]
GCV1	Matriz	X	3	[14, 22]
ILV1	MIM		3	[14, 22]
KGD2	Matriz	X	3	[14, 20, 22]
MCR1	Espacio Intermembranal	X	3	[14, 20, 22]
OXA1	MIM	X	3	[14, 20, 21, 184]
TIM50	MIM	X	4	[14, 20, 22]
TIM54	MIM		3	[14, 20]
YER077C	MIM		3	[14, 22]

La importación de la proteína mitocondrial Fumarasa 1 también depende del complejo $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37

Con el objetivo de validar la información presentada en la tabla 1, decidimos investigar si la presencia de aminoácidos positivos de la proteína fumarasa1 Fum1 son importantes para su importación mitocondrial y así conocer si depende del complejo $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37. Para esto, clonamos a *FUM1* con una etiqueta de tres hemaglutininas bajo un promotor inducible por galactosa *GAL1* (Fum1-3HA). Así mismo, generamos una versión en donde cambiamos los aminoácidos positivos R3, K10 y K14 presentes en el extremo N-terminal por alaninas (Fum1^{AAA}-3HA). En primer lugar, evaluamos la localización de ambas versiones mediante un fraccionamiento celular. Para el caso de Fum1-3HA (Figura 16A), se encontró un comportamiento similar al registrado para Oxa1¹⁻⁵⁰-GFP, el nivel basal está disminuido en la fracción mitocondrial de la triple mutante $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$. Por el contrario, para la versión Fum1^{AAA}-3HA, el nivel basal presente en la fracción mitocondrial de ambas cepas estudiadas, silvestre y mutante $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$, son muy similares (Figura 16B). Este resultado confirma la importancia de estos aminoácidos positivos presentes en el extremo N-terminal de algunas proteínas mitocondriales durante su importación.

Asimismo, estudiamos la cinética de importación *in vivo* de ambas versiones generadas de Fum1. Tanto para Fum1-3HA como para Fum1^{AAA}-3HA, la cinética de importación se encuentra retrasada en la cepa mutante $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$ (Figuras 16C y 16D, respectivamente). Este resultado es similar al obtenido con las quimeras de Oxa1 (Revisar figuras 13B y 15D).

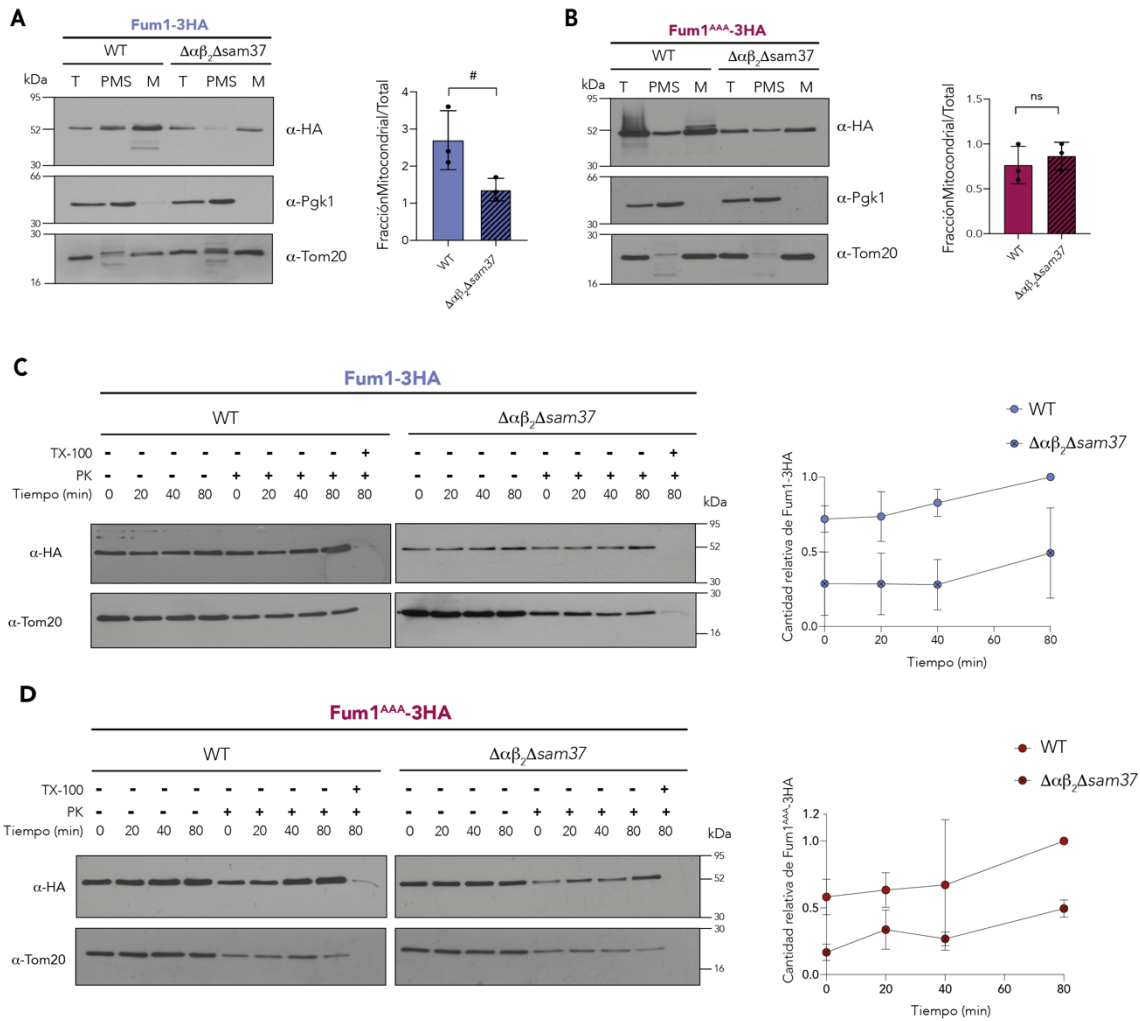


Figura 16. La importación de Fum1 a la mitocondria es dependiente del complejo $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37. **A.** Fum1-3HA **B.** Fum1^{AAA}-3HA, Se purificaron mitocondrias de la cepa silvestre o la triple mutante $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$ que expresan las construcciones indicadas. La presencia de las proteínas quiméricas en la fracción mitocondrial o en el sobrenadante post-mitocondrial (PMS) se analizó mediante inmunorréplica western blot, α -Pgk1 y α -Mdm38 fueron usados como marcadores de citosol y mitocondria, respectivamente. La intensidad de señal se cuantificó usando el programa ImageJ, la cantidad de proteína presente fue comparada con la fracción total (FT). Se graficó el promedio \pm desviación estándar, # $p=0.05$, $n=3$. **C.** Fum1-3HA y **D.** Fum1^{AAA}-3HA, se crecieron en medio sintético con rafinosa (SD-Raf) y permeabilizadas con Zymolyasa para producir células semi-intactas [191]. Las células se transfirieron a un amortiguador de importación que contiene galactosa al 2% para inducir la expresión de las proteínas quiméricas y seguir la importación a los tiempos de 0, 20, 40 y 80 min. La reacción se detuvo con la adición de antimicina, valinomicina y oligomicina. Posteriormente, las muestras se trataron con proteinasa K (PK) y Tritón X-100 (TX-100). Las muestras fueron analizadas mediante inmunorréplica tipo western blot, Tom20 fue usada como control para la digestión de proteínas expuestas o presentes en el citosol. Para la cuantificación, la muestra de 80 min de la cepa WT se consideró como 1 (representando la cantidad máxima de proteína importada), las muestras de 0, 20, 40 y 80 min se analizaron como una fracción del valor de referencia, se graficó el promedio \pm desviación estándar, $n=3$.

Parte II. ¿La ausencia del complejo $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37 genera acumulación de proteínas mitocondriales mal dirigidas hacia otros organelos?

En los últimos años se ha estudiado ampliamente las consecuencias derivadas de fallas en la importación de proteínas a la mitocondria y las respuestas celulares generadas por estas fallas. A grandes rasgos hay un cambio transcripcional, en donde se activa o reprime la expresión genes que permiten combatir la acumulación de proteínas mal plegadas o direccionadas a la mitocondria; entre estos genes se encuentran aquellos que codifican para chaperonas, proteosoma, AAA-ATPasas, entre otros [168].

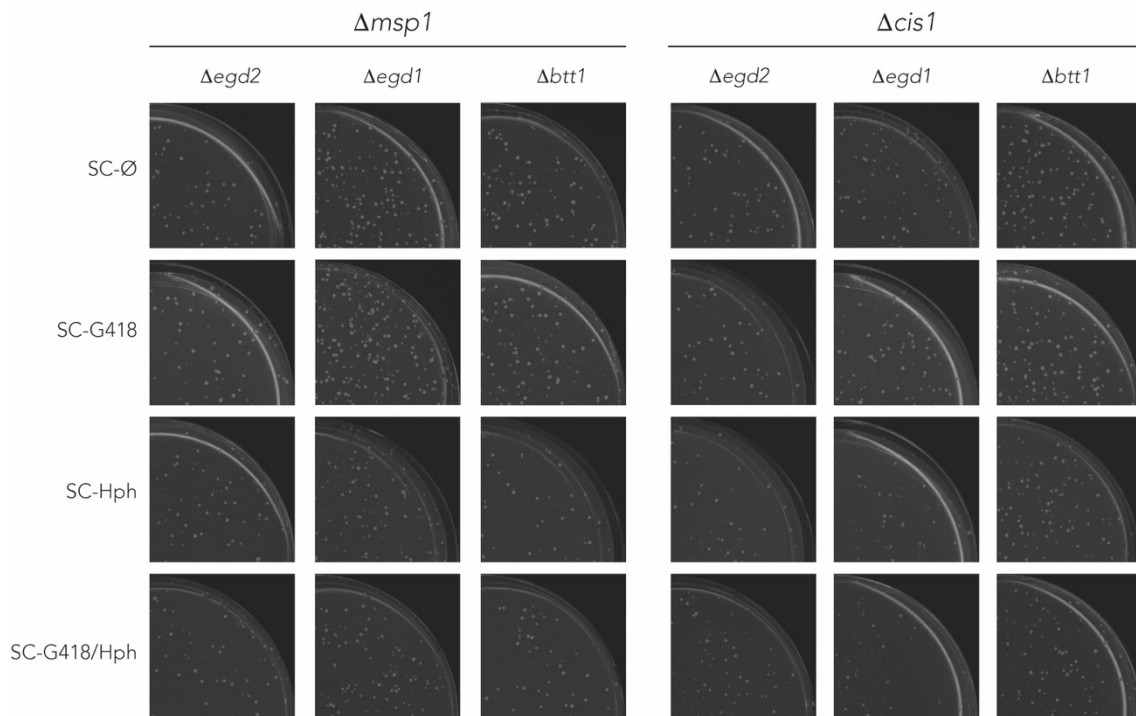
Dos de las proteínas que nos llamaron la atención fueron Msp1 y Cis1; ambas participan en la respuesta llamada mitoCPR, en la cual proteínas mitocondriales con una señal de localización bipartita ocluyen el poro de translocación Tom40 debido a alteraciones en el potencial de membrana $\Delta\Psi$ [169]. Msp1 es una AAA-ATPasa presente en la membrana externa mitocondrial que se encarga de retirar de Tom40 a las proteínas que se encuentran obstruyéndolo, para hacerlo requiere de Cis1, que a su vez es activada por el factor de transcripción Pdr3 [169].

En un estudio previo de nuestro laboratorio, se encontró que los genes *EGD1* y *BTT1*, que codifican para las subunidades β de NAC, tienen una interacción genética negativa con *MSP1*; por lo tanto, decidimos investigar a fondo esta interacción [186].

Los genes individuales *EGD1*, *EGD2* y *BTT1* no tienen interacción genética con *MSP1* o *CIS1*

Debido a que el análisis anterior se realizó de manera masiva, era pertinente repetir el experimento de rastreo de interacciones genéticas, incluyendo únicamente los genes que codifican para el complejo NAC, *MSP1* y *CIS1*, usando la técnica de Análisis de Esporas al azar RSA (de las siglas en inglés Random Spore Analysis) [194]. Esta técnica consiste en cruzar dos cepas mutantes sencillas de diferente tipo sexual, por ejemplo, $\Delta msp1$ con Δx (donde x puede ser *EDG1*, *EGD2* o *BTT1*), cuando se han generado las cepas diploides, se crecen en un medio de esporulación, obteniendo esporas que van a dar lugar a cepas haploides; posteriormente, las esporas se crecen en diferentes medios de selección que permiten la selección de colonias de acuerdo con ciertas características, en nuestro caso, que sean dobles mutantes.

En la figura 17 se muestran los resultados obtenidos del RSA con las cepas $\Delta msp1$ y $\Delta cis1$, cuya conclusión principal es que ninguno de los dos genes tiene interacción genética con los genes $EGD1$, $EGD2$ y $BTT1$ que codifican para las subunidades de NAC. A pesar de que ya se había reportado la interacción genética negativa de los genes $EGD1$ y $BTT1$ con $MSP1$ [183]. No es sorprendente que con los genes individuales no se haya encontrado lo mismo, puesto que en *S. cerevisiae* hay muchos genes con funciones redundantes que pueden suplir las funciones de otros.



*Figura 17. No hay interacción genética entre MSP1 o CIS1 con los genes que codifican para las subunidades del complejo NAC. Después de cruzar las cepas $\Delta msp1$ y $\Delta cis1$ con $\Delta egd2$, $\Delta egd1$ o $\Delta btt1$, las células diploides obtenidas fueron inducidas a generar esporas. Posteriormente, la solución de esporas se sembró en medio sólido de la siguiente forma: sin selección (SC∅), selección sencilla (SC+*hph* o SC+G418) y selección doble (SC+G418/*hph*). Se determina si hay interacción genética al evaluar el crecimiento de las dobles mutantes.*

De manera adicional evaluamos el fenotipo de crecimiento de las cepas obtenidas mediante la siembra de las diluciones seriadas de un cultivo. En este caso, tampoco se observaron diferencias apreciables en el crecimiento entre las cepas dobles mutantes, las mutantes sencillas y la cepa silvestre (Figura 18).

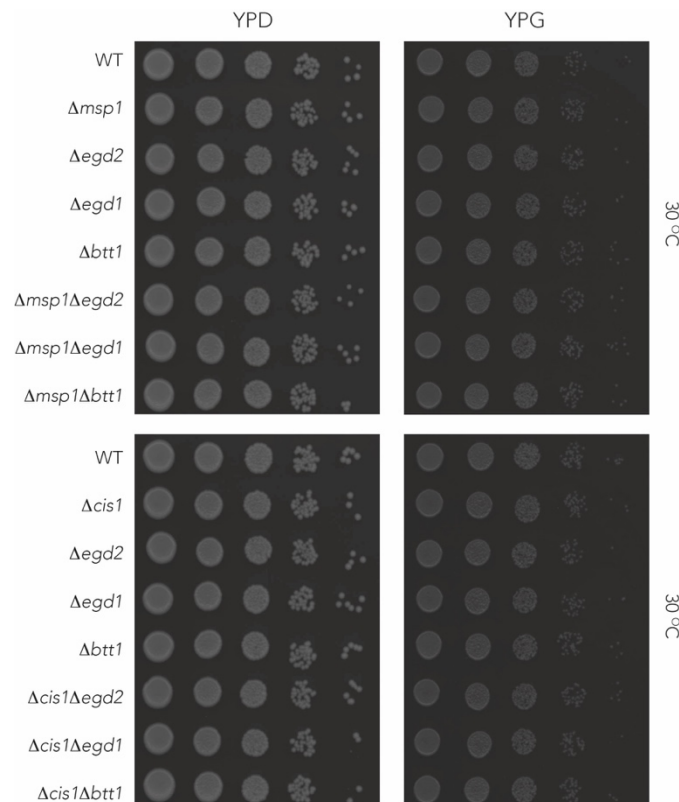


Figura 18. MSP1 y CIS1 no tienen interacción genética con los genes que codifican para las subunidades del complejo NAC. Las cepas indicadas se crecieron en medio rico fresco hasta alcanzar una $DO_{600}=1$, posteriormente se realizaron diluciones seriadas del cultivo y se sembraron gotas en medio rico sólido fresco usando glucosa o glicerol como fuente de carbono. Las cajas se incubaron a 30°C durante 36-60 horas aproximadamente. EGD1= β_1 , EDG2= α , BTT1= β_2 .

La eliminación simultánea de los genes *EGD1*, *BTT1* y *MSP1* no genera un fenotipo de crecimiento diferente al de la cepa silvestre

A pesar de los resultados anteriores, era preciso repetir el experimento con dobles mutantes del complejo NAC $\Delta\alpha\Delta\beta_1$, $\Delta\alpha\Delta\beta_2$ y $\Delta\beta_1\Delta\beta_2$ para conocer si la interacción genética con *MSP1* previamente descrita era real o fue un artilugio como resultado del análisis masivo. Por lo tanto, se realizó un nuevo RSA con las dobles mutantes antes descritas cruzándolas con las mutantes sencillas $\Delta msp1$ y $\Delta cis1$. En esta ocasión, se esperaba obtener triples mutantes.

No es muy claro si existe o no interacción genética entre los genes *EGD1*, *BTT1* y *MSP1*, (interacción previamente reportada por nuestro grupo de investigación), ya que el número de colonias obtenidas es bastante homogéneo en el medio de selección para triples mutantes (Figura 19, SC-G418/Hph/Nat), aunque las colonias parecen ser de menor tamaño. Algo similar ocurre para la triple mutante $\Delta\alpha\Delta\beta_2\Delta msp1$. Por el contrario, no hay interacción genética entre los genes *EGD2*, *BTT1* y *MSP1* ni tampoco entre las dobles combinaciones de los genes *EGD2*, *EGD1* y *BTT1* con *CIS1*.

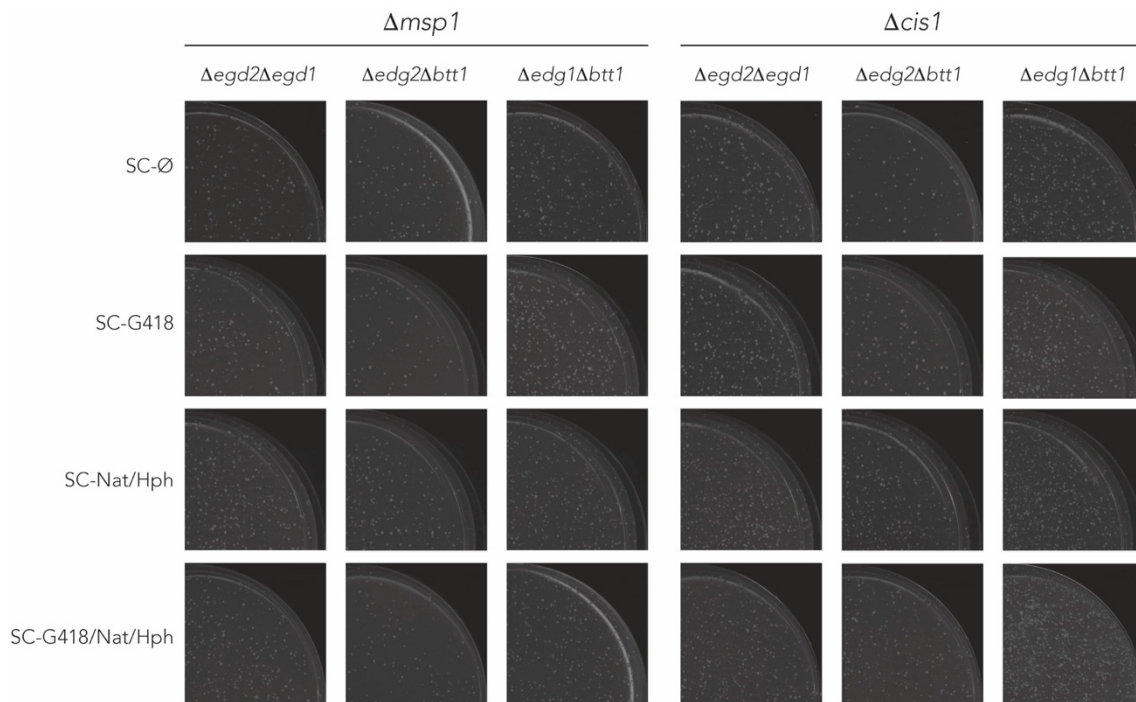


Figura 19. No hay interacción genética entre MSP1 o CIS1 y combinaciones de dobles mutantes de los genes que codifican para NAC. Después de cruzar las cepas $\Delta msp1$ y $\Delta cis1$ con $\Delta egd2 \Delta egd1$, $\Delta egd1 \Delta btt1$ y $\Delta btt1 \Delta egd2$, las células diploides obtenidas fueron inducidas a generar esporas. Posteriormente, la solución de esporas se sembró en medio sólido de la siguiente forma: sin selección (SC-Ø), selección sencilla (SC+G418 o SC+Nat/hyg) y selección triple (SC+G418/hyg/Nat). Se determina si hay interacción genética al evaluar el crecimiento de las triples mutantes.

Para tener un panorama más claro, decidimos evaluar con mayor detalle el fenotipo de crecimiento de las cepas obtenidas mediante el RSA, con el objetivo de visualizar mejor posibles diferencias que nos pudieran indicar una interacción genética. Para esto, crecimos en medio de cultivo rico con glucosa y glicerol como fuente de carbono, diluciones seriadas de un cultivo fresco de las cepas indicadas en la figura 20. Al no observar diferencia alguna en el fenotipo de crecimiento entre las cepas evaluadas, podemos concluir que no hay interacción genética entre los genes estudiados *EGD1*, *EGD2*, *BTT1*, *MSP1* y *CIS1*.

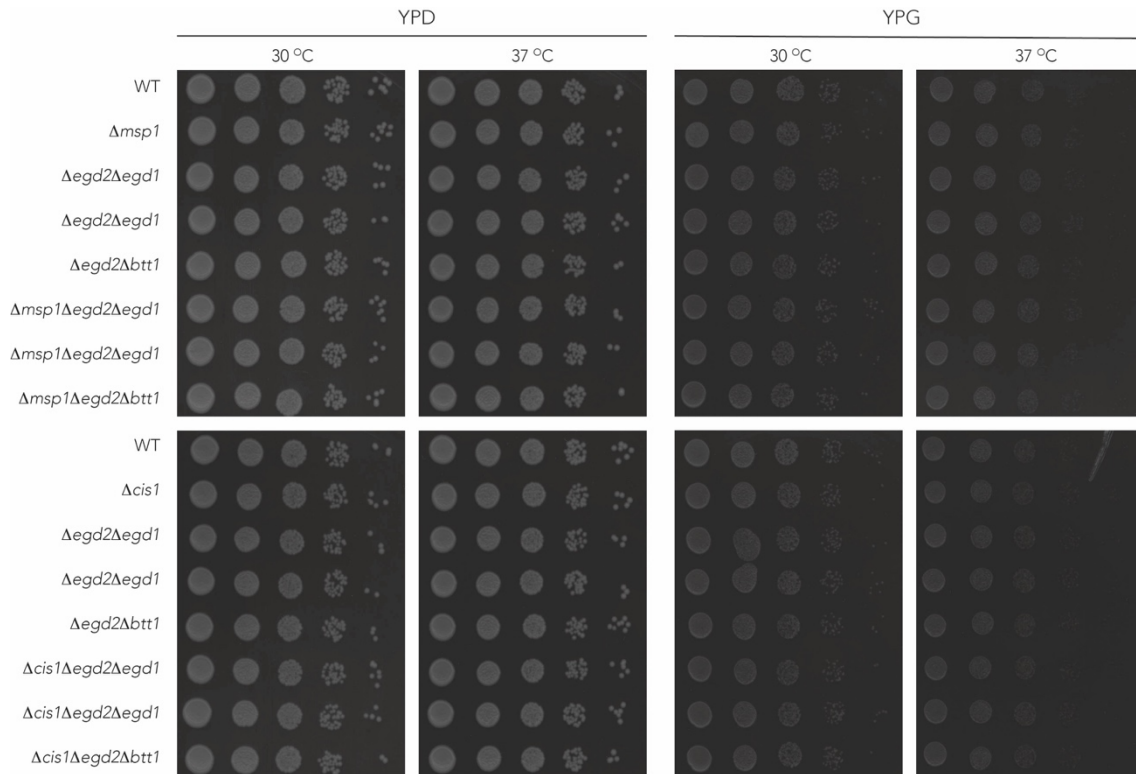


Figura 20. *MSP1 y CIS1 no tienen interacción genética con los genes que codifican para las subunidades del complejo NAC.* Las cepas indicadas se crecieron en medio rico fresco hasta alcanzar una $DO_{600}=1$, posteriormente se realizaron diluciones seriadas del cultivo y se sembraron gotas en medio rico sólido fresco usando glucosa o glicerol como fuente de carbono. Las cajas se incubaron a 30°C durante 36-60 horas aproximadamente. $EGD1=\beta_1$, $EDG2=\alpha$, $BTT1=\beta_2$.

El fenotipo de crecimiento de la cuádruple mutante $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37\Delta msp1$ es similar al de la triple mutante $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$

El rol de Msp1 en el control de calidad durante la importación de proteínas a la mitocondria es un reflejo de lo preciso y controlado que es este proceso [169]–[171]. La ausencia de interacción genética entre los genes que codifican para el complejo NAC y Msp1 no correlaciona con el papel de NAC durante la importación co-traduccional de proteínas mitocondriales, puesto que fallas o la ausencia $\alpha\beta_2$ -NAC en este proceso pueden desencadenar la deslocalización de proteínas mitocondriales. Sin embargo, en los experimentos anteriores no se incluyó uno de los protagonistas de este estudio: *SAM37*. Por esta razón, decidimos generar una cuádruple mutante por recombinación homóloga, al sustituir el gen *MSP1* por el casete de selección de *URA3* en la triple mutante $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$.

El primer paso fue evaluar el fenotipo de crecimiento de la mutante obtenida $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37\Delta msp1$ mediante el crecimiento en medio rico de diluciones seriadas de un cultivo fresco de las cepas señaladas (Figura 21). Es importante resaltar, que el crecimiento de la cuádruple y triple mutante es muy similar, ambas crecen menos que las mutante sencilla $\Delta sam37$ y la cepa silvestre. Incluso el crecimiento

de estas dos cepas a 37°C es nulo, podemos decir que en estas condiciones la ausencia de los genes *SAM37*, *EGD2*, *BTT1* y *MSP1* es de tipo letal.

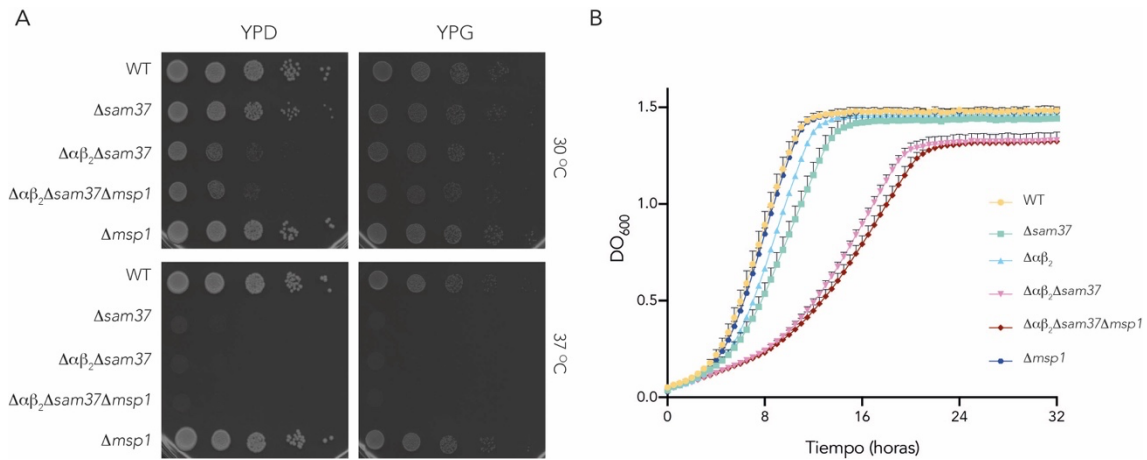


Figura 21. No existe interacción genética entre *MSP1*, y el complejo $\alpha\beta_2$ -NAC y *SAM37*. **A.** Las cepas indicadas se crecieron en medio rico hasta alcanzar una $DO_{600}=1$, posteriormente se realizaron diluciones seriadas del cultivo y se sembraron gotas en medio rico sólido usando glucosa (YPD) o glicerol (YPG) como fuente de carbono. Las cajas se incubaron a 30°C o 37°C durante 36-60 horas. $EGD1=\beta_1$, $EDG2=\alpha$, $BTT1=\beta_2$. **B.** Curvas de crecimiento, las cepas mostradas se crecieron en medio rico líquido (YPD) durante toda la noche, posteriormente se diluyeron tomando 10 μ L del cultivo en 290 μ L de medio rico; la medición de la DO_{600} se realizó cada 30 minutos durante 48 horas en un crecínómetro Bioscreen. Los puntos representan el promedio de tres réplicas independientes y las barras la desviación estándar, $n=3$.

Es difícil discernir si la cuádruple mutante $\Delta \alpha\beta_2 \Delta sam37 \Delta msp1$ crece un poco menos que la triple mutante $\Delta \alpha\beta_2 \Delta sam37$; por esto, decidimos realizar una curva de crecimiento para observar si existe tal diferencia entre las dos cepas. En la figura 19B, se muestra el resultado del análisis del crecimiento, en donde la cepa $\Delta \alpha\beta_2 \Delta sam37 \Delta msp1$ tiene una tenue diferencia comparada con la triple mutante $\Delta \alpha\beta_2 \Delta sam37$ durante la fase exponencial (comparar las líneas rosada y vino tinto), lo que nos permite decir que no existe interacción genética entre los cuatro genes *EDG2*, *BTT1*, *SAM37* y *MSP1* estudiados.

Discusión

La distribución de las proteínas dentro de los compartimentos de una célula representa un desafío importante para éstas, ya que son necesarios la identificación y direccionamiento correcto hacia donde las proteínas realizan su función. La identificación se realiza mediante señales que son reconocidas por ciertos factores que, a su vez, pueden desempeñar la función de transporte hacia el organelo blanco. Específicamente, el caso de las proteínas mitocondriales no se ha profundizado en el estudio de cómo suceden los primeros pasos, tanto de identificación como de direccionamiento en la importación de proteínas mitocondriales.

En este trabajo, proponemos que el complejo $\alpha\beta_2$ -NAC reconoce una región en el extremo N-terminal de algunas proteínas mitocondriales. Pensamos que la ausencia de este complejo y de Sam37, ocasiona una deslocalización de la proteína estudiada Oxa1¹⁻⁵⁰-GFP; es decir, ésta se encontraría en la fracción citosólica. Por el contrario, observamos que la proteína quimérica se encuentra en la fracción mitocondrial, pero en una menor cantidad. Esto puede explicarse por varias razones:

- i. Señales presentes en el 3'UTR pueden jugar un papel fundamental en la importación co-traducciona [4], [195]. Estas señales favorecen la traducción localizada en la periferia de la mitocondria, al interactuar con proteínas que pueden unirse al ARN, tal es el caso de Puf3 [196]–[198]. Tradicionalmente, la localización de los ARNm y el papel de chaperonas co-traduccionales se han estudiado de forma independiente; Oxa1 se postula como el ejemplo ideal en que ambos mecanismos actúan para favorecer la importación co-traducciona de proteínas a la mitocondria.
- ii. Diferentes estudios han propuesto que proteínas mitocondriales pueden llegar al retículo endoplásmico, debido a que sus señales pueden confundirse o a fallas en el sistema de reconocimiento de éstas; un ejemplo estudiado es Oxa1 [177]–[179], [199], [200]. Recientemente, se propuso una ruta de re-localización para proteínas que llegan erróneamente al retículo endoplásmico, se trata de ER-SURF, donde la chaperona Djp1 es capaz de identificar a la proteína mitocondrial deslocalizada y redirigirla hacia la mitocondria [179].
- iii. Los sistemas de ubiquitinación-proteosoma siempre están patrullando para mantener la proteostasis en la célula; por lo que es plausible que una parte de Oxa1¹⁻⁵⁰-GFP sea degradada por el proteosoma al no ser dirigida correctamente a la mitocondria.

Las cinéticas de importación de proteínas mitocondriales *in vivo* son una excelente herramienta en nuestro caso; porque al estudiar un complejo proteico que se une al túnel de salida de ribosoma, es ideal que el complejo NAC no esté presente en el sistema, situación difícil de lograr en un sistema de traducción *in vitro* que utiliza reticulocitos de conejo. Tomando ventaja de la facilidad de generar cepas mutantes nulas no letales en *S. cerevisiae*, más la posibilidad de hacer células permeabilizadas, el estudio de cómo suceden durante los primeros pasos de la síntesis de proteínas mitocondriales se ve simplificado por completo.

Es importante mencionar que para realizar este protocolo fue necesario sub-clonar las construcciones bajo un promotor inducible por galactosa, para las construcciones Oxa1¹⁻⁵⁰-GFP y Mdm38¹⁻⁶⁰-GFP se usó el promotor *GAL1* y para Su9¹⁻⁶⁹-GFP el promotor *GAL10*, esta diferencia se debe a que se usaron todos los sitios de restricción de la región de poli-clonación y fue necesario usar otro plásmido. Es posible que esta diferencia en los promotores se vea reflejada en la cantidad de proteína presente en el tiempo 0 de las cinéticas.

Al analizar la cinética de importación *in vivo* de Oxa1¹⁻⁵⁰-GFP vemos que está alterada, al existir un retraso en la cantidad de proteína presente con respecto al tiempo en la cepa mutante $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$; esto concuerda muy bien con la disminución en la cantidad de proteína presente en la fracción mitocondrial de esta misma cepa. Este resultado nos indica que los primeros pasos durante el transporte y la llegada a la mitocondria de esta quimera dependen del complejo $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37 y que, a su vez, la información necesaria para el tipo de importación (co-traducciona l o post-traducciona l) que debe seguir Oxa1 está contenida en sus primeros 50 aminoácidos, que corresponden a su MTS.

Un resultado a resaltar obtenido de la cinética de Su9¹⁻⁶⁹-GFP, es que los primeros pasos de su importación están retrasados en la triple mutante $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$, incluso después de 80 min, la cantidad de proteína importada es menor comparada con la cepa silvestre. Este resultado fue inesperado ya que, en el fraccionamiento celular, la cantidad de proteína presente en la fracción mitocondrial de ambas cepas es muy similar; indicándonos que Su9¹⁻⁶⁹-GFP requiere de $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37 en los primeros pasos de su importación, pero probablemente en ausencia de éstos, llegue a la mitocondria exitosamente mediante chaperonas tipo Hsp70's y Hsp90's. Esto da pie para proponer que algunas proteínas mitocondriales pueden depender de elementos que actúan a nivel co-traducciona l o post-traducciona l, pero probablemente *in vivo* es necesaria la acción conjunta de ambos tipos de señales de manera que se asegure la correcta localización de las proteínas.

Algo importante a recalcar es que los primeros 69 aminoácidos correspondientes a la MTS de la subunidad β de la ATPasa de *N. crassa*, son suficientes para indicar el tipo de importación que utiliza. De este modo, los resultados obtenidos con la MTS de Oxa1 y Su9 nos permiten proponer a la MTS como algo más que una señal de localización. Algunos estudios también han propuesto la existencia de MTS fuertes y débiles como un mecanismo para señalización de respuesta por cambios en el potencial de membrana ($\Delta\Psi$) [201] y recientemente, se encontró que la MTS de precursores no importados es relevante para mediar su degradación [177]; reforzando la idea de que las MTS son más que señales de localización. Así, resulta plausible, que existan tipos de MTS, donde unas sean más fuertes que otras indicando el tipo de importación (co-traducciona l o post-traducciona l) que utilizan los precursores; por ejemplo, Oxa1, cuya importación es, en mayor medida, co-traducciona l; incluso podría variar según el estado metabólico de la mitocondria (por ejemplo, en fermentación o en respiración en el caso de levadura).

Para conocer cuál es la región específica dentro de la MTS de Oxa1 que es importante para el reconocimiento de $\alpha\beta_2$ -NAC decidimos hacer quimeras combinando en fragmentos de diez aminoácidos las MTS de Oxa1 y Mdm38. De esta manera, nos aseguramos de que no pierdan sus características intrínsecas (amfifilicidad y capacidad de formar α -hélices), situación que si sucediese al recortar su longitud.

Es interesante que con sólo cambiar los primeros diez aminoácidos de Oxa1, se restablece la cantidad de proteína presente en la fracción mitocondria l de la triple mutante $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$ a los niveles de la cepa silvestre. En la literatura hay varios reportes que muestran que el péptido naciente se expone al citosol cuando se han sintetizado aproximadamente 33 aminoácidos; por lo que parecía plausible que la región se encontrara en una longitud similar [140], [151]. Sin embargo, en un estudio reciente, probaron que la subunidad β del complejo NAC puede interaccionar con el péptido naciente cuando tiene alrededor de diez aminoácidos [151]; este reporte junto con nuestro resultado sugiere que el complejo $\alpha\beta_2$ -NAC puede decidir, de manera muy temprana en la síntesis de una proteína, si ésta es mitocondria l y si requiere una importación co-traducciona l.

La presencia de precursores en la fracción citosólica de la cepa $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$ que expresan las construcciones Mdm38¹⁻³⁰Oxa1³⁰⁻⁵⁰-GFP, Mdm38¹⁻⁴⁰Oxa1⁴⁰⁻⁵⁰-GFP y Mdm38¹⁻⁵⁰Oxa1⁴⁰⁻⁵⁰-GFP puede tener varias explicaciones. La primera es que pueden existir señales de degradación presentes en Oxa1 que fueron camufladas al reemplazarlas por las regiones de Mdm38; realizar experimentos con el inhibidor del proteosoma MG132 puede ayudar a corroborar esta propuesta. La segunda es que la expresión de estas construcciones se vea beneficiada por alguna razón,

como su promotor, saturando el sistema de importación (TOM-TIM23) dejando una fracción de la proteína libre en el citosol; sin embargo, esta propuesta no explica porque la versión precursora no se observa en la cepa silvestre.

Las herramientas *in silico* nos permiten realizar análisis que de forma tradicional o manual nos llevaría mucho tiempo. Al iniciar el proyecto, se pensó que la señal que era reconocida por el complejo $\alpha\beta_2$ -NACse encontraba en la secuencia de aminoácidos (estructura primaria), por lo que se realizaron alineamientos de diferentes MTS con el objetivo de encontrar una secuencia consenso o una región donde predominan ciertos aminoácidos; sin embargo, esta aproximación no fue exitosa.

En cambio, el programa en línea HeliQuest [193] nos permitió conocer la distribución espacial de los aminoácidos de las MTS estudiadas, así como calcular su hidrofobicidad, la carga neta y su momento hidrofóbico. El análisis de las MTS de Oxa1 y de Mdm38 mostró la presencia de un grupo de aminoácidos con carga positiva, lisina y argininas, en los primeros 18 residuos de Oxa1. Al realizar los cambios K3A, R7A y R12A en Oxa1 obtuvimos lo siguiente:

- i. El nivel basal de Oxa1^{AAA} en la fracción mitocondrial es muy similar entre la cepa silvestre y la triple mutante $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$; esto es importante porque los cambios no ocasionaron la pérdida de la localización.
- ii. La cinética de importación *in vivo* nos indicó que, aún con los cambios realizados, los primeros pasos en el reconocimiento y direccionamiento de Oxa1^{AAA}-GFP hacia la mitocondria continúan estando alterados en la triple mutante. Una explicación para este resultado es que los cambios realizados permitieron que la proteína fuera accesible a chaperonas del tipo Hsp70's y Hsp90's, ya que tienen predilección por aminoácidos hidrofóbicos, evitando un mal plegamiento o reconocimiento y guiando, por lo tanto, su correcta llegada hasta la mitocondria. Esta situación se asemeja al fenotipo presentado por Su9¹⁻⁶⁹-GFP.
- iii. La relevancia de la presencia de un grupo de aminoácidos positivos en el extremo N-terminal de un grupo de proteínas mitocondria, fue confirmado al obtener los mismos resultados para el caso de la proteína Fum1; cuya importación co-traducciona ya fue sugerida en estudios previos [17], [18].

Con todos estos resultados podemos proponer que el complejo $\alpha\beta_2$ -NAC es un modulador fundamental en la importación de proteínas a la mitocondria, ya que evita que otros complejos como SRP y RAC se unan precipitadamente a péptidos nacientes mitocondriales que van emergiendo del túnel de salida del ribosoma [140], [144]–[146], [148], [162], [202]; dicho en otras palabras, NAC evita que los precursores mitocondriales sean distribuidos erróneamente dentro del tráfico

celular de proteínas. La presencia de grupos de aminoácidos positivos en el extremo N-terminal de las proteínas mitocondriales es clave para dictaminar una importación co-traducciona, mecanismo en el que participan $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37, aunque es posible que existan otros factores o seales no identificados o relacionados en este proceso.

Al pensar en el proceso análogo que ocurre en el transporte co-traducciona de proteínas al retículo endoplásmico, podemos proponer que $\alpha\beta_2$ -NAC actúa de forma similar a SRP, en donde podemos plantear escenarios diferentes:

- i. En una cepa silvestre, $\alpha\beta_2$ -NAC detecta un grupo de aminoácidos positivos en precursores mitocondriales, detiene la traducción y se dirige a la periferia mitocondrial, en donde interacciona con Sam37 y entrega el precursor al complejo TOM. Por el contrario, cuando $\alpha\beta_2$ -NAC está presente pero el péptido naciente no presenta una seala mitocondrial que requiera importación co-traducciona, la traducción no se detiene y la proteína quedaría expuesta a chaperonas que actúan río abajo, como es el caso de Hsp70's y Hsp90's, dependiendo de las características fisicoquímicas de la proteína sintetizada, sería el caso de la proteína Mdm38. En ambos casos $\alpha\beta_2$ -NAC evitaría que factores como SRP o RAC se unan al túnel de salida del ribosoma.
- ii. En ausencia de $\alpha\beta_2$ -NAC y, el péptido naciente, posee un grupo de aminoácidos positivos (cepa $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$ que expresa Oxa1¹⁻⁵⁰-GFP), la traducción no se ve afectada, por lo que la proteína quedaría expuesta a otras chaperonas presentes en el túnel de salida del ribosoma (SRP o RAC), ocasionando una deslocalización del precursor. Estudios recientes proponen que cuando hay fallas en el proceso de importación a la mitocondria, las proteínas pueden tener cinco destinos diferentes: mitocondria, núcleo, retículo endoplásmico, citosol o degradación [177]. Sin duda alguna, el caso más estudiado es la localización errónea en el retículo endoplásmico de proteínas mitocondriales proponiendo diferentes respuestas: a) la proteína Ema19 es capaz de degradar a estas proteínas mitocondriales deslocalizadas [180]; b) Spf1 es una *desinsertasa* de proteínas presente en la membrana del retículo endoplásmico, por lo que, una de sus funciones propuestas es retirar de la membrana del retículo a las proteínas mal localizadas o insertadas [181]; c) la ruta ER-SURF y su protagonista Djp1 serían claves para mantener la proteostasis celular, al redirigir a las proteínas mitocondriales que fueron erróneamente llevadas a este organelo [179]; y d) la localización errónea de proteínas mitocondriales derivada de la ausencia del complejo NAC enciende la respuesta a proteínas mal plegadas UPR en *Caenorhabditis elegans* [162].

- iii. Por último, un escenario sintético que podemos tener registrado para nuestro caso de estudio: la ausencia del complejo $\alpha\beta_2$ -NAC y una señal mitocondrial que requiera importación co-traduccional alterada (cepa $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$ que expresa Oxa1^{AAA}-GFP). En este caso, la proteína se sintetiza por completo y quedaría libre el citosol, de manera que probablemente se importe post-traduccionalmente. Sin embargo, debe existir una razón por la que una proteína mitocondrial use los mecanismos de importación co-traduccional. Se ha propuesto que proteínas muy hidrofóbicas, como Oxa1 y algunos componentes de la cadena transportadora de electrones, requieren este tipo de importación debido a que termodinámicamente no es viable exponer residuos hidrofóbicos en un ambiente acuoso como es el citosol, por lo que requeriría la asistencia de chaperonas. Por consiguiente, es posible que inicialmente, la proteína sea “atacada” por los sistemas de degradación, eventualmente, algunas escapan y son ayudadas por chaperonas, permitiendo que lleguen de forma correcta a la mitocondria y restablezcan su nivel basal.

En este punto, es importante resaltar el origen endosimbionte de las mitocondrias. Las α -proteobacterias, ancestros de las mitocondrias, traían consigo sus propias proteínas codificadas en su genoma; la endosimbiosis ocasionó que gran parte de sus genes se relocalizaran en el núcleo del hospedero. Una teoría propone que las proteínas mitocondriales que provienen de su ancestro procarionte tienen mayor probabilidad de requerir una importación co-traduccional [20]; incluso al expresar en *S. cerevisiae* y en células de mamífero proteínas bacterianas de *Escherichia coli* enteropatógena como Map y EspF, se dirigen a la mitocondria y se importan en sistemas *in vitro* ([203]–[205]). Esto podría indicar que hay características intrínsecas de las proteínas que las hace susceptibles de usar este tipo de importación, lo cual ayuda a explicar la dificultad para encontrar una señal que muestre fenotipos directos y no parciales como los descritos en el presente trabajo.

Con los resultados obtenidos al estudiar la interacción genética entre *MSP1* y los genes que codifican para las subunidades de NAC (*EGD1*, *EGD2* y *BTT1*) no es posible concluir nada más allá de que no hay interacción genética entre estos genes. Estudios encaminados a entender la relación funcional entre Msp1 y el complejo NAC son necesarios.

Modelo Final

Una visión general que engloba los resultados obtenidos en el presente trabajo y la discusión enunciada en la sección anterior se representa en la Figura 20. Así, $\alpha\beta_2$ -NAC reconoce un grupo de aminoácidos positivos en algunas proteínas mitocondriales y dirige a la maquinaria traducciona a las cercanías de la

mitocondria, específicamente al complejo TOM, donde con ayuda de Sam37, facilita la importación co-traducciona de los precursores mitocondriales. Al mismo tiempo $\alpha\beta_2$ -NAC evita que SRP pueda unirse al túnel de salida del ribosoma [141], [143], [147]. En ausencia de $\alpha\beta_2$ -NAC, las proteínas mitocondriales que contienen un grupo de aminoácidos positivos en su extremo N-terminal, podrían ser localizadas erróneamente en el retículo endoplásmico [162], [179]–[181]; algunas de ellas podrían ser ayudadas por otras chaperonas tipo Hsp70's y Hsp90's, otras serían degradadas por el proteosoma.

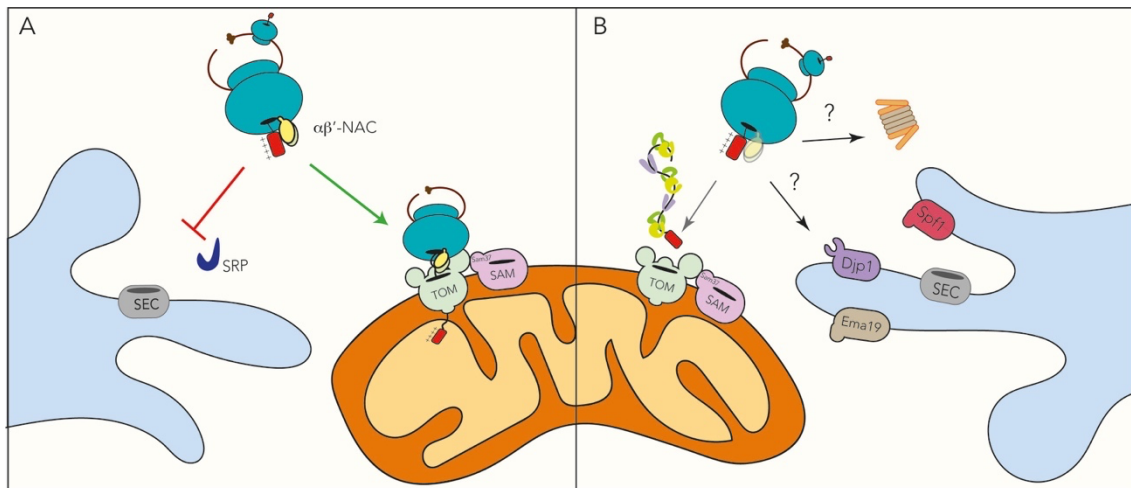


Figura 22. Modelo Final. A. $\alpha\beta_2$ -NAC reconoce un grupo de aminoácidos positivos en algunas proteínas mitocondriales, detiene la traducción y dirige a la maquinaria traduccional al complejo TOM, donde con ayuda de Sam37, facilita la importación co-traducciona de estos precursores mitocondriales. *B.* En ausencia del complejo $\alpha\beta_2$ -NAC, proteínas con un grupo de aminoácidos positivos en su extremo N-terminal podrían ser dirigidas erróneamente al retículo endoplásmico o ser degradadas por el proteosoma. De forma alternativa, al cambiar los aminoácidos positivos por anilinas, es probable que la proteína mitocondrial sea más accesible a chaperonas del tipo Hsp70 y Hsp90.

Conclusiones

- i. El nivel basal de Oxa1¹⁻⁵⁰-GFP y Oxa1¹⁻¹⁴⁵-GFP está disminuido en la fracción mitocondrial de las cepas carentes del complejo $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37. Las quimeras Mdm38¹⁻⁶⁰-GFP, Mdm38¹⁻¹⁶⁵-GFP y Su9¹⁻⁶⁹-GFP se encuentran en igual proporción en la fracción mitocondrial de la cepa silvestre y en la triple mutante.
- ii. La eliminación simultánea de $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37 afecta la cinética de importación *in vivo* de las quimeras Oxa1¹⁻⁵⁰-GFP y Su9¹⁻⁶⁹-GFP. No hay diferencia entre las cepas estudiadas para la cinética de Mdm38¹⁻⁶⁰-GFP.
- iii. El nivel basal que se encuentra en la fracción mitocondrial de todas las quimeras estudiadas Mdm38¹⁻¹⁰Oxa¹¹⁻⁵⁰-GFP, Mdm38¹⁻²⁰Oxa²¹⁻⁵⁰-GFP, Mdm38¹⁻³⁰Oxa³¹⁻⁵⁰-GFP, Mdm38¹⁻⁴⁰Oxa⁴¹⁻⁵⁰-GFP y Mdm38¹⁻⁵⁰Oxa⁴¹⁻⁵⁰-GFP es igual en la cepa silvestre y en la triple mutante $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$.
- iv. Los primeros diez aminoácidos de Oxa1 contienen información importante que dictaminan si su importación es dependiente del complejo $\alpha\beta_2$ -NAC.
- v. Un grupo de aminoácidos positivos localizados en el extremo N-terminal de Oxa1 son importantes para el reconocimiento del complejo $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37 durante la importación co-traduccional de proteínas a la mitocondria.

Perspectivas

- i. En el modelo co-traducciona1 de importación de proteínas a la mitocondria se ha propuesto que señales presentes en el extremo 3'UTR de los ARNm que codifican para proteínas mitocondriales, son importantes para la ubicación de estos ARNm en la periferia de la mitocondria y así, favorecer una traducción localizada. En el presente estudio, únicamente se abordaron señales presentes en los precursores mitocondriales. Evaluar la posible relación entre las señales presentes en el extremo 3'UTR de los ARNm que codifican para proteínas mitocondriales y el complejo $\alpha\beta_2$ -NAC es un campo inexplorado que podría ofrecer información sobre los diferentes sellos que puede tener una proteína mitocondrial para indicar que requiere una importación co-traducciona1: ya sea dependiente de $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37, de las señales presentes en extremo 3'UTR de su ARNm o ambas.

Una primera aproximación es eliminar el extremo 3'UTR de las construcciones Oxa1¹⁻⁵⁰-GFP y Fum1-3HA y evaluar la localización celular y la cinética de importación in vivo en la triple mutante $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$.

- ii. En el primer experimento observamos que la cantidad en la fracción mitocondrial de la proteína quimérica Oxa1¹⁻⁵⁰-GFP es menor en la triple mutante $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$. Una posibilidad es que proteína que no llegó correctamente a la mitocondria fue degradada. Para probar este evento, propongo realizar un fraccionamiento celular en la cepa triple mutante que expresa la construcción Oxa1¹⁻⁵⁰-GFP en presencia del inhibidor del proteosoma MG132. En este caso, la versión precursora que no fue degradada se observaría en la fracción citosólica.

En este orden de ideas, en nuestros experimentos de fraccionamiento celular con algunas construcciones donde mezclamos la MTS de Oxa1 y Mdm38, se observó la presencia de la versión precursora de la proteína estudiada. Específicamente estas proteínas son: Mdm38¹⁻³⁰Oxa1³¹⁻⁵⁰-GFP, Mdm38¹⁻⁴⁰Oxa1⁴¹⁻⁵⁰-GFP y Mdm38¹⁻⁵⁰Oxa1⁴¹⁻⁵⁰-GFP. Sin embargo, la versión precursora no fue vista en el fraccionamiento con la MTS de Oxa1 completa Oxa1¹⁻⁵⁰-GFP. Una posible explicación, es que la MTS de Oxa1 tenga aminoácidos susceptibles de sufrir ubiquitinación, como es el caso de las lisinas, una marca de degradación por proteosoma; dicha marca puede "enmascarse" al realizar la combinación de las MTSs. Una forma de probar esta teoría es cambiar las lisinas presentes en la MTS de Oxa1 y realizar un fraccionamiento celular, donde la versión precursora de Oxa1¹⁻⁵⁰-GFP se encontraría en la fracción citosólica.

- iii. Retomando el punto anterior, otra posibilidad es que la proteína que no llegó correctamente a la mitocondria fue llevada de forma errónea al retículo endoplásmico. En el presente estudio realizamos fracciones celulares crudas, esto significa que en la fracción mitocondrial es posible encontrar partes del sistema de membranas o retículo endoplásmico. Realizar un fraccionamiento celular seguido de un gradiente de sacarosa, para obtener fracciones mitocondriales más limpias, nos permitirá conocer si la proteína quimérica Oxa1¹⁻⁵⁰-GFP pueda llegar erróneamente al retículo endoplásmico en ausencia del complejo $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37.
- iv. Estudios realizados en *C. elegans* muestran que la ausencia del complejo NAC desencadena estrés de retículo (UPR) y de mitocondria, ya que la entrega de proteínas no se lleva a cabo de forma adecuada. Lo anterior se debe a que se ha propuesto que NAC actúa como un regulador negativo de SRP. Estudiar las respuestas celulares que desencadena la ausencia del complejo $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37 complementa el trabajo aquí desarrollado; puesto que cambios en la expresión de genes, como chaperonas y algunos factores de transcripciones, nos habla de la importancia de la regulación en el transporte de proteínas a la mitocondria.

En este punto, es clave establecer si la vía UPR se encuentra activada en la cepa mutante $\Delta\alpha\beta_2\Delta sam37$. Para esto, es posible medir la expresión de genes como Kar2 mediante qPCR, evaluar la edición del ARNm HAC1 o incluso construir un reportero fluorescente (clonar a una proteína fluorescente bajo el control del promotor de Kar2 es un buen ejemplo). Así mismo, es difícil medir estrés de mitocondria puesto que no se ha descrito una UPR mitocondrial en levadura. Una posibilidad es construir un reportero fluorescente: usar a la YFP bajo un promotor que contiene los sitios de reconocimiento HSE, sitios que reconoce el factor de transcripción Hsf1, controlador maestro de genes que codifican para proteínas mitocondriales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Mantenimiento y manipulación de las cepas de levadura

Todas las cepas se conservaron en 15% v/v de glicerol a una temperatura de -80°C. Antes de iniciar cualquier experimento, las cepas fueron sembradas en el medio sólido correspondiente y se crecieron a 25°C durante 3-5 días. Para la mayoría de los experimentos se partió de un cultivo líquido, o precultivo, crecido durante toda la noche, seguido de la respectiva dilución. El crecimiento fue monitoreado mediante la determinación de la densidad óptica DO_{600} .

La lista de cepas y su genotipo con las que se trabajó durante la investigación se muestran en el Apéndice 1.

La lista de medios y suplementos se muestran en el Apéndice 2.

Mantenimiento y manipulación de las cepas de *Escherichia coli*

Todas las cepas se conservaron en 50% v/v de glicerol a una temperatura de -80°C. Antes de iniciar cualquier experimento, las cepas se sembraron en medio sólido y se crecieron a 37°C durante toda la noche.

La lista de cepas, y su genotipo, se muestran en el Apéndice 1.

La lista de medios y suplementos se muestran en el Apéndice 2.

Preparación de células competentes de *E. coli* DH5 α

Las células competentes se prepararon siguiendo el protocolo del Amortiguador Inoue del Cold Spring Harbor [206]; este método permite la obtención de células competentes con alta eficiencia.

Se partió de tomar una colonia de *E. coli* DH5 α crecida en LB_{Sólido} y se transfirió a un matraz de 250 mL con 25 mL de medio SOB y se dejó crecer durante 6-8 horas a 37°C, 250 rpm. Este cultivo se utilizó como precultivo para inocular tres matraces de un 1 L, cada uno con 250 mL de medio SOB, que fueron inoculados de la siguiente manera: el primero con 10 mL del precultivo, el segundo con 4 mL y el último, con 2 mL. Los tres matraces se incubaron a 18°C, 200 rpm durante 14 horas. Pasado este tiempo, se monitoreó la densidad óptica cada 45 min. Cuando uno de los cultivos alcanzó una $DO_{600} = 0.55$, el matraz se transfirió a un baño de hielo durante 10 min; los otros dos cultivos fueron descartados. Las células fueron cosechadas por centrifugación a 2500 g por 10 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y se removió con especial cuidado cualquier sobrante de medio. Las

células se resuspendieron cuidadosamente en 80 mL de amortiguador de transformación Inoue frío (Apéndice 3). Posteriormente, las células se recuperaron por centrifugación a 2500 g por 10 min a 4°C y se removió el sobrenadante. Las células se resuspendieron cuidadosamente en 20 mL de amortiguador de transformación Inoue frío (Apéndice 4) y se adicionaron 1.5 mL de DMSO; se mezcló la solución e incubó 10 min en hielo. Las células se almacenaron en alícuotas a -70°C. Es importante considerar que este trabajo debe hacerse de forma rápida y precisa; adicionalmente, se requiere que el congelado sea instantáneo por la inmersión de los tubos en un baño de nitrógeno líquido.

Transformación bacteriana

Se utilizaron células competentes de *E. coli* DH5 α . Se tomaron alícuotas correspondientes al volumen de células competentes a utilizar y se descongelaron en hielo. Una vez listas, a 50 μ L de células competentes se les adicionó 1 μ L de plásmido o el volumen deseado de la reacción de ligación, seguido por una incubación en hielo por 30 min. Pasado este tiempo, se dio un choque térmico de 45 segundos a 42°C, seguido de una incubación en hielo de 2 min y posteriormente la adición de 1 mL de medio LB. Por último, las células se recuperaron durante 1 hora a 37°C con agitación. Las células se centrifugaron y se sembraron en el medio correspondiente, generalmente LB-ampicilina.

Análisis de crecimiento por diluciones seriadas

La evaluación del crecimiento mediante el cultivo de diluciones seriadas es un método ampliamente utilizado por los científicos que eligen a la levadura como su modelo de estudio. Si bien, es sencillo, requiere concentración y cierta destreza para evitar la contaminación en cualquiera de los pasos.

Precultivos de 5 mL de cada una de las cepas a analizar en el medio de cultivo adecuado se incubaron a 30°C con agitación de 200 rpm durante toda la noche. Al siguiente día, los cultivos se diluyeron en medio YPD fresco a una $DO_{600} = 0.3-0.4$ (dependiendo de la cepa estudiada). Cuando los cultivos alcanzaron una $DO_{600} = 1$ se realizó una primera dilución a una $DO_{600} = 0.5$ y seis diluciones seriadas subsecuentes 1:10 en agua destilada estéril.

Se tomaron 3.5 μ L de cada dilución y se dejaron caer suavemente sobre el medio. Las cajas se incubaron a 30°C y durante 24 a 36 horas.

Transformación de levadura

El objetivo directo de este método es permitir el ingreso de ADN a la levadura, ya sea un producto de PCR para la generación de mutantes o de plásmido para la

expresión de algún gen en particular. Se emplea el método de acetato de litio/Polietilenglicol/ADN acarreador [207].

Se inició con un precultivo en 5 mL de YPD de la cepa a transformar crecido durante toda la noche a 30°C, 200 rpm. Al siguiente día, los cultivos se diluyeron a una $DO_{600} = 0.3-0.4$ (dependiendo de la cepa a transformar) en medio YPD fresco, y se esperó hasta que el cultivo alcanzó una $DO_{600} = 1$. En este punto, se tomaron 1.5 mL del cultivo y se centrifugó a 10000 rpm durante 3 min, se desechó el sobrenadante. Seguido, se resuspendió en 1 mL de H₂O destilada estéril, se centrifugó nuevamente a 8600 g durante 3 min y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, las células fueron resuspendidas en 1 mL de acetato de litio 0.1 M y se incubó durante 10 min a T_{amb} ; pasado este tiempo se centrifugó a 8600 g durante 3 min, se descartó el sobrenadante. A continuación, los siguientes componentes fueron agregados en este orden

PEG 3350 50% (p/v)	240 μ L
Acetato de litio 1M	36 μ L
ADN acarreador cadena sencilla 10mg/mL	10 μ L
ADN blanco	5 μ L plásmido/45 μ L de la PCR
H ₂ O estéril	69 μ L/29 μ L

La pastilla se resuspendió al agitar el tubo con un vortex y se incubó durante 45 min a 42°C. Pasado este tiempo, la mezcla se centrifugó a 8600 g durante 3 min, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 100 μ L de H₂O estéril. Finalmente, se sembraron en el medio sólido adecuado. Para la generación de mutantes, las células se sembraron en primer lugar en medio no selectivo y al obtener un césped celular adecuado, se re-sembraron en el medio selectivo con ayuda de un replicador y terciopelos. Para el caso de transformación de plásmido, la reacción se sembró en el medio directo de selección.

Extracción de ADN total de levadura

Para la purificación de ADN total de levadura se siguió el protocolo de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico [208]. Se partió de un cultivo en 5 mL de medio YPD de las cepas a estudiar, se crecieron durante toda la noche a 30°C con agitación. Al siguiente día, se tomó 1.5 mL del cultivo y las células se cosecharon por centrifugación a 13200 g, durante 3 min a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante; el botón celular se resuspendió en 500 μ L de H₂O destilada y nuevamente se centrifugó a 13200 g durante 3 min a temperatura ambiente antes de descartar el sobrenadante. Posteriormente, las células se resuspendieron en 200 μ L de amortiguador de lisis (apéndice 3) y se adicionaron 200 μ L de la mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). La suspensión se agitó en vortex a

velocidad máxima durante 3 min y se centrifugó a 13200 g durante 5 min a temperatura ambiente. Al término de la centrifugación se debieron formar dos fases, se tomó la fase superior (fase acuosa) y se transfirió a un tubo nuevo. A continuación, se precipitó el ADN con la adición de 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5.3 y 3 volúmenes de etanol 96% previamente enfriado a -20 °C (es decir, si se tomaron 300 µL de la fase acuosa, se agregaron 30 µL de acetato de sodio y 900 µL de etanol), se centrifugó a 13200 g durante 10 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. El botón de ADN se lavó con 1 mL de etanol al 70% previamente enfriado a -20 °C. Nuevamente, se centrifugó a 13200 g durante 10 min a 4 °C y se eliminó por completo el etanol, las muestras se dejaron secar al aire y se resuspendió el ADN en 50 µL de H₂O libre de nucleasas. Se almacenó a -20 °C.

Extracción de ADN plasmídico de bacteria (método de laboratorio)

Este método se usa para la prueba de colonias obtenidas de un proceso de transformación. Se partió de un cultivo con 3 mL de medio LB-ampicilina de cada una de las colonias a probar y se crecieron a 37°C con agitación durante toda la noche. Al siguiente día, se tomaron 1.5 mL de cada cultivo y se pusieron en tubos de microcentrífuga, las células se cosecharon por centrifugación a 10000 rpm durante 3 min, se descartó el sobrenadante. El botón celular, se resuspendió en 50 µL de H₂O destilada, posteriormente se le adicionó 300 µL del amortiguador TENS (Apéndice 3), seguido de una agitación momentánea en vortex; se adicionaron 150 µL de acetato de sodio 3 M pH 4.9. La mezcla se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min a 4°C, el sobrenadante se transfirió a tubos nuevos y se adicionaron 900 µL de etanol 96% previamente enfriado. Se volvió a centrifugar a 14000 rpm durante 10 min a 4°C, se descartó el sobrenadante lo más rápido posible y se agregaron 250 µL de etanol 70% previamente enfriado. Nuevamente, se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. Para retirar la mayor cantidad de etanol remanente, se centrifugó a 10000 rpm durante 1 min a T_{amb} y se retiró la mayor cantidad posible de etanol. El botón de ADN se dejó secar y finalmente se resuspendió en 100 µL de H₂O libre de nucleasas.

Extracción de ADN plasmídico de bacteria (Método con kit comercial)

Para la purificación de plásmidos se utilizó el kit comercial PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega). Se partió de un cultivo con 50mL de medio LB-ampicilina crecido durante 16-21 horas a 37°C con agitación y se siguieron las instrucciones del fabricante. Es importante mencionar que, entre los pasos de lavado de la columna y elución, la columna se debe dejar secar por completo, de lo contrario el rendimiento se verá afectado significativamente. Finalmente, se midió la concentración del ADN por absorbancia a 260 nm (Nanodrop 1000).

Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR

La PCR es una técnica básica en biología molecular y es un punto de partida clásico para muchos experimentos. Dependiendo del objetivo para el cual se requirió el producto de PCR, se utilizó un tipo de enzima diferente. Todos los oligonucleótidos usados en el presente estudio se muestran en el Apéndice 3. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

i. Prueba de cepas mutantes y clonaciones.

Para estas dos situaciones se utilizó la enzima NZYTMTaq II 2X Green Master Mix (NZYTECH). En este caso en particular, es posible realizar una PCR de colonia, lo cual acorta los tiempos y evita la extracción de ADN genómico o de plásmido según sea el caso. Para realizarla, es necesario tomar una cantidad equivalente al tamaño de una cabeza de alfiler y ponerla en el tubo de reacción. A continuación, se describen los pasos que se siguieron:

Reactivo	Volumen
Master Mix 2X	10 µL
Oligonucleótido directo	1 µL
Oligonucleótido reverso	1 µL
ADN molde	1 µL
H ₂ O libre de nucleasas	7 µl

Pasos	Temperatura	Tiempos
Desnaturalización inicial	95°C	5 min *
Desnaturalización	94°C	1min
Alineamiento	55°C	1 min
Extensión	72°C	15 seg/kb
Extensión final	72°C	5 min

*Si es PCR de colonia aumentar a 10 min
30 ciclos

ii. PCR para amplificación de módulos de resistencia a antibióticos y auxotrofías.

Para este caso en particular se utilizó la enzima Kapa Taq DNA Polymerase (KAPA BIOSYSTEMS). A continuación, se describen los pasos que se siguieron (para mayor detalle consultar el manual del fabricante):

Reactivo	Volumen
Amortiguador	5 µL
dNTPs	0.7 µL
Oligonucleótido directo	2.5 µL
Oligonucleótido reverso	2.5 µL
ADN molde	1 µL
Enzima	0.5 µL
H ₂ O libre de nucleasas	37.8 µl

Pasos	Temperatura	Tiempos
Desnaturalización inicial	95°C	5 min
Desnaturalización	95°C	30 s
Alineamiento	55°C	30 s
Extensión	72°C	1 min/kb
Extensión final	72°C	8 min

30 ciclos

iii. PCR para la amplificación de fragmentos para clonación

Se usó la enzima Phusion® High Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs). En caso de que se tuviera ya clonado el fragmento a amplificar, se usó preferentemente el ADN clonado. A continuación, se describen los pasos que se siguieron:

Reactivo	Volumen
Master Mix 2X	25 µL
Oligonucleótido directo	2.5 µL
Oligonucleótido reverso	2.5 µL
ADN molde	1 µL
H ₂ O	20 µl

Pasos	Temperatura	Tiempos
Desnaturalización inicial	98°C	3 min
Desnaturalización	98°C	30 s

Alineamiento	55°C	30 s
Extensión	72°C	15 s/kb
Extensión final	72°C	5 min

30 ciclos

Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa permite la separación de fragmentos de ADN según su peso. Se preparó agarosa 1% (p/v) en amortiguador TAE 1X (Apéndice 4); a cada muestra se le adicionó las cantidades correctas de Gel Red 3X (Biotium) y amortiguador de carga 6X (Thermo Scientific) antes de cargar las muestras en los respectivos pozos del gel. Los geles se corrieron en amortiguador TAE 1X a 110 V / 100 mA durante 35-50 min. El gel se visualizó bajo la luz UV y los productos de PCR fueron analizados al compararlos con una escalera de fragmentos de ADN de tamaño conocido (GeneRuler DNA1kb ladder, Thermo Scientific).

Generación de mutantes nulas

La generación de mutantes nulas implica la eliminación completa del gen de interés, para esto, se hace uso del proceso de recombinación homóloga, por lo que se espera que el gen se intercambie por un módulo de selección, ya sea antibióticos (Geneticina, Higromicina o clonNAT) o, auxotrofías (Uracilo). Para esto, se deben diseñar oligonucleótidos con una región homóloga al gen (antes del AUG de inicio) y otra región complementaria al gen que se desea eliminar. Todos los oligonucleótidos usados en esta investigación se muestran en el Apéndice 4.

El primer paso es realizar una PCR, generalmente con una reacción de 50 μ L es suficiente, donde se amplifique el módulo de selección. Después de confirmar que el producto de PCR es del tamaño deseado, se realizó la transformación de la cepa de levadura de interés. Es importante recordar que la siembra de la transformación debe hacerse en medio no selectivo y, posteriormente, se hace la réplica en el medio selectivo correspondiente. Realizado esto, se debe esperar alrededor de 3-5 días hasta obtener colonias individuales y de buen tamaño. Finalmente, las colonias se probaron por PCR verificando la presencia del módulo de selección y la ausencia del gen.

Es importante mencionar que, si se parte de una cepa silvestre, el medio no selectivo será YPD; pero, si se parte de una cepa mutante, el medio no selectivo será el que corresponde a dicha mutante (por ejemplo, si la cepa tiene el módulo de selección a higromicina el medio no selectivo será YPD-Hph). Adicionalmente, si se utilizan combinaciones de auxotrofías y antibióticos, el medio debe ser Sintético Completo.

Clonación por el método tradicional

Clonar un fragmento de ADN de interés en un plásmido que permita su manipulación y expresión posterior, es quizás uno de los métodos más temidos y evitados en Biología Molecular porque no es tan directo como los protocolos lo describen. Tal vez se deba a que requiere especial atención en cada uno de los pasos, desde el diseño de la estrategia y oligonucleótidos, hasta la PCR, digestiones y ligación. En este escrito, se describirá el protocolo seguido durante el desarrollo de esta investigación.

El primer paso es el diseño de la estrategia que incluye: la selección del plásmido que se utilizó (única copia o múltiples copias); el tipo de promotor (endógeno, constitutivo o inducible) y la longitud del promotor y el terminador; el gen a clonar y si va a llevar alguna etiqueta y los sitios de restricción que se usaron. De manera general, los pares de oligonucleótidos se diseñaron de forma tal que amplificaran ya sea el gen, promotor o terminador de interés; para esto, el oligonucleótido directo es complementario a la región 5' del ADN blanco y, el oligonucleótido reverso es complementario a la región 3' del ADN blanco. Adicionalmente, los oligonucleótidos contienen la secuencia de reconocimiento de las enzimas de restricción seleccionadas. Todos los pares de oligonucleótidos se encuentran descritos en el Apéndice 4. A continuación se describen los pasos a seguir en la mesa de laboratorio:

- i. Preparación del inserto (gen, promotor o terminador).
La preparación del inserto puede ser de dos formas: por amplificación mediante PCR o por liberación del fragmento por digestión, si este se encuentra previamente clonado en otro vector. En este proyecto, todos los insertos se prepararon a partir de la amplificación por PCR. Se partieron de 4 reacciones independientes de 50 μ L y un control negativo, tras verificar que el producto de PCR fuera del tamaño esperado, las reacciones se purificaron por columna usando el kit FastGene Gel/PCR Extraction Kit (Nippon) siguiendo las instrucciones del fabricante y se utilizaron 50 μ L de H₂O para eluir.
- ii. Digestión del inserto y del plásmido.
Se hicieron digestiones dobles con enzimas de restricción correspondientes (New England Biolabs) según el diseño inicial. La selección del amortiguador correcto se consultó la página web <http://nebcloner.neb.com/#!/redigest>. Las digestiones se incubaron a 37°C por mínimo tres horas, aunque preferentemente se dejaron toda la noche. Finalmente, las digestiones se cargaron en un gel de agarosa para asegurar la correcta separación de los fragmentos deseados (inserto y plásmido), se cortó la banda correspondiente a los mismos, se

purificaron usando el kit FastGene Gel/PCR Extraction kit (Nippon) y se eluyeron en un volumen de 30 μL . La concentración del inserto y plásmido se midió por Absorbancia a 260 nm (Nanodrop 1000).

Reactivos	plásmido	inserto
Enzima 1	1 μL	1 μL
Enzima 2	1 μL	1 μL
Amortiguador 10X	5 μL	5 μL
ADN	1.5 μg	4 rxn purificadas
H ₂ O libre de nucleasas	50 μL^*	-
*Volumen suficiente para 50 μL		

iii. Ligación.

Se pusieron reacciones con T4 ADN Ligasa (New England Biolabs). Las cantidades de inserto y de plásmido necesarias se calcularon usando la aplicación NEBtools (generalmente, se usó la relación 1:7); se hizo, además, un control de re-ligación sin inserto. Las reacciones se incubaron a 16°C durante toda la noche.

Reactivo	Reacción 1:7	Control
T4 Ligasa	1 μL	1 μL
Amortiguador 10X	1 μL	1 μL
Inserto**	58.3 ng	-
Plásmido	1 μL	1 μL
H ₂ O libre de nucleasas	10 μL^*	7 μL

**volumen suficiente para

*Cálculo basado en: longitud del inserto: 1000 pb, longitud del plásmido: 6 kb y concentración del plásmido 50 ng/ μL

iv. Transformación en células competentes de *E. coli* DH5 α .

Se transformó el total de la reacción de ligación siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Las cajas se revisaron al día siguiente esperando encontrar colonias, las cuales se re-sembraron en medio LB_{sólido}-ampicilina.

v. Prueba de colonias obtenidas.

Se pusieron cultivos en 3 mL en medio LB de cada una de las colonias obtenidas y se dejaron crecer durante toda la noche a 37°C con agitación. Posteriormente, se realizó la purificación del ADN plasmídico mediante el protocolo de laboratorio ya descrito. Una vez, se obtuvieron los plásmidos de las diferentes colonias, se realizó una PCR o una digestión; se analizó el resultado por electroforesis en gel de agarosa. Aquellos plásmidos que amplificaron un producto o liberaron un inserto del tamaño esperado se consideraron como positivos.

- vi. Purificación del plásmido obtenido. Al obtener colonias positivas, se seleccionaron dos de cada clonación y se pusieron cultivos en 50 mL de medio LB-ampicilina, se crecieron durante toda la noche a 37°C con agitación. Al siguiente día, se realizó la purificación de los plásmidos usando el kit comercial PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega). Finalmente, los plásmidos se secuenciaron en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Todos los plásmidos construidos durante esta investigación se enlistan en el Apéndice 5.

Extracción de proteína total

Este protocolo permite la extracción total de proteína de levadura y se basa en la precipitación con ácido tricloroacético (TCA). Se partió de un cultivo fresco del cual se toman 2 mL de un cultivo con una DO_{600} de 1, se centrifugó 2 min a 8600 g, se desechó el sobrenadante, el botón celular se resuspendió en 1 mL de agua destilada, se centrifugó nuevamente durante 2 min a 8600 g y se descartó el sobrenadante. El botón celular se resuspendió en 250 μ L de Tris pH 8 50 mM, se adicionó 50 μ L de amortiguador de lisis (Apéndice 3) y se incubó 10 min en hielo. Pasado este tiempo, se adicionaron 60 μ L de ácido tricloroacético 72% w/v (concentración final 12% w/v) y se agitó por vortex. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a -20°C (en este paso las muestras se pueden quedar incluso un fin de semana). Posteriormente, se centrifugó a 18200 g a 4°C durante 30 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavó con 1 mL de acetona pre-enfriada a -20°C. Nuevamente, se centrifugó a 18200 g a 4°C durante 30 minutos. El botón obtenido, se resuspendió en 100 μ L de amortiguador de carga Laemmli 2X (Apéndice 3, [209]).

Cuantificación de la concentración de proteínas

Se usó el método de Lowry modificado para proteínas de membrana [210]. Se preparó una curva estándar de albúmina con concentraciones de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 μ g/mL en 1 mL H₂O destilada. Las muestras se diluyeron

1:10 en H₂O destilada, de esta dilución se tomaron 20 µl y 30 µL (la cuantificación de la concentración de las muestras se hizo por duplicado) y se llevaron a un volumen final de 1 mL. Se adicionó a cada tubo de ensayo 3 mL de Solución C, se mezclaron en vortex y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. Se agregaron 300 µL de la Solución D, se mezclaron y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Se determinó la absorbancia de cada muestra a 660 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV160U.

Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) e Inmunorréplica tipo Western-blot

Este protocolo permite la separación de proteínas de acuerdo con su peso y carga. Incluye diferentes pasos que se describen a continuación.

Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes

Se prepararon geles de poliacrilamida al 17.5% como se indica en la tabla. El gel de corrida se dejó polimerizar durante 40 min y el gel separador se dejó polimerizar durante 30 min. Los geles se corrieron en Amortiguador de corrida 1X (Apéndice 4) a 120 V y 30 mA/gel durante 2.5 horas. Antes de cargar, las muestras se pusieron a baño maría a 96°C durante 2 min. Se cargaron en cada pozo 0.2 unidades de DO (aproximadamente 10 µL) de cada muestra, a menos que se especifique algo diferente.

Reactivos	Gel de corrida (17.5%)	Gel concentrador (4.8%)
Acrilamida 30%	3.1 mL	0.32 mL
Bisacrilamida 0.2%		
Tris 1.875 M pH 8.8	1.16 mL	-
Tris 0.6 M pH 6.8	-	0.2 mL
H ₂ O	1.16 mL	1.44 mL
SDS 10% w/v	55.66 µL	20 µL
APS 10% w/v	33.3 µL	10 µL
TEMED	3.3 µL	2 µL

Electrotransferencia a membranas de Nitrocelulosa

Una vez realizada la electroforesis SDS-PAGE, las proteínas se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa Amersham™ Protran™ 0.2µm NC (GE Healthcare Life Science) en una cámara húmeda usando el amortiguador de transferencia (Apéndice 3). La transferencia se realizó a 120 V y 380 mA durante 1 hora a 4°C. Al terminar, las membranas se tiñeron con Rojo Ponceau (Apéndice 4) para verificar el éxito de esta.

Inmunodetección por quimioluminiscencia

Las membranas se incubaron en solución de bloqueo (Apéndice 3) durante 1 hora a 4°C. Posteriormente, se incubaron las membranas con el anticuerpo correspondiente. Todos los anticuerpos, así como las condiciones de incubación, usados en esta investigación se muestran en el Apéndice 6. Se lavó el anticuerpo primario; una vez con TBS-Tween 0.1% durante 10 min y dos veces con TBS durante 10 min. Luego, se incubó el anticuerpo secundario durante 1-2 horas a 4°C y se repitió el proceso de lavado. Finalmente, las membranas fueron reveladas por quimioluminiscencia; por último, las membranas se expusieron a una película de autorradiografía Biomax XAR (Kodak), seguido de la respectiva inmersión en solución reveladora y fijadora.

Fraccionamiento celular

Este protocolo permite separar mediante centrifugación diferencial mitocondrias y citosol (en realidad, sobrenadante post-mitocondrial). Este protocolo está diseñado para 50-100 mL de medio de cultivo. Se partió de un cultivo fresco con una $DO_{600}=1$ (independientemente del medio de cultivo, en este trabajo se usó medio mínimo sintético con rafinosa como fuente de carbono). Las células se cosecharon mediante centrifugación a 4000 g durante 5 min a temperatura ambiente (usar tubos cónicos graduados de 50 mL), se descartó el sobrenadante. El botón celular se lavó con 10 mL de H_2O_{dd} y se centrifugó nuevamente a 4000 g durante 5 min a temperatura ambiente. Se resuspendió el botón celular en 10 mL de amortiguador Tris-DTT (Apéndice 3) y se incubó 10 min a 30°C en agitación, antes de centrifugar nuevamente a 4000 g durante 5 min a temperatura ambiente. Se resuspendió el botón celular en 10 mL de amortiguador de zimolyasa (Apéndice 3) y la solución resultante se incubó a 30°C durante 60 min en agitación. En caso de ser necesario, en este punto se tomaron 100 μ L de muestra para representar a la fracción total. Los esferoplastos se recuperaron por centrifugación a 4000 g durante 5 min a 4°C y se desechó el sobrenadante. El botón se resuspendió en 1 mL de amortiguador de homogeneización (Apéndice 3) y se las células se rompieron con un homogeneizador de vidrio (30 ciclos). El homogenizado resultante se transfirió a tubos de 1.5 mL. Se centrifugó a 4000 g durante 5 min a 4°C para eliminar el debris celular. Se recuperó el sobrenadante en tubos nuevos de 1.5 mL y se centrifugó a 12000 g durante 10min a 4°C. El sobrenadante se fue recuperado (fracción citosólica) en tubos nuevos de 1.5 mL. Ciudadosamente, se resuspendió el botón mitocondrial en 500 μ L de Amortiguador SH (Apéndice 3) y se centrifugó nuevamente a 12000 g durante 10min a 4°C; se retiró el sobrenadante. Finalmente, el botón (fracción mitocondrial) se resuspendió en 100 μ L de Amortiguador SH (Apéndice 3). Alícuotas de esta suspensión mitocondrial se alicuotaron y almacenaron a -80°C.

El fraccionamiento se analizó mediante una electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida; para este caso, se cargaron 5 µg de la fracción mitocondrial, 25 µg de la fracción citosólica y 10 µL de la fracción total.

Ensayo de digestión con proteinasa K

Este protocolo permite analizar si las proteínas estudiadas se encuentran en el interior o en la periferia de la mitocondria, al someter a estas últimas a una digestión con proteinasa K (PK, Invitrogen™). Antes de iniciar, es necesario saber que se requieren 3 tubos por muestra (-PK, +PK y +PK/TX) por lo que es necesario rotular muy bien los tubos. Se tomaron 5 µg de mitocondrias y se adicionaron 500 µL de amortiguador SH (Apéndice 3) colocando posteriormente las muestras en hielo. Se adicionó PK a una concentración final de 50 µg/mL y TritonX-100 1.5% y se incubaron 20 min en hielo usando un bloque de metal. La digestión se detuvo adicionando PMSF a una concentración final 2 mM. Se centrifugaron las muestras a 12000 g durante 10 min a 4°C, y se desechó el sobrenadante. Se lavó el botón con 500 µL de Amortiguador SH-KCl + 2 mM PMSF (el PMSF se adicionó en el momento). Se centrifugó a 12000 g durante 10 min a 4°C, y se descartó el sobrenadante con ayuda de una punta de micropipeta. El botón se resuspendió en 10 µL de amortiguador de carga Laemmli 2X. Antes de cargar en el gel de poliacrilamida, las muestras se calentaron a 96°C durante 2 min en baño maría.

Preparación de células permeabilizadas o semi-intactas de levadura

Este protocolo está tomado de [191] y está hecho para un volumen de 250 mL de cultivo. Todos los amortiguadores usados se describen en el Apéndice 3. El protocolo debe realizarse en todo momento bajo condiciones de esterilidad. Se partió de un cultivo con una $DO_{600} = 1$ (independientemente del medio de cultivo). Como primer paso se centrifugaron las células 7 min a 700 g a temperatura ambiente (usando tubos cónicos graduados de 50 mL) y se descartó el sobrenadante. El botón celular se resuspendió en 25 mL de amortiguador SP1, y se incubó 10 min a 30°C en agitación. Las células se centrifugaron 5 min a 1000 g a temperatura ambiente y se resuspendieron en 6 mL de amortiguador SP2 antes de incubaslas por un lapso de 30 min a 30°C en agitación. A continuación, se centrifugaron 5 min a 1000 g a temperatura ambiente. El botón se resuspendió cuidadosamente en 40 mL de amortiguador SP3 con ayuda de una pipeta Pasteur y la suspensión resultante se incubó 20 min a 30°C en agitación. Se recuperó el botón de esferoplastos centrifugando 5 min a 1000 g a 4°C y se lavaron dos veces con 20 mL de amortiguador de permeabilización enfriado en hielo. Finalmente, el botón se resuspendió en 1 mL de Amortiguador de Permeabilización + 0.5 mM EGTA. Se hicieron alícuotas de 50µL cada una y se congelaron a -80°C.

Este protocolo tiene un paso especial: la congelación debe hacerse de forma lenta con los vapores de nitrógeno líquido antes de colocar las muestras en el ultracongelador a -80°C . Para conocer los detalles de este paso consultar [191].

Importación en células permeabilizadas o semi-intactas.

Este protocolo fue modificado del protocolo descrito en [191]. Todos los amortiguadores usados se describen en el Apéndice 3. Células permeabilizadas o semi-intactas obtenidas siguiendo el protocolo anteriormente descrito se descongelaron en hielo. Antes de comenzar se determinó la DO_{600} de la suspensión de células permeabilizadas en amortiguador B88 y se tomó el volumen necesario para tener 0.1 unidades de DO_{600} por reacción colocándolas en tubos de 1.5 mL. Se ajustó el volumen 100 μL con el amortiguador B88 + Gal 2% y se agitó la suspensión suavemente en vortex (número 5 en vortex Daigger). La suspensión se agitó a 30°C durante los tiempos deseados, en este caso 0, 20, 40 y 80 min. La reacción se detiene con 1 μL de AVO (antimicina, valinomicina y oligomicina) y se colocaron las muestras en hielo para ser tratadas con o sin proteinasa K. Se añadió proteinasa K a una concentración final de 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$, agitando suavemente antes de incubar en hielo durante 30 min. La digestión se detuvo con la adición de PMSF a una concentración final de 2 mM. Las muestras se centrifugaron 5 min a 4000 g a 4°C , se desechó el sobrenadante con una micropipeta. Se lavó el botón celular con 100 μL de amortiguador B88 con 2 mM de PMSF y se centrifugaron 10 min a 4000 g a 4°C , se retiró el sobrenadante lo mejor posible. Finalmente, el botón se resuspendió en 20 μL de Amortiguador de carga Laemmli 2X (cantidad suficiente para dos geles).

Visualización de células por microscopía confocal

Para determinar la localización mitocondrial de las construcciones con GFP se observaron las células en un microscopio confocal ZEISS LSM 800 de la Unidad de Imagenología del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Las diferentes cepas por estudiar se crecieron en el medio correspondiente a 25°C hasta una $\text{DO}_{600} = 1$. Se tomó la cantidad equivalente a 1 unidad de DO_{600} y se pusieron en tubos de 1.5 mL. Las células se cosecharon por centrifugación a 8600 g durante 3 min a temperatura ambiente, posteriormente se lavaron con H_2O estéril y se volvieron a centrifugar de la misma manera. Se resuspendió el botón celular en 100 μL de H_2O estéril. Se tomaron 7 μL de células y se sembraron en un colchón de agarosa previamente hecho sobre el portaobjetos. Para la toma de las imágenes, se siguieron las recomendaciones del personal de la Unidad de Imagenología.

El colchón de agarosa permite una mejor calidad en las imágenes ya que las células no se mueven, pero siguen vivas. Para hacerlos, se fundió agarosa 1% w/v en medio

de cultivo a 95 °C, y se colocaron 30 µL sobre un portaobjetos que previamente tenía los extremos cubiertos con cinta adhesiva transparente, la preparación se cubrió con otro portaobjetos y se dejó secar en frío durante 1' 45'' antes de deslizar suavemente el portaobjetos superior. Se sembraron 7 µL de células sobre el colchón y se esparcieron antes de dejar secar por 2' 30'' a T_{amb}; por último, se colocó el cubreobjetos y se fijó con esmalte para uñas transparente.

Rastreo de interacciones genéticas (RSA)

Para la generación de dobles mutantes, se prepararon cultivos líquidos independientes en medio rico con glucosa (YPD) de las cepas carnada ($\Delta msp1$ o $\Delta cis1$) y las cepas presas ($\Delta egd1$, $\Delta egd2$ y $\Delta btt1$), y se sembraron en medio rico sólido con glucosa (YPD) las cepas se incubaron a 30°C durante 24 h o hasta obtener un crecimiento tipo césped. Luego se replicó la cepa carnada en una caja con medio rico sólido con glucosa y encima se replicó la cepa presa correspondiente (fase de cruza), las cruza se incubaron durante 24 horas a 30°C. A continuación, las cepas se sembraron en medio de selección de células diploides (SD-Met/Lys), adicionando los antibióticos apropiados según el caso, las cajas se incubaron durante 48 horas a 30°C. Posteriormente, las cepas se replicaron en un medio de bajos nutrientes y nitrógeno, para inducir esporulación, las cajas se incubaron a 25°C durante 8 días. Pasando este tiempo, fue necesario confirmar la formación de esporas mediante la observación bajo el microscopio óptico de una suspensión de ascas (se debe observar que cada asca tiene 4 esporas en su interior). A continuación, se preparó una nueva suspensión de células y se depositaron cantidades crecientes en diferentes medios para seleccionar y analizar el crecimiento de: a) células haploides, b) células resistentes a uno u otro antibiótico de selección (mutantes sencillas) y c) para células resistentes a ambos antibióticos (dobles mutantes). La presencia de las interacciones genéticas se determinó cualitativamente al observar y comparar el crecimiento de las cepas mutantes sencillas y dobles. Para mayor detalle consultar [194].

En el caso de la generación de triples mutantes se siguió el mismo procedimiento tomando en consideración las resistencias de los antibióticos de las nuevas cepas mutantes. Las cepas carnada fueron nuevamente $\Delta msp1$ o $\Delta cis1$ y las cepas presas $\Delta egd2\Delta egd1$, $\Delta egd2 \Delta btt1$ y $\Delta egd1\Delta btt1$.

Curva de crecimiento

Las curvas de crecimiento se realizaron mediante la determinación de la DO₆₀₀ cada media hora durante dos días. Para esto se utilizó una placa Honeycomb de 100 pozos, se tomaron 10 µL de un cultivo de 16 h y se diluyeron en 290 µL en medio líquido YPD. Las placas inoculadas se colocaron en un crecínómetro Bioscreen C utilizando las siguientes condiciones:

- Temperatura: 30°C
- Filtro: 600 nm, Brown
- Agitación: normal, continua, alta.

Análisis estadístico

En todos los casos se utilizó el programa Prism-GraphPad para realizar los análisis estadísticos, se realizaron pruebas *t* de Student no pareadas y se tomó $p < 0.05$ como valor de significancia.

APÉNDICE 1. Cepas de levadura

Nombre de la Cepa	Fondo Genético	Referencia
BY4741 (WT)	MATa <i>his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i>	[211]
Δ sam37	MATa <i>his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, sam37Δ::kanMX4</i>	Euroscarf ,[212]
Δ msp1	MATa <i>his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, msp1Δ::kanMX4</i>	Euroscarf, [212]
$\Delta\alpha\Delta\beta_2\Delta$ sam37	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, sam37Δ0::kanMX4, egd2Δ0::hph, btt1 Δ0::URA3</i>	Este trabajo
$\Delta\alpha\Delta\beta_2\Delta$ sam37	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, sam37Δ 0::kanMX4, egd2Δ 0::hph, btt1Δ 0::Nat1</i>	Este trabajo
$\Delta\alpha$	MATα <i>can1Δ::STE2pr-Sp_his5 lyp1Δ ::STE3pr-LEU2 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0, egd2Δ0::hph</i>	[184], [186]
$\Delta\beta_1$	MATα <i>can1Δ::STE2pr-Sp_his5 lyp1Δ ::STE3pr-LEU2 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0, egd1Δ0::hph</i>	[184], [186]
$\Delta\beta_2$	MATα <i>can1Δ ::STE2pr-Sp_his5 lyp1Δ ::STE3pr-LEU2 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0, btt1Δ0::hph</i>	[184], [186]
$\Delta\alpha\Delta\beta_1$	MATα <i>can1Δ ::STE2pr-Sp_his5 lyp1Δ ::STE3pr-LEU2 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0, egd2Δ0::nat1, egd1 Δ0::hph</i>	[184], [186]
$\Delta\alpha\Delta\beta_2$	MATα <i>can1Δ::STE2pr-Sp_his5 lyp1Δ::STE3pr-LEU2 his3Δ1 leu2Δ0</i>	[184], [186]

	<i>ura3Δ0, egd2Δ0::hph, btt1Δ0::nat1</i>	
$\Delta\beta_1\Delta\beta_2$	MAT α <i>can1Δ::STE2pr- Sp_his5 lyp1Δ::STE3pr- LEU2 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0, egd1Δ0::hph, btt1Δ0::nat1</i>	[184], [186]
$\Delta\alpha\Delta msp1$	MAT α <i>can1Δ::STE2pr- Sp_his5 lyp1Δ::STE3pr- LEU2 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0, egd2Δ0::hph, msp1Δ0::kanMX4</i>	Este trabajo
$\Delta\beta_1\Delta msp1$	MAT α <i>can1Δ::STE2pr- Sp_his5 lyp1Δ::STE3pr- LEU2 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0, egd1Δ0::hph, msp1Δ0::kanMX4</i>	Este trabajo
$\Delta\beta_2\Delta msp1$	MAT α <i>can1Δ::STE2pr- Sp_his5 lyp1Δ::STE3pr- LEU2 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0, btt1Δ0::hph, msp1Δ0::kanMX4</i>	Este trabajo
$\Delta\alpha\Delta\beta_1\Delta msp1$	MAT α <i>can1Δ::STE2pr- Sp_his5 lyp1Δ::STE3pr- LEU2 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0, egd2Δ0::Nat1, egd1Δ0::hph, msp1Δ0::KanMX4</i>	Este trabajo
$\Delta\alpha\Delta\beta_2\Delta msp1$	MAT α <i>can1Δ::STE2pr- Sp_his5 lyp1Δ::STE3pr- LEU2 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0, egd2Δ0::hph, btt1Δ0::nat1, msp1Δ0::KanMX4</i>	Este trabajo
$\Delta\beta_1\Delta\beta_2\Delta msp1$	MAT α <i>can1Δ::STE2pr- Sp_his5 lyp1Δ::STE3pr- LEU2 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0, egd1Δ0::hph, btt1Δ0::nat1, msp1Δ0::kanMX4</i>	Este trabajo

$\Delta\alpha\Delta\beta_2\Delta sam37\Delta msp1$	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0</i> <i>met15Δ0 ura3Δ0,</i> <i>sam37Δ0::kanMX4,</i> <i>egd2Δ0::hph,</i> <i>btt1Δ0::Nat1,</i> <i>msp1Δ0::URA3</i>	Este trabajo
Y8205	MAT α <i>can1Δ ::STE2pr-</i> <i>Sp_his5 lyp1Δ ::STE3pr-</i> <i>LEU2 his3Δ1 leu2Δ0</i> <i>ura3Δ0</i>	[194]

APÉNDICE 2. Medios de Cultivo y Suplementos

Los medios fueron esterilizados por autoclave 20 min 120°C. En algunos casos, los medios se esterilizaron por filtración.

YPD/YPGAL pH 6

Extracto de levadura	1%
Peptona	2%
Glucosa/Galactosa	2%
Agar	2%

Medio mínimo sintético

Base nitrogenada YNB (sin aminoácidos ni $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	0.17%
Sulfato de Amonio	0.5%
Glucosa/Rafinosa/Galactosa	2%
Aminoácidos y nucleótidos	Ver tabla *
Agar	2%

Medio completo sintético

Base nitrogenada YNB (sin aminoácidos ni $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	0.17%
Ácido glutámico monosódico	0.1%
Suplemento de aminoácidos	0.2%
Glucosa/Rafinosa/Galactosa	2%
Agar	2%

LB

Extracto de levadura	0.5%
Triptona	1%
Cloruro de sodio	1%
Agar	2%

SOB* pH 7

Extracto de levadura	0.5%
Triptona	2%

Cloruro de Sodio	0.05%
Cloruro de Potasio	2.5mM
Cloruro de Magnesio	0.01M

*Consultar las indicaciones de preparación en [213].

Antibiótico/ Compuesto	Concentración solución madre	Concentración final	Volumen para 1 L de medio	Volumen para una caja de Petri
Geneticina	50 mg/mL	200 µg/mL	4 mL	120 µL
Higromicina B	50 mg/mL	250 µg/mL	5 mL	150 µL
CloNAT	100 mg/mL	100 µg/mL	1 mL	30 µL
Ampicilina	100 mg/mL	100 µg/mL	1 mL	30 µL
X-Gal	20 mg/mL	100 µg/mL	5 mL	150 µL
IPTG	100 mM	0.5 mM	5 mL	150 µL

Aminoácido/Nucleótido	Solución madre g/100mL	Volumen para 1L de medio	Volumen para una caja Petri
Adenina	0.2	10 mL	200 µL
Uracilo	0.2	10 mL	200 µL
L-Triptófano	1	2 mL	100 µL
L-Histidina	1	2 mL	100 µL
L-Leucina	1	10 mL	200 µL
L-Lisina	1	3 mL	150 µL
L-Arginina	1	2 mL	100 µL

Drop out

Componentes	Cantidad
Adenina	3 g
Uracilo	2 g
Inositol	2 g
Ácido p-aminobenzoico	0.2 g
L-Alanina	2 g
L-Arginina	2 g
L-Ácido aspártico	2 g
L-Asparagina	2 g
L-Ácido glutámico	2 g
L-Glutamina	2 g
L-Glicina	2 g

L-Histidina	2 g
L-Isoleucina	2 g
L-Leucina	10 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-Triptofano	2 g
L-Tirosina	2 g
L-Valina	2 g
L-Cisteína	2 g

APÉNDICE 3. Amortiguadores y Soluciones

Amortiguador Inoue para la preparación de las células competentes

Reactivo	Cantidad para un litro	Concentración final
MnCl ₂ .4H ₂ O	10.88 g	55 mM
CaCl ₂ .2H ₂ O	2.20 g	15 mM
KCl	18.65 g	250 mM
PIPES (5 M, pH 6.7)	20 mL	10 mM
H ₂ O	Para 1L	-

Amortiguador extracción de ADN total de levadura

Reactivo	Cantidad para 20 mL	Concentración final
Tritón X-100 100%	400 µL	2 %
SDS 20%	1 mL	1 %
NaCl 5M	400 µL	100 mM
Tris HCl 2M pH 8	100 µL	10 mM
EDTA 0.5M pH 8	40 µL	1 mM
H ₂ O	18.06 mL	-

Amortiguador extracción de ADN plasmídico de bacteria

Reactivo	Cantidad para 50 mL	Concentración final
Tris HCl 1M pH 7.5	500 µL	10 mM
EDTA 0.5M pH 8	100 µL	1 mM
NaOH 10N	500 µL	0.1 N
SDS 20%	1.25 mL	0.5%
H ₂ O	Para 50 mL	-

Amortiguador de corrida TAE 50x

Reactivo	Cantidad para 1L	Concentración final
Tris	242 g	4.84 g/L
Ácido acético glacial	57.1 mL	1.2 mL/L
EDTA 0.5M pH 8	100 mL	1 mM
H ₂ O	Para 1L	-

Amortiguadores de extracción total de proteína

Amortiguador de lisis

Reactivo	Cantidad para 1mL	Concentración final
NaOH 10 N	185 μ L	1.85 N
β -Mercaptoetanol	74 μ L	7.4 %
PMSF 200 mM	100 μ L	20 mM
H ₂ O	641 μ L	-

Amortiguador Laemmli 2X

Tris-HCl 60mM pH 8

Glicerol 10%

SDS 2%

Soluciones para cuantificación de proteínas Método Lowry

Solución A

Carbonato de sodio	2%
Hidróxido de sodio	0.4%
Tartrato de sodio	0.16%
SDS	2%

Solución B

Sulfato de cobre pentahidratado	4%
---------------------------------	----

Solución C

Mezclar 100 volumen de solución A con 1 volumen de solución B

Solución D

Mezclar 1 volumen del reactivo de Folin con 1 volumen H₂O

Soluciones para inmuno-réplica western blot

Amortiguador de corrida 10X

Reactivo	Cantidad para 1 L	Concentración final
Tris base	30.3 g	0.2505 M
Glicina	144.4 g	1.924 M
SDS	10 g	0.0347 M
H ₂ O	Para 1 L	-

Amortiguador de transferencia 1X

Reactivo	Cantidad para 1L	Concentración final
Tris Base	5.8 g	
Glicina	2.9 g	

SDS	0.37 g
Metanol	200 mL
H ₂ O	Para 1 L

Solución de tinción con Rojo Ponceau

Ácido acético 1%

Rojo Ponceau S 0.5 % (w/v)

Amortiguador TBS 1X

Reactivo	Cantidad para 1 L	Concentración final
Tris	6.05 g	50 mM
NaCl	8.76 g	150 mM
H ₂ O	Para 1 L	-

Ajustar el pH 7.5 con HCl 1 M.

Solución de Bloqueo

Leche en polvo descremada 5% (w/v) en TBS

Amortiguador TBS-Tween

Tween 0.1% en TBS

Soluciones para fraccionamiento celular

Amortiguador Tris-DTT

Tris (no pH) 100 mM

DTT 10 mM

Amortiguador Zimolyasa

Sorbitol 1.2 M

Amortiguador fosfatos (pH 7.4) 20 mM

Zimolyasa 3-5 mg/g de peso húmedo

Amortiguador de Homogeneización

Sorbitol 0.6 M

Tris-HCl (pH 7.4) 10 mM

EDTA 1 mM

BSA (libre de ácidos grasos) 0.2%

PMSF 1 mM

Amortiguador SH

Sorbitol 0.6 M

Hepes (pH 7.4) 20 mM

Amortiguador SH-KCl

Sorbitol	0.6 M
Hepes (pH 7.4)	20 mM
KCl	80 mM

Soluciones para la preparación de células semi-intactas**Amortiguador SP1**

Tris	100 mM (no pH)
DTT	10 mM

Amortiguador SP2

Sorbitol	0.6 M
YP	1X
Glucosa	0.2%
Buffer Fosfatos (pH7.4)	50 mM
Zymolyasa	3-5 mg por gramo de peso húmedo

Amortiguador SP3

Sorbitol	0.7 M
YP	1X
Glucosa	1%

Amortiguador de Permeabilización

Hepes pH 6.8	20 mM
Acetato de potasio	150 mM
Acetato de magnesio	2 mM
Sorbitol	0.4 M

Soluciones para importaciones en células semi-intactas**Amortiguador B88**

Hepes pH 6.8	20mM
Sorbitol	250mM
Acetato de potasio	150mM
Acetato de magnesio	5mM

Amortiguador B88 Ajustado

Hepes pH 6.8	20 mM
Sorbitol	100 mM
Acetato de potasio	150 mM
Acetato de magnesio	8 mM

ATP	2 mM
NADH	2 mM
Creatinina fosfato	5 mM
Creatinina cinasa	100 µg/mL
Galactosa	2%

AVO

Antimicina	1.25 µM
Valinomicina	80 µM
Oligomicina	0.65 µM

APÉNDICE 4. Oligonucleótidos

Oligonucleótidos		Usado para
Nombre	Secuencia 5'-3'	
Pro-Oxa1-SacIF	gaagagctcCATCGGTGGTCACCAGTCTTTTCG	Clonación de señales fusionadas a GFP
Pro-Oxa1-NotIR	tatgcgccgcCGTCGGGGAGGTTATTCTGTGGC	
MTS-Oxa1-NotIF	attgcgccgcATGTTCAAACCTCACCTCTCGACTCG	
MTS-Oxa1-BamHIR	cgcgatccGTTGGCATTGGGCCCGTCG	
Ter-Oxa1-XmalF	ataccgggATAAAGGCTCTATATCTCTCTG	
Ter-Oxa1-XhoIR	gggctcgagAATGTATACAATCCACTGCTGAG	
Pro-Mdm38-SacIF	ttagagctcCCAAGTTCCTTTAAACGATACC	
Pro-Mdm38-NotIR	aatgcgccgcCTTAGTATATTATCTGTAGTGATAG	
MTS-Mdm38-NotIF	aaagcgccgcATGTTGAATTTTCGCATCAAGAGCGTC	
MTS-Mdm38-BamHIR	gcggatccCTTATCAGTAGAATAAAATCTCAAAG	
Ter-Mdm38-XmalF	gcggcgggTATTAGATCAAAGCCTAAGAAAAAAC	
Ter-Mdm38-XhoIR	gggctcgagTATAAAAAAAAATAAGGCGGTAG	
ProNter-Oxa1-NotIR	atgcgccgcATGAACGGCCTCCAAGACGTG	
ProNter-Mdm38-NotIR	aatgcgccgcATCGCCATTGCTCTCTC	
TM1-Oxa1-NotIF	aagcgccgcGTTTACTCTGGGTG	
TM1-Oxa1-BamHIR	aagatccAATGAGGATGGTGGTG	
TM1-Mdm38-NotIF	aagcgccgcGTGTTAGGTTGATCCCTTTTC	
TM1-Mdm38-BamHIR	gtggatccAGCGAAAGGCAAAAATAGTTCCG	
Cter-Oxa1-BamHIF	tatgatccCGATGCCTGATGTTCCCTC	
Cter-Mdm38-BamHIF	tgtgatccTTGAAACTCTTCCCAACTTAC	
GFP-Seq	GTTTGAAGGTGATACCTTG	
ADH-GFP-SacIF	ataccgggcTTGTCTCACCATATCCGCAATG	
ADH-GFP-SpeIR	gcgactagtGCCGGTAGAGGTGGTG	
GFP-BamHI-F	gcggatccATGAGTAAGGGTGAAGAATTTTC	
GFP-Xmal	actccgggTATTTGTATAGTTCATCCATGCCAT	
mRfC-BamHIF	atggatccccgggtaccagatctATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGG	
mRfC-XhoIR	gcgctcgagtaCTGTACAGCTCGTCCATGCCGC	
MTS-Mdm38-SpeIF	gcaactagtATGTTGAATTTTCGCATCAAGAGCGTC	
MTS-Oxa1-SpeIF	gttactagtATGTTCAAACCTCACCTCTCGACTCG	
MTSSu9-SpeIF	gcgactagtATGGCCTCCACTCGTGTCC	
GFP-XhoIR	gcgctcgagTATTTGTATAGTTCATCCATGCCAT	
ADHTer-HindIIIR	gcgaagcttCGCCGTAGAGGTGGTG	
GalIR-SacI	gcgagctcCTATAGTGAGTCGATTACAG	
CQOPCR-1R	GGAAGAGGCAGCAAACCTTGAACATGACGCTCTTGATGCCAAATT	
CQOPCR-2F	TCCGATCAAGAGCGTCATGTTCAAGGTTGCTGCCTCTC	
CQOPCR-3R	AATACTATGGTTCGAGCGGTAATAACAAGCTTGCTTGACGTC	
CQOPCR-4F	GTCAGCAAGCTTGATTTTACCGTCTGAACCATAGTATTG	
CQOPCR-5R	AAAGAGATCCATGACGGATGAGCTATTAATCTAGGGCCTTGA	
CQOPCR-6F	AAGGCCCTAGATTAATAGCTCATCCGTCATGGATCTTTTTTC	
CQOPCR-7R	GGGCCGTCGAATTAATCTCAAAGGCCAATGACACGAGG	
CQOPCR-8F	CCTCGTGTATTGGCCTTTGAGATTAATTCGACGGGCC	
CQOPCR-9R	GGAGTACAGCCCAACTATCCTAGGATAGTGGGCTGACTCC	
CQOPCR-10F	GGAGTACAGCCCAACTATCCTAGATTAATTCGACGGGCC	
OxaSDMNotI	gcggcggcATGTTCCGACTCACCTCTGCATCGTCACGTGAGCTTTGCTGCCTC	
OxaSDMXbaI	ttagaactagtATGTTCCGACTCACCTCTGCATCGTCACGTGAGCTTTGCTGCCT	
Cis1-Ch-F	GCCGCCATCAATTTTCAGCG	
Cis1-Ch-R	AGCAACTCCTGCATTTCCGC	
Msp1-DelF	AGAACGAAAAGAGATAAGGATTCAAAAGAAAGGCCAccagctgaagctcgtacgc	
Msp1-DelR	GAATAAAAAGCTTTCTTTTTTTTCTAATTTTCTTCCatcgtatgaattcgagctcgtt	
Msp1-Ch-F	ATCACGCTTTCACCGTGGAG	
Msp1-Ch-R	CAAGCACCTAGCGGTGTCTT	
Fum1_RAA_F	AGTTGCGCTACTTTTCGTAGCT TCGTCATATAAGCTTAATATAAG	
Fum1_AAA_F_XbaI	CAA TCTAGA ATGTTGGCTTTTACCAATTGT AGTTGCGCTACTTTTCGTAGCT	
Fum1ORFf-XbaI	GAGTCTAGACTATAGTGAGTCGATTACAG	
Fum1RV-HA	AGCATAACTCTGGAACATCATATGGATATTAGGACCTAGCATGTGTTT	
HA*2tagReverseXhoI	CGCCTCGAGTCGCTTTAAGCATAATCTGGAACATCATATGGATAAGCATAATCTG GAACATCATATGGATAAGCATAATCTGGAAC	
Fum1 TerFXhoI	GCGCTCGAGTCCTGAACACATGCTAGG	
Fum1 TerRKpnI	GAGGGTACCTGCGGGTAATACTAGGTC	
CqmPCR-1	CTTGCTTGACGTCTTGTCACCGTGACGAGCTGAGAGGTGA	
CqmPCR-2	TCACCTCTCGACTCGTCACGGTGACAAGACGTCGAAGCAAG	
CqmPCR-3	CTAGGGCCTTGATTTTTAACGGCCAGTCTGGAAGAGGCAG	
CqmPCR-4	CTGCCTTCCAGACTGGCCGTTAAAAATCAAGGCCCTAG	
		Clonación mCherry
		Clonación del promotor <i>GAL1</i>
		Clonación de regiones quiméricas de la MTS de Oxa1 y Mdm38
		Mutagénesis sitio-dirigida
		Mutantes <i>CIS1</i> y <i>MSP1</i>
		Clonación <i>FUM1</i>
		Clonación Oxa1 ¹⁻ Mdm38 ¹¹⁻⁶⁰ -GFP

APÉNDICE 5. Plásmidos

Plásmido	Fuente
pRS315	[214]
pRS316	[214]
Rosella	Dr. Alexander de Luna
pVT100U-mtGFP	Dr. Benedikt Westerman
pYX122-mtGFP	Dr. Benedikt Westerman
pYX223-mtGFP	Dr. Benedikt Westerman
pYX122-mtmCherry	Este trabajo
pOxa1 ¹⁻⁵⁰ -GFP	Este trabajo
pMdm38 ¹⁻⁶⁰ -GFP	Este trabajo
pOxa1 ¹⁻¹⁴⁵ -GFP	Este trabajo
pMdm38 ¹⁻¹⁶⁵ -GFP	Este trabajo
pNcSu9 ¹⁻⁶⁹ -GFP	Este trabajo
pGAL1-Oxa1 ¹⁻⁵⁰ -GFP	Este trabajo
pGAL1-Mdm38 ¹⁻⁶⁰ -GFP	Este trabajo
pGAL1-NcSu9 ¹⁻⁶⁹ -GFP	Este trabajo
pMdm38 ¹⁻¹⁰ Oxa1 ¹¹⁻⁵⁰ -GFP	Este trabajo
pMdm38 ¹⁻²⁰ Oxa1 ²¹⁻⁵⁰ -GFP	Este trabajo
pMdm38 ¹⁻³⁰ Oxa1 ³¹⁻⁵⁰ -GFP	Este trabajo
pMdm38 ¹⁻⁴⁰ Oxa1 ⁴¹⁻⁵⁰ -GFP	Este trabajo
pMdm38 ¹⁻⁵⁰ Oxa1 ⁴¹⁻⁵⁰ -GFP	Este trabajo
pOxa1 ¹⁻¹⁰ Mdm38 ¹¹⁻⁶⁰ -GFP	Este trabajo
p315-Oxa1 ^{AAA} -GFP	Este trabajo
pGAL-Oxa1 ^{AAA} -GFP	Este trabajo
pGAL-Fum1-3HA	Este trabajo
PGAL-Fum1 ^{AAA} -3HA	Este trabajo

Para los plásmidos pRS315 y pRS316 consultar [214]

APÉNDICE 6. Anticuerpos

Anticuerpos Primarios

Anticuerpo	Concentración	Fuente
α -GFP	1:2000	Santa Cruz
α -Hog1	1:2000	Santa Cruz
α -Ubiquitina	1:1000	Sigma
α -Pgk1	1:5000	Invitrogen
α -ha	1:5000	Millipore
α -Mdm38	1:5000	Laboratorio Dr. Neupert
α -Tom20	1:1000	Laboratorio Dr. Herrmann
α -Ssc1	1:5000	Laboratorio Dr. Herrmann

Anticuerpos Secundarios

Anticuerpo	Concentración	Fuente
α -IgG ratón	1:10000	Jackson
α -IgG conejo	1:5000	Invitrogen

APÉNDICE 7. Tabla

Debido al tamaño de la tabla, se adjunta el enlace en donde se puede consultar en cualquier momento:

<https://tinyurl.com/mwkzh7df>

REFERENCIAS

- [1] B. Alberts, *Molecular biology of the cell*, Sixth edition. New York, NY: Garland Science, Taylor and Francis Group, 2015.
- [2] C. de Duve, «The origin of eukaryotes: a reappraisal», *Nat. Rev. Genet.*, vol. 8, n.º 5, pp. 395-403, may 2007, doi: 10.1038/nrg2071.
- [3] S. Das, M. Vera, V. Gandin, R. H. Singer, y E. Tutucci, «Intracellular mRNA transport and localized translation», *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 22, n.º 7, pp. 483-504, jul. 2021, doi: 10.1038/s41580-021-00356-8.
- [4] J. Sylvestre, A. Margeot, C. Jacq, G. Dujardin, y M. Corral-Debrinski, «The role of the 3' untranslated region in mRNA sorting to the vicinity of mitochondria is conserved from yeast to human cells», *Mol. Biol. Cell*, vol. 14, n.º 9, pp. 3848-3856, sep. 2003, doi: 10.1091/mbc.e03-02-0074.
- [5] L. Sagan, «On the origin of mitosing cells. 1967», *J. NIH Res. Life Sci. Res. News Natl. Inst. Health Alcohol Drug Abuse Ment. Health Adm.*, vol. 5, n.º 3, pp. 65-72, mar. 1993.
- [6] A. Chacinska, C. M. Koehler, D. Milenkovic, T. Lithgow, y N. Pfanner, «Importing Mitochondrial Proteins: Machineries and Mechanisms», *Cell*, vol. 138, n.º 4, pp. 628-644, ago. 2009, doi: 10.1016/j.cell.2009.08.005.
- [7] M. Kunze y J. Berger, «The similarity between N-terminal targeting signals for protein import into different organelles and its evolutionary relevance», *Front. Physiol.*, vol. 6, sep. 2015, doi: 10.3389/fphys.2015.00259.
- [8] M. C. Avendaño-Monsalve, J. C. Ponce-Rojas, y S. Funes, «From cytosol to mitochondria: the beginning of a protein journey», *Biol. Chem.*, vol. 401, n.º 6-7, pp. 645-661, may 2020, doi: 10.1515/hsz-2020-0110.
- [9] C. Lesnik, A. Golani-Armon, y Y. Arava, «Localized translation near the mitochondrial outer membrane: An update», *RNA Biol.*, vol. 12, n.º 8, pp. 801-809, ago. 2015, doi: 10.1080/15476286.2015.1058686.
- [10] T. Lithgow, «Targeting of proteins to mitochondria», *FEBS Lett.*, vol. 476, n.º 1-2, pp. 22-26, jun. 2000, doi: 10.1016/S0014-5793(00)01663-X.
- [11] R. E. Kellems, V. F. Allison, y R. A. Butow, «Cytoplasmic type 80S ribosomes associated with yeast mitochondria. IV. Attachment of ribosomes to the outer membrane of isolated mitochondria.», *J. Cell Biol.*, vol. 65, n.º 1, pp. 1-14, abr. 1975, doi: 10.1083/jcb.65.1.1.
- [12] R. E. Kellems, V. F. Allison, y R. A. Butow, «Cytoplasmic type 80 S ribosomes associated with yeast mitochondria. II. Evidence for the association of cytoplasmic ribosomes with the outer mitochondrial membrane in situ», *J. Biol. Chem.*, vol. 249, n.º 10, pp. 3297-3303, may 1974.
- [13] V. A. Gold, P. Chrosicki, P. Bragoszewski, y A. Chacinska, «Visualization of cytosolic ribosomes on the surface of mitochondria by electron cryotomography», *EMBO Rep.*, vol. 18, n.º 10, pp. 1786-1800, oct. 2017, doi: 10.15252/embr.201744261.
- [14] C. C. Williams, C. H. Jan, y J. S. Weissman, «Targeting and plasticity of mitochondrial proteins revealed by proximity-specific ribosome profiling», *Science*, vol. 346, n.º 6210, pp. 748-751, nov. 2014, doi: 10.1126/science.1257522.
- [15] N. T. Ingolia, J. A. Hussmann, y J. S. Weissman, «Ribosome Profiling:

- Global Views of Translation», *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 11, n.º 5, p. a032698, may 2019, doi: 10.1101/cshperspect.a032698.
- [16] I. Stein, Y. Peleg, S. Even-Ram, y O. Pines, «The single translation product of the FUM1 gene (fumarase) is processed in mitochondria before being distributed between the cytosol and mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*», *Mol. Cell. Biol.*, vol. 14, n.º 7, pp. 4770-4778, jul. 1994, doi: 10.1128/mcb.14.7.4770-4778.1994.
- [17] C. Knox, E. Sass, W. Neupert, y O. Pines, «Import into Mitochondria, Folding and Retrograde Movement of Fumarase in Yeast», *J. Biol. Chem.*, vol. 273, n.º 40, pp. 25587-25593, oct. 1998, doi: 10.1074/jbc.273.40.25587.
- [18] O. Yogev, S. Karniely, y O. Pines, «Translation-coupled Translocation of Yeast Fumarase into Mitochondria in Vivo», *J. Biol. Chem.*, vol. 282, n.º 40, pp. 29222-29229, oct. 2007, doi: 10.1074/jbc.M704201200.
- [19] E. Luk, M. Yang, L. T. Jensen, Y. Bourbonnais, y V. C. Culotta, «Manganese Activation of Superoxide Dismutase 2 in the Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*», *J. Biol. Chem.*, vol. 280, n.º 24, pp. 22715-22720, jun. 2005, doi: 10.1074/jbc.M504257200.
- [20] M. Garcia, X. Darzacq, T. Delaveau, L. Jourden, R. H. Singer, y C. Jacq, «Mitochondria-associated Yeast mRNAs and the Biogenesis of Molecular Complexes», *Mol. Biol. Cell*, vol. 18, n.º 2, pp. 362-368, feb. 2007, doi: 10.1091/mbc.e06-09-0827.
- [21] N. Gadir, L. Haim-Vilmovsky, J. Kraut-Cohen, y J. E. Gerst, «Localization of mRNAs coding for mitochondrial proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*», *RNA*, vol. 17, n.º 8, pp. 1551-1565, ago. 2011, doi: 10.1261/rna.2621111.
- [22] P. Marc, A. Margeot, F. Devaux, C. Blugeon, M. Corral-Debrinski, y C. Jacq, «Genome-wide analysis of mRNAs targeted to yeast mitochondria», *EMBO Rep.*, vol. 3, n.º 2, pp. 159-164, feb. 2002, doi: 10.1093/embo-reports/kvf025.
- [23] D. Zabezhinsky, B. Slobodin, D. Rapaport, y J. E. Gerst, «An Essential Role for COPI in mRNA Localization to Mitochondria and Mitochondrial Function», *Cell Rep.*, vol. 15, n.º 3, pp. 540-549, abr. 2016, doi: 10.1016/j.celrep.2016.03.053.
- [24] O. Yogev y O. Pines, «Dual targeting of mitochondrial proteins: Mechanism, regulation and function», *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, vol. 1808, n.º 3, pp. 1012-1020, mar. 2011, doi: 10.1016/j.bbamem.2010.07.004.
- [25] Avendaño-Monsalve, Maria Clara y Funes, Soledad, «La célula y sus medios de transporte de proteínas: Metro o Taxi», *Aceptado. Ciencia*.
- [26] G. E. Palade, «A small particulate component of the cytoplasm », *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, vol. 1, n.º 1, pp. 59-68, ene. 1955, doi: 10.1083/jcb.1.1.59.
- [27] G. E. Palade, «Studies on the endoplasmic reticulum», *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, vol. 1, n.º 6, pp. 567-582, nov. 1955, doi: 10.1083/jcb.1.6.567.
- [28] G. E. Palade, «The endoplasmic reticulum», *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, vol. 2, n.º 4, pp. 85-98, jul. 1956, doi: 10.1083/jcb.2.4.85.
- [29] G. E. Palade, «The organization of living matter», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 52, n.º 2, pp. 613-634, ago. 1964, doi: 10.1073/pnas.52.2.613.
- [30] G. Blobel y B. Dobberstein, «Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin

- light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma.», *J. Cell Biol.*, vol. 67, n.º 3, pp. 835-851, dic. 1975, doi: 10.1083/jcb.67.3.835.
- [31] R. C. Jackson y G. Blobel, «Post-translational cleavage of presecretory proteins with an extract of rough microsomes from dog pancreas containing signal peptidase activity.», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 74, n.º 12, pp. 5598-5602, dic. 1977, doi: 10.1073/pnas.74.12.5598.
- [32] G. Blobel, «Protein targeting (Nobel lecture)», *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.*, vol. 1, n.º 2, pp. 86-102, ago. 2000, doi: 10.1002/1439-7633(20000818)1:2<86::AID-CBIC86>3.0.CO;2-A.
- [33] T. A. Rapoport, «Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes», *Nature*, vol. 450, n.º 7170, pp. 663-669, nov. 2007, doi: 10.1038/nature06384.
- [34] N. Aviram y M. Schuldiner, «Targeting and translocation of proteins to the endoplasmic reticulum at a glance», *J. Cell Sci.*, vol. 130, n.º 24, pp. 4079-4085, dic. 2017, doi: 10.1242/jcs.204396.
- [35] N. Aviram *et al.*, «The SND proteins constitute an alternative targeting route to the endoplasmic reticulum», *Nature*, vol. 540, n.º 7631, pp. 134-138, dic. 2016, doi: 10.1038/nature20169.
- [36] M. Schuldiner *et al.*, «The GET Complex Mediates Insertion of Tail-Anchored Proteins into the ER Membrane», *Cell*, vol. 134, n.º 4, pp. 634-645, ago. 2008, doi: 10.1016/j.cell.2008.06.025.
- [37] L. Ellgaard, N. McCaul, A. Chatsisvili, y I. Braakman, «Co- and Post-Translational Protein Folding in the ER: Co- and Post-Translational Protein Folding in the ER», *Traffic*, vol. 17, n.º 6, pp. 615-638, jun. 2016, doi: 10.1111/tra.12392.
- [38] C. K. Barlowe y E. A. Miller, «Secretory Protein Biogenesis and Traffic in the Early Secretory Pathway», *Genetics*, vol. 193, n.º 2, pp. 383-410, feb. 2013, doi: 10.1534/genetics.112.142810.
- [39] N. Gomez-Navarro y E. Miller, «Protein sorting at the ER–Golgi interface», *J. Cell Biol.*, vol. 215, n.º 6, pp. 769-778, dic. 2016, doi: 10.1083/jcb.201610031.
- [40] C. Viotti, «ER to Golgi-Dependent Protein Secretion: The Conventional Pathway», en *Unconventional Protein Secretion*, vol. 1459, A. Pompa y F. De Marchis, Eds. New York, NY: Springer New York, 2016, pp. 3-29. doi: 10.1007/978-1-4939-3804-9_1.
- [41] T. Walter y R. Erdmann, «Current Advances in Protein Import into Peroxisomes», *Protein J.*, vol. 38, n.º 3, pp. 351-362, jun. 2019, doi: 10.1007/s10930-019-09835-6.
- [42] T. Pollar, Earnshaw, William C., Lippincott-Schwartz, Jennifer, y Johnson, Graham T., «Chapter 18. Posttranslational Targeting of Proteins», en *Cell Biology*, Third Edition., Elsevier, 2017.
- [43] J. Farré, S. S. Mahalingam, M. Proietto, y S. Subramani, «Peroxisome biogenesis, membrane contact sites, and quality control», *EMBO Rep.*, vol. 20, n.º 1, ene. 2019, doi: 10.15252/embr.201846864.
- [44] T. Jovanovic-Taliman y A. Zilman, «Protein Transport by the Nuclear Pore Complex: Simple Biophysics of a Complex Biomachine», *Biophys. J.*, vol. 113, n.º 1, pp. 6-14, jul. 2017, doi: 10.1016/j.bpj.2017.05.024.
- [45] Y. Miyamoto, Y. Yoneda, y M. Oka, «Protein Transport Between the Nucleus and Cytoplasm», en *Nuclear Architecture and Dynamics*, Elsevier, 2018, pp. 387-403. doi: 10.1016/B978-0-12-803480-4.00025-9.

- [46] Y. H. Kim, M.-E. Han, y S.-O. Oh, «The molecular mechanism for nuclear transport and its application», *Anat. Cell Biol.*, vol. 50, n.º 2, p. 77, 2017, doi: 10.5115/acb.2017.50.2.77.
- [47] M. Christie *et al.*, «Structural Biology and Regulation of Protein Import into the Nucleus», *J. Mol. Biol.*, vol. 428, n.º 10, pp. 2060-2090, may 2016, doi: 10.1016/j.jmb.2015.10.023.
- [48] X. Chen y D. J. Schnell, «Protein import into chloroplasts», *Trends Cell Biol.*, vol. 9, n.º 6, pp. 222-227, jun. 1999, doi: 10.1016/S0962-8924(99)01554-8.
- [49] E. Kovács-Bogdán, J. Soll, y B. Bölter, «Protein import into chloroplasts: The Tic complex and its regulation», *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.*, vol. 1803, n.º 6, pp. 740-747, jun. 2010, doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.01.015.
- [50] G. Burger, M. W. Gray, y B. F. Lang, «Mitochondrial genomes: anything goes», *Trends Genet. TIC*, vol. 19, n.º 12, pp. 709-716, dic. 2003, doi: 10.1016/j.tig.2003.10.012.
- [51] G. von Heijne, «Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices», *EMBO J.*, vol. 5, n.º 6, pp. 1335-1342, jun. 1986.
- [52] F.-N. Vögtle *et al.*, «Global Analysis of the Mitochondrial N-Proteome Identifies a Processing Peptidase Critical for Protein Stability», *Cell*, vol. 139, n.º 2, pp. 428-439, oct. 2009, doi: 10.1016/j.cell.2009.07.045.
- [53] O. Gakh, P. Cavadini, y G. Isaya, «Mitochondrial processing peptidases», *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.*, vol. 1592, n.º 1, pp. 63-77, sep. 2002, doi: 10.1016/S0167-4889(02)00265-3.
- [54] B. S. Glick, A. Brandt, K. Cunningham, S. Müller, R. L. Hallberg, y G. Schatz, «Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism», *Cell*, vol. 69, n.º 5, pp. 809-822, may 1992, doi: 10.1016/0092-8674(92)90292-k.
- [55] P.-S. Jan, K. Esser, E. Prati, y G. Michaelis, «Som1, a third component of the yeast mitochondrial inner membrane peptidase complex that contains Imp1 and Imp2», *Mol. Gen. Genet. MGG*, vol. 263, n.º 3, pp. 483-491, abr. 2000, doi: 10.1007/s004380051192.
- [56] N. Pfanner, P. Hoeben, M. Tropschug, y W. Neupert, «The carboxyl-terminal two-thirds of the ADP/ATP carrier polypeptide contains sufficient information to direct translocation into mitochondria», *J. Biol. Chem.*, vol. 262, n.º 31, pp. 14851-14854, nov. 1987.
- [57] N. Pfanner y W. Neupert, «Distinct steps in the import of ADP/ATP carrier into mitochondria», *J. Biol. Chem.*, vol. 262, n.º 16, pp. 7528-7536, jun. 1987.
- [58] D. P. Sideris y K. Tokatlidis, «Oxidative folding of small Tims is mediated by site-specific docking onto Mia40 in the mitochondrial intermembrane space», *Mol. Microbiol.*, vol. 65, n.º 5, pp. 1360-1373, sep. 2007, doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05880.x.
- [59] D. Milenkovic *et al.*, «Identification of the Signal Directing Tim9 and Tim10 into the Intermembrane Space of Mitochondria», *Mol. Biol. Cell*, vol. 20, n.º 10, pp. 2530-2539, may 2009, doi: 10.1091/mbc.e08-11-1108.
- [60] S. Kutik *et al.*, «Dissecting Membrane Insertion of Mitochondrial β -Barrel Proteins», *Cell*, vol. 132, n.º 6, pp. 1011-1024, mar. 2008, doi: 10.1016/j.cell.2008.01.028.
- [61] A. Zamudio-Ochoa, Y. Camacho-Villasana, A. E. García-Guerrero, y X. Pérez-Martínez, «The Pet309 pentatricopeptide repeat motifs mediate efficient

- binding to the mitochondrial *COX1* transcript in yeast», *RNA Biol.*, vol. 11, n.º 7, pp. 953-967, jul. 2014, doi: 10.4161/rna.29780.
- [62] J. M. Herrmann, M. W. Woellhaf, y N. Bonnefoy, «Control of protein synthesis in yeast mitochondria: The concept of translational activators», *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.*, vol. 1833, n.º 2, pp. 286-294, feb. 2013, doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.03.007.
- [63] G. M. Manthey, B. D. Przybyla-Zawislak, y J. E. McEwen, «The *Saccharomyces cerevisiae* Pet309 protein is embedded in the mitochondrial inner membrane», *Eur. J. Biochem.*, vol. 255, n.º 1, pp. 156-161, jul. 1998, doi: 10.1046/j.1432-1327.1998.2550156.x.
- [64] G. Bader *et al.*, «Assigning mitochondrial localization of dual localized proteins using a yeast Bi-Genomic Mitochondrial-Split-GFP», *eLife*, vol. 9, p. e56649, jul. 2020, doi: 10.7554/eLife.56649.
- [65] M. C. Avendaño-Monsalve, J. C. Ponce-Rojas, y S. Funes, «Viaje al centro de la mitocondria: importación de proteínas, sus alteraciones y enfermedades relacionadas», *TIP Rev. Espec. En Cienc. Quím.-Biológicas*, vol. 24, oct. 2021, doi: 10.22201/fesz.23958723e.2021.370.
- [66] D. Rapaport y W. Neupert, «Biogenesis of Tom40, Core Component of the Tom Complex of Mitochondria», *J. Cell Biol.*, vol. 146, n.º 2, pp. 321-332, jul. 1999, doi: 10.1083/jcb.146.2.321.
- [67] T. Söllner, G. Griffiths, R. Pfaller, N. Pfanner, y W. Neupert, «MOM19, an import receptor for mitochondrial precursor proteins», *Cell*, vol. 59, n.º 6, pp. 1061-1070, dic. 1989, doi: 10.1016/0092-8674(89)90762-9.
- [68] A. Mayer, F. E. Nargang, W. Neupert, y R. Lill, «MOM22 is a receptor for mitochondrial targeting sequences and cooperates with MOM19», *EMBO J.*, vol. 14, n.º 17, pp. 4204-4211, sep. 1995.
- [69] V. Hines y G. Schatz, «Precursor binding to yeast mitochondria. A general role for the outer membrane protein Mas70p», *J. Biol. Chem.*, vol. 268, n.º 1, pp. 449-454, ene. 1993.
- [70] K. Dietmeier *et al.*, «Tom5 functionally links mitochondrial preprotein receptors to the general import pore», *Nature*, vol. 388, n.º 6638, pp. 195-200, jul. 1997, doi: 10.1038/40663.
- [71] C. K. Kassenbrock, W. Cao, y M. G. Douglas, «Genetic and biochemical characterization of ISP6, a small mitochondrial outer membrane protein associated with the protein translocation complex», *EMBO J.*, vol. 12, n.º 8, pp. 3023-3034, ago. 1993.
- [72] A. Hönlinger *et al.*, «Tom7 modulates the dynamics of the mitochondrial outer membrane translocase and plays a pathway-related role in protein import», *EMBO J.*, vol. 15, n.º 9, pp. 2125-2137, may 1996.
- [73] J. Brix, S. Rüdiger, B. Bukau, J. Schneider-Mergener, y N. Pfanner, «Distribution of Binding Sequences for the Mitochondrial Import Receptors Tom20, Tom22, and Tom70 in a Presequence-carrying Preprotein and a Non-cleavable Preprotein», *J. Biol. Chem.*, vol. 274, n.º 23, pp. 16522-16530, jun. 1999, doi: 10.1074/jbc.274.23.16522.
- [74] J. Schlossmann, R. Lill, W. Neupert, y D. A. Court, «Tom71, a Novel Homologue of the Mitochondrial Preprotein Receptor Tom70», *J. Biol. Chem.*, vol. 271, n.º 30, pp. 17890-17895, jul. 1996, doi: 10.1074/jbc.271.30.17890.
- [75] T. Shiota *et al.*, «Molecular architecture of the active mitochondrial protein

- gate», *Science*, vol. 349, n.º 6255, pp. 1544-1548, sep. 2015, doi: 10.1126/science.aac6428.
- [76] T. Bausewein, D. J. Mills, J. D. Langer, B. Nitschke, S. Nussberger, y W. Kühlbrandt, «Cryo-EM Structure of the TOM Core Complex from *Neurospora crassa*», *Cell*, vol. 170, n.º 4, pp. 693-700.e7, ago. 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.07.012.
- [77] K. Tucker y E. Park, «Cryo-EM structure of the mitochondrial protein-import channel TOM complex at near-atomic resolution», *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 26, n.º 12, pp. 1158-1166, dic. 2019, doi: 10.1038/s41594-019-0339-2.
- [78] Y. Araiso *et al.*, «Structure of the mitochondrial import gate reveals distinct preprotein paths», *Nature*, vol. 575, n.º 7782, pp. 395-401, nov. 2019, doi: 10.1038/s41586-019-1680-7.
- [79] P. J. Dekker, P. Keil, J. Rassow, A. C. Maarse, N. Pfanner, y M. Meijer, «Identification of MIM23, a putative component of the protein import machinery of the mitochondrial inner membrane», *FEBS Lett.*, vol. 330, n.º 1, pp. 66-70, sep. 1993, doi: 10.1016/0014-5793(93)80921-g.
- [80] N. N. Alder, R. E. Jensen, y A. E. Johnson, «Fluorescence Mapping of Mitochondrial TIM23 Complex Reveals a Water-Facing, Substrate-Interacting Helix Surface», *Cell*, vol. 134, n.º 3, pp. 439-450, ago. 2008, doi: 10.1016/j.cell.2008.06.007.
- [81] A. C. Maarse, J. Blom, P. Keil, N. Pfanner, y M. Meijer, «Identification of the essential yeast protein MIM17, an integral mitochondrial inner membrane protein involved in protein import», *FEBS Lett.*, vol. 349, n.º 2, pp. 215-221, ago. 1994, doi: 10.1016/0014-5793(94)00669-5.
- [82] D. Mokranjac *et al.*, «Role of Tim50 in the Transfer of Precursor Proteins from the Outer to the Inner Membrane of Mitochondria», *Mol. Biol. Cell*, vol. 20, n.º 5, pp. 1400-1407, mar. 2009, doi: 10.1091/mbc.e08-09-0934.
- [83] D. Mokranjac, D. Popov-Čeleketić, K. Hell, y W. Neupert, «Role of Tim21 in Mitochondrial Translocation Contact Sites», *J. Biol. Chem.*, vol. 280, n.º 25, pp. 23437-23440, jun. 2005, doi: 10.1074/jbc.C500135200.
- [84] M. K. Dienhart y R. A. Stuart, «The Yeast Aac2 Protein Exists in Physical Association with the Cytochrome *bc₁*-COX Supercomplex and the TIM23 Machinery», *Mol. Biol. Cell*, vol. 19, n.º 9, pp. 3934-3943, sep. 2008, doi: 10.1091/mbc.e08-04-0402.
- [85] N. Wiedemann, M. van der Laan, D. P. Hutu, P. Rehling, y N. Pfanner, «Sorting switch of mitochondrial presequence translocase involves coupling of motor module to respiratory chain», *J. Cell Biol.*, vol. 179, n.º 6, pp. 1115-1122, dic. 2007, doi: 10.1083/jcb.200709087.
- [86] R. Ieva *et al.*, «Mgr2 Functions as Lateral Gatekeeper for Preprotein Sorting in the Mitochondrial Inner Membrane», *Mol. Cell*, vol. 56, n.º 5, pp. 641-652, dic. 2014, doi: 10.1016/j.molcel.2014.10.010.
- [87] H.-C. Schneider *et al.*, «Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import», *Nature*, vol. 371, n.º 6500, pp. 768-774, oct. 1994, doi: 10.1038/371768a0.
- [88] J. Rassow *et al.*, «Mitochondrial protein import: biochemical and genetic evidence for interaction of matrix hsp70 and the inner membrane protein MIM44.», *J. Cell Biol.*, vol. 127, n.º 6, pp. 1547-1556, dic. 1994, doi: 10.1083/jcb.127.6.1547.

- [89] P. R. D'Silva, B. Schilke, M. Hayashi, y E. A. Craig, «Interaction of the J-Protein Heterodimer Pam18/Pam16 of the Mitochondrial Import Motor with the Translocon of the Inner Membrane», *Mol. Biol. Cell*, vol. 19, n.º 1, pp. 424-432, ene. 2008, doi: 10.1091/mbc.e07-08-0748.
- [90] P. R. D'Silva, B. Schilke, W. Walter, y E. A. Craig, «Role of Pam16's degenerate J domain in protein import across the mitochondrial inner membrane», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 102, n.º 35, pp. 12419-12424, ago. 2005, doi: 10.1073/pnas.0505969102.
- [91] B. Westermann, C. Prip-Buus, W. Neupert, y E. Schwarz, «The role of the GrpE homologue, Mge1p, in mediating protein import and protein folding in mitochondria», *EMBO J.*, vol. 14, n.º 14, pp. 3452-3460, jul. 1995.
- [92] M. van der Laan *et al.*, «Pam17 is required for architecture and translocation activity of the mitochondrial protein import motor», *Mol. Cell. Biol.*, vol. 25, n.º 17, pp. 7449-7458, sep. 2005, doi: 10.1128/MCB.25.17.7449-7458.2005.
- [93] M. Horst, W. Oppliger, B. Feifel, G. Schatz, y B. S. Glick, «The mitochondrial protein import motor: Dissociation of mitochondrial hsp70 from its membrane anchor requires ATP binding rather than ATP hydrolysis: ATP requirement of the mitochondrial import motor», *Protein Sci.*, vol. 5, n.º 4, pp. 759-767, abr. 1996, doi: 10.1002/pro.5560050421.
- [94] C. Sirrenberg, M. F. Bauer, B. Guiard, W. Neupert, y M. Brunner, «Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22», *Nature*, vol. 384, n.º 6609, pp. 582-585, dic. 1996, doi: 10.1038/384582a0.
- [95] O. Kerscher, J. Holder, M. Srinivasan, R. S. Leung, y R. E. Jensen, «The Tim54p-Tim22p Complex Mediates Insertion of Proteins into the Mitochondrial Inner Membrane», *J. Cell Biol.*, vol. 139, n.º 7, pp. 1663-1675, dic. 1997, doi: 10.1083/jcb.139.7.1663.
- [96] C. Sirrenberg, M. Endres, H. Fölsch, R. A. Stuart, W. Neupert, y M. Brunner, «Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5», *Nature*, vol. 391, n.º 6670, pp. 912-915, feb. 1998, doi: 10.1038/36136.
- [97] A. Adam, «Tim9, a new component of the TIM2254 translocase in mitochondria», *EMBO J.*, vol. 18, n.º 2, pp. 313-319, ene. 1999, doi: 10.1093/emboj/18.2.313.
- [98] A. I. C. Höhr *et al.*, «Membrane protein insertion through a mitochondrial β -barrel gate», *Science*, vol. 359, n.º 6373, p. eaah6834, ene. 2018, doi: 10.1126/science.aah6834.
- [99] V. Kozjak *et al.*, «An Essential Role of Sam50 in the Protein Sorting and Assembly Machinery of the Mitochondrial Outer Membrane», *J. Biol. Chem.*, vol. 278, n.º 49, pp. 48520-48523, dic. 2003, doi: 10.1074/jbc.C300442200.
- [100] D. Milenkovic *et al.*, «Sam35 of the Mitochondrial Protein Sorting and Assembly Machinery Is a Peripheral Outer Membrane Protein Essential for Cell Viability», *J. Biol. Chem.*, vol. 279, n.º 21, pp. 22781-22785, may 2004, doi: 10.1074/jbc.C400120200.
- [101] T. Waizenegger *et al.*, «Tob38, a novel essential component in the biogenesis of β -barrel proteins of mitochondria», *EMBO Rep.*, vol. 5, n.º 7, pp. 704-709, jul. 2004, doi: 10.1038/sj.embor.7400183.
- [102] S. Gratzer *et al.*, «Mas37p, a novel receptor subunit for protein import into

- mitochondria», *J. Cell Biol.*, vol. 129, n.º 1, pp. 25-34, abr. 1995, doi: 10.1083/jcb.129.1.25.
- [103] M. Naoé *et al.*, «Identification of Tim40 That Mediates Protein Sorting to the Mitochondrial Intermembrane Space», *J. Biol. Chem.*, vol. 279, n.º 46, pp. 47815-47821, nov. 2004, doi: 10.1074/jbc.M410272200.
- [104] A. Chacinska *et al.*, «Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins», *EMBO J.*, vol. 23, n.º 19, pp. 3735-3746, sep. 2004, doi: 10.1038/sj.emboj.7600389.
- [105] S. Allen, V. Balabanidou, D. P. Sideris, T. Lisowsky, y K. Tokatlidis, «Erv1 Mediates the Mia40-dependent Protein Import Pathway and Provides a Functional Link to the Respiratory Chain by Shuttling Electrons to Cytochrome c», *J. Mol. Biol.*, vol. 353, n.º 5, pp. 937-944, nov. 2005, doi: 10.1016/j.jmb.2005.08.049.
- [106] M. Rissler *et al.*, «The Essential Mitochondrial Protein Erv1 Cooperates with Mia40 in Biogenesis of Intermembrane Space Proteins», *J. Mol. Biol.*, vol. 353, n.º 3, pp. 485-492, oct. 2005, doi: 10.1016/j.jmb.2005.08.051.
- [107] T. Waizenegger, S. Schmitt, J. Zivkovic, W. Neupert, y D. Rapaport, «Mim1, a protein required for the assembly of the TOM complex of mitochondria», *EMBO Rep.*, vol. 6, n.º 1, pp. 57-62, ene. 2005, doi: 10.1038/sj.embor.7400318.
- [108] K. S. Dimmer *et al.*, «A crucial role of Mim2 in the biogenesis of mitochondrial outer membrane proteins», *J. Cell Sci.*, p. jcs.103804, ene. 2012, doi: 10.1242/jcs.103804.
- [109] T. Becker *et al.*, «Biogenesis of the Mitochondrial TOM Complex», *J. Biol. Chem.*, vol. 283, n.º 1, pp. 120-127, ene. 2008, doi: 10.1074/jbc.M706997200.
- [110] K. Hell, J. M. Herrmann, E. Pratje, W. Neupert, y R. A. Stuart, «Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 95, n.º 5, pp. 2250-2255, mar. 1998, doi: 10.1073/pnas.95.5.2250.
- [111] M. Preuss, M. Ott, S. Funes, J. Luirink, y J. M. Herrmann, «Evolution of Mitochondrial Oxa Proteins from Bacterial YidC», *J. Biol. Chem.*, vol. 280, n.º 13, pp. 13004-13011, abr. 2005, doi: 10.1074/jbc.M414093200.
- [112] S. W. Hennon, R. Soman, L. Zhu, y R. E. Dalbey, «YidC/Alb3/Oxa1 Family of Insertases», *J. Biol. Chem.*, vol. 290, n.º 24, pp. 14866-14874, jun. 2015, doi: 10.1074/jbc.R115.638171.
- [113] W. Neupert y J. M. Herrmann, «Translocation of Proteins into Mitochondria», *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 76, n.º 1, pp. 723-749, jun. 2007, doi: 10.1146/annurev.biochem.76.052705.163409.
- [114] T. Becker, J. Song, y N. Pfanner, «Versatility of Preprotein Transfer from the Cytosol to Mitochondria», *Trends Cell Biol.*, vol. 29, n.º 7, pp. 534-548, jul. 2019, doi: 10.1016/j.tcb.2019.03.007.
- [115] Y. E. Kim, M. S. Hipp, A. Bracher, M. Hayer-Hartl, y F. Ulrich Hartl, «Molecular Chaperone Functions in Protein Folding and Proteostasis», *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 82, n.º 1, pp. 323-355, jun. 2013, doi: 10.1146/annurev-biochem-060208-092442.
- [116] J. Frydman, «Folding of Newly Translated Proteins In Vivo: The Role of Molecular Chaperones», *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 70, n.º 1, pp. 603-647, jun. 2001, doi: 10.1146/annurev.biochem.70.1.603.
- [117] E. A. Craig, «Hsp70 at the membrane: driving protein translocation», *BMC*

- Biol.*, vol. 16, n.º 1, p. 11, dic. 2018, doi: 10.1186/s12915-017-0474-3.
- [118] R. Rosenzweig, N. B. Nillegoda, M. P. Mayer, y B. Bukau, «The Hsp70 chaperone network», *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 20, n.º 11, pp. 665-680, nov. 2019, doi: 10.1038/s41580-019-0133-3.
- [119] T. Morán Luengo, M. P. Mayer, y S. G. D. Rüdiger, «The Hsp70–Hsp90 Chaperone Cascade in Protein Folding», *Trends Cell Biol.*, vol. 29, n.º 2, pp. 164-177, feb. 2019, doi: 10.1016/j.tcb.2018.10.004.
- [120] K. Peisker, M. Chiabudini, y S. Rospert, «The ribosome-bound Hsp70 homolog Ssb of *Saccharomyces cerevisiae*», *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.*, vol. 1803, n.º 6, pp. 662-672, jun. 2010, doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.03.005.
- [121] H. Hoseini *et al.*, «The cytosolic cochaperone Sti1 is relevant for mitochondrial biogenesis and morphology», *FEBS J.*, vol. 283, n.º 18, pp. 3338-3352, sep. 2016, doi: 10.1111/febs.13813.
- [122] J. C. Young, N. J. Hoogenraad, y F. U. Hartl, «Molecular Chaperones Hsp90 and Hsp70 Deliver Preproteins to the Mitochondrial Import Receptor Tom70», *Cell*, vol. 112, n.º 1, pp. 41-50, ene. 2003, doi: 10.1016/S0092-8674(02)01250-3.
- [123] Y. Wu y B. Sha, «Crystal structure of yeast mitochondrial outer membrane translocon member Tom70p», *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 13, n.º 7, pp. 589-593, jul. 2006, doi: 10.1038/nsmb1106.
- [124] J. Li, X. Qian, J. Hu, y B. Sha, «Molecular Chaperone Hsp70/Hsp90 Prepares the Mitochondrial Outer Membrane Translocon Receptor Tom71 for Preprotein Loading», *J. Biol. Chem.*, vol. 284, n.º 35, pp. 23852-23859, ago. 2009, doi: 10.1074/jbc.M109.023986.
- [125] J. Becker, W. Walter, W. Yan, y E. A. Craig, «Functional interaction of cytosolic hsp70 and a DnaJ-related protein, Ydj1p, in protein translocation in vivo», *Mol. Cell. Biol.*, vol. 16, n.º 8, pp. 4378-4386, ago. 1996, doi: 10.1128/MCB.16.8.4378.
- [126] W. L. Kelley, «The J-domain family and the recruitment of chaperone power», *Trends Biochem. Sci.*, vol. 23, n.º 6, pp. 222-227, jun. 1998, doi: 10.1016/S0968-0004(98)01215-8.
- [127] Ł. Opaliński *et al.*, «Recruitment of Cytosolic J-Proteins by TOM Receptors Promotes Mitochondrial Protein Biogenesis», *Cell Rep.*, vol. 25, n.º 8, pp. 2036-2043.e5, nov. 2018, doi: 10.1016/j.celrep.2018.10.083.
- [128] D. Papić *et al.*, «The Role of Dj1 in Import of the Mitochondrial Protein Mim1 Demonstrates Specificity between a Cochaperone and Its Substrate Protein», *Mol. Cell. Biol.*, vol. 33, n.º 20, pp. 4083-4094, oct. 2013, doi: 10.1128/MCB.00227-13.
- [129] T. Jores *et al.*, «Cytosolic Hsp70 and Hsp40 chaperones enable the biogenesis of mitochondrial β -barrel proteins», *J. Cell Biol.*, vol. 217, n.º 9, pp. 3091-3108, sep. 2018, doi: 10.1083/jcb.201712029.
- [130] F. H. Schopf, M. M. Biebl, y J. Buchner, «The HSP90 chaperone machinery», *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 18, n.º 6, pp. 345-360, jun. 2017, doi: 10.1038/nrm.2017.20.
- [131] S. Wickner, J. L. Camberg, S. M. Doyle, y D. M. Johnston, «Molecular Chaperones ☆», en *Reference Module in Life Sciences*, Elsevier, 2017, p.

- B9780128096338067000. doi: 10.1016/B978-0-12-809633-8.06723-6.
- [132] A. Brinker y F. U. Hartl, «Chaperonins», en *Encyclopedia of Genetics*, Elsevier, 2001, pp. 324-325. doi: 10.1006/rwgn.2001.1510.
- [133] K. C. Stein, A. Kriel, y J. Frydman, «Nascent Polypeptide Domain Topology and Elongation Rate Direct the Cotranslational Hierarchy of Hsp70 and TRiC/CCT», *Mol. Cell*, vol. 75, n.º 6, pp. 1117-1130.e5, sep. 2019, doi: 10.1016/j.molcel.2019.06.036.
- [134] A. Hoffmann, B. Bukau, y G. Kramer, «Structure and function of the molecular chaperone Trigger Factor», *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.*, vol. 1803, n.º 6, pp. 650-661, jun. 2010, doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.01.017.
- [135] Y. Zhang, I. Sinning, y S. Rospert, «Two chaperones locked in an embrace: structure and function of the ribosome-associated complex RAC», *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 24, n.º 8, pp. 611-619, ago. 2017, doi: 10.1038/nsmb.3435.
- [136] K. Döring *et al.*, «Profiling Ssb-Nascent Chain Interactions Reveals Principles of Hsp70-Assisted Folding», *Cell*, vol. 170, n.º 2, pp. 298-311.e20, jul. 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.06.038.
- [137] Y. Zhang *et al.*, «The ribosome-associated complex RAC serves in a relay that directs nascent chains to Ssb», *Nat. Commun.*, vol. 11, n.º 1, p. 1504, dic. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-15313-w.
- [138] T. A. Rapoport, B. Jungnickel, y U. Kutay, «Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes», *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 65, n.º 1, pp. 271-303, jun. 1996, doi: 10.1146/annurev.bi.65.070196.001415.
- [139] Gariépy, Cheryl E. y Dickinson, Chris J., «Chapter 2. Translation and Posttranslational Processing of Gastrointestinal Peptides», en *Physiology of gastrointestinal tract*, Elsevier Academic Press.
- [140] B. Wiedmann, H. Sakai, T. A. Davis, y M. Wiedmann, «A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation», *Nature*, vol. 370, n.º 6489, pp. 434-440, ago. 1994, doi: 10.1038/370434a0.
- [141] B. Luring, H. Sakai, G. Kreibich, y M. Wiedmann, «Nascent polypeptide-associated complex protein prevents mistargeting of nascent chains to the endoplasmic reticulum», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 92, n.º 12, pp. 5411-5415, jun. 1995, doi: 10.1073/pnas.92.12.5411.
- [142] S. Wang, H. Sakai, y M. Wiedmann, «NAC covers ribosome-associated nascent chains thereby forming a protective environment for regions of nascent chains just emerging from the peptidyl transferase center», *J. Cell Biol.*, vol. 130, n.º 3, pp. 519-528, ago. 1995, doi: 10.1083/jcb.130.3.519.
- [143] T. Powers y P. Walter, «The nascent polypeptide-associated complex modulates interactions between the signal recognition particle and the ribosome», *Curr. Biol.*, vol. 6, n.º 3, pp. 331-338, mar. 1996, doi: 10.1016/S0960-9822(02)00484-0.
- [144] M. Halic *et al.*, «Signal Recognition Particle Receptor Exposes the Ribosomal Translocon Binding Site», *Science*, vol. 312, n.º 5774, pp. 745-747, may 2006, doi: 10.1126/science.1124864.
- [145] I. Moller *et al.*, «A general mechanism for regulation of access to the translocon: Competition for a membrane attachment site on ribosomes», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 95, n.º 23, pp. 13425-13430, nov. 1998, doi:

10.1073/pnas.95.23.13425.

[146] B. Wiedmann y S. Prehn, «The nascent polypeptide-associated complex (NAC) of yeast functions in the targeting process of ribosomes to the ER membrane», *FEBS Lett.*, vol. 458, n.º 1, pp. 51-54, sep. 1999, doi:

10.1016/S0014-5793(99)01118-7.

[147] A. Jomaa *et al.*, «Mechanism of signal sequence handover from NAC to SRP on ribosomes during ER-protein targeting», *Science*, vol. 375, n.º 6583, pp. 839-844, feb. 2022, doi: 10.1126/science.abl6459.

[148] Y. Zhang *et al.*, «NAC functions as a modulator of SRP during the early steps of protein targeting to the endoplasmic reticulum», *Mol. Biol. Cell*, vol. 23, n.º 16, pp. 3027-3040, ago. 2012, doi: 10.1091/mbc.e12-02-0112.

[149] R. D. Wegrzyn *et al.*, «A Conserved Motif Is Prerequisite for the Interaction of NAC with Ribosomal Protein L23 and Nascent Chains», *J. Biol. Chem.*, vol. 281, n.º 5, pp. 2847-2857, feb. 2006, doi: 10.1074/jbc.M511420200.

[150] M. Pech, T. Spreter, R. Beckmann, y B. Beatrix, «Dual Binding Mode of the Nascent Polypeptide-associated Complex Reveals a Novel Universal Adapter Site on the Ribosome», *J. Biol. Chem.*, vol. 285, n.º 25, pp. 19679-19687, jun. 2010, doi: 10.1074/jbc.M109.092536.

[151] M. Gamerdinger *et al.*, «Early Scanning of Nascent Polypeptides inside the Ribosomal Tunnel by NAC», *Mol. Cell*, vol. 75, n.º 5, pp. 996-1006.e8, sep. 2019, doi: 10.1016/j.molcel.2019.06.030.

[152] X. Shi, M. R. Parthun, y J. A. Jaehning, «The yeast EGD2 gene encodes a homologue of the α NAC subunit of the human nascent-polypeptide-associated complex», *Gene*, vol. 165, n.º 2, pp. 199-202, ene. 1995, doi: 10.1016/0378-1119(95)00577-5.

[153] M. R. Parthun, D. A. Mangus, y J. A. Jaehning, «The EGD1 product, a yeast homolog of human BTF3, may be involved in GAL4 DNA binding», *Mol. Cell. Biol.*, vol. 12, n.º 12, pp. 5683-5689, dic. 1992, doi: 10.1128/mcb.12.12.5683-5689.1992.

[154] G.-Z. Hu y H. Ronne, «Yeast BTF3 protein is encoded by duplicated genes and inhibits the expression of some genes *in vivo*», *Nucleic Acids Res.*, vol. 22, n.º 14, pp. 2740-2743, 1994, doi: 10.1093/nar/22.14.2740.

[155] B. Reimann *et al.*, «Initial characterization of the nascent polypeptide-associated complex in yeast», *Yeast Chichester Engl.*, vol. 15, n.º 5, pp. 397-407, mar. 1999, doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(19990330)15:5<397::AID-YEA384>3.0.CO;2-U.

[156] R. George, T. Beddoe, K. Landl, y T. Lithgow, «The yeast nascent polypeptide-associated complex initiates protein targeting to mitochondria *in vivo*», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 95, n.º 5, pp. 2296-2301, mar. 1998, doi: 10.1073/pnas.95.5.2296.

[157] Y. Nyathi y M. R. Pool, «Analysis of the interplay of protein biogenesis factors at the ribosome exit site reveals new role for NAC», *J. Cell Biol.*, vol. 210, n.º 2, pp. 287-301, jul. 2015, doi: 10.1083/jcb.201410086.

[158] T. A. Bloss, E. S. Witze, y J. H. Rothman, «Suppression of CED-3-independent apoptosis by mitochondrial β NAC in *Caenorhabditis elegans*», *Nature*, vol. 424, n.º 6952, pp. 1066-1071, ago. 2003, doi: 10.1038/nature01920.

[159] D. C. Markesich, K. M. Gajewski, M. E. Nazimiec, y K. Beckingham, «bicaudal encodes the *Drosophila* beta NAC homolog, a component of the

- ribosomal translational machinery*», *Dev. Camb. Engl.*, vol. 127, n.º 3, pp. 559-572, feb. 2000.
- [160] J. M. Deng y R. R. Behringer, «An insertional mutation in the BTF3 transcription factor gene leads to an early postimplantation lethality in mice», *Transgenic Res.*, vol. 4, n.º 4, pp. 264-269, jul. 1995, doi: 10.1007/BF01969120.
- [161] M. del Alamo, D. J. Hogan, S. Pechmann, V. Albanese, P. O. Brown, y J. Frydman, «Defining the Specificity of Cotranslationally Acting Chaperones by Systematic Analysis of mRNAs Associated with Ribosome-Nascent Chain Complexes», *PLoS Biol.*, vol. 9, n.º 7, p. e1001100, jul. 2011, doi: 10.1371/journal.pbio.1001100.
- [162] M. Gamerding, M. A. Hanebuth, T. Frickey, y E. Deuerling, «The principle of antagonism ensures protein targeting specificity at the endoplasmic reticulum», *Science*, vol. 348, n.º 6231, pp. 201-207, abr. 2015, doi: 10.1126/science.aaa5335.
- [163] R. George, P. Walsh, T. Beddoe, y T. Lithgow, «The nascent polypeptide-associated complex (NAC) promotes interaction of ribosomes with the mitochondrial surface in vivo», *FEBS Lett.*, vol. 516, n.º 1-3, pp. 213-216, abr. 2002, doi: 10.1016/S0014-5793(02)02528-0.
- [164] U. Fünfschilling y S. Rospert, «Nascent Polypeptide-associated Complex Stimulates Protein Import into Yeast Mitochondria», *Mol. Biol. Cell*, vol. 10, n.º 10, pp. 3289-3299, oct. 1999, doi: 10.1091/mbc.10.10.3289.
- [165] A. Koplín *et al.*, «A dual function for chaperones SSB-RAC and the NAC nascent polypeptide-associated complex on ribosomes», *J. Cell Biol.*, vol. 189, n.º 1, pp. 57-68, abr. 2010, doi: 10.1083/jcb.200910074.
- [166] K. Shen *et al.*, «Dual Role of Ribosome-Binding Domain of NAC as a Potent Suppressor of Protein Aggregation and Aging-Related Proteinopathies», *Mol. Cell*, vol. 74, n.º 4, pp. 729-741.e7, may 2019, doi: 10.1016/j.molcel.2019.03.012.
- [167] B. Guo *et al.*, «The nascent polypeptide-associated complex is essential for autophagic flux», *Autophagy*, vol. 10, n.º 10, pp. 1738-1748, oct. 2014, doi: 10.4161/auto.29638.
- [168] F. Boos *et al.*, «Mitochondrial protein-induced stress triggers a global adaptive transcriptional programme», *Nat. Cell Biol.*, vol. 21, n.º 4, pp. 442-451, abr. 2019, doi: 10.1038/s41556-019-0294-5.
- [169] H. Weidberg y A. Amon, «MitoCPR—A surveillance pathway that protects mitochondria in response to protein import stress», *Science*, vol. 360, n.º 6385, p. eaan4146, abr. 2018, doi: 10.1126/science.aan4146.
- [170] M. Basch *et al.*, «Msp1 cooperates with the proteasome for extraction of arrested mitochondrial import intermediates», *Mol. Biol. Cell*, vol. 31, n.º 8, pp. 753-767, abr. 2020, doi: 10.1091/mbc.E19-06-0329.
- [171] S. Matsumoto, K. Nakatsukasa, C. Kakuta, Y. Tamura, M. Esaki, y T. Endo, «Msp1 Clears Mistargeted Proteins by Facilitating Their Transfer from Mitochondria to the ER», *Mol. Cell*, vol. 76, n.º 1, pp. 191-205.e10, oct. 2019, doi: 10.1016/j.molcel.2019.07.006.
- [172] V. Dederer, A. Khmelinskii, A. G. Huhn, V. Okreglak, M. Knop, y M. K. Lemberg, «Cooperation of mitochondrial and ER factors in quality control of tail-anchored proteins», *eLife*, vol. 8, p. e45506, jun. 2019, doi: 10.7554/eLife.45506.
- [173] L. Wrobel *et al.*, «Mistargeted mitochondrial proteins activate a proteostatic

response in the cytosol», *Nature*, vol. 524, n.º 7566, pp. 485-488, ago. 2015, doi: 10.1038/nature14951.

[174] X. Wang y X. J. Chen, «A cytosolic network suppressing mitochondria-mediated proteostatic stress and cell death», *Nature*, vol. 524, n.º 7566, pp. 481-484, ago. 2015, doi: 10.1038/nature14859.

[175] C. U. Mårtensson *et al.*, «Mitochondrial protein translocation-associated degradation», *Nature*, vol. 569, n.º 7758, pp. 679-683, may 2019, doi: 10.1038/s41586-019-1227-y.

[176] M. B. Metzger, J. L. Scales, M. F. Dunkleberger, J. Loncarek, y A. M. Weissman, «A protein quality control pathway at the mitochondrial outer membrane», *eLife*, vol. 9, p. e51065, mar. 2020, doi: 10.7554/eLife.51065.

[177] V. P. Shakya, W. A. Barbeau, T. Xiao, C. S. Knutson, M. H. Schuler, y A. L. Hughes, «A nuclear-based quality control pathway for non-imported mitochondrial proteins», *eLife*, vol. 10, p. e61230, mar. 2021, doi: 10.7554/eLife.61230.

[178] T. Xiao, V. P. Shakya, y A. L. Hughes, «ER targeting of non-imported mitochondrial carrier proteins is dependent on the GET pathway», *Life Sci. Alliance*, vol. 4, n.º 3, p. e202000918, mar. 2021, doi: 10.26508/lsa.202000918.

[179] K. G. Hansen *et al.*, «An ER surface retrieval pathway safeguards the import of mitochondrial membrane proteins in yeast», *Science*, vol. 361, n.º 6407, pp. 1118-1122, sep. 2018, doi: 10.1126/science.aar8174.

[180] J. Laborenz *et al.*, «The ER protein Ema19 facilitates the degradation of nonimported mitochondrial precursor proteins», *Mol. Biol. Cell*, vol. 32, n.º 8, pp. 664-674, abr. 2021, doi: 10.1091/mbc.E20-11-0748.

[181] M. J. McKenna *et al.*, «The endoplasmic reticulum P5A-ATPase is a transmembrane helix dislocase», *Science*, vol. 369, n.º 6511, p. eabc5809, sep. 2020, doi: 10.1126/science.abc5809.

[182] D. Poveda-Huertes *et al.*, «An Early mtUPR: Redistribution of the Nuclear Transcription Factor Rox1 to Mitochondria Protects against Intramitochondrial Proteotoxic Aggregates», *Mol. Cell*, vol. 77, n.º 1, pp. 180-188.e9, ene. 2020, doi: 10.1016/j.molcel.2019.09.026.

[183] Ponce-Rojas, José Carlos, «Mapeo de las interacciones genéticas del complejo NAC y su relevancia durante el proceso co-traduccion de importación de proteínas a la mitocondria», Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 2012.

[184] J. C. Ponce-Rojas *et al.*, « $\alpha\beta'$ -NAC cooperates with Sam37 to mediate early stages of mitochondrial protein import», *FEBS J.*, vol. 284, n.º 5, pp. 814-830, mar. 2017, doi: 10.1111/febs.14024.

[185] Yañez Falcón de la Barrera, Armando Roberto, «Estudio del papel de NAC y Sam37 en la importación co-traduccion de la proteína mitocondrial Mmf1 en *Saccharomyces cerevisiae*», Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 2014.

[186] Ponce-Rojas, José Carlos, «Estudio de la ruta de importación de proteínas mitocondriales mediada por $\alpha\beta'$ -NAC y Sam37 en *Saccharomyces cerevisiae*», Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 2017.

[187] Avendaño-Monsalve, Maria Clara, «Interacciones genéticas y físicas entre en complejo NAC y la proteína Sam37 durante la importación de proteínas a la

mitocondria», Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 2017.

- [188] J. M. Herrmann, W. Neupert, y R. A. Stuart, «Insertion into the mitochondrial inner membrane of a polytopic protein, the nuclear-encoded Oxa1p», *EMBO J.*, vol. 16, n.º 9, pp. 2217-2226, may 1997, doi: 10.1093/emboj/16.9.2217.
- [189] D. Lupo *et al.*, «Mdm38 is a 14-3-3-Like Receptor and Associates with the Protein Synthesis Machinery at the Inner Mitochondrial Membrane», *Traffic*, vol. 12, n.º 10, pp. 1457-1466, oct. 2011, doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01239.x.
- [190] M. Eilers y G. Schatz, «Binding of a specific ligand inhibits import of a purified precursor protein into mitochondria», *Nature*, vol. 322, n.º 6076, pp. 228-232, jul. 1986, doi: 10.1038/322228a0.
- [191] J. Laborenz, K. Hansen, C. Prescianotto-Baschong, A. Spang, y J. M. Herrmann, «*In vitro* import experiments with semi-intact cells suggest a role of the Sec61 paralog Ssh1 in mitochondrial biogenesis», *Biol. Chem.*, vol. 400, n.º 9, pp. 1229-1240, ago. 2019, doi: 10.1515/hsz-2019-0196.
- [192] R. W. West, R. R. Yocum, y M. Ptashne, «*Saccharomyces cerevisiae* GAL1-GAL10 divergent promoter region: location and function of the upstream activating sequence UASG», *Mol. Cell. Biol.*, vol. 4, n.º 11, pp. 2467-2478, nov. 1984, doi: 10.1128/mcb.4.11.2467-2478.1984.
- [193] R. Gautier, D. Douguet, B. Antony, y G. Drin, «HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific -helical properties», *Bioinformatics*, vol. 24, n.º 18, pp. 2101-2102, sep. 2008, doi: 10.1093/bioinformatics/btn392.
- [194] A. H. Y. Tong y C. Boone, «16 High-Throughput Strain Construction and Systematic Synthetic Lethal Screening in», en *Methods in Microbiology*, vol. 36, Elsevier, 2007, pp. 369-707. doi: 10.1016/S0580-9517(06)36016-3.
- [195] J. M. Liu y D. R. Liu, «Discovery of a mRNA mitochondrial localization element in *Saccharomyces cerevisiae* by nonhomologous random recombination and *in vivo* selection», *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, n.º 20, pp. 6750-6761, nov. 2007, doi: 10.1093/nar/gkm777.
- [196] M. Wang, L. Ogé, M.-D. Perez-Garcia, L. Hamama, y S. Sakr, «The PUF Protein Family: Overview on PUF RNA Targets, Biological Functions, and Post Transcriptional Regulation», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, n.º 2, p. 410, ene. 2018, doi: 10.3390/ijms19020410.
- [197] X. Wang, P. D. Zamore, y T. M. T. Hall, «Crystal Structure of a Pumilio Homology Domain», *Mol. Cell*, vol. 7, n.º 4, pp. 855-865, abr. 2001, doi: 10.1016/S1097-2765(01)00229-5.
- [198] X. Wang, J. McLachlan, P. D. Zamore, y T. M. T. Hall, «Modular Recognition of RNA by a Human Pumilio-Homology Domain», *Cell*, vol. 110, n.º 4, pp. 501-512, ago. 2002, doi: 10.1016/S0092-8674(02)00873-5.
- [199] D. G. Vitali *et al.*, «The GET pathway can increase the risk of mitochondrial outer membrane proteins to be mistargeted to the ER», *J. Cell Sci.*, p. jcs.211110, ene. 2018, doi: 10.1242/jcs.211110.
- [200] S. Backes *et al.*, «The chaperone-binding activity of the mitochondrial surface receptor Tom70 protects the cytosol against mitoprotein-induced stress», *Cell Rep.*, vol. 35, n.º 1, p. 108936, abr. 2021, doi: 10.1016/j.celrep.2021.108936.
- [201] S. G. Rolland *et al.*, «Compromised Mitochondrial Protein Import Acts as a

- Signal for UPRmt», *Cell Rep.*, vol. 28, n.º 7, pp. 1659-1669.e5, ago. 2019, doi: 10.1016/j.celrep.2019.07.049.
- [202] H.-H. Hsieh, J. H. Lee, S. Chandrasekar, y S. Shan, «A ribosome-associated chaperone enables substrate triage in a cotranslational protein targeting complex», *Nat. Commun.*, vol. 11, n.º 1, p. 5840, dic. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-19548-5.
- [203] J.-P. Nougayrede y M. S. Sonnenberg, «Enteropathogenic *Escherichia coli* EspF is targeted to mitochondria and is required to initiate the mitochondrial death pathway», *Cell. Microbiol.*, vol. 6, n.º 11, pp. 1097-1111, nov. 2004, doi: 10.1111/j.1462-5822.2004.00421.x.
- [204] B. Kenny y M. Jepson, «Targeting of an enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) effector protein to host mitochondria», *Cell. Microbiol.*, vol. 2, n.º 6, pp. 579-590, dic. 2000, doi: 10.1046/j.1462-5822.2000.00082.x.
- [205] P. Papatheodorou *et al.*, «The enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Map effector is imported into the mitochondrial matrix by the TOM/Hsp70 system and alters organelle morphology», *Cell. Microbiol.*, vol. 8, n.º 4, pp. 677-689, abr. 2006, doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00660.x.
- [206] J. Sambrook y D. W. Russell, «The Inoue Method for Preparation and Transformation of Competent *E. Coli*: "Ultra-Competent" Cells», *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 2006, n.º 1, p. pdb.prot3944, jun. 2006, doi: 10.1101/pdb.prot3944.
- [207] R. Daniel Gietz y R. A. Woods, «Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method», en *Methods in Enzymology*, vol. 350, Elsevier, 2002, pp. 87-96. doi: 10.1016/S0076-6879(02)50957-5.
- [208] D. Burke, D. Dawson, y T. Stearns, *Methods in yeast genetics: a Cold Spring Harbor Laboratory course manual*, 2000 ed. Plainview, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000.
- [209] U. K. Laemmli, «Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4», *Nature*, vol. 227, n.º 5259, pp. 680-685, ago. 1970, doi: 10.1038/227680a0.
- [210] M. A. K. Markwell, S. M. Haas, L. L. Bieber, y N. E. Tolbert, «A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples», *Anal. Biochem.*, vol. 87, n.º 1, pp. 206-210, jun. 1978, doi: 10.1016/0003-2697(78)90586-9.
- [211] C. B. Brachmann *et al.*, «Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications», *Yeast Chichester Engl.*, vol. 14, n.º 2, pp. 115-132, ene. 1998, doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(19980130)14:2<115::AID-YEA204>3.0.CO;2-2.
- [212] E. A. Winzler *et al.*, «Functional Characterization of the *S. cerevisiae* Genome by Gene Deletion and Parallel Analysis», *Science*, vol. 285, n.º 5429, pp. 901-906, ago. 1999, doi: 10.1126/science.285.5429.901.
- [213] «SOB Medium», *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 2018, n.º 3, p. pdb.rec102723, mar. 2018, doi: 10.1101/pdb.rec102723.
- [214] R. S. Sikorski y P. Hieter, «A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*», *Genetics*, vol. 122, n.º 1, pp. 19-27, may 1989, doi: 10.1093/genetics/122.1.19.

S

ANEXO I

Avendaño-Monsalve, M. C., Mendoza-Martínez, A. E., Ponce-Rojas, J. C., Poot-Hernández, A. C., Rincón-Heredia, R. & Funes, S. (*En revisión*). A positive cluster at the N-terminus of mitochondrial proteins Oxa1 and Fum1 mediates their early recognition by $\alpha\beta'$ -NAC and Sam37.

Avendaño-Monsalve, M. C., Ponce-Rojas, J. C., & Funes, S. (2021). Viaje al centro de la mitocondria: importación de proteínas, sus alteraciones y enfermedades relacionadas. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 24, 1-25. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2021.370>

Avendaño-Monsalve, M. C., Ponce-Rojas, J. C., & Funes, S. (2020). From cytosol to mitochondria: the beginning of a protein journey. *Biological chemistry*, 401(6-7), 645–661. <https://doi.org/10.1515/hsz-2020-0110>

Ponce-Rojas, J. C., **Avendaño-Monsalve, M. C.**, Yañez-Falcón, A. R., Jaimes-Miranda, F., Garay, E., Torres-Quiroz, F., DeLuna, A., & Funes, S. (2017). $\alpha\beta'$ -NAC cooperates with Sam37 to mediate early stages of mitochondrial protein import. *The FEBS journal*, 284(5), 814–830. <https://doi.org/10.1111/febs.14024>

ANEXO II

Avendaño-Monsalve, Maria Clara y Funes, Soledad. *Aceptado en Ciencia, Revista de la Academia Mexicana de Ciencias*. Los sistemas de transporte de proteínas en la célula: ¿metro o taxi?

Avendaño-Monsalve, Maria Clara. *Sometido en Ciencias, Revista de la Facultad de Ciencias, UNAM*. Viajes espaciales y mitocondrias: más allá de la producción de energía

© 2021 Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 24: 1-25, 2021.

<https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2021.370>

Viaje al centro de la mitocondria: importación de proteínas, sus alteraciones y enfermedades relacionadas

Maria Clara Avendaño-Monsalve¹,
José Carlos Ponce-Rojas² y Soledad Funes^{1*}

¹Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, Ciudad de México, México. ²Departamento de Biología Molecular, Celular y del Desarrollo, Universidad de California Santa Bárbara, E.E.U.U. E-mail: *sfunes@ifc.unam.mx

RESUMEN

Las mitocondrias son organelos fascinantes, no solo porque son el sitio en donde se genera la energía de las células, sino por su relevancia en procesos y patologías de interés médico. La gran mayoría de las proteínas que constituyen el proteoma mitocondrial están codificadas en el núcleo y se traducen por ribosomas citosólicos, por lo que deben ser identificadas correctamente para ser distribuidas e insertadas en cada uno de los subcompartimentos mitocondriales. En este artículo realizamos una descripción de las maquinarias de importación mitocondrial, además de las diferentes respuestas celulares que contrarrestan las alteraciones en los procesos de transporte de las proteínas o cuando existe una disfunción mitocondrial. Finalmente, mencionamos las enfermedades causadas por mutaciones en los complejos transportadores y de distribución de las proteínas de este organelo, que se han identificado hasta la fecha.

Palabras clave: importación; presecuencia; translocación de proteínas; estrés; mitocondriopatías.

Journey to the center of mitochondria: Protein import, its alterations and related diseases

ABSTRACT

Mitochondria are exciting organelles not only because they are in charge of the energy production within the cell, but also because of their relevance in processes and pathologies of medical interest. The vast majority of the proteins that constitute the mitochondrial proteome are encoded in the nucleus and translated by cytosolic ribosomes, hence these have to be correctly identified in order to be distributed and inserted in each of the mitochondrial subcompartments. In this review, we describe the mitochondrial import machineries, as well as the different cellular responses to alterations in protein transport processes or when a mitochondrial dysfunction arises. Lastly, we give an overview of the identified pathologies triggered by mitochondrial dysfunction derived from mutations in the components of the import and sorting machineries of the organelle.

Keywords: protein import; presequence; protein translocation; stress; mitochondriopathies.

LISTA DE ABREVIATURAS

LECA, último ancestro común eucarionte; RNAt, ácido ribonucleico de transferencia; RNAr, ácido ribonucleico ribosomal; RNAm, ácido ribonucleico mensajero; TOM, translocasa de la membrana externa; SAM, maquinaria de distribución y ensamblaje; VDAC, canal aniónico dependiente del voltaje; ERMES, estructuras de encuentro entre el retículo endoplásmico y la mitocondria; MIM, maquinaria de importación mitocondrial; TIM22, translocasa de la membrana interna mitocondrial 22; TIM23, translocasa de la membrana interna mitocondrial 23; PAM, motor asociado a la translocasa de presecuencias; MTS, secuencia de localización mitocondrial; MPP, peptidasa de procesamiento mitocondrial; UPRam, respuesta a proteínas desplegadas activada por localización incorrecta de proteínas; mtDNA, DNA mitocondrial; mPOS, estrés provocado por sobreacumulación de precursores mitocondriales; mTAD, degradación de proteínas mitocondriales asociada a la translocación; mitoCPR, respuesta a problemas de importación de proteínas a la mitocondria; ER-SURF, ruta de recuperación superficial del retículo endoplásmico; DCMA, cardiomiopatía dilatada con ataxia; SMDMDM, displasia espondilo metafísica de Megarbane-Dagher-Melki; DDS, síndrome de distonía y sordera; VAV, vectores adenovirales; SDO, sulfuro dioxigenasa; MNGIE, encefalopatía mitocondrial neuro-gastrointestinal; TALENS, nucleasas efectoras similares a activadores transcripcionales; OXPHOS, fosforilación oxidativa.

INTRODUCCIÓN

Las mitocondrias son organelos esenciales para la gran mayoría de las células eucariontes. Están compuestas por dos membranas lipídicas, que a su vez delimitan dos espacios acuosos independientes: la matriz y el espacio intermembranal. La membrana interna mitocondrial, además, se pliega hacia el interior de la matriz formando estructuras que se conocen como crestas mitocondriales. La función más estudiada de estos organelos es la producción de energía a través de la fosforilación oxidativa, sin embargo, también llevan a cabo el metabolismo de los aminoácidos y de los lípidos (la beta oxidación) y la formación de centros hierro-azufre. Además, las mitocondrias están estrechamente relacionadas con la apoptosis y, por lo tanto, son uno de los elementos claves de la supervivencia celular.

Origen evolutivo de las mitocondrias

Se ha calculado que el origen de las células eucariontes data de entre 1,000 y 1,900 millones de años (Eme, Sharpe, Brown & Roger, 2014). El surgimiento de estas células ha sido tema de numerosos debates científicos, en particular sobre el tipo de organismos que se asociaron y las presiones evolutivas que favorecieron este proceso. Durante mucho tiempo se pensó que las mitocondrias se originaron por la endosimbiosis de una α -proteobacteria con un protoeucarionte como lo propuso originalmente Lynn Margulis (Sagan, 1993). Sin embargo, hipótesis subsecuentes propusieron que el hospedero de la

α -proteobacteria podría haber sido un integrante del dominio Archea (Martin & Müller, 1998). Datos filogenéticos recientes sugieren fuertemente que el hospedero de esta endosimbiosis pertenecía a un arqueón del clado Asgard y que estos procariontes actuales son los familiares más cercanos a los eucariontes (**Figura 1, lado izquierdo**; Tria *et al.*, 2021; Williams, Cox, Foster, Szöllösi & Embley 2020; Zaremba-Niedzwiedzka *et al.*, 2017). Es posible que el hospedero original no haya sido un arqueón simple, sino un organismo quimérico con gran diversidad genética resultado de interacciones endosimbióticas transitorias anteriores o de eventos masivos de transferencia lateral de genes. En los últimos años, se han postulado diversas hipótesis que explican el establecimiento de la integración física de dos o más células en una y, por lo tanto, el origen de las células eucariontes. En general, en todos los modelos postulados se considera que las interacciones metabólicas entre las células procariontes involucradas favorecieron su asociación permanente con el hospedero. Sin embargo, además de los modelos clásicos de endosimbiosis, actualmente se han planteado mecanismos de fagocitosis o incluso de formación de protuberancias “de adentro hacia afuera” a través de las cuales se explica con mayor parsimonia la formación de la membrana nuclear y del sistema de endomembranas (**Figura 1, lado derecho**; Baum & Baum, 2014; Eme, Spang, Lombard, Stairs & Ettema, 2017; López-García & Moreira, 2020; Zaremba-Niedzwiedzka *et al.*, 2017). Como se puede apreciar, aún existen grandes incógnitas sobre el origen de las células eucariontes, algunas de ellas se podrán resolver tal vez al obtener mayor información sobre el grupo de las Asgard arqueas, tanto sobre la diversidad dentro de este grupo como de los mecanismos que les permiten establecer relaciones físicas con otros procariontes.

Independientemente de la identidad del hospedero o de su grado de complejidad estructural (por ejemplo, la existencia de otros organelos membranales), esta asociación endosimbiótica dio origen a un ancestro del que se propone derivan todos los eucariontes actuales y que se conoce como el último ancestro común eucarionte o LECA (Last Eukaryotic Common Ancestor, por sus siglas en inglés, Eme *et al.*, 2017; Gray, 2012).

Uno de los desafíos más grandes con el establecimiento de LECA, además de coexistir y organizar el desarrollo celular de dos entidades independientes para asegurar la herencia de esta relación, fue la conservación, la transmisión, la coordinación y la lectura de dos genomas diferentes. Estos dos genomas son el del hospedero que se convirtió en el genoma nuclear y el del huésped que se convirtió en el genoma mitocondrial (Gray, 2015; Karakaidos & Rampias, 2020). Posteriormente, ocurrió una migración del material genético del huésped hacia el genoma del hospedero. Durante esta transferencia ha ocurrido un proceso de continua coevolución entre ambos genomas: a) se perdieron genes irrelevantes para el metabolismo del huésped en su nueva situación de organelo; b) se eliminaron genes con información redundante como procesos metabólicos repetidos;

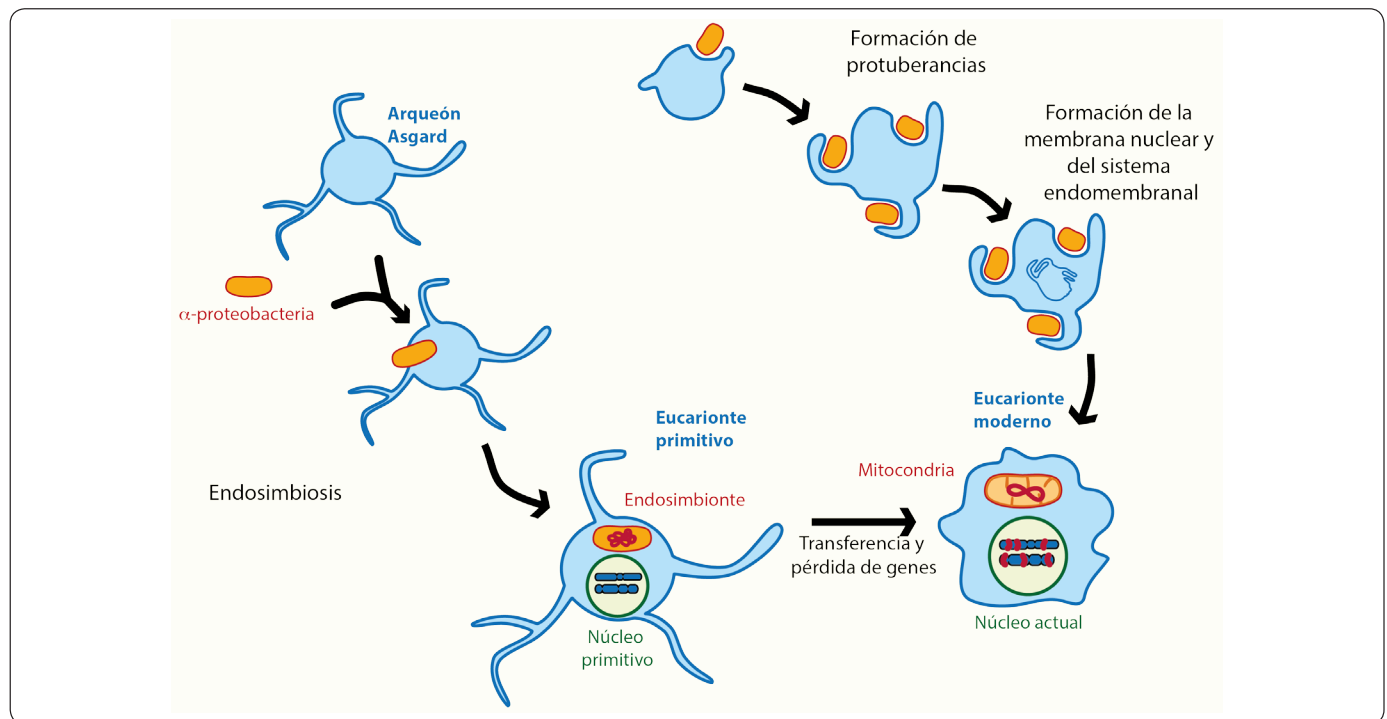


Figura 1. Origen de la célula eucarionte. Existen dos modelos que explican el origen de las células eucariontes: el primero, del lado izquierdo, es la endosimbiosis; propone que el ancestro de un arqueón Asgard engulló una α -proteobacteria para dar lugar a las células eucariontes actuales; el segundo, del lado derecho, indica que el ancestro eucarionte internalizó, mediante protuberancias de su membrana, la α -proteobacteria. Sin importar el modelo, la transferencia de los genes desde la α -proteobacteria, actual mitocondria, al núcleo del hospedero, fue un proceso consecuente. Elaboración personal.

y c) se establecieron sistemas bidireccionales de comunicación entre el núcleo y la mitocondria que coordinan la expresión genética de ambos genomas de acuerdo con las necesidades metabólicas de la célula (Bock, 2017). Actualmente, no se conoce totalmente cómo ocurre el proceso de migración de los genes mitocondriales al núcleo; sin embargo, se sabe que de forma natural el mtDNA puede escapar del organelo y convertirse en material genético nuclear o ser usado para la reparación de roturas del DNA de cadena doble en el núcleo (Bock, 2017; Portugez, Martin & Hazkani-Covo, 2018). Existen algunos estudios en levaduras donde se usan marcadores de selección que son transformados en la mitocondria y, de esta forma, es posible calcular la tasa de migración al núcleo, luego de colocar a las levaduras en un medio selectivo; con esta aproximación se ha podido estimar que para los genes mitocondriales la tasa es de 2×10^{-5} , sugiriendo que este proceso continúa ocurriendo (Thorsness & Fox, 1990). Sin embargo, existen genes que son retenidos en el genoma mitocondrial, particularmente aquellos que codifican para proteínas hidrofóbicas, aparentemente, porque representa una desventaja energética importar este tipo de proteínas desde el citosol (Björkholm, Harish, Hagström, Ernst & Andersson, 2015).

Los genomas mitocondriales actuales tienen estructuras muy diversas, algunos son lineales y otros circulares, algunos

contienen intrones y otros no, pero todos se componen de un número muy reducido de genes que generalmente codifican para proteínas hidrofóbicas de la cadena respiratoria, RNAt y RNAr (Burger, Gray & Franz Lang, 2003; Ghiselli *et al.*, 2021). Estos genes codifican tan solo el 1% del proteoma mitocondrial, lo que implica que el 99% restante se encuentra codificado en el genoma nuclear (Song, Hermann & Becker, *et al.*, 2021). Esta cantidad masiva de genes codificados en el núcleo son transcritos y posteriormente traducidos por ribosomas citosólicos. Por lo tanto, una necesidad adicional de la endosimbiosis fue el establecimiento de sistemas de reconocimiento y transporte de proteínas desde el citosol hasta la mitocondria (Herrmann, 2003). Es decir, establecer en las proteínas cuyo destino funcional es la mitocondria, una secuencia señal que sea reconocida tanto por las chaperonas en el citoplasma como por los receptores en el organelo, que aseguren su correcta entrega. En consecuencia, las proteínas mitocondriales son sintetizadas en el citosol como proteínas precursoras (también conocidas como proteínas sustrato o proteínas cliente) que únicamente alcanzan su plegamiento funcional al ser localizadas en su destino final (Becker, Song & Pfanner, 2019; Schmidt, Pfanner & Meisinger, 2010). El objetivo de este artículo es: (a) describir las maquinarias que se encargan del transporte de las proteínas mitocondriales y el tipo de secuencia señal que es reconocida por cada una

de estas maquinarias (b) detallar las respuestas celulares que se activan como resultado de las alteraciones de estos procesos de distribución; y (c) mencionar las enfermedades ocasionadas por mutaciones en los componentes de importación mitocondrial.

MAQUINARIAS ENCARGADAS DE LA DISTRIBUCIÓN Y ENSAMBLAJE DE LAS PROTEÍNAS MITOCONDRIALES
El portal de entrada a la mitocondria TOM

El complejo TOM (*Translocase of the Outer Membrane*, por sus siglas en inglés), localizado en la membrana externa mitocondrial, es el portal de entrada para casi todas las proteínas mitocondriales. TOM, está formado por tres receptores: Tom70, Tom20 y Tom22; tres subunidades pequeñas: Tom5, Tom6 y

Tom7, que juegan un rol importante durante la biogénesis y estabilidad del complejo, y Tom40, una proteína con estructura de barril-β que forma el poro por donde las proteínas mitocondriales son translocadas al interior del organelo (Figura 2, verde claro; Araiso *et al.*, 2019; Tucker & Park, 2019).

Los receptores de TOM están anclados en la membrana externa mitocondrial y exponen los dominios de unión a sustratos hacia el citosol. Estos receptores reciben a las proteínas mitocondriales mediante el reconocimiento de diversas secuencias señal. Mientras que Tom20 reconoce señales que dirigen proteínas hasta la matriz mitocondrial, Tom70 reconoce señales hidrofóbicas de proteínas cuyo destino es la membrana interna mitocondrial (Backes *et al.*, 2018; Brix, Dietmeier &

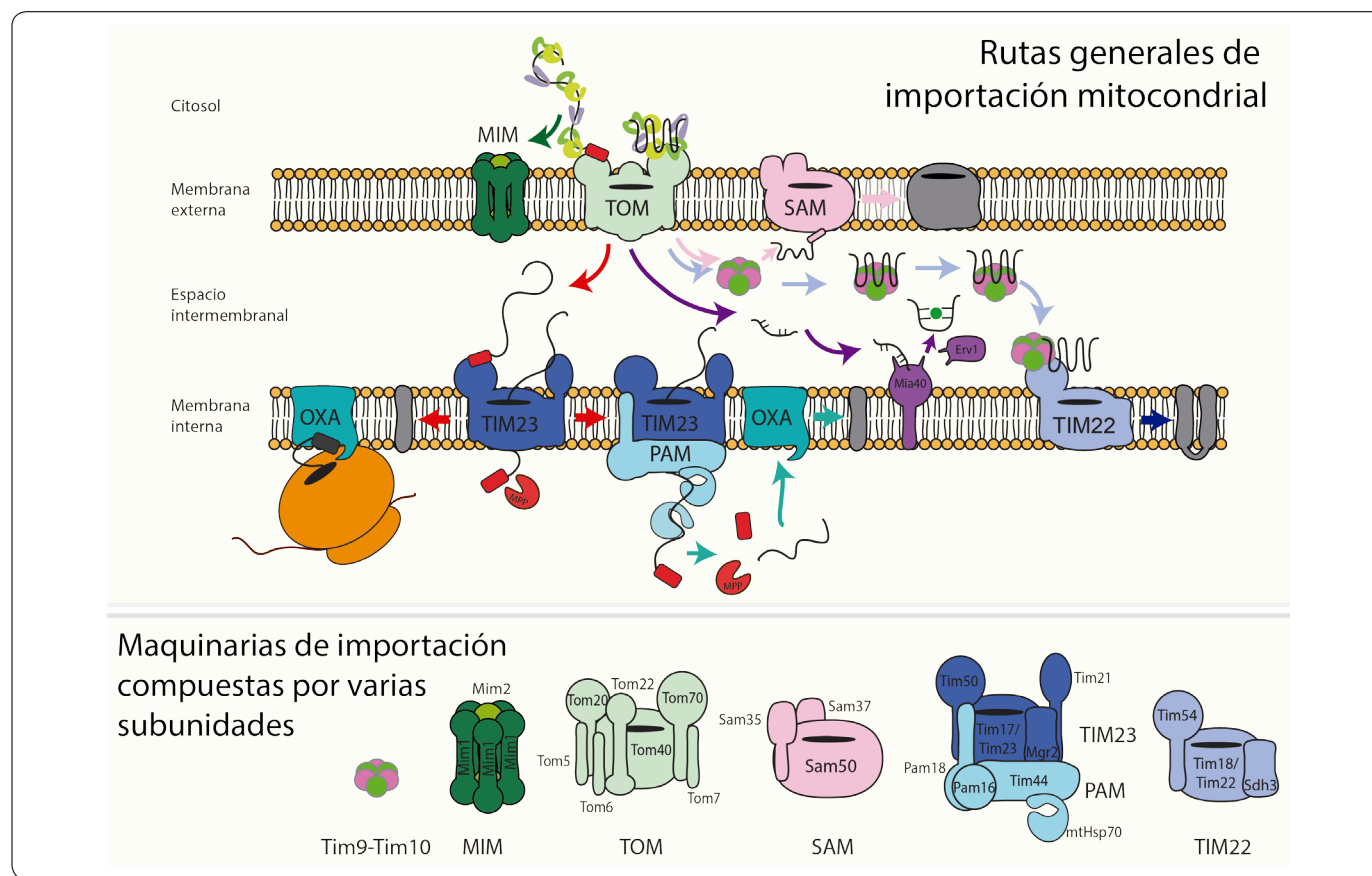


Figura 2. Rutas de transporte de las proteínas mitocondriales. Una vez que los precursores mitocondriales llegan hasta la periferia mitocondrial asociados a chaperonas, siguen diferentes rutas dependiendo del compartimento mitocondrial donde realizan su función. Las proteínas de la membrana externa mitocondrial tipo barril-β, atraviesan el complejo TOM y son recibidas por las pequeñas Tims que las dirigen al complejo SAM (flechas rosas). Las proteínas de la membrana externa mitocondrial, se anclan a la membrana directamente o utilizan el complejo MIM (flechas verde oscuro). Las proteínas del espacio intermembranal requieren de la proteína Mia40 para su importación (flechas moradas). Los precursores de la membrana interna mitocondrial que son transportadores de metabolitos usan el complejo TIM22 para su inserción, después de pasar por el complejo TOM (flechas azul claro). El complejo TIM23 participa en la importación de proteínas de la matriz mitocondrial (para esto se asocia con PAM) y de la membrana interna mitocondrial (flechas rojas). Finalmente, las proteínas sintetizadas en la mitocondria, son insertadas en la membrana interna mitocondrial por Oxa1. En el cuadro inferior se esquematizan las subunidades que constituyen cada uno de los complejos, sin embargo, los esquemas son sólo una representación gráfica. Los detalles estructurales se amplían en el texto y las Referencias. Elaboración personal.

Pfanner, 1997; Brix, Rudiger, Bukau, Scheneider-Mergener & Pfanner, 1999; Yamamoto *et al.*, 2009; Yamano *et al.*, 2008). Una vez que la proteína sustrato es reconocida por Tom20 o Tom70, esta es transferida al tercer receptor Tom22, cuyo papel es entregar a las proteínas al poro de translocación Tom40. Los sustratos cruzan la membrana externa mitocondrial a través de Tom40 y son recibidas en el espacio intermembranal por el extremo C-terminal de Tom22 (Mani, Rout, Desy & Schneider, 2017; Shiota, Mabuchi, Tanaka-Yamano, Yamano & Endo, 2011). De aquí en adelante, la proteína sustrato es entregada a otros complejos dentro de la mitocondria para su correcta distribución hacia el subcompartimento mitocondrial que será su destino final.

Recientemente, se han realizado esfuerzos por esclarecer la estructura y la estequiometría del complejo TOM en *Saccharomyces cerevisiae* y *Neurospora crassa*, así como en *Homo sapiens* (Araiso *et al.*, 2019; Bausewein *et al.*, 2017; Tucker & Park, 2019; Wang *et al.*, 2020). De manera general, el complejo TOM es un dímero formado por dos poros Tom40 que están unidos por dos subunidades Tom22, las subunidades pequeñas Tom5, Tom6 y Tom7 se ubican en la periferia del poro de Tom40 de forma que Tom6 y Tom7 se encuentran en posiciones opuestas. Asimismo, se plantea la posibilidad de algunos estados de oligomerización del complejo TOM, al sugerir una transición de dímero a trímero (Araiso *et al.*, 2019; Shiota *et al.*, 2015) o incluso la formación de un tetrámero (Bausewein *et al.*, 2017; Tucker & Park, 2019; Wang *et al.*, 2020). Ninguna de las estructuras reportadas contiene a los receptores Tom20 y Tom70; por lo que, una de las preguntas abiertas más importantes en cuanto a la organización de este complejo es si la asociación de estas dos subunidades es transitoria, o si existen subtipos de complejos TOM, según la clase de precursores mitocondriales a importar.

Pequeñas Tims, chaperonas del espacio intermembranal independientes de ATP

Las pequeñas Tims (pTims) son chaperonas localizadas en el espacio intermembranal que se unen a los precursores mitocondriales, evitando así que sus residuos hidrofóbicos queden expuestos al ambiente hidrofílico (Petrakis, Alcock & Tokatlidis, 2009; Wiedemann, Pfanner & Chacinska, 2006). Adicionalmente, las pTims participan en dirigir a estos precursores hacia la membrana externa o interna mitocondriales, donde los complejos proteicos SAM y TIM22, respectivamente, los insertan y ensamblan. Entre los sustratos de las pTims están: i) los transportadores de metabolitos como el transportador ADP/ATP (Curran, Leuenberger, Oppliger & Koehler, 2002; Endres, Neupert & Brunner, 1999; Koehler *et al.*, 1998; Sirrenberg *et al.*, 1998; Vasiljev *et al.*, 2004); ii) las proteínas tipo barril- β como Tom40 (Wiedemann *et al.*, 2004); y iii) la proteína Tim23, una subunidad del complejo TIM23 (Curran, Leuenberger, Oppliger & Koehler, 2002; Davis, Alder, Jensen & Johnson, 2007; Davis, Sepuri, Holder, Johnson & Jensen, 2000).

Las pTims son: Tim8, Tim9, Tim10, Tim12 y Tim13, las cuales forman complejos hexaméricos alternados. Aunque el complejo funcional predominante es Tim9₃-Tim10₃ que es esencial en la levadura *S. cerevisiae* (**Figura 2, hexámero verde y rosa**; Vergnolle *et al.*, 2005; Webb, Gorman, Lazarou, Ryan & Gulbis, 2006); existe también el complejo análogo Tim8₃-Tim13₃. Por otro lado, Tim12 forma un complejo con Tim9₃-Tim10₃, relevante para la unión con el complejo TIM22, que será mencionado más adelante (Koehler *et al.*, 1998; Sirrenberg *et al.*, 1998). Los complejos Tim9₃-Tim10₃ y Tim8₃-Tim13₃ pesan aproximadamente 60 kDa y su estructura está formada por α -hélices cuya forma se asemeja a una propela de 6 palas, donde cada una de las palas es una proteína Tim (Baker *et al.*, 2009; Beverly, Sawaya, Schmid & Koehler, 2008; Webb *et al.*, 2006). Cada pTim tiene un motivo de cisteínas CX₃CX_nCX₃C (donde 11 > n < 16), importante en la formación de dos puentes disulfuro relevantes para su función y su estructura (Koehler, 2004).

Las proteínas con estructura barril- β utilizan la vía de inserción mediada por SAM

Una particularidad de la mitocondria es la presencia de proteínas con estructura de barril- β en la membrana externa mitocondrial. Este tipo de proteínas también están presentes en las bacterias Gram-negativas y en la membrana externa de los cloroplastos (Chaturvedi & Mahalakshmi, 2017). Algunos ejemplos de barriles- β mitocondriales son el poro de translocación Tom40, la porina (también llamada VDAC), que es una proteína que permite el transporte de iones y metabolitos, la subunidad Mdm10 del complejo ERMES, involucrado en mediar contactos mitocondria-retículo endoplásmico (Fairman, Noinaj & Buchanan, 2011; Flinner *et al.*, 2013; Tucker & Park, 2019) y la subunidad Sam50 del complejo SAM, cuyo rol es la inserción de barriles- β en la mitocondria.

Insertar y plegar barriles- β en la membrana externa mitocondrial es un proceso costoso desde el punto de vista energético. El sistema de transporte de estos sustratos consta de tres pasos sucesivos que involucran a tres diferentes complejos proteicos (**Figura 2, flechas rosas**). En el primer paso, el precursor del barril- β llega al complejo TOM para ingresar a la mitocondria. El segundo paso, ocurre cuando el sustrato alcanza el espacio intermembranal y se asocia al complejo Tim9₃-Tim10₃ (Habib, Waizenegger, Lech, Neupert & Rapaport, 2005; Weinhäupl *et al.*, 2018). Finalmente, el tercer paso implica la entrega al complejo SAM del sustrato (*Sorting and Assembly Machinery*, por sus siglas en inglés), en la membrana externa mitocondrial (Gentle, Gabriel, Beech, Waller & Lithgow, 2004; Qiu *et al.*, 2013; Wenz *et al.*, 2015; Wiedemann *et al.*, 2003).

SAM está formado por tres subunidades, Sam35, Sam37 y Sam50. La subunidad Sam50 es el núcleo del complejo y adopta una estructura barril- β (Kozjak *et al.*, 2003; Stroud *et al.*, 2011). El modelo actual establece que Sam50 utiliza

su propia estructura para facilitar el plegamiento de otros barriles-β (Hohr *et al.*, 2018; Noinaj *et al.*, 2013). Sam35 y Sam37 son subunidades periféricas de SAM que se anclan a la membrana externa mitocondrial y quedan expuestas hacia el citosol. Sam35 funciona como receptor para los sustratos barril-β, mediante el reconocimiento de las señales-β en su extremo C-terminal (**Figura 3, caja rosa**; Chan & Lithgow, 2008; Habib *et al.*, 2007; Milenkovic *et al.*, 2004). Por su parte, Sam37 promueve la liberación de los barriles-β en la membrana externa mitocondrial una vez que han sido plegados correctamente (Chan & Lithgow, 2008). Adicionalmente, Sam37 promueve la asociación transitoria que ocurre entre TOM y SAM durante la biogénesis de los barriles-β (Qiu *et al.*, 2013; Wenz *et al.*, 2015). Esta asociación es una estrategia que minimiza el tiempo de exposición de los sustratos hidrofóbicos en el medio acuoso del espacio intermembranal. Finalmente, se ha sugerido que Sam37 podría funcionar, de manera similar a como lo hace Tom70, como un receptor para proteínas mitocondriales que deben ser translocadas al interior del organelo (Gratzer *et al.*, 1995; Ponce-Rojas *et al.*, 2017). La eliminación simultánea del gen *SAM37* con *TOM70* genera un fenotipo letal en la levadura

S. cerevisiae, lo cual sugiere que los dos receptores tienen papeles funcionales al menos, parcialmente redundantes. Sin embargo, también se ha observado que la asociación de Sam37 a TOM modifica ligeramente la afinidad de Tom70 por sus sustratos (Gratzer *et al.*, 1995). Por lo que es necesario realizar estudios adicionales para determinar hasta qué punto las funciones de Sam37 y Tom70 se sobrelapan, así como para determinar cómo la acción de uno modifica la especificidad del otro, durante el reconocimiento de las proteínas mitocondriales.

El complejo MIM inserta proteínas con cruces transmembranales a la membrana externa mitocondrial

Además de los barriles-β, existen proteínas mitocondriales con topología distinta en la membrana externa mitocondrial, ancladas por medio de uno o varios cruces transmembranales. Los cruces pueden localizarse tanto en el extremo amino como en el carboxilo terminal de las proteínas. Recientemente, se ha descrito que el complejo MIM (*Mitochondrial Import Machinery*, por sus siglas en inglés) promueve la inserción de este tipo de proteínas (**Figura 2, flecha verde oscuro**; Becker *et al.*, 2011; Papic, Krumpel, Dukanovic, Dimmer & Rapaport,



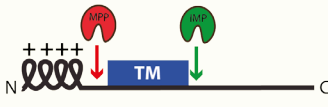






Tipo de señal	Maquinarias	Destino
Secuencias señal editables (Presecuencias α-hélices anfífilas) 	TOM TIM23 PAM	Matriz
Ancla hidrofóbica Señal de transferencia detenida 	TOM TIM23	Membrana interna Espacio intermembranal
Señal bipartita 	TOM TIM23	Espacio intermembranal
Señales no editables		
Señal tipo presecuencia no editable 	TOM TIM23	Membrana interna
Señales internas hidrofóbicas 	TOM TIM22	Membrana interna
Señal β 	TOM SAM	Membrana externa
Señal de anclaje en el N-terminal 	Receptores TOM MIM	Membrana externa
Señal de anclaje en el C-terminal 	Receptores TOM/SAM MIM	Membrana externa
Señales de retención en el espacio intermembranal ITS / MISS 	TOM TIM 9/10 Mia40	Espacio intermembranal

Figura 3. Señales de localización mitocondrial. Las proteínas mitocondriales tienen señales a lo largo de su secuencia de aminoácidos que les permiten ser identificadas. Los detalles se muestran en la figura. Elaboración personal.

2011). El complejo MIM, localizado en la membrana externa mitocondrial, está formado por múltiples copias de la proteína de un cruce transmembranal Mim1 que se asocian formando un poro de translocación, además de una o dos copias de la proteína Mim2 (Dimmer *et al.*, 2012; Kruger *et al.*, 2017). MIM funciona en tres modos distintos: i) en forma individual, participa en la inserción de proteínas que tienen un cruce transmembranal (Doan *et al.*, 2020); ii) asociado al receptor Tom70, facilitando así la inserción de proteínas con uno o varios cruces transmembranales; o iii) acoplado al complejo SAM, para en conjunto insertar a las subunidades pequeñas del complejo TOM y sus receptores Tom20 y Tom70 en la membrana externa mitocondrial (Becker *et al.*, 2008; Popov-Celeketić, Waizenegger & Rapaport, 2008). Es posible que en este último caso la participación de MIM con SAM también asegure un ensamblaje eficiente y coordinado del complejo TOM. Esta coordinación durante el ensamblaje del complejo TOM podría evitar que sus subunidades individuales se encuentren en puntos distantes dentro de la membrana externa mitocondrial y de esta manera, afecten la importación de proteínas. Otra pregunta abierta es si la proteína Tom40 puede actuar sin las otras subunidades del complejo TOM, lo que podría provocar un paso desregulado de proteínas entre el citosol y el espacio intermembranal.

El sistema de relevo oxidativo Mia40-Erv1 retiene proteínas en el espacio intermembranal y ayuda a su plegamiento

La oxidorreductasa Mia40 es una proteína anclada en la membrana interna mitocondrial en la levadura *S. cerevisiae*, pero en las plantas y en los mamíferos se trata de una proteína soluble (CHCHD4 en mamíferos, Backes & Herrmann, 2017). Todos los homólogos de Mia40 comparten una región central en la que hay seis residuos de cisteína invariables organizados en un motivo CPC y dos motivos CX₉C (donde X puede ser cualquier aminoácido). Mia40 recibe en el espacio intermembranal a las proteínas que ya cruzaron la membrana externa mitocondrial y establece enlaces disulfuro transitorios con las proteínas entrantes para evitar su regreso al citosol. Mia40 funciona también como chaperona al facilitar el plegamiento oxidativo de sus proteínas sustrato, ya que favorece el establecimiento de puentes disulfuro intramoleculares o la unión con iones divalentes (**Figura 2, flechas púrpura**; Backes & Herrmann, 2017; Stojanovski, Bragoszewski & Chacinska, 2012).

Las proteínas sustrato de Mia40 contienen residuos de cisteína en motivos CX₃C o CX₉C que son importantes, por un lado, para su retención en el espacio intermembranal, puesto que muchas de estas proteínas tienen una masa molecular pequeña y pueden entrar o salir de la mitocondria a través del complejo TOM (Stojanovski *et al.*, 2012); y, por otro lado, para los pasos posteriores de plegamiento oxidativo. Los sustratos contienen una secuencia señal de localización en el espacio intermembranal conocida como ITS o MISS, que se compone de 9 aminoácidos río arriba o río abajo de la cisteína importante para el anclaje. Esta secuencia señal forma una hélice

anfipática que expone residuos hidrofóbicos que se acoplan a una hendidura hidrofóbica en Mia40 (**Figura 3**; Milenkovic *et al.*, 2009; Sideris *et al.*, 2009).

Una vez que llega al espacio intermembranal, la proteína cliente forma un puente disulfuro transitorio con Mia40; paso inicial en el relevo redox entre ambas proteínas. Posteriormente, Mia40 se asocia tanto con el sustrato como con la proteína Erv1 para transferir los electrones liberados con la formación de los puentes disulfuro y permitir así la oxidación del precursor. Una vez oxidados, los sustratos son liberados en el espacio intermembranal y Mia40 queda en estado reducido. Para que un nuevo ciclo de importación comience, es necesario que Mia40 regrese a su estado oxidado. Esto se logra gracias a Erv1, que acepta los electrones de Mia40 reducida a través de la formación de nuevos puentes disulfuro. Finalmente, Erv1 transfiere los electrones a través del citocromo *c* a la cadena respiratoria, y, por lo tanto, al oxígeno, quien es el aceptor final de los electrones en el proceso. Es importante mencionar que la presencia del glutatión en el espacio intermembranal es necesaria para crear un ambiente que favorezca la formación de los puentes disulfuro (Bien *et al.*, 2010).

Los transportadores de metabolitos se insertan mediante TIM22 en la membrana interna mitocondrial

TIM22 (*Translocase of the Inner Membrane*, por sus siglas en inglés) es un complejo presente en la membrana interna mitocondrial encargado de insertar y ensamblar a los transportadores de metabolitos, en este mismo compartimento mitocondrial (Endres *et al.*, 1999; Gomkale *et al.*, 2020; Kubrich, Rassow, Voos, Pfanner & Honlinger, 1998; Rampelt *et al.*, 2020; Sirrenberg, Bauer, Guiard, Neupert & Brunner, 1996). El complejo TIM22 está formado por tres subunidades: Tim22, la cual forma el poro de translocación (Kubrich *et al.*, 1998; Sirrenberg *et al.*, 1996); Tim54, el receptor del complejo (Kerscher, Holder, Srinivasan, Leung & Jensen, 1997) y Tim18 que, además de mediar la inserción de las proteínas en la membrana interna mitocondrial, también promueve el ensamblaje y da estabilidad al complejo (Kerscher, Sepuri & Jensen, 2000; Koehler *et al.*, 2000). Se ha observado que la proteína succinato deshidrogenasa 3 (Sdh3) interacciona con Tim18 y favorece el ensamblaje del complejo TIM22 (Gebert *et al.*, 2011).

Los complejos TOM y TIM22 trabajan en forma conjunta en cinco pasos que se describen a continuación (**Figura 2, flechas lavanda**; Pfanner & Neupert, 1987; Rehling, Brandner & Pfanner, 2004): i) el precursor mitocondrial es llevado hasta el complejo TOM por chaperonas presentes en el citosol (Young, Hoogenraad & Hartl, 2003) donde ii) interacciona con el receptor Tom70, que reconoce las secuencias internas en los precursores (Brix *et al.*, 2000; Wiedemann, Pfanner & Ryan, 2001; Young *et al.*, 2003), iii) al cruzar la membrana externa mitocondrial, el sustrato es recibido por las chaperonas Tim9₃-Tim10₃ que

lo entregan al complejo TIM22 (Koehler *et al.*, 1998; Murphy, Leuenberger, Curran, Oppliger & Koehler, 2001), en este paso es importante la participación de la chaperona Tim12 (Koehler *et al.*, 1998; Sirrenberg *et al.*, 1996), ya que ésta facilita que Tim54 reconozca a la proteína sustrato, iv) el precursor es insertado y ensamblado en el poro del complejo aunque este proceso no se ha estudiado con gran detalle (Rehling *et al.*, 2004); y finalmente v) la proteína es liberada lateralmente e insertada en la membrana interna mitocondrial.

Las proteínas que son clientes del complejo TIM22, también presentan señales de localización mitocondrial caracterizadas por 6 cruces transmembranales de aproximadamente 10 aminoácidos cada uno; estas señales están integradas a la proteína y no son editables (**Figura 3**; Chacinska, Koehler, Milenkovic, Lithgow & Pfanner, 2009).

Las proteínas cuyo destino es la matriz mitocondrial utilizan la ruta TIM23-PAM

El segundo complejo translocador de proteínas situado en la membrana interna mitocondrial es TIM23 (**Figura 2, azul**; *Translocase of the Inner Membrane*, por sus siglas en inglés), quien se encarga de facilitar la translocación de las proteínas que residen en la matriz mitocondrial o de insertarlas en la membrana interna, de una manera dependiente del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$; Callegari, Cruz-Zaragoza & Rehling, 2020; Mokranjac & Neupert, 2010; Schulz, Schendzielorz & Rehling, 2015). El potencial de membrana mitocondrial es un gradiente electroquímico que se establece a través de la membrana interna tanto por el paso de protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembranal, por los complejos I, III y IV de la cadena respiratoria, así como por el paso de los electrones derivados de las reacciones de óxido-reducción del ciclo de Krebs. El gradiente de protones es aprovechado también para la síntesis de ATP (Zorova *et al.*, 2018; Rich & Maréchal, 2010).

TIM23 está formado por las siguientes subunidades: Tim17 y Tim23 que forman el poro de translocación (Dekker, *et al.*, 1993; Kubrich *et al.*, 1994; Maarse, Blom, Keil, Pfanner & Meijer, 1994); Tim50, es el receptor que reconoce las presecuencias de los precursores que provienen del complejo TOM (Geissler *et al.*, 2002; Mokranjac *et al.*, 2003; Mokranjac *et al.*, 2009; Yamamoto *et al.*, 2002) y regula también la permeabilidad del poro formado por Tim23-Tim17 (Meinecke *et al.*, 2006) y Tim21, que es una proteína integral de membrana (Chacinska *et al.*, 2005; Mokranjac, Popov-Celeketić, Hell & Neupert, 2005) capaz de interactuar con el complejo TOM a través del receptor Tom22 (Albrecht *et al.*, 2006; Chacinska *et al.*, 2005). Además, Tim21 participa en la asociación del complejo TIM23 con los complejos de la cadena respiratoria (van der Laan *et al.*, 2006). Así, al crearse un potencial de membrana localizado, se facilita la translocación electroforética de las presecuencias y, por tanto, del resto de la proteína entrante.

Los precursores que se dirigen hacia la matriz mitocondrial contienen una presecuencia y utilizan la llamada “ruta de la presecuencia” (en inglés *Presequence Pathway*), que requiere el acoplamiento de TIM23 con el complejo motor PAM (**Figura 2, azul cielo**; *Presequence translocase-Associated Motor*, por sus siglas en inglés; Berthold *et al.*, 1995; Mokranjac, 2020). Esta presecuencia llamada MTS (*Matrix Targeting Sequence*, por sus siglas en inglés; **Figura 3**) está en el extremo N-terminal de las proteínas y se caracteriza por ser una alfa-hélice anfipática, con una cara cargada positivamente y la otra con aminoácidos hidrofóbicos; es de longitud variable, aunque generalmente está formada por 20-50 aminoácidos (von Heijne, 1986).

La función de PAM es promover la translocación de las proteínas sustrato a la matriz mitocondrial mediante el consumo de ATP. TIM23 y PAM se asocian a través de la proteína Tim44 (Maarse, Blom, Grivell & Meijer, 1992) que a su vez sirve como andamio para la chaperona dependiente de ATP mtHsp70/Ssc1, el primer componente de PAM (Kang *et al.*, 1990; Kronidou *et al.*, 1994; Rassow *et al.*, 1994; Schneider *et al.*, 1994). mtHsp70 a su vez requiere de las cochaperonas Pam18 (D’Silva, Schilke, Walter, Andrew & Craig, 2003; Truscott *et al.*, 2003) y Pam16 (Frazier *et al.*, 2004) así como del factor de recambio de nucleótidos Mge1 (Miao, Davis & Craig, 1997). De esta forma, cuando un precursor atraviesa el complejo TIM23, se asocia a la mtHsp70 a través del dominio de unión al sustrato, mientras que el dominio de unión a nucleótidos, se une al ATP; acto seguido las proteínas Pam18 y Pam16 favorecen la hidrólisis del ATP y Mge1 intercambia el ADP por ATP, permitiendo la liberación del precursor y así, comienza un nuevo ciclo. Cada uno de estos ciclos de unión-liberación, permite la translocación de las proteínas hacia la matriz mitocondrial. Una vez que el precursor ingresa a la matriz mitocondrial, su MTS es eliminada por la proteasa de la matriz mitocondrial MPP (*Mitochondrial Processing Peptidase*, por sus siglas en inglés; Hawlitschek *et al.*, 1988), para que el sustrato alcance su estado maduro y adquiera el plegamiento apropiado para su función. Existe otra subunidad accesoria, Pam17, a la que se le ha adjudicado la función de estabilizar la unión de Pam18-Pam16 y de esta forma, promover la asociación con Tim23 y Tim17 (van der Laan *et al.*, 2005).

Como se mencionó anteriormente, las presecuencias dirigen a las proteínas hacia la matriz mitocondrial, sin embargo, pueden acompañarse de otros motivos que son interpretados por TIM23 y que determinan que el destino de un precursor no sea precisamente la matriz mitocondrial. Lo anterior acontece cuando una MTS es seguida de un cruce transmembranal que funciona como un ancla hidrofóbica (**Figura 3**). En este caso la señal indica que las proteínas deben ser insertadas en la membrana interna mitocondrial en un proceso denominado “transferencia detenida” (en inglés *Stop Transfer*; Glick *et al.*, 1992; van der Laan *et al.*, 2007). En estos casos, la MTS se expone a la matriz; sin embargo, el cruce transmembranal se retiene en

el canal de TIM23 y la proteína es liberada lateralmente con ayuda de la proteína Mgr2 (Ieva *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2020; Matta, Kumar & D'Silva, 2020). Ejemplos de proteínas que siguen esta ruta de importación son los citocromos c_1 y b_2 (Glick *et al.*, 1992). Una modificación de este proceso permite liberar a la proteína madura directamente al espacio intermembranal, cuando después del cruce transmembranal existe una secuencia de corte que es reconocida por las proteasas de la membrana interna mitocondrial (Gakh, Cavadini & Isaya, 2002). Por tener dos sitios de corte, este tipo de señales se conocen como señales bipartitas (**Figura 3**) como es el caso de la proteína Smac/Diablo (Burri *et al.*, 2005).

En ocasiones, los sustratos contienen más de un cruce transmembranal y, en estos casos, el segundo cruce es el que indica que se debe detener la importación, para que la proteína pueda ser liberada lateralmente a la membrana. Cuando esto ocurre, el primer cruce llega hasta la matriz mitocondrial y, posteriormente, se inserta en la membrana interna mitocondrial mediante un mecanismo llamado “distribución conservada” (en inglés *Conservative Sorting*) utilizando a la maquinaria Oxa1 (ver sección siguiente; Hartl, Schmidt, Wachter, Weiss & Neupert, 1986; Hell, Herrmann, Pratje, Neupert & Stuart, 1998; Herrmann, Neupert & Stuart, 1997). Es importante considerar que existen proteínas sustratos que utilizan tanto la “distribución conservada” como la “transferencia detenida” para alcanzar su topología final; como sucede para la proteína Mdl1, que ilustra la cooperación que existe entre los diferentes componentes de los sistemas de transporte de proteínas mitocondriales (Bohnert *et al.*, 2010).

Oxa1 inserta en la membrana interna mitocondrial proteínas codificadas en el genoma mitocondrial

La translocasa Oxa1 es un miembro de la familia YidC/Oxa1/Alb3, presente en bacterias, mitocondrias y cloroplastos, respectivamente, por lo que se presume que los integrantes de esta familia están presentes en los organelos que fueron heredados de las bacterias endosimbiontes que les dieron origen. Los tres homólogos tienen una región central conservada de cinco cruces transmembranales esencial para insertar y plegar a las proteínas membranales (Funes, Kauff, van der Sluis, Ott & Herrmann, 2011).

Localizada en la membrana interna mitocondrial, Oxa1 interacciona con proteínas recién importadas por el complejo TIM23 hasta la matriz y facilita su inserción en la membrana interna mitocondrial en una reacción de exportación, es decir, desde la matriz hacia la membrana interna mitocondrial (**Figura 2, turquesa**; Hell *et al.*, 1998). Además, media la inserción de proteínas codificadas en el genoma mitocondrial, al facilitar la asociación de los ribosomas mitocondriales con la membrana interna mitocondrial, en un proceso denominado inserción cotraduccional, ya que la síntesis de la proteína y la inserción suceden de forma simultánea. Este proceso requiere la presencia

de otras proteínas como Mba1, Mdm38 y Mrx15 para asegurar el anclaje del ribosoma con la membrana interna mitocondrial (Bauerschmitt *et al.*, 2010; Möller-Hergt, Carlström, Stephan, Imhof & Ott, 2018; Pfeffer, Woellhaf, Herrmann & Förster, 2015; Preuss, Ott, Funes, Luirink & Herrmann, 2005). La función de Oxa1 repercute indirectamente en la biogénesis de otros sustratos mitocondriales; esto se debe a que Oxa1 es necesaria para el ensamblaje del módulo Tim18-Sdh3 y, por tanto, la ausencia de Oxa1 compromete la inserción en la membrana interna de los transportadores de metabolitos dependientes de TIM22 (Hildenbeutel *et al.*, 2012; Stiller *et al.*, 2016).

RESPUESTAS CELULARES A FALLAS EN LOS SISTEMAS DE TRANSPORTE E IMPORTACIÓN DE LAS PROTEÍNAS MITOCONDRIALES

Dado que la importación de las proteínas a la mitocondria es un proceso complejo que implica diferentes pasos que van desde la síntesis, pasando por el transporte, la importación y la ubicación en el compartimento mitocondrial correspondiente, está sujeto a fallas. Sin embargo, existen respuestas celulares que ayudan a contrarrestar estas alteraciones. En esta sección, se mencionan las principales características de las respuestas celulares activadas cuando ocurren alteraciones en los sistemas de transporte de las proteínas mitocondriales; un campo de investigación muy activo en los últimos años. Es importante mencionar que, en general, estas respuestas implican cambios tanto transcripcionales como traduccionales en la célula; es decir, se activan factores de transcripción que inducen la expresión de los genes relacionados con las respuestas al estrés; al tiempo que disminuye la síntesis de proteínas no requeridas (Boos *et al.*, 2019).

Cualquier alteración en los sistemas de transporte implica la acumulación de precursores mitocondriales en el citosol o en el poro de translocación Tom40. Un ejemplo del primer caso es la UPRam o mPOS (*Unfolded Protein Response activated by mistargeting of proteins* o *mitochondrial Precursor Over-accumulation Stress*, por sus siglas en inglés respectivamente; Wang & Chen, 2015; Wrobel *et al.*, 2015), ocasionada por alteraciones en el funcionamiento de Mia40 y cuyo resultado es un incremento en la actividad del proteosoma (la maquinaria encargada de la degradación de las proteínas en el citosol) y una reprogramación traduccional (**Figura 4, lado izquierdo, flechas azules claras**). En el segundo caso, la respuesta se llama mTAD (*Mitochondrial protein Translocation-Associated Degradation*, por sus siglas en inglés), caracterizada por la detección de la oclusión del complejo TOM por parte de la proteína Ubx2, que recluta a la AAA-ATPasa Cdc48 y remueve al precursor para su posterior degradación vía el proteosoma (**Figura 4, lado izquierdo, flechas negras**; Mårtensson *et al.*, 2019). Estudios recientes han mostrado que Ubx2 también favorece el marcaje por ubiquitinación de las proteínas mitocondriales que por aumentos en la temperatura no son funcionales y, por lo tanto, no son importadas a la

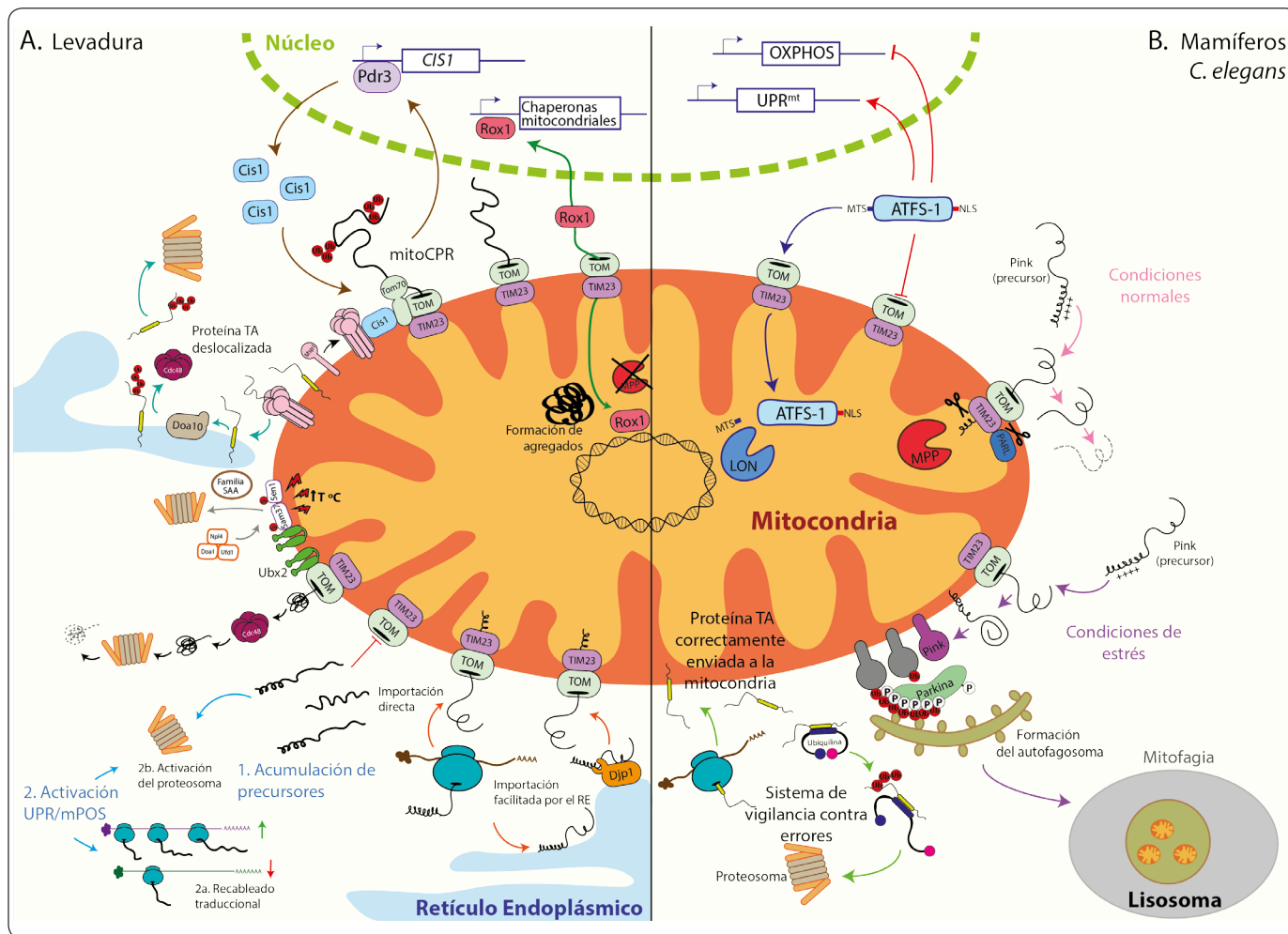


Figura 4. Respuestas celulares a fallas en los sistemas de transporte y disfunción mitocondrial. A. Levadura *Sacharomyces cerevisiae* *Rox1* (rojo fucsia) es un factor de transcripción que al fallar la proteasa *Mpp1* (rojo) se dirige al núcleo y promueve la transcripción de las chaperonas mitocondriales (flechas verdes). Fallas en las maquinarias de importación, como la obstrucción de TOM, inician diferentes respuestas: por un lado el reclutamiento de la proteína *Msp1*, que extrae al precursor para ser degradado (flechas cafés) y por otro la intervención de *Cdc48* (rojo vino), reclutada por *Ubx2* (verde limón), para extraer el precursor atascado del canal de TOM (flechas negras). La acumulación de precursores en el citosol ocasiona un reprogramado de la traducción para incrementar la síntesis de proteínas del proteosoma a través de UPRam/mPOS (flechas azules claras). Las alteraciones en las proteínas por cambios en la temperatura son detectados por *Ubx2* (verde limón), que recluta al sistema *Doa1-Ufd1-Npl4* y marca con ubiquitina (rojo cereza) a las proteínas dañadas para su posterior degradación (flechas grises). Las fallas en la distribución de las proteínas, tienen sus sistemas correctivos: las proteínas con topología TA del retículo endoplásmico, pero que se encuentran erróneamente en la mitocondria son re-localizadas por *Msp1* (rosado claro) al retículo endoplásmico, donde son ubiquitinadas y retiradas para su degradación (flechas turquesas). Por su parte, las proteínas mitocondriales pueden ser dirigidas de forma errónea al retículo endoplásmico, sin embargo, *Djp1* (naranja) es capaz de redirigirlas a la mitocondria (flechas naranjas). **B. Mamíferos y *C. elegans***. La respuesta mitocondrial a proteínas mal plegadas o *mtUPR*, se caracteriza por la localización dual (mitocondrial/nuclear) de *ATFS-1* (azul claro): cuando hay fallas en la mitocondria, *ATFS-1* se dirige al núcleo para promover la transcripción de genes que ayuden a contrarrestar la falla (flechas azules y rojas). *PINK* es una proteína mitocondrial que en condiciones de estrés se encuentra en la membrana externa mitocondrial y desde allí dirige una cascada de eventos junto con *Parkina* (fosforilación y ubiquitinación; verde pistacho), que actúa como señal para reclutar a la maquinaria autofágica (flechas rosadas y moradas). Las ubiquilinas (azul ultramar), son chaperonas citosólicas que reconocen a las proteínas con topología TA que no son dirigidas correctamente a la mitocondria, redirigen a estas proteínas o las marcan para su degradación (flechas verdes limón). Elaboración personal.

mitocondria. La función de Ubx2 requiere del reclutamiento de las proteínas Doa1-Ufd1-Npl4. Los sustratos no funcionales son ubiquitinados por Ubx2 una vez que fueron reconocidos por las chaperonas de la familia SSA y Sis1 (**Figura 4, lado izquierdo, flechas grises**; Metzger, Scales, Dunkleberger, Loncarek & Weissman, 2020).

Otra alteración en el sistema de importación ocurre cuando la peptidasa MPP no funciona adecuadamente e impide la correcta maduración de los precursores y el inicio de una respuesta temprana a proteínas mal plegadas, ya que se generan agregados proteicos en la matriz mitocondrial. Esta respuesta ocasiona que el factor de transcripción Rox1 sea importado a la mitocondria para unirse al ADN mitocondrial y, de esta forma, se asegure la relación funcional coordinada mitocondria-núcleo (**Figura 4, lado izquierdo, flechas verdes**; Poveda-Huertes *et al.*, 2020).

Otra proteína capaz de retirar precursores atrapados en Tom40 es Msp1, una AAA-ATPasa presente en la membrana externa mitocondrial. Alteraciones en el potencial electroquímico transmembranal ($\Delta\Psi$) pueden afectar la translocación de los precursores a través de Tom40 y bloquearlo. Msp1 es capaz de retirar al precursor que obstruye a Tom40 y dirigirlo a su degradación por el proteosoma (**Figura 4, lado izquierdo, flechas cafés**; Basch *et al.*, 2020; Weidberg & Amon, 2018). Es importante mencionar que, para el caso de las proteínas con una señal bipartita, el paso de extracción requiere a la proteína Cis1, esta respuesta particular se denomina mitoCPR (*mitochondria Compromised Protein-import Response*, por sus siglas en inglés; Weidberg & Amon, 2018). El rol de Msp1 va más allá de rescatar a Tom40 de precursores atrapados, también es capaz de identificar proteínas del retículo endoplásmico que han sido insertadas erróneamente en la membrana externa mitocondrial y llevarlas a su destino original, donde son ubiquitinadas y extraídas por Cdc48 para su posterior degradación por el proteosoma (**Figura 4, lado izquierdo, flechas turquesas**; Dederer *et al.*, 2019; Matsumoto *et al.*, 2019).

Los errores en la distribución de las proteínas hacia los organelos incorrectos abarcan más ejemplos que el mencionado anteriormente. En ocasiones algunas proteínas mitocondriales pueden ser dirigidas erróneamente al retículo endoplásmico; en donde la proteína Djpl (localizada en la membrana del propio retículo) es capaz de reconocerlas y redirigirlas a la mitocondria para que continúen su proceso de importación y ensamblaje (**Figura 4, lado izquierdo, flechas naranjas**; Hansen *et al.*, 2018). Este mecanismo se denomina ER-SURF (*Endoplasmic Reticulum SURFace retrieval pathway*, por sus siglas en inglés). Otras proteínas, como las ubiquilinas de mamíferos, reconocen proteínas mitocondriales con topología TA (*Tail-Anchored*, por sus siglas en inglés; proteínas ancladas por un segmento transmembranal en su extremo C-terminal) que no fueron correctamente integradas en la membrana externa mitocondrial;

las ubiquilinas son capaces de redirigirlas o marcarlas para su posterior degradación (**Figura 4, lado derecho, flechas verde limón**; Itakura *et al.*, 2016).

En mamíferos también existen respuestas celulares por daño mitocondrial. El sistema más conocido es el par PINK1/Parkina, proteínas descubiertas en pacientes con enfermedad de Parkinson (Kitada *et al.*, 1998; Valente *et al.*, 2001), una enfermedad neurodegenerativa relacionada fuertemente con disfunción mitocondrial (Abou-Sleiman, Muqit & Wood, 2006). PINK1 es una cinasa que actúa como sensor del daño mitocondrial, generalmente ocasionado por una disminución en el potencial de membrana. Su función es fosforilar ubiquitinas previamente añadidas a proteínas de la membrana externa mitocondrial por Parkina. La acción conjunta de PINK1/Parkina genera ciclos de ubiquitinación-fosforilación en algunas proteínas de la membrana externa mitocondrial; estos ciclos funcionan como señal para el reclutamiento de la maquinaria autofágica y llevar a la mitocondria a su degradación en un proceso denominado mitofagia (**Figura 4, lado derecho, flechas rosas y moradas**; Nguyen, Padman & Lazarou, 2016; Yamano, Matsuda & Tanaka, 2016).

Uno de los factores de transcripción clave en la respuesta mitocondrial a proteínas mal plegadas es ATFS-1 en *Caenorhabditis elegans* (Nargund, Pellegrino, Fiorese, Baker & Haynes, 2012) o ATF5 en mamíferos (Zhao *et al.*, 2002). Este factor de transcripción tiene tanto una señal de localización mitocondrial como una de localización nuclear. En condiciones de homeostasis mitocondrial, ATFS-1 es importado hasta la matriz donde es degradado. Por el contrario, cuando hay un daño en la función mitocondrial que se refleja en la disminución del $\Delta\Psi$, ATFS-1 se acumula en el citosol y es translocado al núcleo para activar la transcripción de genes que permiten contrarrestar la disfunción en este organelo (**Figura 4, lado derecho, flechas azules y rojas**; Melber & Haynes, 2018; Qureshi, Haynes & Pellegrino, 2017). Entre los genes cuya expresión es inducida por ATFS-1 se encuentran chaperonas, proteasas y componentes de la maquinaria de importación mitocondrial (Lin *et al.*, 2016; Nargund, Fiorese, Pellegrino, Deng & Haynes, 2015; Nargund *et al.*, 2012).

ENFERMEDADES ASOCIADAS A DEFECTOS DE IMPORTACIÓN DE PROTEÍNAS MITOCONDRIALES

La mayor parte del conocimiento que tenemos sobre el funcionamiento y regulación de las maquinarias de importación de proteínas a la mitocondria proviene de estudios en organismos modelo. Sin embargo, se han identificado algunas enfermedades en humanos con mutaciones en componentes específicos de las maquinarias de importación, por lo que se ha planteado que los síntomas desarrollados son consecuencia de alteraciones durante la identificación y distribución de las proteínas mitocondriales. Hasta ahora, la mayoría de los reportes se limitan a describir la enfermedad y no ha sido posible comprender los detalles

del mecanismo que subyace en el desarrollo de los síntomas observados. Es fundamental entender cómo las mutaciones actualmente identificadas afectan la importación de proteínas a la mitocondria, con el fin de proponer terapias para el tratamiento de estas patologías.

Enfermedades asociadas a la vía TOM-TIM23

Debido a que la mayor parte del proteoma mitocondrial reside en la membrana interna y en la matriz, muchas de las enfermedades mitocondriales descritas hasta este momento están asociadas con defectos en la importación de proteínas cuya translocación o inserción depende de TIM23 (Tabla I).

La cardiomiopatía dilatada con ataxia DCMA (*Dilated CardioMyopathy with Ataxia*, por sus siglas en inglés) es una enfermedad que está relacionada con mutaciones en el gen *DNAJC19* cuyo correspondiente en *S. cerevisiae* es *PAM18* (Al Teneji, Siriwardena, George, Mital & Mercimek-Mahmutoglu, 2016; Davey *et al.*, 2006; Ojala *et al.*, 2012). Esta enfermedad

es autosómica recesiva y se caracteriza por la presencia de cardiomiopatía y ataxia desde la niñez (la ataxia es la incapacidad de coordinar movimientos voluntarios asociada con daño neural). A nivel molecular, la enfermedad causa una disminución en el contenido de las proteínas mitocondriales y en la actividad de los complejos de la fosforilación oxidativa, presuntamente, como resultado de la disminución en la importación de proteínas a la mitocondria. De manera similar a *DNAJC19*, mutaciones en el gen *MAGMAS*, el ortólogo en levadura de *PAM16*, provocan la displasia SMDMDM (*Spondylo Metaphyseal Dysplasia Megarbane-Dagher-Melki*, por sus siglas en inglés; Mehawej *et al.*, 2014; Short *et al.*, 2012; Sinha, Joshi, Chiittoor, Samji & D’Silva, 2010). Esta enfermedad se caracteriza por distrofia muscular severa y defectos en el crecimiento y el desarrollo.

La encefalopatía epiléptica mitocondrial ha sido relacionada con mutaciones en la subunidad Tim50 del complejo TIM23 (Shahrouf *et al.*, 2017; Tort *et al.*, 2019). Esta enfermedad

Tabla I. Enfermedades en humanos que se han asociado con mutaciones en las maquinarias de importación de proteínas a la mitocondria.

Patología	Ruta de Importación	Gen afectado en humanos	Gen ortólogo en levaduras	Referencias
Cardiomiopatía dilatada con ataxia (DCMA)	TOM-TIM23	DNAJC19	<i>PAM18</i>	Davey <i>et al.</i> , 2006 Ojala <i>et al.</i> , 2012 Al Teneji <i>et al.</i> , 2016
Displasia SMDMDM		MAGMAS	<i>PAM16</i>	Sinha <i>et al.</i> , 2010 Short <i>et al.</i> , 2012 Mehawej <i>et al.</i> , 2014
Encefalopatía epiléptica mitocondrial		TIM50	<i>TIM50</i>	Shahrouf <i>et al.</i> , 2017 Tort <i>et al.</i> , 2019
Ataxia espinoocerebelar recesiva autosómica		PMPCA	<i>MAS2</i>	Choquet <i>et al.</i> , 2016 Jobling <i>et al.</i> , 2015
Enfermedad de Parkinson		TOMM20	<i>TOM20</i>	Di Maio <i>et al.</i> , 2016 Devi <i>et al.</i> , 2008 Franco-Iborra <i>et al.</i> , 2018
Enfermedad de Huntington		TIMM23	<i>TIM23</i>	Yablonska <i>et al.</i> , 2019 Yano <i>et al.</i> , 2014
Síndrome de distonía y sordera humana	TOM-TIM22	DDP1	<i>TIM8</i>	Koehler <i>et al.</i> , 1999 Tranebjaerg <i>et al.</i> , 1995
Síndrome de Sengers		AGK		Kang <i>et al.</i> , 2017 Vukotic <i>et al.</i> , 2017 Aldahmesh <i>et al.</i> , 2012 Mayr <i>et al.</i> , 2012 Calvo <i>et al.</i> , 2012 Bektas <i>et al.</i> , 2005
Miopatía	MIA	ALR	<i>ERV1</i>	Ceh-Pavia <i>et al.</i> , 2014 Sztolsztener <i>et al.</i> , 2013 Di Fonzo <i>et al.</i> , 2009

está asociada con defectos en la función de la ATP sintasa, posiblemente derivado de la disminución en la función de TIM23 y en los defectos de importación de las subunidades que participan en la fosforilación oxidativa.

Otra enfermedad relacionada con la ruta TOM-TIM23 es la ataxia espinocerebelar recesiva autosómica, ocasionada por mutaciones en el gen *PMPCA*, que codifica para la subunidad α de la proteasa de la matriz MPP en humanos (Choquet *et al.*, 2016; Jobling *et al.*, 2015). Uno de los sustratos identificados con un procesamiento anormal resultado de estas mutaciones es la frataxina, proteína involucrada en la formación de centros hierro-azufre en la mitocondria y cuya alteración se asocia con la ataxia de Friedreich (Joshi *et al.*, 2016). De manera similar, las mutaciones en el gen *PMPCB*, que codifica para la subunidad β de la MPP, se han relacionado con la neurodegeneración durante la infancia (Vögtle *et al.*, 2018). Es probable que en estos casos exista un procesamiento deficiente de las MTS mitocondriales, que desencadena tanto una respuesta a proteínas mal plegadas, como la retención de los precursores mitocondriales en los complejos TOM y TIM23, comprometiendo así la importación de otros sustratos mitocondriales.

La vía de importación TOM-TIM23 también está afectada en neuropatologías. En la enfermedad de Parkinson se encontró que versiones de la α -sinucleína modificadas postraduccionalmente, inducen su interacción con el receptor Tom20 en las mitocondrias de las neuronas, tanto en modelos murinos como en muestras del tejido cerebral de pacientes (Di Maio *et al.*, 2016); y esta asociación se correlaciona con una disminución en los complejos respiratorios, particularmente del complejo I (Devi, Raghavendran, Prabhu, Avadhani & Anandatheerthavarada, 2008; Franco-Iborra *et al.*, 2018). Es probable que la asociación de la α -sinucleína con Tom20 comprometa su asociación con otros sustratos de importación. Estos hallazgos podrían explicar la disfunción mitocondrial previamente descrita en la enfermedad de Parkinson. En la enfermedad de Huntington se ha propuesto un modelo similar de patogénesis, donde la proteína huntingtina mutante es capaz de asociarse al complejo TIM23 e inhibir su función (Yablonska *et al.*, 2019; Yano *et al.*, 2014).

Enfermedades asociadas a la vía TOM-TIM22

El síndrome de distonía (contracción muscular involuntaria) y sordera humana DDS (*human Deafness Distonia Syndrome*, por sus siglas en inglés), está ligado al cromosoma X y es ocasionado por mutaciones en el gen *DDPI*, que codifica a una proteína equivalente a Tim8 de *S. cerevisiae*, una de las chaperonas del espacio intermembranal (Koehler *et al.*, 1999; Tranebjaerg *et al.*, 1995). Las mutaciones en *DDPI* comprometen la función mitocondrial, posiblemente por el deterioro en la importación de proteínas a la mitocondria. El papel fundamental de las chaperonas del espacio intermembranal en las diversas rutas de importación podría explicar el fenotipo pleiotrópico encontrado

en pacientes con este síndrome, que incluyen retraso mental, pérdida de la audición y ceguera (Jin *et al.*, 1996).

El síndrome de Sengers es causado por mutaciones en el gen *AGK*, que codifica para la acil glicerol cinasa mitocondrial (Aldahmesh, Khan, Mohamed, Alghamdi & Alkuraya, 2012; Calvo *et al.*, 2012; Mayr *et al.*, 2012). Entre los síntomas de esta enfermedad se encuentran la cardiomiopatía hipertrófica, cataratas congénitas, acidosis láctica e intolerancia al ejercicio. Aunque inicialmente esta enzima se relacionó con la síntesis del ácido fosfatídico, recientemente se descubrió como una subunidad adicional del complejo TIM22 en humanos (Bektas *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2017; Vukotic *et al.*, 2017). La observación de que existe una disminución de los transportadores de metabolitos en la membrana interna mitocondrial en pacientes con síndrome de Sengers, refuerza la idea de que esta enfermedad está relacionada con defectos en la importación mediada por el complejo TIM22 (Kang *et al.*, 2017). A pesar de esto, aún no se ha dilucidado la relevancia del gen *AGK* en el desarrollo de la enfermedad de Sengers. Hasta este punto no se puede determinar si el rol de *AGK* ocurre sobre la biogénesis, la degradación, la estabilidad o la función de los transportadores de metabolitos en la membrana interna.

Enfermedades asociadas a la vía de MIA

Las mutaciones en el gen *ALR*, homólogo en *S. cerevisiae* del gen *ERV1*, provocan un cuadro patológico que incluye miopatía y cataratas (Di Fonzo *et al.*, 2009). Debido al papel de ALR/Erv1 en la vía de importación de proteínas al espacio intermembranal, es posible que la biogénesis de Mia40 esté afectada y, en consecuencia, también la importación de los sustratos que emplean esta vía (Ceh-Pavia, Ang, Spiller & Lu, 2014; Sztolsztener, Brewinska, Guiard & Chacinska, 2013).

Avances terapéuticos para el tratamiento de enfermedades mitocondriales

La terapia genética es una alternativa estudiada para curar enfermedades mitocondriales. En la actualidad, estas terapias se basan en el uso de vectores adeno-virales (VAVs) que permiten expresar un gen en un órgano blanco. Este tipo de terapias son más eficaces en las enfermedades causadas por la mutación de un solo gen, como es el caso de algunas ya mencionadas.

Los estudios pioneros en este campo demostraron la corrección de defectos musculares en ratones mutantes del gen *ANTI* (transportador de la membrana interna mitocondrial), al expresar el gen silvestre mediante VAVs (Flierl, Chen, Coskun, Samulski & Wallace, 2005). De manera similar, se ha logrado expresar a la enzima sulfuro dioxigenasa (SDO) en el hígado de ratones *knock-out* de la SDO, lo que restableció la función hepática y la supervivencia de los animales (Di Meo *et al.*, 2012). En otro ejemplo, el modelo murino *knock-out* del gen *TYMP* recrea el cuadro clínico observado en la encefalopatía mitocondrial neurogastrointestinal MNGIE (*Mitochondrial Neuro-GastroIntestinal*

Encephalopathy, por sus siglas en inglés). Para este último caso, también se han logrado revertir los cambios del metabolismo de la timidina con el uso de VAVs que permiten expresar al gen silvestre específicamente en el hígado (Torres-Torronteras *et al.*, 2014; Torres-Torronteras *et al.*, 2018). Por otro lado, se ha logrado revertir la degeneración de las neuronas del nervio óptico en modelos murinos *Harlequin*, mediante la administración vítrea de VAVs para expresar al gen silvestre *AIF*; y en modelos murinos con atrofia óptica dominante (Klein *et al.*, 2002; Sarzi *et al.*, 2018). Es notable que estas aproximaciones han escalado a estudios clínicos en humanos. Un estudio reciente en fase III, realizado en pacientes con distrofia retinal, demostró mejoría en la función visual después de la administración subretinal de VAVs permitiendo la expresión del gen silvestre *RPE65* (Russell *et al.*, 2017).

Estos estudios sustentan la viabilidad de expresar genes mitocondriales en pacientes que padecen enfermedades mitocondriales asociadas con la mutación de un gen nuclear en particular. El éxito de estas terapias dependerá principalmente del diseño del sistema de expresión utilizado, por un lado, para asegurar una expresión específica en el órgano blanco (serotipo viral y promotor utilizados) y, por el otro, para asegurar la integración del producto proteico en el subcompartimento mitocondrial deseado (adición de secuencias señal correctas tanto a nivel de proteína como de RNAm).

Mención aparte, son las enfermedades ocasionadas por mutaciones del genoma mitocondrial. Ya que, el genoma mitocondrial se resguarda en la matriz mitocondrial, su manipulación representa un reto de mayor complejidad. El genoma mitocondrial codifica proteínas altamente hidrofóbicas que son parte de los complejos respiratorios, por lo que su expresión desde el núcleo o “expresión alotópica”, involucra el rediseño de la secuencia de aminoácidos de las proteínas para disminuir su hidrofobicidad y permitir su transporte y translocación exitosas a la mitocondria, pero conservando su asociación y función en los complejos respiratorios. Por todos estos aspectos, esta aproximación ha tenido resultados poco exitosos. Sin embargo, una estrategia diferente ha propuesto una solución a este problema con el uso de sistemas de edición genética con nucleasas híbridas denominadas TALENS (*Transcription activator-like effector nucleases*, por sus siglas en inglés). Las TALENS son nucleasas programables que cortan secuencias de DNA específicas, y han sido diseñadas para ingresar a la mitocondria y editar regiones del genoma mitocondrial, hasta el momento exitosas en modelos murinos de la mutación del RNAt^{A1a}. Estos estudios han demostrado que el genoma mitocondrial dañado deja de ser detectado después de la edición por las TALENS, sugiriendo una mejoría en la función mitocondrial. Sin embargo, es indispensable realizar más pruebas, en particular con la función de la OXPHOS, para asegurar que este proceso de edición genera los resultados esperados (Bacman *et al.*, 2018; Gammage *et al.*, 2018).

CONCLUSIONES

Las mitocondrias son organelos que muy posiblemente se originaron a partir de un proceso endosimbionte entre una Archea y una α -proteobacteria, afectando radicalmente a ambos organismos. Una de las consecuencias más importantes fue la migración de los genes del genoma del huésped al genoma hospedero; por lo que se hizo imperativo el desarrollo de diferentes sistemas de transporte y distribución de las proteínas mitocondriales, actualmente codificadas mayoritariamente en el genoma nuclear. De esta forma, las células eucariontes establecieron diversas maquinarias para la translocación e inserción de las proteínas mitocondriales en los diferentes subcompartimentos de este organelo. Como cualquier proceso celular, el transporte y la importación de proteínas a la mitocondria puede alterarse por diferentes factores. Conocer las respuestas celulares que se desencadenan ha sido un tema de gran avance en los últimos años, teniendo como corolario general que hay cambios transcripcionales y traduccionales que conllevan a la síntesis de proteínas que ayudan a contrarrestar los efectos del daño. La mayoría de las mutaciones en las subunidades que componen las maquinarias de translocación son letales; sin embargo, algunas de estas mutaciones son viables, aunque generan fenotipos severos en las personas que las poseen, subrayando la importancia del correcto funcionamiento de las mitocondrias.

DECLARACIÓN DE CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

María Clara Avendaño-Monsalve, José Carlos Ponce-Rojas y Soledad Funes planearon el artículo, revisaron el material bibliográfico, escribieron el texto y elaboraron las figuras.

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

AGRADECIMIENTOS

Nuestro trabajo está financiado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM, IN207518 e IN208921) y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT FORDECYT-PRONACES/54550/2020). María Clara Avendaño-Monsalve es estudiante del Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y ha sido apoyada de dos formas: una beca del CONACYT (464718) para la realización de sus estudios doctorales y un préstamo condonable del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación de Colombia (Convocatoria número 885). José Carlos Ponce-Rojas es apoyado con una beca de la UC-MEXUS (Convocatoria 2020). Al Dr. Diego González Halphen por revisar críticamente este manuscrito.

REFERENCIAS

- Abou-Sleiman, P. M., Muqit, M. M. & Wood, N. W. (2006). Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nature reviews. Neuroscience*, **7**(3), 207–219. <https://doi.org/10.1038/nrn1868>

- Al Teneiji, A., Siriwardena, K., George, K., Mital, S. & Mercimek-Mahmutoglu, S. (2016). Progressive Cerebellar Atrophy and a Novel Homozygous Pathogenic DNAJC19 Variant as a Cause of Dilated Cardiomyopathy Ataxia Syndrome. *Pediatric neurology*, **62**, 58–61. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2016.03.020>
- Albrecht, R., Rehling, P., Chacinska, A., Brix, J., Cadamuro, S. A., Volkmer, R., Guiard, B., Pfanner, N. & Zeth, K. (2006). The Tim21 binding domain connects the preprotein translocases of both mitochondrial membranes. *EMBO reports*, **7(12)**, 1233–1238. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400828>
- Aldahmesh, M. A., Khan, A. O., Mohamed, J. Y., Alghamdi, M. H. & Alkuraya, F. S. (2012). Identification of a truncation mutation of acylglycerol kinase (AGK) gene in a novel autosomal recessive cataract locus. *Human mutation*, **33(6)**, 960–962. <https://doi.org/10.1002/humu.22071>
- Araiso, Y., Tsutsumi, A., Qiu, J., Imai, K., Shiota, T., Song, J., Lindau, C., Wenz, L. S., Sakaue, H., Yunoki, K., Kawano, S., Suzuki, J., Wischniewski, M., Schutze, C., Ariyama, H., Ando, T., Becker, T., Lithgow, T., Wiedemann, N., Pfanner, N., Kikkawa, M & Endo, T. (2019). Structure of the mitochondrial import gate reveals distinct preprotein paths. *Nature*, **575(7782)**, 395–401. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1680-7>
- Backes, S. & Herrmann, J. M. (2017). Protein Translocation into the Intermembrane Space and Matrix of Mitochondria: Mechanisms and Driving Forces. *Frontiers in molecular biosciences*, **4**, 83. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00083>
- Backes, S., Hess, S. Boos, F., Woellhaf, M. W., Godel, S., Jung, M., Muhlhaus, T. & Herrmann, J. M. (2018). Tom70 enhances mitochondrial preprotein import efficiency by binding to internal targeting sequences. *The Journal of cell biology*, **217(4)**, 1369–1382.
- Bacman, S. R., Kauppila, J., Pereira, C. V., Nissanka, N., Miranda, M., Pinto, M., Williams, S. L., Larsson, N. G., Stewart, J. B. & Moraes, C. T. (2018). MitoTALEN reduces mutant mtDNA load and restores tRNA^{Ala} levels in a mouse model of heteroplasmic mtDNA mutation. *Nature medicine*, **24(11)**, 1696–1700. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0166-8>
- Baker, M. J., Webb, C. T., Stroud, D. A., Palmer, C. S., Frazier, A. E., Guiard, B., Chacinska, A., Gulbis, J. M. & Ryan, M. T. (2009). Structural and functional requirements for activity of the Tim9-Tim10 complex in mitochondrial protein import. *Molecular biology of the cell*, **20(3)**, 769–779. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-09-0903>
- Basch, M., Wagner, M., Rolland, S., Carbonell, A., Zeng, R., Khosravi, S., Schmidt, A., Aftab, W., Imhof, A., Wagener, J., Conradt, B., & Wagener, N. (2020). Msp1 cooperates with the proteasome for extraction of arrested mitochondrial import intermediates. *Molecular Biology of the Cell*, **31(8)**, 753–767. <https://doi.org/10.1091/mbc.E19-06-0329>
- Bauerschmitt, H., Mick, D. U., Deckers, M., Vollmer, C., Funes, S., Kehrein, K., Ott, M., Rehling, P. & Herrmann, J. M. (2010). Ribosome-binding Proteins Mdm38 and Mba1 Display Overlapping Functions for Regulation of Mitochondrial Translation. *Molecular biology of the cell*, **21(12)**, 1937–1944. <https://doi.org/10.1091/mbc.e10-02-0101>
- Baum, D. A. & Baum, B. (2014). An inside-out origin for the eukaryotic cell. *BMC biology*, **12**, 76. <https://doi.org/10.1186/s12915-014-0076-2>
- Bausewein, T., Mills, D. J., Langer, J. D., Nitschke, B., Nussberger, S. & Kühlbrandt, W. (2017). Cryo-EM Structure of the TOM Core Complex from *Neurospora crassa*. *Cell*, **170(4)**, 693–700.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.012>
- Becker, T., Pfannschmidt, S., Guiard, B., Stojanovski, D., Milenkovic, D., Kutik, S., Pfanner, N., Meisinger, C. & Wiedemann, N. (2008). Biogenesis of the mitochondrial TOM complex: Mim1 promotes insertion and assembly of signal-anchored receptors. *The Journal of biological chemistry*, **283(1)**, 120–127. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706997200>
- Becker, T., Song, J. & Pfanner, N. (2019). Versatility of Preprotein Transfer from the Cytosol to Mitochondria. *Trends in cell biology*, **29(7)**, 534–548. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.03.007>
- Becker, T., Wenz, L. S., Kruger, V., Lehmann, W., Muller, J. M., Goroncy, L., Zufall, N., Lithgow, T., Guiard, B., Chacinska, A., Wagner, R., Meisinger, C. & Pfanner, N. (2011). The mitochondrial import protein Mim1 promotes biogenesis of multispinning outer membrane proteins. *The Journal of cell biology*, **194(3)**, 387–395. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102044>
- Bektas, M., Payne, S. G., Liu, H., Goparaju, S., Milstien, S. & Spiegel, S. (2005). A novel acylglycerol kinase that produces lysophosphatidic acid modulates cross talk with EGFR in prostate cancer cells. *The Journal of cell biology*, **169(5)**, 801–811. <https://doi.org/10.1083/jcb.200407123>
- Berthold, J., Bauer, M. F., Schneider, H. C., Klaus, C., Dietmeier, K., Neupert, W. & Brunner, M. (1995). The MIM complex mediates preprotein translocation across the mitochondrial inner membrane and couples it to the mt-Hsp70/ATP driving system. *Cell*, **81(7)**, 1085–1093. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(05\)80013-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(05)80013-3)
- Beverly, K. N., Sawaya, M. R., Schmid, E. & Koehler, C. M. (2008). The Tim8-Tim13 complex has multiple substrate binding sites and binds cooperatively to Tim23. *Journal of molecular biology*, **382(5)**, 1144–1156. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.07.069>
- Bien, M., Longen, S., Wagener, N., Chwalla, I., Herrmann, J. M. & Riemer, J. (2010). Mitochondrial disulfide bond formation is driven by intersubunit electron transfer in Erv1 and proofread by glutathione. *Molecular cell*, **37(4)**, 516–528. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.017>

- Björkholm, P., Harish, A., Hagström, E., Ernst, A. M. & Andersson, S. G. (2015). Mitochondrial genomes are retained by selective constraints on protein targeting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **112**(33), 10154–10161. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421372112>
- Bohnert, M., Rehling, P., Guiard, B., Herrmann, J. M., Pfanner, N. & van der Laan, M. (2010). Cooperation of stop-transfer and conservative sorting mechanisms in mitochondrial protein transport. *Current biology: CB*, **20**(13), 1227–1232. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.05.058>
- Boos, F., Kramer, L., Groh, C., Jung, F., Haberkant, P., Stein, F., Wollweber, F., Gackstatter, A., Zoller, E., van der Laan, M., Savitski, M. M., Benes, V. & Herrmann, J. M. (2019). Mitochondrial protein-induced stress triggers a global adaptive transcriptional programme. *Nature cell biology*, **21**(4), 442–451. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0294-5>
- Brix, J., Dietmeier, K. & Pfanner, N. (1997). Differential recognition of preproteins by the purified cytosolic domains of the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70. *The Journal of biological chemistry*, **272**(33), 20730–20735. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.33.20730>
- Brix, J., Rudiger, S., Bukau, B., Schneider-Mergener, J. & Pfanner, N. (1999). Distribution of binding sequences for the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70 in a presequence-carrying preprotein and a non-cleavable preprotein. *The Journal of biological chemistry*, **274**(23), 16522–16530. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.23.16522>
- Brix, J., Ziegler, G. A., Dietmeier, K., Schneider-Mergener, J., Schulz, G. E. & Pfanner, N. (2000). The mitochondrial import receptor Tom70: identification of a 25 kDa core domain with a specific binding site for preproteins. *Journal of molecular biology*, **303**(4), 479–488. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4120>
- Bock, R. (2017). Witnessing Genome Evolution: Experimental Reconstruction of Endosymbiotic and Horizontal Gene Transfer. *Annual review of genetics*, **51**, 1–22. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035329>
- Burger, G., Gray, M. W. & Franz Lang, B. (2003). Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends in genetics: TIG*, **19**(12), 709–716. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2003.10.012>
- Burri, L., Strahm, Y., Hawkins, C. J., Gentle, I. E., Puryer, M. A., Verhagen, A., Callus, B., Vaux, D. & Lithgow, T. (2005). Mature DIABLO/Smac is produced by the IMP protease complex on the mitochondrial inner membrane. *Molecular biology of the cell*, **16**(6), 2926–2933. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-12-1086>
- Callegari, S., Cruz-Zaragoza, L. D. & Rehling, P. (2020). From TOM to the TIM23 complex - handing over of a precursor. *Biological chemistry*, **401**(6-7), 709–721. <https://doi.org/10.1515/hsz-2020-0101>
- Calvo, S. E., Compton, A. G., Hershman, S. G., Lim, S. C., Lieber, D. S., Tucker, E. J., Laskowski, A., Garone, C., Liu, S., Jaffe, D. B., Christodoulou, J., Fletcher, J. M., Bruno, D. L., Goldblatt, J., Dimauro, S., Thorburn, D. R. & Mootha, V. K. (2012). Molecular diagnosis of infantile mitochondrial disease with targeted next-generation sequencing. *Science translational medicine*, **4**(118), 118ra10. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003310>
- Ceh-Pavia, E., Ang, S. K., Spiller, M. P. & Lu, H. (2014). The disease-associated mutation of the mitochondrial thiol oxidase Erv1 impairs cofactor binding during its catalytic reaction. *The Biochemical journal*, **464**(3), 449–459. <https://doi.org/10.1042/BJ20140679>
- Chacinska, A., Koehler, C. M., Milenkovic, D., Lithgow, T. & Pfanner, N. (2009). Importing Mitochondrial Proteins: Machineries and Mechanisms. *Cell*, **138**(4), 628–644. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.005>
- Chacinska, A., Lind, M., Frazier, A. E., Dudek, J., Meisinger, C., Geissler, A., Sickmann, A., Meyer, H. E., Truscott, K. N., Guiard, B., Pfanner, N. & Rehling, P. (2005). Mitochondrial presequence translocase: switching between TOM tethering and motor recruitment involves Tim21 and Tim17. *Cell*, **120**(6), 817–829. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.011>
- Chan, N. C. & Lithgow, T. (2008). The peripheral membrane subunits of the SAM complex function codependently in mitochondrial outer membrane biogenesis. *Molecular biology of the cell*, **19**(1), 126–136. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-08-0796>
- Chaturvedi, D. & Mahalakshmi, R. (2017). Transmembrane beta-barrels: Evolution, folding and energetics. *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes*, **1859**(12), 2467–2482. <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2017.09.020>
- Chquet, K., Zurita-Rendon, O., La Piana, R., Yang, S., Dicaire, M. J., Care4Rare, C., Boycott, K. M., Majewski, J., Shoubridge, E. A., Brais, B. & Tetreault, M. (2016). Autosomal recessive cerebellar ataxia caused by a homozygous mutation in PMPCA. *Brain: a journal of neurology*, **139**(Pt 3), e19. <https://doi.org/10.1093/brain/awv362>
- Curran, S. P., Leuenberger, D., Oppliger, W. & Koehler, C. M. (2002). The Tim9p-Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ADP/ATP carrier. *The EMBO journal*, **21**(5), 942–953. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.5.942>
- Curran, S. P., Leuenberger, D., Schmidt, E. & Koehler, C. M. (2002). The role of the Tim8p-Tim13p complex in a conserved import pathway for mitochondrial polytopic inner membrane proteins. *The Journal of cell biology*, **158**(6), 1017–1027. <https://doi.org/10.1083/jcb.200205124>
- D’Silva, P. D., Schilke, B., Walter, W., Andrew, A. & Craig, E. A. (2003). J protein cochaperone of the mitochondrial inner membrane required for protein import into the mitochondrial matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**(24), 13839–13844. <https://doi.org/10.1073/pnas.1936150100>
- Davey, K. M., Parboosingh, J. S., McLeod, D. R., Chan, A., Casey, R., Ferreira, P., Snyder, F. F., Bridge, P. J. & Bernier, L.

- F. P. (2006). Mutation of DNAJC19, a human homologue of yeast inner mitochondrial membrane co-chaperones, causes DCMA syndrome, a novel autosomal recessive Barth syndrome-like condition. *Journal of medical genetics*, **43(5)**, 385–393. <https://doi.org/10.1136/jmg.2005.036657>
- Davis, A. J., Alder, N. N., Jensen, R. E. & Johnson, A. E. (2007). The Tim9p/10p and Tim8p/13p complexes bind to specific sites on Tim23p during mitochondrial protein import. *Molecular biology of the cell*, **18(2)**, 475–486. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-06-0546>
- Davis, A. J., Sepuri, N. B., Holder, J., Johnson, A. E. & Jensen, R. E. (2000). Two intermembrane space TIM complexes interact with different domains of Tim23p during its import into mitochondria. *The Journal of cell biology*, **150(6)**, 1271–1282. <https://doi.org/10.1083/jcb.150.6.1271>
- Dederer, V., Khmelinskii, A., Huhn, A. G., Okreglak, V., Knop, M. & Lemberg, M. K. (2019). Cooperation of mitochondrial and ER factors in quality control of tail-anchored proteins. *eLife*, **8**, e45506. <https://doi.org/10.7554/eLife.45506>
- Dekker, P. J., Keil, P., Rassow, J., Maarse, A. C., Pfanner, N. & Meijer, M. (1993). Identification of MIM23, a putative component of the protein import machinery of the mitochondrial inner membrane. *FEBS letters*, **330(1)**, 66–70. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80921-g](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80921-g)
- Devi, L., Raghavendran, V., Prabhu, B. M., Avadhani, N. G. & Anandatheerthavarada, H. K. (2008). Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *The Journal of biological chemistry*, **283(14)**, 9089–9100.
- Di Fonzo, A., Ronchi, D., Lodi, T., Fassone, E., Tigano, M., Lamperti, C., Corti, S., Bordoni, A., Fortunato, F., Nizzardo, M., Napoli, L., Donadoni, C., Salani, S., Saladino, F., Moggio, M., Bresolin, N., Ferrero, I. & Comi, G. P. (2009). The mitochondrial disulfide relay system protein GFER is mutated in autosomal-recessive myopathy with cataract and combined respiratory-chain deficiency. *American journal of human genetics*, **84(5)**, 594–604. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.04.004>
- Di Maio, R., Barrett, P. J., Hoffman, E. K., Barrett, C. W., Zharikov, A., Borah, A., Hu, X., McCoy, J., Chu, C. T., Burton, E. A., Hastings, T. G. & Greenamyre, J. T. (2016). alpha-Synuclein binds to TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease. *Science translational medicine*, **8(342)**, 342ra78. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf3634>
- Di Meo, I., Auricchio, A., Lamperti, C., Burlina, A., Viscomi, C. & Zeviani, M. (2012). Effective AAV-mediated gene therapy in a mouse model of ethylmalonic encephalopathy. *EMBO molecular medicine*, **4(9)**, 1008–1014. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201433>
- Dimmer, K. S., Papic, D., Schumann, B., Sperl, D., Krumpe, K., Walther, D. M. & Rapaport, D. (2012). A crucial role for Mim2 in the biogenesis of mitochondrial outer membrane proteins. *Journal of cell science*, **125(Pt 14)**, 3464–3473. <https://doi.org/10.1242/jcs.103804>
- Doan, K. N., Grevel, A., Martensson, C. U., Ellenrieder, L., Thornton, N., Wenz, L. S., Opalinski, L., Guiard, B., Pfanner, N. & Becker, T. (2020). The Mitochondrial Import Complex MIM Functions as Main Translocase for alpha-Helical Outer Membrane Proteins. *Cell reports*, **31(4)**, 107567. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107567>
- Eme, L., Sharpe, S. C., Brown, M. W. & Roger, A. J. (2014). On the age of eukaryotes: evaluating evidence from fossils and molecular clocks. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **6(8)**, a016139. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016139>
- Eme, L., Spang, A., Lombard, J., Stairs, C. W. & Ettema, T. J. G. (2017). Archaea and the origin of eukaryotes. *Nature reviews. Microbiology*, **16(2)**, 120. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.154>
- Endres, M., Neupert, W. & Brunner, M. (1999). Transport of the ADP/ATP carrier of mitochondria from the TOM complex to the TIM22.54 complex. *The EMBO journal*, **18(12)**, 3214–3221. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.12.3214>
- Fairman, J. W., Noinaj, N. & Buchanan, S. K. (2011). The structural biology of beta-barrel membrane proteins: a summary of recent reports. *Current opinion in structural biology*, **21(4)**, 523–531. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2011.05.005>
- Flierl, A., Chen, Y., Coskun, P. E., Samulski, R. J. & Wallace, D. C. (2005). Adeno-associated virus-mediated gene transfer of the heart/muscle adenine nucleotide translocator (ANT) in mouse. *Gene therapy*, **12(7)**, 570–578. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302443>
- Flinner, N., Ellenrieder, L., Stiller, S. B., Becker, T., Schleiff, E. & Mirus, O. (2013). Mdm10 is an ancient eukaryotic porin co-occurring with the ERMES complex. *Biochimica et biophysica acta*, **1833(12)**, 3314–3325. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.10.006>
- Franco-Iborra, S., Cuadros, T., Parent, A., Romero-Gimenez, J., Vila, M. & Perier, C. (2018). Defective mitochondrial protein import contributes to complex I-induced mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Cell death & disease*, **9(11)**, 1122. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1154-0>
- Frazier, A. E., Dudek, J., Guiard, B., Voos, W., Li, Y., Lind, M., Meisinger, C., Geissler, A., Sickmann, A., Meyer, H. E., Bilanchone, V., Cumsy, M. G., Truscott, K. N., Pfanner, N. & Rehling, P. (2004). Pam16 has an essential role in the mitochondrial protein import motor. *Nature structural & molecular biology*, **11(3)**, 226–233. <https://doi.org/10.1038/nsmb735>
- Funes, S., Kauff, F., van der Sluis, E. O., Ott, M. & Herrmann, J. M. (2011). Evolution of YidC/Oxa1/Alb3 insertases: three independent gene duplications followed by functional specialization in bacteria, mitochondria and chloroplasts. *Biological chemistry*, **392(1-2)**, 13–19. <https://doi.org/10.1002/biot.1000>

- org/10.1515/BC.2011.013
- Gakh, O., Cavadini, P. & Isaya, G. (2002). Mitochondrial processing peptidases. *Biochimica et biophysica acta*, **1592(1)**, 63–77. [https://doi.org/10.1016/s0167-4889\(02\)00265-3](https://doi.org/10.1016/s0167-4889(02)00265-3)
- Gammage, P. A., Viscomi, C., Simard, M. L., Costa, A., Gaude, E., Powell, C. A., Van Haute, L., McCann, B. J., Rebelo-Guimar, P., Cerutti, R., Zhang, L., Rebar, E. J., Zeviani, M., Frezza, C., Stewart, J. B., & Minczuk, M. (2018). Genome editing in mitochondria corrects a pathogenic tDNA mutation *in vivo*. *Nature medicine*, **24(11)**, 1691–1695. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0165-9>
- Gebert, N., Gebert, M., Oeljeklaus, S., von der Malsburg, K., Stroud, D. A., Kulawiak, B., Wirth, C., Zahedi, R. P., Dolezal, P., Wiese, S., Simon, O., Schulze-Specking, A., Truscott, K. N., Sickmann, A., Rehling, P., Guiard, B., Hunte, C., Warscheid, B., van der Laan, M., Pfanner, N. & Wiedemann, N. (2011). Dual function of Sdh3 in the respiratory chain and TIM22 protein translocase of the mitochondrial inner membrane. *Molecular cell*, **44(5)**, 811–818. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.09.025>
- Geissler, A., Chacinska, A., Truscott, K. N., Wiedemann, N., Brandner, K., Sickmann, A., Meyer, H. E., Meisinger, C., Pfanner, N. & Rehling, P. (2002). The mitochondrial presequence translocase: an essential role of Tim50 in directing preproteins to the import channel. *Cell*, **111(4)**, 507–518. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)01073-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)01073-5)
- Gentle, I., Gabriel, K., Beech, P., Waller, R. & Lithgow, T. (2004). The Omp85 family of proteins is essential for outer membrane biogenesis in mitochondria and bacteria. *The Journal of cell biology*, **164(1)**, 19–24. <https://doi.org/10.1083/jcb.200310092>
- Ghiselli, F., Gomes-Dos-Santos, A., Adema, C. M., Lopes-Lima, M., Sharbrough, J. & Boore, J. L. (2021). Molluscan mitochondrial genomes break the rules. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **376(1825)**, 20200159. <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0159>
- Glick, B. S., Brandt, A., Cunningham, K., Muller, S., Hallberg, R. L. & Schatz, G. (1992). Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism. *Cell*, **69(5)**, 809–822. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90292-k](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90292-k)
- Gomkale, R., Cruz-Zaragoza, L. D., Suppanz, I., Guiard, B., Montoya, J., Callegari, S., Pacheu-Grau, D., Warscheid, B. & Rehling, P. (2020). Defining the Substrate Spectrum of the TIM22 Complex Identifies Pyruvate Carrier Subunits as Unconventional Cargos. *Current biology: CB*, **30(6)**, 1119–1127.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.01.024>
- Gratzer, S., Lithgow, T., Bauer, R. E., Lamping, E., Paltauf, F., Kohlwein, S. D., Haucke, V., Junne, T., Schatz, G. & Horst, M. (1995). Mas37p, a novel receptor subunit for protein import into mitochondria. *The Journal of cell biology*, **129(1)**, 25–34. <https://doi.org/10.1083/jcb.129.1.25>
- Gray, M. W. (2012). Mitochondrial Evolution. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **4(9)**, a011403. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011403>
- Gray, M. W. (2015). Mosaic nature of the mitochondrial proteome: Implications for the origin and evolution of mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **112(33)**, 10133–10138. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421379112>
- Habib, S. J., Waizenegger, T., Lech, M., Neupert, W. & Rapaport, D. (2005). Assembly of the TOB complex of mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, **280(8)**, 6434–6440. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411510200>
- Habib, S. J., Waizenegger, T., Niewianda, A., Paschen, S. A., Neupert, W. & Rapaport, D. (2007). The N-terminal domain of Tob55 has a receptor-like function in the biogenesis of mitochondrial beta-barrel proteins. *The Journal of cell biology*, **176(1)**, 77–88. <https://doi.org/10.1083/jcb.200602050>
- Hansen, K. G., Aviram, N., Laborenz, J., Bibi, C., Meyer, M., Spang, A., Schuldiner, M. & Herrmann, J. M. (2018). An ER surface retrieval pathway safeguards the import of mitochondrial membrane proteins in yeast. *Science (New York, N.Y.)*, **361(6407)**, 1118–1122. <https://doi.org/10.1126/science.aar8174>
- Hartl, F. U., Schmidt, B., Wachter, E., Weiss, H. & Neupert, W. (1986). Transport into mitochondria and intramitochondrial sorting of the Fe/S protein of ubiquinol-cytochrome c reductase. *Cell*, **47(6)**, 939–951. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90809-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90809-3)
- Hawllitschek, G., Schneider, H., Schmidt, B., Tropschug, M., Hartl, F. U. & Neupert, W. (1988). Mitochondrial protein import: identification of processing peptidase and of PEP, a processing enhancing protein. *Cell*, **53(5)**, 795–806. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90096-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90096-7)
- Hell, K., Herrmann, J. M., Pratje, E., Neupert, W. & Stuart, R. A. (1998). Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95(5)**, 2250–2255. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2250>
- Herrmann, J. M. (2003). Converting bacteria to organelles: evolution of mitochondrial protein sorting. *Trends in microbiology*, **11(2)**, 74–79. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(02\)00033-1](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(02)00033-1)
- Herrmann, J. M., Neupert, W. & Stuart, R. A. (1997). Insertion into the mitochondrial inner membrane of a polytopic protein, the nuclear-encoded Oxa1p. *The EMBO journal*, **16(9)**, 2217–2226. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.9.2217>
- Hildenbeutel, M., Theis, M., Geier, M., Haferkamp, I., Neuhaus, H. E., Herrmann, J. M. & Ott, M. (2012). The Membrane Insertase Oxa1 Is Required for Efficient Import of Carrier Proteins into Mitochondria. *Journal of molecular biology*, **423(4)**, 590–599. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.07.018>

- Hohr, A. I. C., Lindau, C., Wirth, C., Qiu, J., Stroud, D. A., Kutik, S., Guiard, B., Hunte, C., Becker, T., Pfanner, N. & Wiedemann, N. (2018). Membrane protein insertion through a mitochondrial beta-barrel gate. *Science (New York, N.Y.)*, **359(6373)**, eaah6834. <https://doi.org/10.1126/science.aah6834>
- Ieva, R., Schrempf, S. G., Opalinski, L., Wollweber, F., Hoss, P., Heisswolf, A. K., Gebert, M., Zhang, Y., Guiard, B., Rospert, S., Becker, T., Chacinska, A., Pfanner, N. & van der Laan, M. (2014). Mgr2 functions as lateral gatekeeper for preprotein sorting in the mitochondrial inner membrane. *Molecular cell*, **56(5)**, 641–652. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.10.010>
- Itakura, E., Zavodszky, E., Shao, S., Wohlever, M. L., Keenan, R. J., & Hegde, R. S. (2016). Ubiquilins Chaperone and Triage Mitochondrial Membrane Proteins for Degradation. *Molecular cell*, **63(1)**, 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.020>
- Jin, H., May, M., Tranebjaerg, L., Kendall, E., Fontan, G., Jackson, J., Subramony, S. H., Arena, F., Lubs, H., Smith, S., Stevenson, R., Schwartz, C. & Vetric, D. (1996). A novel X-linked gene, DDP, shows mutations in families with deafness (DFN-1), dystonia, mental deficiency and blindness. *Nature genetics*, **14(2)**, 177–180. <https://doi.org/10.1038/ng1096-177>
- Jobling, R. K., Assoum, M., Gakh, O., Blaser, S., Raiman, J. A., Mignot, C., Roze, E., Durr, A., Brice, A., Levy, N., Prasad, C., Paton, T., Paterson, A. D., Roslin, N. M., Marshall, C. R., Desvignes, J. P., Roeckel-Trevisiol, N., Scherer, S. W., Rouleau, G. A., Megarbane, A., Isaya, G., Delague, V. & Yoon, G. (2015). PMPCA mutations cause abnormal mitochondrial protein processing in patients with non-progressive cerebellar ataxia. *Brain: a journal of neurology*, **138(Pt 6)**, 1505–1517. <https://doi.org/10.1093/brain/awv057>
- Joshi, M., Anselm, I., Shi, J., Bale, T. A., Towne, M., Schmitz-Abe, K., Crowley, L., Giani, F. C., Kazerounian, S., Markianos, K., Lidov, H. G., Folkert, R., Sankaran, V. G. & Agrawal, P. B. (2016). Mutations in the substrate binding glycine-rich loop of the mitochondrial processing peptidase-alpha protein (PMPCA) cause a severe mitochondrial disease. *Cold Spring Harbor molecular case studies*, **2(3)**, a000786. <https://doi.org/10.1101/mcs.a000786>
- Kang, P. J., Ostermann, J., Shilling, J., Neupert, W., Craig, E. A. & Pfanner, N. (1990). Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature*, **348(6297)**, 137–143. <https://doi.org/10.1038/348137a0>
- Kang, Y., Stroud, D. A., Baker, M. J., De Souza, D. P., Frazier, A. E., Liem, M., Tull, D., Mathivanan, S., McConville, M. J., Thorburn, D. R., Ryan, M. T. & Stojanovski, D. (2017). Sengers Syndrome-Associated Mitochondrial Acylglycerol Kinase Is a Subunit of the Human TIM22 Protein Import Complex. *Molecular cell*, **67(3)**, 457–470.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.06.014>
- Karakaidos, P. & Rampias, T. (2020). Mitonuclear Interactions in the Maintenance of Mitochondrial Integrity. *Life (Basel, Switzerland)*, **10(9)**, 173. <https://doi.org/10.3390/life10090173>
- Kerscher, O., Holder, J., Srinivasan, M., Leung, R. S. & Jensen, R. E. (1997). The Tim54p-Tim22p complex mediates insertion of proteins into the mitochondrial inner membrane. *The Journal of cell biology*, **139(7)**, 1663–1675. <https://doi.org/10.1083/jcb.139.7.1663>
- Kerscher, O., Sepuri, N. B. & Jensen, R. E. (2000). Tim18p is a new component of the Tim54p-Tim22p translocon in the mitochondrial inner membrane. *Molecular biology of the cell*, **11(1)**, 103–116. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.1.103>
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y. & Shimizu, N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, **392(6676)**, 605–608. <https://doi.org/10.1038/33416>
- Klein, J. A., Longo-Guess, C. M., Rossmann, M. P., Seburn, K. L., Hurd, R. E., Frankel, W. N., Bronson, R. T. & Ackerman, S. L. (2002). The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature*, **419(6905)**, 367–374. <https://doi.org/10.1038/nature01034>
- Koehler, C. M. (2004). The small Tim proteins and the twin Cx3C motif. *Trends in biochemical sciences*, **29(1)**, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2003.11.003>
- Koehler, C. M., Jarosch, E., Tokatlidis, K., Schmid, K., Schweyen, R. J. & Schatz, G. (1998). Import of mitochondrial carriers mediated by essential proteins of the intermembrane space. *Science (New York, N.Y.)*, **279(5349)**, 369–373. <https://doi.org/10.1126/science.279.5349.369>
- Koehler, C. M., Leuenberger, D., Merchant, S., Renold, A., Junne, T. & Schatz, G. (1999). Human deafness dystonia syndrome is a mitochondrial disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96(5)**, 2141–2146. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.5.2141>
- Koehler, C. M., Merchant, S., Oppliger, W., Schmid, K., Jarosch, E., Dolfini, L., Junne, T., Schatz, G. & Tokatlidis, K. (1998). Tim9p, an essential partner subunit of Tim10p for the import of mitochondrial carrier proteins. *The EMBO journal*, **17(22)**, 6477–6486. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.22.6477>
- Koehler, C. M., Murphy, M. P., Bally, N. A., Leuenberger, D., Oppliger, W., Dolfini, L., Junne, T., Schatz, G. & Or, E. (2000). Tim18p, a new subunit of the TIM22 complex that mediates insertion of imported proteins into the yeast mitochondrial inner membrane. *Molecular and cellular biology*, **20(4)**, 1187–1193. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.4.1187-1193.2000>
- Kozjak, V., Wiedemann, N., Milenkovic, D., Lohaus, C., Meyer, H. E., Guiard, B., Meisinger, C. & Pfanner, N. (2003). An essential role of Sam50 in the protein sorting and assembly

- machinery of the mitochondrial outer membrane. *The Journal of biological chemistry*, **278**(49), 48520–48523. <https://doi.org/10.1074/jbc.C300442200>
- Kronidou, N. G., Oppliger, W., Bolliger, L., Hannavy, K., Glick, B. S., Schatz, G. & Horst, M. (1994). Dynamic interaction between Isp45 and mitochondrial hsp70 in the protein import system of the yeast mitochondrial inner membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**(26), 12818–12822. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.26.12818>
- Kruger, V., Becker, T., Becker, L., Montilla-Martinez, M., Ellenrieder, L., Vogtle, F. N., Meyer, H. E., Ryan, M. T., Wiedemann, N., Warscheid, B., Pfanner, N., Wagner, R. & Meisinger, C. (2017). Identification of new channels by systematic analysis of the mitochondrial outer membrane. *The Journal of cell biology*, **216**(11), 3485–3495. <https://doi.org/10.1083/jcb.201706043>
- Kubrich, M., Keil, P., Rassow, J., Dekker, P. J., Blom, J., Meijer, M. & Pfanner, N. (1994). The polytopic mitochondrial inner membrane proteins MIM17 and MIM23 operate at the same preprotein import site. *FEBS letters*, **349**(2), 222–228. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)00670-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00670-9)
- Kubrich, M., Rassow, J., Voos, W., Pfanner, N. & Honlinger, A. (1998). The import route of ADP/ATP carrier into mitochondria separates from the general import pathway of cleavable preproteins at the trans side of the outer membrane. *The Journal of biological chemistry*, **273**(26), 16374–16381. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.26.16374>
- Lee, S., Lee, H., Yoo, S., Ieva, R., van der Laan, M., von Heijne, G. & Kim, H. (2020). The Mgr2 subunit of the TIM23 complex regulates membrane insertion of marginal stop-transfer signals in the mitochondrial inner membrane. *FEBS letters*, **594**(6), 1081–1087. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13692>
- Lin, Y. F., Schulz, A. M., Pellegrino, M. W., Lu, Y., Shaham, S. & Haynes, C. M. (2016). Maintenance and propagation of a deleterious mitochondrial genome by the mitochondrial unfolded protein response. *Nature*, **533**(7603), 416–419. <https://doi.org/10.1038/nature17989>
- López-García, P. & Moreira, D. (2020). The Syntrophy hypothesis for the origin of eukaryotes revisited. *Nature microbiology*, **5**(5), 655–667. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0710-4>
- Maarse, A. C., Blom, J., Grivell, L. A. & Meijer, M. (1992). MPI1, an essential gene encoding a mitochondrial membrane protein, is possibly involved in protein import into yeast mitochondria. *The EMBO journal*, **11**(10), 3619–3628.
- Maarse, A. C., Blom, J., Keil, P., Pfanner, N. & Meijer, M. (1994). Identification of the essential yeast protein MIM17, an integral mitochondrial inner membrane protein involved in protein import. *FEBS letters*, **349**(2), 215–221. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)00669-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00669-5)
- Mani, J., Rout, S., Desy, S. & Schneider, A. (2017). Mitochondrial protein import - Functional analysis of the highly diverged Tom22 orthologue of *Trypanosoma brucei*. *Scientific reports*, **7**, 40738. <https://doi.org/10.1038/srep40738>
- Mårtensson, C. U., Priesnitz, C., Song, J., Ellenrieder, L., Doan, K. N., Boos, F., Floerchinger, A., Zufall, N., Oeljeklaus, S., Warscheid, B. & Becker, T. (2019). Mitochondrial protein translocation-associated degradation. *Nature*, **569**(7758), 679–683. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1227-y>
- Martin, W. & Müller, M. (1998). The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature*, **392**(6671), 37–41. <https://doi.org/10.1038/32096>
- Matsumoto, S., Nakatsukasa, K., Kakuta, C., Tamura, Y., Esaki, M. & Endo, T. (2019). Msp1 Clears Mistargeted Proteins by Facilitating Their Transfer from Mitochondria to the ER. *Molecular cell*, **76**(1), 191–205.e10. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.07.006>
- Matta, S. K., Kumar, A. & D’Silva, P. (2020). Mgr2 regulates mitochondrial preprotein import by associating with channel-forming Tim23 subunit. *Molecular biology of the cell*, **31**(11), 1112–1123. <https://doi.org/10.1091/mbc.E19-12-0677>
- Mayr, J. A., Haack, T. B., Graf, E., Zimmermann, F. A., Wieland, T., Haberberger, B., Superti-Furga, A., Kirschner, J., Steinmann, B., Baumgartner, M. R., Moroni, I., Lamantea, E., Zeviani, M., Rodenburg, R. J., Smeitink, J., Strom, T. M., Meitinger, T., Sperl, W. & Prokisch, H. (2012). Lack of the mitochondrial protein acylglycerol kinase causes Sengers syndrome. *American journal of human genetics*, **90**(2), 314–320. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.12.005>
- Mehawej, C., Delahodde, A., Legeai-Mallet, L., Delague, V., Kaci, N., Desvignes, J. P., Kibar, Z., Capo-Chichi, J. M., Chouery, E., Munnich, A., Cormier-Daire, V. & Mégarbané, A. (2014). The impairment of MAGMAS function in human is responsible for a severe skeletal dysplasia. *PLoS genetics*, **10**(5), e1004311. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004311>
- Meinecke, M., Wagner, R., Kovermann, P., Guiard, B., Mick, D. U., Hutu, D. P., Voos, W., Truscott, K. N., Chacinska, A., Pfanner, N. & Rehling, P. (2006). Tim50 maintains the permeability barrier of the mitochondrial inner membrane. *Science (New York, N.Y.)*, **312**(5779), 1523–1526. <https://doi.org/10.1126/science.1127628>
- Melber, A. & Haynes, C. M. (2018). UPRmt regulation and output: a stress response mediated by mitochondrial-nuclear communication. *Cell research*, **28**(3), 281–295. <https://doi.org/10.1038/cr.2018.16>
- Metzger, M. B., Scales, J. L., Dunklebarger, M. F., Loncarek, J. & Weissman, A. M. (2020). A protein quality control pathway at the mitochondrial outer membrane. *eLife*, **9**, e51065. <https://doi.org/10.7554/eLife.51065>
- Miao, B., Davis, J. E. & Craig, E. A. (1997). Mge1 functions as a nucleotide release factor for Ssc1, a mitochondrial Hsp70 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of molecular biology*, **265**(5), 541–552. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0762>
- Milenkovic, D., Kozjak, V., Wiedemann, N., Lohaus, C., Meyer,

- H. E., Guiard, B., Pfanner, N. & Meisinger, C. (2004). Sam35 of the mitochondrial protein sorting and assembly machinery is a peripheral outer membrane protein essential for cell viability. *The Journal of biological chemistry*, **279**(21), 22781–22785. <https://doi.org/10.1074/jbc.C400120200>
- Milenkovic, D., Ramming, T., Müller, J. M., Wenz, L. S., Gebert, N., Schulze-Specking, A., Stojanovski, D., Rospert, S. & Chacinska, A. (2009). Identification of the signal directing Tim9 and Tim10 into the intermembrane space of mitochondria. *Molecular biology of the cell*, **20**(10), 2530–2539. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-11-1108>
- Mokranjac D. (2020). How to get to the other side of the mitochondrial inner membrane - the protein import motor. *Biological chemistry*, **401**(6-7), 723–736. <https://doi.org/10.1515/hsz-2020-0106>
- Mokranjac, D. & Neupert, W. (2010). The many faces of the mitochondrial TIM23 complex. *Biochimica et biophysica acta*, **1797**(6-7), 1045–1054. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.01.026>
- Mokranjac, D., Paschen, S. A., Kozany, C., Prokisch, H., Hoppins, S. C., Nargang, F. E., Neupert, W. & Hell, K. (2003). Tim50, a novel component of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria. *The EMBO journal*, **22**(4), 816–825. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg090>
- Mokranjac, D., Popov-Celeketić, D., Hell, K. & Neupert, W. (2005). Role of Tim21 in mitochondrial translocation contact sites. *The Journal of biological chemistry*, **280**(25), 23437–23440. <https://doi.org/10.1074/jbc.C500135200>
- Mokranjac, D., Sichting, M., Popov-Celeketić, D., Mapa, K., Gevorkyan-Airapetov, L., Zohary, K., Hell, K., Azem, A. & Neupert, W. (2009). Role of Tim50 in the transfer of precursor proteins from the outer to the inner membrane of mitochondria. *Molecular biology of the cell*, **20**(5), 1400–1407. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-09-0934>
- Möller-Hergt, B. V., Carlström, A., Stephan, K., Imhof, A. & Ott, M. (2018). The ribosome receptors Mrx15 and Mba1 jointly organize cotranslational insertion and protein biogenesis in mitochondria. *Molecular biology of the cell*, **29**(20), 2386–2396. <https://doi.org/10.1091/mbc.E18-04-0227>
- Murphy, M. P., Leuenberger, D., Curran, S. P., Oppliger, W. & Koehler, C. M. (2001). The essential function of the small Tim proteins in the TIM22 import pathway does not depend on formation of the soluble 70-kilodalton complex. *Molecular and cellular biology*, **21**(18), 6132–6138. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.18.6132-6138.2001>
- Nargund, A. M., Fiorese, C. J., Pellegrino, M. W., Deng, P. & Haynes, C. M. (2015). Mitochondrial and nuclear accumulation of the transcription factor ATF5-1 promotes OXPHOS recovery during the UPR(mt). *Molecular cell*, **58**(1), 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.02.008>
- Nargund, A. M., Pellegrino, M. W., Fiorese, C. J., Baker, B. M. & Haynes, C. M. (2012). Mitochondrial import efficiency of ATF5-1 regulates mitochondrial UPR activation. *Science (New York, N.Y.)*, **337**(6094), 587–590. <https://doi.org/10.1126/science.1223560>
- Nguyen, T. N., Padman, B. S. & Lazarou, M. (2016). Deciphering the Molecular Signals of PINK1/Parkin Mitophagy. *Trends in cell biology*, **26**(10), 733–744. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.05.008>
- Noinaj, N., Kuszak, A. J., Gumbart, J. C., Lukacik, P., Chang, H., Easley, N. C., Lithgow, T. & Buchanan, S. K. (2013). Structural insight into the biogenesis of β -barrel membrane proteins. *Nature*, **501**(7467), 385–390. <https://doi.org/10.1038/nature12521>
- Ojala, T., Polinati, P., Manninen, T., Hiippala, A., Rajantie, J., Karikoski, R., Suomalainen, A. & Tyni, T. (2012). New mutation of mitochondrial DNAJC19 causing dilated and noncompaction cardiomyopathy, anemia, ataxia, and male genital anomalies. *Pediatric research*, **72**(4), 432–437. <https://doi.org/10.1038/pr.2012.92>
- Papic, D., Krumpke, K., Dukanovic, J., Dimmer, K. S. & Rapaport, D. (2011). Multispan mitochondrial outer membrane protein Ugo1 follows a unique Mim1-dependent import pathway. *The Journal of cell biology*, **194**(3), 397–405. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102041>
- Petrakis, N., Alcock, F. & Tokatlidis, K. (2009). Mitochondrial ATP-independent chaperones. *IUBMB life*, **61**(9), 909–914. <https://doi.org/10.1002/iub.235>
- Pfanner, N. & Neupert, W. (1987). Distinct steps in the import of ADP/ATP carrier into mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, **262**(16), 7528–7536.
- Pfeffer, S., Woellhaf, M. W., Herrmann, J. M. & Förster, F. (2015). Organization of the mitochondrial translation machinery studied *in situ* by cryoelectron tomography. *Nature communications*, **6**, 6019. <https://doi.org/10.1038/ncomms7019>
- Ponce-Rojas, J. C., Avendaño-Monsalve, M. C., Yañez-Falcón, A. R., Jaimes-Miranda, F., Garay, E., Torres-Quiroz, F., DeLuna, A. & Funes, S. (2017). $\alpha\beta$ -NAC cooperates with Sam37 to mediate early stages of mitochondrial protein import. *The FEBS journal*, **284**(5), 814–830. <https://doi.org/10.1111/febs.14024>
- Popov-Celeketić, J., Waizenegger, T. & Rapaport, D. (2008). Mim1 functions in an oligomeric form to facilitate the integration of Tom20 into the mitochondrial outer membrane. *Journal of molecular biology*, **376**(3), 671–680. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.12.006>
- Portugez, S., Martin, W. F. & Hazkani-Covo, E. (2018). Mosaic mitochondrial-plastid insertions into the nuclear genome show evidence of both non-homologous end joining and homologous recombination. *BMC evolutionary biology*, **18**(1), 162. <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1279-x>
- Poveda-Huertes, D., Matic, S., Marada, A., Habernig, L., Licheva, M., Myketin, L., Gilsbach, R., Tosal-Castano, S., Papinski, D., Mulica, P., Kretz, O., Kücükköse, C., Taskin, A. A., Hein, L., Kraft, C., Büttner, S., Meisinger, C. & Vögtle, F. N. (2020). An Early mtUPR: Redistribution

- of the Nuclear Transcription Factor Rox1 to Mitochondria Protects against Intramitochondrial Proteotoxic Aggregates. *Molecular cell*, **77(1)**, 180–188.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.026>
- Preuss, M., Ott, M., Funes, S., Luirink, J., & Herrmann, J. M. (2005). Evolution of mitochondrial oxa proteins from bacterial YidC. Inherited and acquired functions of a conserved protein insertion machinery. *The Journal of biological chemistry*, **280(13)**, 13004–13011. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414093200>
- Qiu, J., Wenz, L. S., Zerbes, R. M., Oeljeklaus, S., Bohnert, M., Stroud, D. A., Wirth, C., Ellenrieder, L., Thornton, N., Kutik, S., Wiese, S., Schulze-Specking, A., Zufall, N., Chacinska, A., Guiard, B., Hunte, C., Warscheid, B., van der Laan, M., Pfanner, N., Wiedemann, N., & Becker, T. (2013). Coupling of mitochondrial import and export translocases by receptor-mediated supercomplex formation. *Cell*, **154(3)**, 596–608. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.033>
- Qureshi, M. A., Haynes, C. M. & Pellegrino, M. W. (2017). The mitochondrial unfolded protein response: Signaling from the powerhouse. *The Journal of biological chemistry*, **292(33)**, 13500–13506. <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.791061>
- Rampelt, H., Succi, I., Bersch, B., Horten, P., Perschil, I., Martinou, J. C., van der Laan, M., Wiedemann, N., Schanda, P. & Pfanner, N. (2020). The mitochondrial carrier pathway transports non-canonical substrates with an odd number of transmembrane segments. *BMC biology*, **18(1)**, 2. <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0733-6>
- Rassow, J., Maarse, A. C., Krainer, E., Kübrich, M., Müller, H., Meijer, M., Craig, E. A. & Pfanner, N. (1994). Mitochondrial protein import: biochemical and genetic evidence for interaction of matrix hsp70 and the inner membrane protein MIM44. *The Journal of cell biology*, **127(6 Pt 1)**, 1547–1556. <https://doi.org/10.1083/jcb.127.6.1547>
- Rehling, P., Brandner, K. & Pfanner, N. (2004). Mitochondrial import and the twin-pore translocase. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **5(7)**, 519–530. <https://doi.org/10.1038/nrm1426>
- Rich, P. R. & Maréchal, A. (2010). The mitochondrial respiratory chain. *Essays in biochemistry*, **47**, 1–23. <https://doi.org/10.1042/bse0470001>
- Russell, S., Bennett, J., Wellman, J. A., Chung, D. C., Yu, Z. F., Tillman, A., Wittes, J., Pappas, J., Elci, O., McCague, S., Cross, D., Marshall, K. A., Walshire, J., Kehoe, T. L., Reichert, H., Davis, M., Raffini, L., George, L. A., Hudson, F. P., Dingfield, L., Zhu, X., Haller, J. A., Sohn, E. H., Mahajan, V. B., Pfeifer, W., Weckmann, M., Johnson, C., Gewaily, D., Drack, A., Stone, E., Wachtel, K., Simonelli, F., Leroy, B. P., Wright, J. F., High, K. A. & Maguire, A. M. (2017). Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet (London, England)*, **390(10097)**, 849–860. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31868-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31868-8)
- Sagan L. (1993). On the origin of mitosing cells. 1967. *The Journal of NIH research: life sciences research and news about the National Institutes of Health and the Alcohol, Drug Abuse, and Mental Health Administration*, **5(3)**, 65–72.
- Sarzi, E., Seveno, M., Piro-Mégy, C., Elzière, L., Quilès, M., Péquignot, M., Müller, A., Hamel, C. P., Lenaers, G. & Delettre, C. (2018). OPA1 gene therapy prevents retinal ganglion cell loss in a Dominant Optic Atrophy mouse model. *Scientific reports*, **8(1)**, 2468. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20838-8>
- Schmidt, O., Pfanner, N. & Meisinger, C. (2010). Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **11(9)**, 655–667. <https://doi.org/10.1038/nrm2959>
- Schneider, H. C., Berthold, J., Bauer, M. F., Dietmeier, K., Guiard, B., Brunner, M. & Neupert, W. (1994). Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import. *Nature*, **371(6500)**, 768–774. <https://doi.org/10.1038/371768a0>
- Schulz, C., Schendzielorz, A. & Rehling, P. (2015). Unlocking the presequence import pathway. *Trends in cell biology*, **25(5)**, 265–275. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.12.001>
- Shahrour, M. A., Staretz-Chacham, O., Dayan, D., Stephen, J., Weech, A., Damsch, N., Pri Chen, H., Edvardson, S., Mazaheri, S., Saada, A., NISC Intramural Sequencing, Hershkovitz, E., Shaag, A., Huizing, M., Abu-Libdeh, B., Gahl, W. A., Azem, A., Anikster, Y., Vilboux, T., Elpeleg, O. & Malicdan, M. C. (2017). Mitochondrial epileptic encephalopathy, 3-methylglutaconic aciduria and variable complex V deficiency associated with TIMM50 mutations. *Clinical genetics*, **91(5)**, 690–696. <https://doi.org/10.1111/cge.12855>
- Shiota, T., Mabuchi, H., Tanaka-Yamano, S., Yamano, K., & Endo, T. (2011). *In vivo* protein-interaction mapping of a mitochondrial translocator protein Tom22 at work. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108(37)**, 15179–15183. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105921108>
- Shiota, T., Imai, K., Qiu, J., Hewitt, V. L., Tan, K., Shen, H. H., Sakiyama, N., Fukasawa, Y., Hayat, S., Kamiya, M., Elofsson, A., Tomii, K., Horton, P., Wiedemann, N., Pfanner, N., Lithgow, T. & Endo, T. (2015). Molecular architecture of the active mitochondrial protein gate. *Science (New York, N. Y.)*, **349(6255)**, 1544–1548. <https://doi.org/10.1126/science.aac6428>
- Short, M. K., Hallett, J. P., Tar, K., Dange, T., Schmidt, M., Moir, R., Willis, I. M. & Jubinsky, P. T. (2012). The yeast magmas ortholog pam16 has an essential function in fermentative growth that involves sphingolipid metabolism. *PloS one*, **7(7)**, e39428. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039428>
- Sideris, D. P., Petrakis, N., Katrakili, N., Mikropoulou, D., Gallo, A., Ciofi-Baffoni, S., Banci, L., Bertini, I. & Tokatlidis, K. (2009). A novel intermembrane space-targeting signal

- docks cysteines onto Mia40 during mitochondrial oxidative folding. *The Journal of cell biology*, **187**(7), 1007–1022. <https://doi.org/10.1083/jcb.200905134>
- Sinha, D., Joshi, N., Chittoor, B., Samji, P. & D’Silva, P. (2010). Role of Magmas in protein transport and human mitochondria biogenesis. *Human molecular genetics*, **19**(7), 1248–1262. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq002>
- Sirrenberg, C., Bauer, M. F., Guiard, B., Neupert, W. & Brunner, M. (1996). Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22. *Nature*, **384**(6609), 582–585. <https://doi.org/10.1038/384582a0>
- Sirrenberg, C., Endres, M., Fölsch, H., Stuart, R. A., Neupert, W. & Brunner, M. (1998). Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5. *Nature*, **391**(6670), 912–915. <https://doi.org/10.1038/36136>
- Song, J., Herrmann, J. M. & Becker, T. (2021). Quality control of the mitochondrial proteome. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **22**(1), 54–70. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00300-2>
- Stiller, S. B., Höpker, J., Oeljeklaus, S., Schütze, C., Schrempf, S. G., Vent-Schmidt, J., Horvath, S. E., Frazier, A. E., Gebert, N., van der Laan, M., Bohnert, M., Warscheid, B., Pfanner, N. & Wiedemann, N. (2016). Mitochondrial OXA Translocase Plays a Major Role in Biogenesis of Inner-Membrane Proteins. *Cell metabolism*, **23**(5), 901–908. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.04.005>
- Stojanovski, D., Bragoszewski, P. & Chacinska, A. (2012). The MIA pathway: a tight bond between protein transport and oxidative folding in mitochondria. *Biochimica et biophysica acta*, **1823**(7), 1142–1150. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.04.014>
- Stroud, D. A., Becker, T., Qiu, J., Stojanovski, D., Pfannschmidt, S., Wirth, C., Hunte, C., Guiard, B., Meisinger, C., Pfanner, N. & Wiedemann, N. (2011). Biogenesis of mitochondrial β -barrel proteins: the POTRA domain is involved in precursor release from the SAM complex. *Molecular biology of the cell*, **22**(16), 2823–2833. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-02-0148>
- Sztolszterer, M. E., Brewinska, A., Guiard, B. & Chacinska, A. (2013). Disulfide bond formation: sulfhydryl oxidase ALR controls mitochondrial biogenesis of human MIA40. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, **14**(3), 309–320. <https://doi.org/10.1111/tra.12030>
- Thorsness, P. E. & Fox, T. D. (1990). Escape of DNA from mitochondria to the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, **346**(6282), 376–379. <https://doi.org/10.1038/346376a0>
- Torres-Torronteras, J., Viscomi, C., Cabrera-Pérez, R., Cámara, Y., Di Meo, I., Barquinero, J., Auricchio, A., Pizzorno, G., Hirano, M., Zeviani, M. & Martí, R. (2014). Gene therapy using a liver-targeted AAV vector restores nucleoside and nucleotide homeostasis in a murine model of MNGIE. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, **22**(5), 901–907. <https://doi.org/10.1038/mt.2014.6>
- Torres-Torronteras, J., Cabrera-Pérez, R., Vila-Julíà, F., Viscomi, C., Cámara, Y., Hirano, M., Zeviani, M. & Martí, R. (2018). Long-Term Sustained Effect of Liver-Targeted Adeno-Associated Virus Gene Therapy for Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy. *Human gene therapy*, **29**(6), 708–718. <https://doi.org/10.1089/hum.2017.133>
- Tort, F., Ugarteburu, O., Texidó, L., Gea-Sorlí, S., García-Villoria, J., Ferrer-Cortès, X., Arias, Á., Matalonga, L., Gort, L., Ferrer, I., Guitart-Mampel, M., Garrabou, G., Vaz, F. M., Pristoupilova, A., Rodríguez, M., Beltran, S., Cardellach, F., Wanders, R. J., Fillat, C., García-Silva, M. T. & Ribes, A. (2019). Mutations in TIMM50 cause severe mitochondrial dysfunction by targeting key aspects of mitochondrial physiology. *Human mutation*, **40**(10), 1700–1712. <https://doi.org/10.1002/humu.23779>
- Tranebjaerg, L., Schwartz, C., Eriksen, H., Andreasson, S., Ponjavic, V., Dahl, A., Stevenson, R. E., May, M., Arena, F. & Barker, D. (1995). A new X linked recessive deafness syndrome with blindness, dystonia, fractures, and mental deficiency is linked to Xq22. *Journal of medical genetics*, **32**(4), 257–263. <https://doi.org/10.1136/jmg.32.4.257>
- Tria, F., Brueckner, J., Skejo, J., Xavier, J. C., Kapust, N., Knopp, M., Wimmer, J., Nagies, F., Zimorski, V., Gould, S. B., Garg, S. G. & Martin, W. F. (2021). Gene duplications trace mitochondria to the onset of eukaryote complexity. *Genome biology and evolution*, evab055. Advance online publication. <https://doi.org/10.1093/gbe/evab055>
- Truscott, K. N., Voos, W., Frazier, A. E., Lind, M., Li, Y., Geissler, A., Dudek, J., Müller, H., Sickmann, A., Meyer, H. E., Meisinger, C., Guiard, B., Rehling, P. & Pfanner, N. (2003). A J-protein is an essential subunit of the presequence translocase-associated protein import motor of mitochondria. *The Journal of cell biology*, **163**(4), 707–713. <https://doi.org/10.1083/jcb.200308004>
- Tucker, K. & Park, E. (2019). Cryo-EM structure of the mitochondrial protein-import channel TOM complex at near-atomic resolution. *Nature structural & molecular biology*, **26**(12), 1158–1166. <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0339-2>
- Valente, E. M., Bentivoglio, A. R., Dixon, P. H., Ferraris, A., Ialongo, T., Frontali, M., Albanese, A. & Wood, N. W. (2001). Localization of a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, PARK6, on human chromosome 1p35-p36. *American journal of human genetics*, **68**(4), 895–900. <https://doi.org/10.1086/319522>
- van der Laan, M., Chacinska, A., Lind, M., Perschil, I., Sickmann, A., Meyer, H. E., Guiard, B., Meisinger, C., Pfanner, N. & Rehling, P. (2005). Pam17 is required for architecture and translocation activity of the mitochondrial protein import motor. *Molecular and cellular biology*, **25**(17), 7449–7458. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.17.7449-7458.2005>

- van der Laan, M., Meinecke, M., Dudek, J., Hutu, D. P., Lind, M., Perschil, I., Guiard, B., Wagner, R., Pfanner, N. & Rehling, P. (2007). Motor-free mitochondrial presequence translocase drives membrane integration of preproteins. *Nature cell biology*, **9**(10), 1152–1159. <https://doi.org/10.1038/ncb1635>
- van der Laan, M., Wiedemann, N., Mick, D. U., Guiard, B., Rehling, P. & Pfanner, N. (2006). A role for Tim21 in membrane-potential-dependent preprotein sorting in mitochondria. *Current biology: CB*, **16**(22), 2271–2276. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.10.025>
- Vasiljev, A., Ahting, U., Nargang, F. E., Go, N. E., Habib, S. J., Kozany, C., Panneels, V., Sinning, I., Prokisch, H., Neupert, W., Nussberger, S. & Rapaport, D. (2004). Reconstituted TOM core complex and Tim9/Tim10 complex of mitochondria are sufficient for translocation of the ADP/ATP carrier across membranes. *Molecular biology of the cell*, **15**(3), 1445–1458. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-05-0272>
- Vergnolle, M. A., Baud, C., Golovanov, A. P., Alcock, F., Luciano, P., Lian, L. Y. & Tokatlidis, K. (2005). Distinct domains of small Tims involved in subunit interaction and substrate recognition. *Journal of molecular biology*, **351**(4), 839–849. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.06.010>
- Vögtle, F. N., Brändl, B., Larson, A., Pendziwiat, M., Friederich, M. W., White, S. M., Basinger, A., Kücükköse, C., Muhle, H., Jähn, J. A., Keminer, O., Helbig, K. L., Delto, C. F., Myketin, L., Mossmann, D., Burger, N., Miyake, N., Burnett, A., van Baalen, A., Lovell, M. A., Matsumoto N., Walsh, M., Yu, H. C., Shinde, D. N., Stephani, U., Van Hove, J. L. K., Müller, F. J. & Helbig, I. (2018). Mutations in PMPCB Encoding the Catalytic Subunit of the Mitochondrial Presequence Protease Cause Neurodegeneration in Early Childhood. *American journal of human genetics*, **102**(4), 557–573. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.02.014>
- von Heijne G. (1986). Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *The EMBO journal*, **5**(6), 1335–1342.
- Vukotic, M., Nolte, H., König, T., Saita, S., Ananjew, M., Krüger, M., Tatsuta, T. & Langer, T. (2017). Acylglycerol Kinase Mutated in Sengers Syndrome Is a Subunit of the TIM22 Protein Translocase in Mitochondria. *Molecular cell*, **67**(3), 471–483.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.06.013>
- Wang, X. & Chen, X. J. (2015). A cytosolic network suppressing mitochondria-mediated proteostatic stress and cell death. *Nature*, **524**(7566), 481–484. <https://doi.org/10.1038/nature14859>
- Wang, W., Chen, X., Zhang, L., Yi, J., Ma, Q., Yin, J., Zhuo, W., Gu, J. & Yang, M. (2020). Atomic structure of human TOM core complex. *Cell discovery*, **6**, 67. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-00198-2>
- Webb, C. T., Gorman, M. A., Lazarou, M., Ryan, M. T. & Gulbis, J. M. (2006). Crystal structure of the mitochondrial chaperone TIM9.10 reveals a six-bladed alpha-propeller. *Molecular cell*, **21**(1), 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.11.010>
- Weidberg, H. & Amon, A. (2018). MitoCPR-A surveillance pathway that protects mitochondria in response to protein import stress. *Science (New York, N.Y.)*, **360**(6385), eaan4146. <https://doi.org/10.1126/science.aan4146>
- Weinhäupl, K., Lindau, C., Hessel, A., Wang, Y., Schütze, C., Jores, T., Melchionda, L., Schönfisch, B., Kalbacher, H., Bersch, B., Rapaport, D., Brennich, M., Lindorff-Larsen, K., Wiedemann, N. & Schanda, P. (2018). Structural Basis of Membrane Protein Chaperoning through the Mitochondrial Intermembrane Space. *Cell*, **175**(5), 1365–1379.e25. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.039>
- Wenz, L. S., Ellenrieder, L., Qiu, J., Bohnert, M., Zufall, N., van der Laan, M., Pfanner, N., Wiedemann, N. & Becker, T. (2015). Sam37 is crucial for formation of the mitochondrial TOM-SAM supercomplex, thereby promoting β -barrel biogenesis. *The Journal of cell biology*, **210**(7), 1047–1054. <https://doi.org/10.1083/jcb.201504119>
- Wiedemann, N., Kozjak, V., Chacinska, A., Schönfisch, B., Rospert, S., Ryan, M. T., Pfanner, N. & Meisinger, C. (2003). Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature*, **424**(6948), 565–571. <https://doi.org/10.1038/nature01753>
- Wiedemann, N., Pfanner, N. & Chacinska, A. (2006). Chaperoning through the mitochondrial intermembrane space. *Molecular cell*, **21**(2), 145–148. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.01.001>
- Wiedemann, N., Pfanner, N. & Ryan, M. T. (2001). The three modules of ADP/ATP carrier cooperate in receptor recruitment and translocation into mitochondria. *The EMBO journal*, **20**(5), 951–960. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.5.951>
- Wiedemann, N., Truscott, K. N., Pfannschmidt, S., Guiard, B., Meisinger, C. & Pfanner, N. (2004). Biogenesis of the protein import channel Tom40 of the mitochondrial outer membrane: intermembrane space components are involved in an early stage of the assembly pathway. *The Journal of biological chemistry*, **279**(18), 18188–18194. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400050200>
- Williams, T. A., Cox, C. J., Foster, P. G., Szöllösi, G. J. & Embley, T. M. (2020). Phylogenomics provides robust support for a two-domains tree of life. *Nature ecology & evolution*, **4**(1), 138–147. <https://doi.org/10.1038/s41559-019-1040-x>
- Wrobel, L., Topf, U., Bragoszewski, P., Wiese, S., Sztolsztener, M. E., Oeljeklaus, S., Varabyova, A., Lirski, M., Chroscicki, P., Mroczek, S., Januszewicz, E., Dziembowski, A., Koblowska, M., Warscheid, B. & Chacinska, A. (2015). Mistargeted mitochondrial proteins activate a proteostatic response in the cytosol. *Nature*, **524**(7566), 485–488. <https://doi.org/10.1038/nature14951>
- Yablonska, S., Ganesan, V., Ferrando, L. M., Kim, J., Pyzel, A., Baranova, O. V., Khattar, N. K., Larkin, T. M., Baranov, S.

- V., Chen, N., Strohlein, C. E., Stevens, D. A., Wang, X., Chang, Y. F., Schurdak, M. E., Carlisle, D. L., Minden, J. S. & Friedlander, R. M. (2019). Mutant huntingtin disrupts mitochondrial proteostasis by interacting with TIM23. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **116**(33), 16593–16602. <https://doi.org/10.1073/pnas.1904101116>
- Yamamoto, H., Esaki, M., Kanamori, T., Tamura, Y., Nishikawa, S. i. & Endo, T. (2002). Tim50 is a subunit of the TIM23 complex that links protein translocation across the outer and inner mitochondrial membranes. *Cell*, **111**(4), 519–528. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)01053-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)01053-x)
- Yamamoto, H., Fukui, K., Takahashi, H., Kitamura, S., Shiota, T., Terao, K., Uchida, M., Esaki, M., Nishikawa, S., Yoshihisa, T., Yamano, K. & Endo, T. (2009). Roles of Tom70 in import of presequence-containing mitochondrial proteins. *The Journal of biological chemistry*, **284**(46), 31635–31646. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.041756>
- Yamano, K., Matsuda, N. & Tanaka, K. (2016). The ubiquitin signal and autophagy: an orchestrated dance leading to mitochondrial degradation. *EMBO reports*, **17**(3), 300–316. <https://doi.org/10.15252/embr.201541486>
- Yamano, K., Yatsukawa, Y., Esaki, M., Hobbs, A. E., Jensen, R. E. & Endo, T. (2008). Tom20 and Tom22 share the common signal recognition pathway in mitochondrial protein import. *The Journal of biological chemistry*, **283**(7), 3799–3807. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708339200>
- Yano, H., Baranov, S. V., Baranova, O. V., Kim, J., Pan, Y., Yablonska, S., Carlisle, D. L., Ferrante, R. J., Kim, A. H. & Friedlander, R. M. (2014). Inhibition of mitochondrial protein import by mutant huntingtin. *Nature neuroscience*, **17**(6), 822–831. <https://doi.org/10.1038/nn.3721>
- Young, J. C., Hoogenraad, N. J. & Hartl, F. U. (2003). Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell*, **112**(1), 41–50. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)01250-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)01250-3)
- Zaremba-Niedzwiedzka, K., Caceres, E. F., Saw, J. H., Bäckström, D., Juzokaite, L., Vancaester, E., Seitz, K. W., Anantharaman, K., Starnawski, P., Kjeldsen, K. U., Stott, M. B., Nunoura, T., Banfield, J. F., Schramm, A., Baker, B. J., Spang, A. & Ettema, T. J. (2017). Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity. *Nature*, **541**(7637), 353–358. <https://doi.org/10.1038/nature21031>
- Zhao, Q., Wang, J., Levichkin, I. V., Stasinopoulos, S., Ryan, M. T., & Hoogenraad, N. J. (2002). A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. *The EMBO journal*, **21**(17), 4411–4419. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf445>
- Zorova, L. D., Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Pevzner, I. B., Jankauskas, S. S., Babenko, V. A., Zorov, S. D., Balakireva, A. V., Juhaszova, M., Sollott, S. J. & Zorov, D. B. (2018). Mitochondrial membrane potential. *Analytical biochemistry*, **552**, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.009>

Review

Maria Clara Avendaño-Monsalve, José Carlos Ponce-Rojas and Soledad Funes*

From cytosol to mitochondria: the beginning of a protein journey

<https://doi.org/10.1515/hsz-2020-0110>

Received January 9, 2020; accepted February 24, 2020

Abstract: Mitochondrial protein import is one of the key processes during mitochondrial biogenesis that involves a series of events necessary for recognition and delivery of nucleus-encoded/cytosol-synthesized mitochondrial proteins into the organelle. The past research efforts have mainly unraveled how membrane translocases ensure the correct protein sorting within the different mitochondrial subcompartments. However, early steps of recognition and delivery remain relatively uncharacterized. In this review, we discuss our current understanding about the signals on mitochondrial proteins, as well as in the mRNAs encoding them, which with the help of cytosolic chaperones and membrane receptors support protein targeting to the organelle in order to avoid improper localization. In addition, we discuss recent findings that illustrate how mistargeting of mitochondrial proteins triggers stress responses, aiming to restore cellular homeostasis.

Keywords: heat shock proteins; mitochondrial protein import; mitochondrial stress response; mRNA targeting; ribosomal chaperones; yeast.

Introduction

Any living cell faces the challenge of properly sorting its proteome to specific destinations inside and outside the cell. The correct localization of proteins in cells aligns

with the compartmentalization process, required to optimize cellular chemical reactions by creating proper microenvironments and channeling between enzymes. However, protein sorting is defiant, and in many cases, mistargeted polypeptides can affect cell homeostasis. For this reason, cells have developed intricately systems to ensure the correct delivery of proteins to their final destinations. Such systems rely on two mechanisms to ensure correct protein targeting: (i) membrane receptors at the target organelle, exposing soluble domains to the cytosol that can couple with pore-forming proteins, which in turn allow translocation of substrates across the membrane into the organelle; and (ii) soluble factors in the cytosol that recognize substrates by identifying either amino acid sequences and/or secondary structures and keeping them in a partially unfolded state or certain elements on the mRNAs, which improve fidelity during protein transport.

The initial phases of protein transport into mitochondria correspond to the synthesis of precursors by cytosolic ribosomes. As soon as a nascent peptide emerges from the ribosomal exit tunnel, their unproductive association with other cellular components must be avoided to prevent protein misfolding or aggregation. Thereby, cytosolic chaperones bind and protect nascent proteins to assist their folding and to maintain precursor proteins in an import-competent conformation (Saibil, 2013). Chaperones can also act as recognition factors that promote the delivery of synthesized substrates to the required subcellular location. Substrate proteins often harbor targeting signals that are maintained accessible to be read due to the activity of chaperones and that determine the final localization of the protein.

The development and use of *in organello* import assays showed that protein transport to mitochondria can occur once protein synthesis is completed, that is, in a posttranslational manner (Harmey et al., 1977; Maccacchini et al., 1979a,b; Reid and Schatz, 1982; Adrian et al., 1986; Bihlmaier et al., 2008). This is true for all studied matrix proteins or transporters such as the ATP/ADP carrier (Aac2 or AAC), which can be efficiently imported after full synthesis *in vitro*. However, an increasing

*Corresponding author: Soledad Funes, Departamento de Genética Molecular Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n Ciudad Universitaria Coyoacán, México, Cd.Mx. 04510, Mexico, e-mail: sfunes@ifc.unam.mx. <https://orcid.org/0000-0003-1815-1977>

Maria Clara Avendaño-Monsalve: Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n Ciudad Universitaria Coyoacán, México, Cd.Mx. 04510, Mexico

José Carlos Ponce-Rojas: Department of Molecular, Cellular, and Developmental Biology, University of California at Santa Barbara, Santa Barbara, CA 93106-9625, USA

amount of experimental evidence coming from *in vivo* and *in vitro* assays, as well as electron microscopy, suggests that import can occur in a cotranslational manner (Kellems and Butow, 1972, 1974; Kellems et al., 1975; Knox et al., 1998; Kaltimbacher et al., 2006; Williams et al., 2014; Gold et al., 2017). In other words, soluble and membrane factors could promote that translationally active ribosomes come near the organelle's outer membrane (OM) to favor protein synthesis in the vicinity of the translocation pore. It has been suggested that the physicochemical traits of each mitochondrial protein, such as hydrophobicity or folding speed, could define their particular mechanisms required for import (Knox et al., 1998; Sass et al., 2003; Luk et al., 2005; Yogev et al., 2007; Williams et al., 2014); however, experimental evidence is still lacking to further understand these early recognition steps of mitochondrial protein import.

The evolutionary origin of mitochondrial targeting machineries

Mitochondria are complex organelles – present in almost every eukaryotic cell – composed of two membranes, the OM and the inner membrane (IM) that delimitate two aqueous spaces; the intermembrane space (IMS); and the mitochondrial matrix (Palade, 1952). Such architecture is the result of their endosymbiotic origin, as these organelles arose from a bacterial ancestor (most likely an α -proteobacteria Roger et al., 2017) that was engulfed by archaea belonging to the superfamily Asgard (Zaremba-Niedzwiedzka et al., 2017; Spang et al., 2019). This event created a symbiotic connection in which the α -proteobacteria assumed selected metabolic functions, the most prominent being energy production, until they became mitochondria of modern eukaryotic cells. The permanent modification of their genomes was a crucial change that occurred in both cell types once fused. A significant fraction of the genome originally contained in the bacterial ancestor was lost, another portion migrated and fused to the host genome, and a small fraction was retained inside the organelle (which is now the mitochondrial genome). In consequence, the host adopted a portion of genes derived from the bacterial cell, which eventually generated the nuclear eukaryotic genome, which encodes more than 99% of the mitochondrial proteome.

Simultaneously with this genetic rearrangement, one of the most dramatic consequences of the endosymbiosis was the modification of the way proteins arrive to mitochondria and are distributed to the different mitochondrial subcompartments (Herrmann, 2003;

Chacinska et al., 2009). Hence, cytosolic and membrane factors evolved to identify those mitochondrial proteins now encoded in the nuclear genome and help them arrive to the organelle where they fulfill their biological function, and their role will be discussed in the following sections. Moreover, targeting signals had to be incorporated into the substrate proteins in order to ensure their identification and correct sorting within the cell. The most studied and understood mitochondrial targeting signals are those located at the N-terminus, called presequences, which are cleaved upon import into the matrix. These presequences have a length of 15 to 50 amino acids and form an amphipathic α helix possessing one side of positively charged residues and the other side rich in hydrophobic residues (Figure 1) (Chacinska et al., 2009; Garg and Gould, 2017).

Membrane receptors at the OM recognize targeting signals and assist the initial stages of protein targeting into mitochondria

Most mitochondrial precursor proteins enter into the organelle using the Translocase of the OM (TOM complex). Several studies addressed the structural arrangement of TOM, both in *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa*, and suggested that this complex associates in dimers or trimers (Model et al., 2002; Shiota et al., 2015; Bausewein et al., 2017; Araiso et al., 2019). Recently, a detailed description of the structural arrangement of the TOM complex was determined by cryo-electron microscopy (Tucker and Park, 2019; Araiso et al., 2019). It was observed that the basal arrangement of the complex involves dimers of the monomeric TOM, where every monomer includes the following proteins: Tom40, the β -barrel pore dedicated to translocate mitochondrial proteins; Tom22, which is a central receptor for preproteins harboring presequences; and the small subunits Tom5, Tom6, and Tom7, which are important for stabilization of the complex and for controlling its biogenesis depending on the phase of the cell cycle. Furthermore, it was determined that within the Tom40 pore, preproteins are sorted depending on their final destination by exposing different contact sites to chaperones at the IMS or to the TIM23 complex at the IM (Kiebler et al., 1990; Moczko et al., 1992; Künkele et al., 1998; Tucker and Park, 2019; Araiso et al., 2019; Sakaue et al., 2019). Additional studies have demonstrated that two receptors can associate with the basal

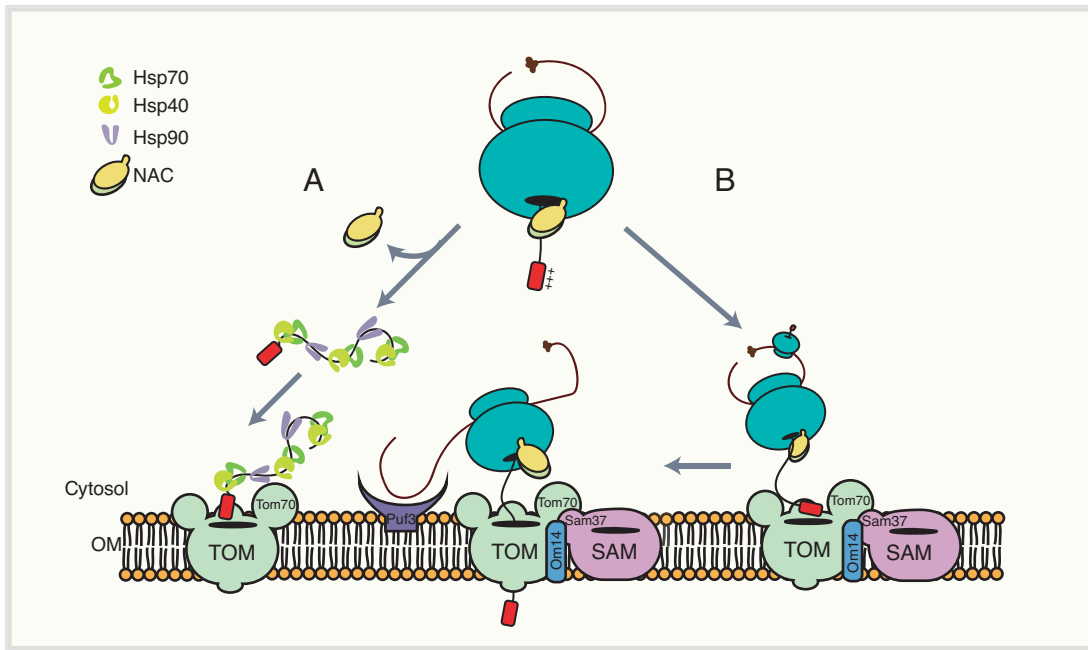


Figure 1: Mitochondrial protein import fidelity can be achieved in the cells by the concomitant action of elements at different stages of targeting. Most mitochondrial proteins are synthesized by cytosolic ribosomes (turquoise) and targeted to the organelle guided by different chaperones whose recognition and binding are essential to avoid mistargeting and possible aggregation. (A) For mitochondrial precursor proteins whose translation is completed in the cytosol, soluble chaperones from the Hsp70, Hsp40, and Hsp90 families (green, lime green, and violet) recognize them after their synthesis is completed and guide their way to the receptors of the TOM complex, thus allowing protein import. (B) Ribosomes translating mitochondrial proteins can be directed to the vicinity of the mitochondrial surface by the action of ribosomal chaperones such as NAC (yellow/green) and/or by proteins functioning as receptors for mRNAs encoding mitochondrial proteins (mMPs) such as Puf3 (purple).

TOM monomer: Tom20 and Tom70; however, their association is weaker than that of Tom22 (Shiota et al., 2015; Sakaue et al., 2019). All three receptors, Tom20, Tom70, and Tom22, expose cytosolic domains required for the recognition of mitochondrial substrates and their delivery to Tom40. These receptors will be discussed in the following sections.

Tom20 recognizes precursors harboring mitochondrial targeting signals

Tom20 is considered the master receptor of TOM because of its capacity to recognize a broad repertoire of precursors, mainly those possessing a cleavable presequence. Work done in *S. cerevisiae* demonstrated that Tom20 can receive different substrates, such as CoxIV, Cyt_c, and reporter constructs, such as Su9-DHFR (presequence of F₀-ATPase subunit 9 of *N. crassa* fused with mouse dihydrofolate reductase) and b2Δ-DHFR (presequence of Cyt_b2 of *S. cerevisiae* lacking 19 amino acids fused to DHFR). However, Tom20 can also recognize precursors with internal signals such as the phosphate carrier (PiC) (Brix et al., 1997, 1999). Just as Tom20, the homolog in *N. crassa* Mom19

also recognizes mitochondrial proteins with editable presequences and internal signals, examples of the latter are Su9-DHFR, F₁-ATPase subunit β, and the Fe/S protein of the bc₁ complex (Moczko et al., 1994). Recently, it was described that Tom20 also recognizes a β-hairpin signal sequence present at the C-terminus of β-barrel protein residents of the OM (Jores et al., 2016). In binding to partially unfolded precursors, Tom20 prevents the aggregation of these proteins before their import to mitochondria, in which Tom20 functions as a chaperone (Yano et al., 2003).

Tom20 is anchored to the OM by an α-helical transmembrane domain (TMD) and exposes its C-terminal domain to the cytosol. This domain contains a motif of tetratricopeptide repeats (TPR), which is important for its association with cytosolic chaperones such as the 70- and 90-heat shock protein families (Hsp70 and Hsp90) that will be discussed later in detail. These chaperones and Tom20 act sequentially during protein transport to mitochondria (Söllner et al., 1989; Harkness et al., 1994; Moczko et al., 1994). In addition, the cytosolic domain of Tom20 can directly bind to the presequence in mitochondrial precursors through negatively charged patches that interact with the positively charged side of the amphipathic presequence

(Brix et al., 1997) or by means of two hydrophobic patches that can also interact with the presequence (Rimmer et al., 2011). This suggests that Tom20 has at least two different sites for recognition of presequences, probably due to their amphipathicity (Abe et al., 2000; Rimmer et al., 2011). The crucial role of *TOM20* is illustrated by the compromised fitness of a *tom20* null mutant in *S. cerevisiae* (Harkness et al., 1994; Moczko et al., 1994), also indicating partial functional redundancy with other mitochondrial receptors, which will be discussed below.

Tom70 is the receptor in charge of recognizing carrier proteins of the IM

The second receptor of the TOM complex is Tom70 that recognizes substrates containing hydrophobic regions such as β -barrel proteins of the OM like Porin (Moczko et al., 1994), IMS proteins like Cyt_c (Brix et al., 1997), and IM carriers like AAC and PiC (Hines et al., 1990; Söllner et al., 1990; Hines and Schatz, 1993; Brix et al., 1997, 1999; Melin et al., 2015). In yeast, Tom70 has a less abundant paralog, Tom71, which is also believed to support protein recognition (Schlossmann et al., 1996; Burri et al., 2006). Tom70 interacts with hydrophobic precursors by the identification of internal noncleavable signal sequences and delivers them to the receptor Tom22 (Hines et al., 1990; Steger et al., 1990; Hines and Schatz, 1993; Schlossmann et al., 1994; Haucke et al., 1996; Brix et al., 1997, 1999; Komiyama et al., 1997). Similar to Tom20, Tom70 is anchored to the OM via its N-terminus, whereas the soluble C-terminal domain faces the cytosol. The latter domain contains 4 to 11 TPR motifs, which constitute the region of interaction with cytosolic chaperones Hsp70 and Hsp90, with mitochondrial precursors, and with Tom20 (Komiyama et al., 1997; Young et al., 2003; Melin et al., 2015). Tom70 also recognizes nonhydrophobic internal presequence-like signal sequences (internal MTS) broadening the protein spectrum whose import is influenced by this receptor (Backes et al., 2018). In this way, Tom70 has a role as cochaperone able to bind these proteins with internal signals and maintaining them in an import-competent state. Tom70 and Tom20 display partial functional redundancy as yeast null mutants on either gene (i.e. *TOM70* or *TOM20*) compromise cell fitness, but a double mutant is synthetic lethal (Ramage et al., 1993).

The receptor where precursor proteins converge: Tom22

The third receptor of the TOM complex is Tom22, which exposes its N- and C-terminal domains to the cytosol

and to the IMS, respectively (Kiebler et al., 1993; Araiso et al., 2019; Tucker and Park, 2019). Tom22 also recognizes and binds the presequence of precursors (Kiebler et al., 1993; Mayer et al., 1995; Brix et al., 1997, 1999; Yamano et al., 2008) simultaneously with Tom20 but at opposite sides of the presequence (Yamano et al., 2008; Rimmer et al., 2011; Shiota et al., 2011). The IMS domain of Tom22 makes part of the *trans* presequence-binding site for precursor translocation along with the loop between β 1 and β 2 sheets of Tom40 and the IMS loop of Tom7 (Araiso et al., 2019; Tucker and Park, 2019). This receiving motif promotes the transfer of precursors from Tom40 to Tim50, which is the receptor for incoming proteins at the TIM23 complex (Bolliger et al., 1995; Moczko et al., 1997; Shiota et al., 2011; Araiso et al., 2019). Tom22 thus mediates the transfer of precursors to complexes located in the IMS or the IM depending on the nature of the incoming polypeptide. The relevance of Tom22 for mitochondrial import is supported by the lethal phenotype of a *TOM22* null mutant (Lithgow et al., 1994; Hönlinger et al., 1995).

Noncanonical receptors support protein transport into mitochondria

Several proteins facilitate membrane insertion of OM proteins but do not require the pore formed by Tom40. One of these is Mim1, a protein anchored to the OM by a single transmembrane helix that contains two GXXXG motifs that allow its oligomerization, a step required for the membrane insertion of incoming proteins such as Tom20 and Tom22 (Waizenegger et al., 2005; Becker et al., 2008; Popov-Čeleketić et al., 2008; Dimmer and Rapaport, 2010). Similarly, the SAM complex (discussed below) enhances the import and assembly of TOM subunits Tom22, Tom20, and Tom6 (Stojanovski et al., 2007; Thornton et al., 2010). The detailed mechanism for the latter remains unclear.

Cytosolic chaperones assist initial phases of mitochondrial protein transport

Family of Hsp

Cytosolic chaperones are one of the main protein families that support protein transport (Deshaies et al., 1988; Young et al., 2003; Fan et al., 2006). Hsp40, Hsp70, and

Hsp90, respectively, recognize and bind nascent peptides as they are synthesized by ribosomes or when protein synthesis is completed (Figure 1A). Heat shock proteins enhance protein transport by maintaining substrates in an import-competent state (i.e. partially unfolded) and deliver them to the mitochondrial surface to the specific receptors localized at the OM. In particular, the cytosolic C-terminus of Tom70 interacts with the EEVD motifs in Hsp70 or Hsp90 before guiding the substrates to the pore of the translocase (Young et al., 2003; Wu and Sha, 2006; Li et al., 2009; Zanphorlin et al., 2016). The relevance of the interaction between Hsp70 or Hsp90 and Tom70 has been demonstrated for hydrophobic substrates such as the reporter construct *Cyb2⁽¹⁻⁸⁷⁾-DHFR*, the phosphate and the AAC carriers in yeast, and the mitochondrial peptide transporter in mammals (Young et al., 2003; Hoseini et al., 2016). It remains unknown how chaperones can discriminate between substrates directed to different organelles and how they participate in more than one route of transport. An example of this is Ssa1, an Hsp70 from the stress subfamily of proteins A (SSA), which impacts the biogenesis of proteins from both the endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria. Indeed, yeast temperature-sensitive *SSA1* mutants accumulate Atp2 as well as α -factor and carboxypeptidase Y precursors, suggesting the role of Ssa1 for proper sorting (Becker et al., 1996). However, whether the lack of function of SSA affects either protein sorting directly or the proteasomal degradation of the untargeted precursors remains undetermined.

Moreover, ribosome profiling studies in yeast have shown that the Ssb subfamily of Hsp70s (Ssb1 and Ssb2) associates to the exit tunnel of ribosomes translating nearly 80% of all mitochondrial proteins. Therefore, it is possible that Ssb binds to the mitochondrial nascent chains directly at the exit tunnel and keeps them in an unfolded state ready to engage the TOM complex for import (Döring et al., 2017; Stein et al., 2019). Furthermore, the cytosolic ring-shaped chaperonin TRiC/CCT also binds mitochondrial precursors cotranslationally without competing with Ssb; thereby, it has been also proposed to enhance mitochondrial protein targeting. However, more work needs to be done to elucidate TRiC relevance for mitochondrial biogenesis (Stein et al., 2019).

The function of the cytosolic chaperones mentioned previously depends on the formation of complexes with cochaperones of the Hsp40 family. Such is the case for Hsp40-related DnaJ chaperones from the DJA family in mammals and cochaperones Sti1, Ydj1, Xdj1, and Djp1 in yeast (Bhangoo et al., 2007; Papić et al., 2013; Hoseini et al., 2016; Opaliński et al., 2018). However, in some cases, Hsp40s promote protein import without association to Hsp70 or Hsp90. One example of this is Xdj1, a protein that

physically interacts with the receptor Tom22 and promotes import of hydrophobic precursors such as Oxa1 by delivering them to Tom22. Xdj1 also promotes the assembly of the TOM complex by enhancing import of TOM subunits such as Tom22 (Opaliński et al., 2018). A similar function is suggested for Djp1, as it displays specific physical interaction with Tom70. Indeed, Djp1 and Tom70 are required for the proper targeting of Mim1 to mitochondria (Papić et al., 2013; Opaliński et al., 2018). Hsp40s also assist delivery of β -barrel proteins such as porin, Tom40, and Sam50 to the OM along with SSA Hsp70s (Jores et al., 2018).

Further investigations are required to better understand the impact each specific chaperone-cochaperone pair has on protein transport. One possibility would be that different associations increase the variety of substrates they can bind while simultaneously giving specificity for the route of transport. Another mutually nonexclusive possibility is that they reside in different locations of the cell such as in the cytosol, on the surfaces of the ER and of mitochondria, and in the nucleus.

The nascent polypeptide-associated complex (NAC)

In addition to cytosolic Hsps, NAC (Nascent polypeptide-Associated Complex) also facilitates mitochondrial protein transport (Figure 1). NAC is a chaperone that assembles in heterodimers (an α and a β subunit) or homodimers (specifically in archaea, where NAC is a homodimer of α subunits). In yeast, there are two genes encoding β -subunits (*EGD1*, which encodes for subunit β , and *BTT1*, which encodes for subunit β'), so that six NAC dimers could be formed. These nonidentical dimers differ in their substrate spectrum as they bind to ribosomes translating different proteins. However, the presence of the six dimers has not directly been proven and is only inferred from work made in mutants lacking two out of the three NAC genes (Hu and Ronne, 1994; Shi et al., 1995; del Alamo et al., 2011). NAC binds cytosolic ribosomes and nascent polypeptides simultaneously, by inserting its positively charged patch located in the N-terminal of subunit β into the ribosomal exit tunnel, contacting nascent polypeptides of at least two amino acids long, close to the ribosomal peptidyl-transfer center. In contrast, subunit α remains at the ribosomal surface and associates with nascent polypeptides when they exit the tunnel. NAC thus functions as a ribosome plug that escorts nascent polypeptides (Reimann et al., 1999; Wegrzyn et al., 2006; Gamerdinger et al., 2019).

It was initially suggested that NAC supports protein sorting to mitochondria as yeast null mutants of NAC show decreased amounts of proteins within the organelle

(George et al., 1998, 2002; Yogev et al., 2007). Additionally, depletion of NAC during *in vitro* import reactions results in less efficient translocation of substrates into mitochondria (Fünfschilling and Rospert, 1999). Furthermore, pull-down experiments of stalled ribosomes and genetic screens suggested that $\alpha\beta'$ and $\beta\beta'$ -NAC dimers bind preferentially mitochondrial proteins, whereas the $\alpha\beta$ -NAC binds cytosolic proteins (del Alamo et al., 2011; Ponce-Rojas et al., 2017). However, both $\alpha\beta$ - and $\alpha\beta'$ -NAC complexes are relevant for mitochondrial protein transport as they bind receptors at the OM: Om14 and Sam37, respectively (Figure 1B, Lesnik et al., 2014; Ponce-Rojas et al., 2017). The relevance of NAC for cell homeostasis is reflected by the fact that the deletion of either of the genes encoding NAC subunits results in a lethal phenotype in mouse, nematodes, and flies (Deng and Behringer, 1995; Markesich et al., 2000; Bloss et al., 2003). Strikingly, in the budding yeast *S. cerevisiae*, deletion of the three genes encoding NAC subunits has no effect on the viability of the organism (Reimann et al., 1999; Ponce-Rojas et al., 2017), which illustrates the buffering capacity of the sorting machineries that orchestrate protein transport to mitochondria. How all these factors associate and organize in protein targeting is unknown, and further studies are necessary to understand the detailed biological implication of each chaperone and receptor pairs to the protein targeting process.

Om14 and Sam37 constitute a docking mitochondrial platform for the ribosomal chaperone NAC

The recruitment of NAC and translationally active ribosomes to the vicinity of the OM has been related to the function of Om14 and Sam37. Om14 is one of the most abundant proteins in yeast OM that spans the membrane three times, with its N-terminus facing the cytosol and its C-terminus in the IMS (Burri et al., 2006). This protein functions as a receptor for $\alpha\beta$ -NAC and associates with cytosolic ribosomal proteins (Lauffer et al., 2012; Lesnik et al., 2014). It has been shown that its absence decreases the number of active ribosomes associated with the mitochondrial surface (Lesnik et al., 2014).

Sam37 is one of the subunits of the SAM complex (Sorting and Assembly Machinery), which mediates the insertion of β -barrels into the OM after they have been imported into the organelle crossing the TOM complex and transiently bound to chaperones at the IMS. The central subunit of SAM is Sam50, a membrane-embedded β -barrel protein (Kozjak et al., 2003; Paschen et al., 2003) that

interacts with the peripheral proteins Sam35 and Sam37 (Kozjak et al., 2003; Wiedemann et al., 2003; Ishikawa et al., 2004; Milenkovic et al., 2004; Waizenegger et al., 2004). Furthermore, it was reported that Sam37 wires the transient association between the TOM and SAM complexes during the insertion of β -barrel proteins (Wenz et al., 2015). It has been also proposed that this protein can participate in the transport of other types of incoming proteins via its cytosolic domain (Stojanovski et al., 2007). Initial biochemical evidence indicated that Sam37 associates with Tom70 and was therefore considered a receptor of the TOM complex; however, it is currently not understood if this association occurs only with Sam37 or if it requires the entire SAM complex. Also, it was shown that blocking the cytosolic domain of Sam37 hampers the transport of proteins such as Aac2 and Cyt_c to the mitochondria (Gratzer et al., 1995). Recently, Sam37 was identified as the binding partner for the $\alpha\beta'$ -NAC complex. The relevance of this physical interaction is reflected in the compromised fitness of a yeast mutant lacking both components that exhibits a decreased import efficiency of the mitochondrial precursors Oxa1, Nfs1, and Sod2 (Ponce-Rojas et al., 2017). These findings suggest a relevant role for both Om14 and Sam37 in early steps of recognition during mitochondrial import, probably by facilitating the approach of translationally active ribosomes to the vicinity of mitochondria (Figure 1B). How these factors are interconnected with each other and other chaperones and receptors in the whole import apparatus is currently not understood.

Mitochondrial localization of mRNAs is important for protein import

Localization of mRNAs is a strategy to ensure that protein synthesis can occur at the site where the encoded polypeptide is needed (Jan et al., 2014; Williams et al., 2014; Buxbaum et al., 2015). Initially, the addition of the antibiotic cycloheximide, which stalls translation without losing the mRNA-ribosome-nascent polypeptide association, allowed the coisolation of translationally active cytosolic ribosomes with purified mitochondria and was observed at the vicinity of the OM, in particular at the OM-IM contact sites (Kellems and Butow, 1972, 1974; Kellems et al., 1974, 1975). The localization of clustered ribosomes at the mitochondrial surface was confirmed by cryo-tomography through the specific binding with

the TOM complex in a nascent-chain-dependent manner (Gold et al., 2017).

mRNAs encoding mitochondrial proteins (mMPs) have also been observed associated with the mitochondrial surface. The analysis of these mMPs enriched at the mitochondrial fractions indicated that their protein products originated from a prokaryotic origin, whereas mMPs of eukaryotic origin were found preferentially at free-cytosolic ribosomes, suggesting that cotranslational acting signals could contribute to ensure the fidelity of the import process before specialized import machineries were fully developed at the mitochondrial membranes (Suissa and Schatz, 1982; Marc et al., 2002). Furthermore, it was observed that polysomes associated at the OM carry preferentially mRNAs encoding IM proteins, supporting the notion that cotranslational import of hydrophobic membrane proteins prevents mislocalization and aggregation in aqueous environments (Williams et al., 2014). As these experiments have been performed in the presence of cycloheximide, whether anchoring of ribosomes with the translocation machinery at the OM is required for import remains undetermined. To elucidate if mRNA association to mitochondria depends on translation, a comparison was made in mammalian HEK293T treated with cycloheximide or with puromycin. These results allowed identifying a subpopulation of mRNAs that remains associated with mitochondria in the absence of intact ribosomes. Among these mMPs are those encoding components of the mitochondrial ribosome and OXPHOS components (Fazal et al., 2019).

mRNA molecules carry signals important for their mitochondrial localization

mRNA trafficking can modulate both spatial and temporal localization of the encoded protein. Such mechanisms involve signals within the mRNA (*cis*-acting elements) and proteins (or protein complexes, *trans*-acting elements) that recognize such signals and determine their localization. For mMPs, it was suggested that there is a signature that recruits them onto the organelle. This signal could either be a particular nucleotide sequence contained within the mRNA or a secondary or tertiary structure formed by the mRNA molecule. Up to date, neither the sequence nor the structure has been precisely determined. However, it was proposed that the mechanisms of recognition are evolutionarily conserved at least between yeast and humans, as human mMPs expressed in yeast cells can localize to mitochondria (Sylvestre et al., 2003).

First approaches indicated that the 3'-untranslated region (3'-UTR) of mRNAs is important for their localization at the mitochondrial surface as this sequence is sufficient to direct nonmitochondrial mRNAs to the OM (Marc et al., 2002; Margeot et al., 2002; Liu and Liu, 2007). Indeed, absence of the 3'-UTR decreases import efficiency of certain substrates such as *Atp2* and *Oxa1*, and their precursor proteins are accumulated outside the mitochondria (Gadir et al., 2011; Zabezhinsky et al., 2016). The region between nucleotides 50 and 150 downstream of the stop codon of *ATP2* mRNA proved to be sufficient to localize such mRNA to the vicinity of mitochondria (Margeot et al., 2002). Comparative analysis of different 3'-UTRs found structural elements and/or particular nucleotide sequences that could function as signals for localization, i.e. the bulged stem-loop structure (Min2 element, Liu and Liu, 2007) and the 10-nt element 5'-CYTGAAATA-3', where Y is C or T, which is present in 56 mMPs (Figure 2, *ATP2* mRNA, Anderson and Parker, 2000).

Even though the influence of the 3'-UTR has been proven important for localization of mRNAs, it also requires the translation of the presequence (Figure 2, *OXA1* mRNA), probably to ensure engagement of the translation machinery to the TOM complex to enable mitochondrial import. The 3'-UTR-mediated localization of mRNAs could also depend on the nature of the encoded protein. One possible feature is the presence of TMDs and their hydrophobicity level, which could be misread as hydrophobic ER signals (Zabezhinsky et al., 2016). In such cases, proper targeting to mitochondria would be ensured *in vivo* only if all the appropriate signals are read; otherwise, proteins could be misdirected to other organelles such as the ER. Imbalances in protein transport specificity could be used by the cell as a mechanism for monitoring metabolic states, and that may trigger stress responses such as the Unfolded Protein Response (UPR).

Puf3: a protein that determines the fate of mMPs

An mRNA-binding protein (mRBP) that has been proposed as a *trans* element for the recognition of mMPs is Puf3. This protein belongs to the PUF (Pumilio and FBF) family of proteins, which are highly conserved among eukaryotes. PUF proteins modulate posttranscriptionally the expression of different mRNA molecules through the recognition of specific *cis*-regulatory elements. Their RNA-binding domain is composed of eight consecutive α -helical PUF repeats that adopt a crescent-shaped structure (reviewed in Wang et al., 2018). Each PUF repeat recognizes a specific

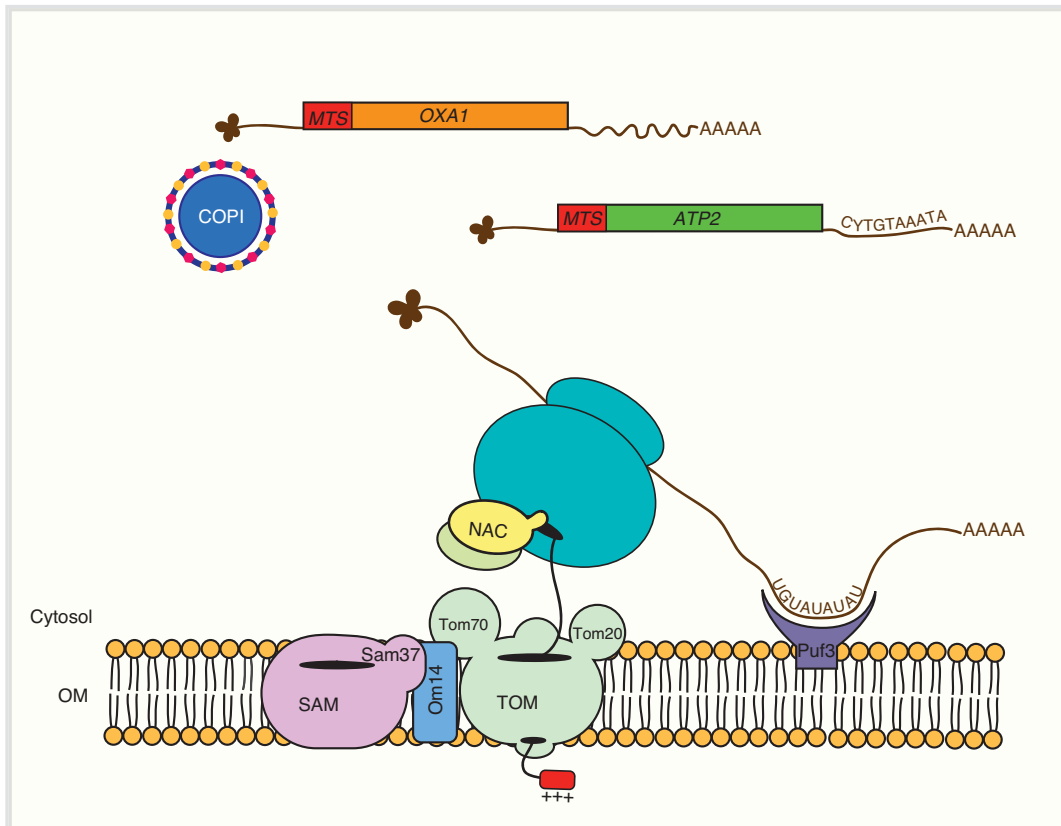


Figure 2: Different signals at mMPs favor their localization at the OM.

Mitochondrial localization of mRNAs can be influenced by signals at the 3'-UTR of mMPs such as CYTGTAATA (where Y represents C or T, Min2 element found in *ATP2* mRNA) or UGUUAUUAU (Puf3 recognition sequence), which can be recognized by mRBPs located at the OM such as Puf3 (purple). In addition, other regions both at the 3'-UTR and at the region encoding the presequence (*MTS*) are relevant for mitochondrial localization of mMPs such as *OXA1*. This transport is also linked to components of the COPI vesicles.

nucleotide on the mRNA target, thereby the recognition sites are composed of eight nucleotides on the bound mRNA (Wang et al., 2001, 2002).

In yeast, there are six PUF proteins, from which Puf3 is involved in several aspects of mitochondrial biogenesis such as decay of mMPs and mitochondrial dynamics through its binding with Mdm12 (Olivas and Parker, 2000; García-Rodríguez et al., 2007; Quenault et al., 2011). Puf3 associates to the cytosolic surface of the OM and binds preferentially mMPs through the recognition of the nucleotide sequence 5'-UGUUAUUAU-3' on their 3'-UTR (Figure 2, Gerber et al., 2004; Kershaw et al., 2015). Furthermore, the presence of the Puf3 recognition site was associated with perimitochondrial localization of the mRNAs carrying it, and thereby Puf3 was proposed as a key component that situates mRNAs to the vicinity of the OM, hence guiding cotranslational mitochondrial import (Saint-Georges et al., 2008). However, not all mMPs possess a Puf3-binding domain, and therefore they have been classified

into two classes depending on the presence or absence of this characteristic.

It has been shown that Puf3 protein levels decrease under respiratory conditions (García-Rodríguez et al., 2007); in addition, Puf3 also enhances degradation of mMPs under fermentative conditions, whereas in respiratory conditions the translation of those mRNAs is favored (Miller et al., 2014; Lee and Tu, 2015) probably as a mechanism to tune protein synthesis. Furthermore, recent ribosome profiling data showed that Puf3-mRNA targets are stabilized in the absence of Puf3, but their translation efficiency is decreased, suggesting that in addition to the role that Puf3 plays during mRNA stability, they can also participate – directly or through its interaction partners – in the translational capacity shifts required during metabolic changes of the cell, in particular from fermentative to nonfermentative metabolism (Wang et al., 2019).

It is clear that Puf3 is vital for the regulation of mitochondrial biogenesis; however, our understanding of

its precise role during mitochondrial import remains far from being completely described.

Tom20 cooperates with Puf3 in the localization of mMPs

Besides its canonical role for protein recognition, Tom20 was found to be important for proper localization of mRNAs in the vicinity of mitochondria. In yeast mutants lacking *TOM20*, some mRNAs lose their mitochondrial localization. The absence of *TOM20* also results in an increased expression of *PUF3*, which points toward an idea that Tom20 and Puf3 could play redundant functions only for mMP localization. Furthermore, a mutant lacking both genes is unable to grow on media with non-fermentable carbon sources, strengthening the idea that these two components cooperate for mitochondrial biogenesis (Eliyahu et al., 2010; Gadir et al., 2011).

Coupling vesicle transport with mRNA localization: the role of coat complex I

Coat Complex I (COPI) is a molecular machinery involved in enabling vesicle formation and selecting the cargo that has to be transported within the formed vesicles in the secretory pathway. The role of COPI has been more closely involved in retrieval from the Golgi apparatus to the ER and intra-Golgi transport, endosomal transport, lipid homeostasis, and mRNA transport (reviewed in Arakel and Schwappach, 2018). However, it was observed that temporal inactivation of Sec27, essential β -coat protein of the COPI coatomer, results in loss of mitochondrial localization of mMPs such as *OXA1*, *CBS1*, *FIS1*, *IMG1*, *RSM25*, and *MDM10* independently on the protein synthesis (Figure 2, Slobodin and Gerst, 2010; Zabezhinsky et al., 2016). Two *cis*-acting elements in *OXA1* mRNA were found to be relevant for localization depending on COPI: the encoded presequence and a TMD region. Alterations on these *cis*-elements resulted in a mislocalization of the mMPs to the ER. As COPI has not been involved yet on vesicle/lipid trafficking to mitochondria, mMP targeting by COPI could be a process independent on vesicle formation and probably relies on the COPI subunits themselves; however, the precise mechanism of mRNA/COPI recognition and binding remains unclear (Zabezhinsky et al., 2016). Disruption of COPI function also affects mitochondrial morphology, respiration, membrane potential, and protein import. However, the pleiotropic effects of

COPI on mitochondrial biogenesis could be either direct or indirect as the result of mRNA mislocalization.

mRBPs related to mitochondrial biogenesis without a clear influence on mitochondrial protein targeting

Clu1 is an mRBP initially reported to be part of the translation initiation factor 3 (eIF3); however, it is not essential for translation, and its absence produces a phenotype of fragmented mitochondria in yeast (Zhu et al., 1997; Vornlocher et al., 1999; Mitchell et al., 2013). The mammalian homolog, CLUH, is a cytosolic RBP that associates with mitochondria and binds several mMPs such as components of the respiratory chain and the tricarboxylic acid cycle (TCA) and the fatty acid and amino acid metabolisms, as well as components of the mitochondrial dynamics and mitophagy (Gao et al., 2014). It has been proposed that CLUH protects target mRNAs from degradation during their transport to the OM and is an important player during posttranscriptional reprogramming to increase the oxidative capacity of mitochondria (Schatton and Rugarli, 2019).

In *Drosophila melanogaster*, the OM protein MDI (Mitochondrial DNA Insufficient) binds to the RNA-binding protein Larp (La-related protein) and recruits it to the mitochondrial surface (Zhang et al., 2016). Larp belongs to a conserved superfamily of eukaryotic proteins that bind RNA molecules and are involved in different stages of RNA biogenesis such as processing, maturation, localization, and regulation of mRNA translation (reviewed in Dock-Bregeon et al., 2019). The elimination of MDI leads to a delocalization of Larp from the mitochondrial surface to the cytosol and to a decreased protein synthesis in the vicinity of mitochondria without affecting general translation. The absence of MDI reduces the presence of 64 nuclear-encoded mitochondrial proteins, including 21 subunits of the mitochondrial ribosome, 23 subunits of the oxidative phosphorylation (OXPHOS) complexes, and the mitochondrial transcription factor TFAM (Zhang et al., 2016).

Cellular responses to mistargeting and mitochondrial protein accumulation

Although it was previously suggested, it is only in recent years that special attention was drawn to the cellular

responses triggered by a failure in the recognition, sorting, and import of mitochondrial proteins (Figure 3).

It has been observed that any decrease in mitochondrial protein import efficiency causes a transcriptional and translational rewiring, reducing the amount of ribosomal proteins (i.e. an attenuation of cytosolic translation) and increasing proteasomal activity. This kind of cellular response was observed to be triggered by clogging

of the TOM complex, by malfunction of Mia40 (a protein relevant for sorting and folding of IMS proteins), or by depleting the membrane potential (essential to mitochondrial import into the IM and matrix). Such response was called UPRam (UPR activated by mistargeting of proteins) or mPOS (mitochondrial precursor overaccumulation stress) (Figure 3A, blue arrows; Wang and Chen, 2015; Wrobel et al., 2015; Boos et al., 2019). The aforementioned

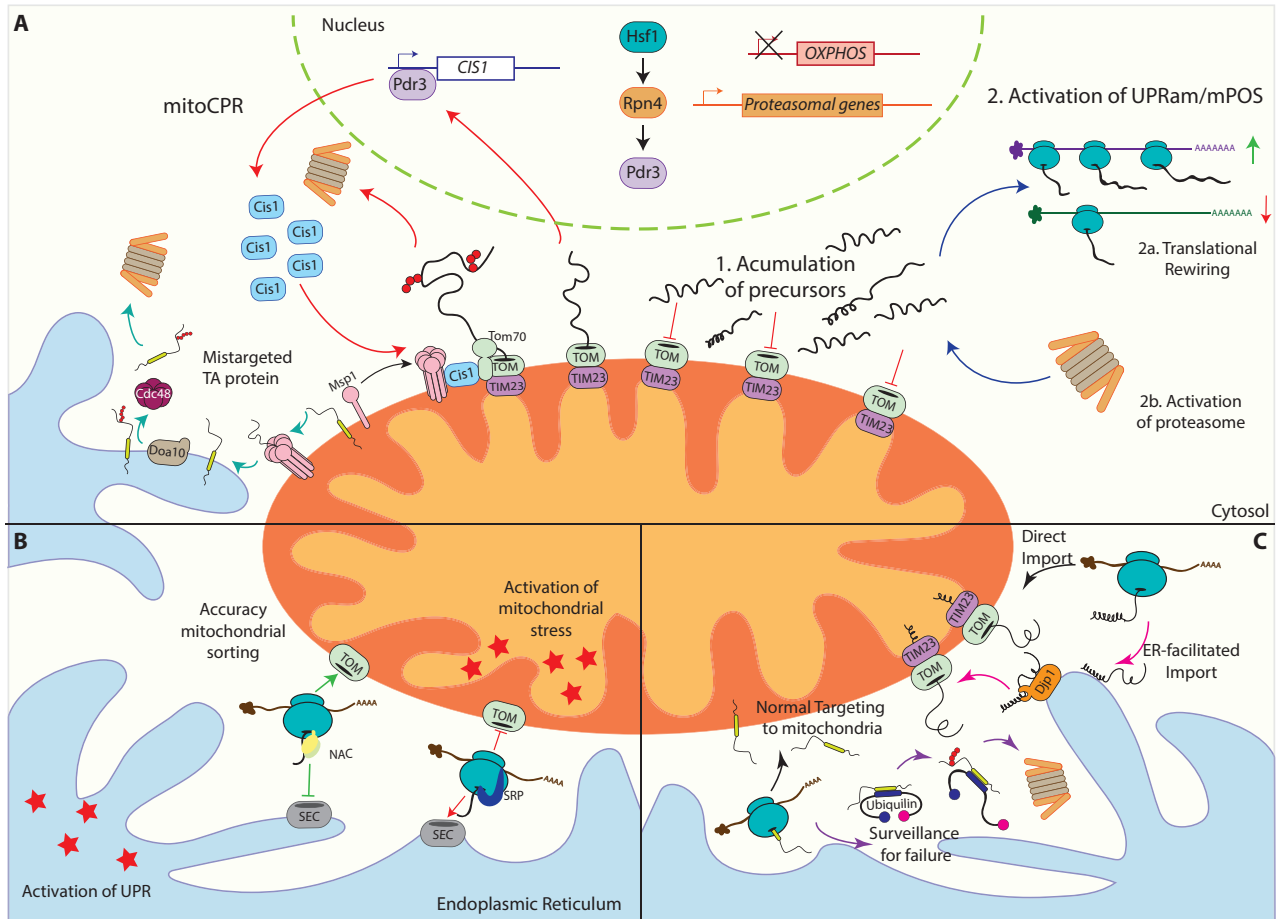


Figure 3: Mistargeting of mitochondrial proteins triggers diverse responses.

(A) Clogging of the TOM complex by saturation with incoming proteins activates changes in the transcriptional program of the cell via the activation of Hsf1 (a modulator of the cytosolic translation), Rpn4 (an activator of proteasomal genes), and Pdr3. One of the genes upregulated by Pdr3 is *CIS1* that encodes for the cytosolic protein Cis1. This protein is directed to the mitochondrial surface where the OM AAA-protease Msp1 is also recruited to the vicinity of the compromised TOM complex. Trapped substrates are then ubiquitinated (red circles) and directed to degradation by the proteasome (red arrows). Msp1 is also involved in the identification of mistargeted tail-anchored proteins at the OM and facilitates their transfer to the ER membrane where they are then ubiquitinated by Doa10 and transferred to the proteasome with the help of Cdc48 (turquoise arrows). An impairment or slowdown in mitochondrial protein import leads to an accumulation of precursor proteins in the cytosol, which triggers the activation of UPRam/mPOS and a translational rewiring that in turn initiates the synthesis of the ubiquitin-proteasome system to degrade the accumulated proteins. In contrast, synthesis of ribosomal proteins and proteins involved in translation is downregulated. (B) Nascent polypeptide-Associated Complex determines accuracy during sorting of mitochondrial proteins to the organelle. Malfunctions in this early recognition lead to mistargeting of mitochondrial proteins to the ER caused by SRP recognition of their hydrophobic segments. This mislocalization activates the UPR in the ER lumen. (C) Mitochondrial proteins mistargeted to the surface of the ER are recognized by the Hsp40 chaperone Djp1 and redirected to the TOM complex (pink arrows). Tail-anchored proteins that have to be localized to the OM are identified in the cytosol by ubiquilins, which are able to either regulate their targeting to the OM or mark them for proteasomal degradation (purple arrows).

adaptive transcriptional program involves the activation of transcriptional factors Hsf1 (inducing the heat shock response) and Rpn4 (inducing proteasome synthesis), as well as the partial inactivation of the HAP complex to mute the expression of OXPHOS genes (Boos et al., 2019). This response demonstrates that when protein transport to mitochondria is halted, protein synthesis is attenuated, and proteasomal degradation increases until clogging of the TOM complex is solved, illustrating how protective responses coordinate and connect to reestablish mitochondrial protein import.

Another response was discovered with the accumulation of proteins containing bipartite signals such as Cox5a (i.e. IM proteins possessing a presequence followed by a TMD), which causes a transcriptional reprogramming that depends on the transcriptional factor Pdr3. One of the Pdr3 targets is *CIS1*, whose encoded protein is found associated with mitochondria where it recruits the AAA-protease Msp1 to the vicinity of the TOM complex. There, Msp1 helps to pull out clogged precursors, which are then ubiquitinated and degraded by the proteasome. This system is called mitochondrial compromised protein-import response or mitoCPR (Figure 3A, red arrows; Weidberg and Amon, 2018). Msp1 has also been related to the surveillance of mislocalized tail-anchored proteins at the OM and facilitates their transfer to the ER. There, the ubiquitin ligase Doa10 and its partners Ubc7, Ubc5, and Cue1 ubiquitinate the tail-anchored protein before it is pulled out of the ER membrane by the cytosolic AAA-ATPase Cdc48 and directed for proteasomal degradation (Figure 3A, turquoise arrows; Matsumoto et al., 2019). Interestingly, the key transcriptional factor for the mitoCPR Pdr3 is one of the targets of Rpn4 (Boos et al., 2019), which could indicate an interconnection between the described responses.

TOM complex clogging activates a specific response that involves Ubx2, a dual localized protein in the ER and mitochondria, which senses the accumulation of precursor proteins at the TOM complex and then recruits the AAA-ATPase Cdc48. There, Cdc48 removes the accumulated proteins, which are then degraded by the proteasome. This pathway, called mitoTAD (mitochondrial protein translocation-associated degradation), ensures that the Tom40 channel is available for translocation of mitochondrial precursors (Mårtensson et al., 2019).

As mentioned earlier, the ribosomal chaperone NAC ensures mitochondrial targeting fidelity avoiding inappropriate entrance of non-ER resident proteins to this organelle. Such vital task was demonstrated by studies in *Caenorhabditis elegans*, where NAC knockdown results in an aberrant mistargeting of mitochondrial

proteins to the ER independently of the signal recognition particle (SRP). As a consequence, there is an overload in the ER capability and mitochondrial dysfunction, which triggers a UPR in both organelles, affecting the whole organism homeostasis (Figure 3B; Gamerdinger et al., 2015, 2019). Similarly, SRP acts as counterpart to NAC providing specificity to protein targeting to the ER, thereby avoiding mislocalization of ER proteins into mitochondria (Costa et al., 2018).

Even with the existence of the described responses to alterations on the import systems, mistargeting to other organelles such as the ER still occurs. To rescue these proteins and redirect them to mitochondria, two different mechanisms have been described to date. One involves Djpl, an Hsp40 chaperone that can be localized both to the ER and the cytosol. Djpl senses mislocalized mitochondrial proteins at the ER surface and returns them to the TOM complex. The discovery of this ER-SURF pathway (ER surface retrieval pathway) supports the notion of buffering systems outside mitochondria that ensure proper mitochondrial transport (Figure 3C, pink arrows; Hansen et al., 2018). Additionally, a recently discovered group of chaperones, the ubiquilins, prevents the aggregation of tail-anchored mitochondrial proteins in the cytosol. The principal function of ubiquilins is to sense if those proteins can be retargeted to the OM or to facilitate their degradation by the proteasome (Figure 3C, violet arrows, Itakura et al., 2016).

The discovery of the different mechanisms by which cells can respond to alterations in mitochondrial protein targeting and import is encouraging toward a more integrative model that explains how mitochondrial protein targeting is finely tuned in response to metabolic changes or stress conditions.

An integrative view on mitochondrial protein recognition in the cytosol

Over the last decades, two models have been proposed for explaining mitochondrial protein import: posttranslational and cotranslational. Different components, such as chaperones, signals on the substrate proteins (i.e. presequence, hydrophobic TMDs, among others), or the signals on the mMPs, were described independently and with the limitations of studying only a handful of mitochondrial proteins. However, few efforts have been made to experimentally address the study of the elements that

mediate early stages of protein import, thereby neglecting the relevance of cotranslational acting elements *in vivo*, even for proteins that have been described to be imported posttranslationally *in vitro*. Furthermore, a comprehensive analysis is crucial to determine the precise role of posttranslational and cotranslational elements, either separately or simultaneously, to better understand how proteins are targeted to the mitochondria.

In this review, we sought to expose and integrate all the different variables that have been considered throughout the years and that must work at early steps of recognition, transport, and targeting for mitochondrial proteins (Figure 1). We therefore propose a model where a translationally active ribosome associated with ribosomal chaperones, such as NAC, identifies the synthesis of a new mitochondrial protein and helps to discriminate between a posttranslational and a cotranslational pathway. If the first is favored, the ribosome completes protein synthesis, and Hsp chaperones associate with the newly synthesized protein and escort it to the TOM complex (Figure 1A). Otherwise, Sam37 and Om14 function as receptors for NAC, thereby facilitating the approach of the translationally active ribosome to the vicinity of the TOM complex coupling mitochondrial translation with import (Figure 1B). Even though Om14 is known to be present only in yeast, it is possible that yet unidentified factors could mediate a similar function in other eukaryotes. We do not conceive these two systems as mutually exclusive *in vivo*, as some of the described components have been reported to have a role in both of them. It seems very plausible that the collection of signals at both the mRNA and protein levels, as well as the nature of the mitochondrial protein and the metabolic state of a cell, determines the factors required for transport of each mitochondrial protein. There are still several questions unanswered before we can fully understand the precise mechanisms underlying mitochondrial protein targeting *in vivo*, but the recent genome-wide analyses are shedding some light on the general mechanisms of recognition and targeting of mitochondrial proteins.

Acknowledgments: Our work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, CB 237344) and the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM, IN207518) to S.F. M.C.A.M. is a graduate student from Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and she is supported by CONACyT (464718). We would like to thank Johannes M. Herrmann, Diego González-Halphen, and Mauricio Cárdenas-Rodríguez for critically reading this manuscript.

References

- Abe, Y., Shodai, T., Muto, T., Mihara, K., Torii, H., Nishikawa, S., Endo, T., and Kohda, D. (2000). Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20. *Cell* *100*, 551–560.
- Adrian, G., McCammon, M., Montgomery, D., and Douglas, M. (1986). Sequences required for delivery and localization of the ADP/ATP translocator to the mitochondrial inner membrane. *Mol. Cell. Biol.* *6*, 626–634.
- Anderson, J.S. and Parker, R. (2000). Computational identification of *cis*-acting elements affecting post-transcriptional control of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* *28*, 1604–1617.
- Araiso, Y., Tsutsumi, A., Qiu, J., Imai, K., Shiota, T., Song, J., Lindau, C., Wenz, L.-S., Sakaue, H., Yunoki, K., et al. (2019). Structure of the mitochondrial import gate reveals distinct preprotein paths. *Nature* *575*, 395–401.
- Arakel, E.C. and Schwappach, B. (2018). Formation of COPI-coated vesicles at a glance. *J. Cell Sci.* *131*, jcs209890.
- Backes, S., Hess, S., Boos, F., Woellhaf, M.W., Gödel, S., Jung, M., Mühlhaus, T., and Herrmann, J.M. (2018). Tom70 enhances mitochondrial preprotein import efficiency by binding to internal targeting sequences. *J. Cell Biol.* *217*, jcb.201708044.
- Bausewein, T., Mills, D.J., Langer, J.D., Nitschke, B., Nussberger, S., and Kühlbrandt, W. (2017). Cryo-EM structure of the TOM core complex from *Neurospora crassa*. *Cell* *170*, 693–700.
- Becker, J., Walter, W., Yan, W., and Craig, E. (1996). Functional interaction of cytosolic Hsp70 and a DnaJ-related protein, Ydj1p, in protein translocation *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 4378–4386.
- Becker, T., Pfannschmidt, S., Guiard, B., Stojanovski, D., Milenkovic, D., Kutik, S., Pfanner, N., Meisinger, C., and Wiedemann, N. (2008). Biogenesis of the mitochondrial TOM complex Mim1 promotes insertion and assembly of signal-anchored receptors. *J. Biol. Chem.* *283*, 120–127.
- Bhango, M.K., Tzankov, S., Fan, A., Dejgaard, K., Thomas, D.Y., and Young, J.C. (2007). Multiple 40-kDa heat-shock protein chaperones function in Tom70-dependent mitochondrial import. *Mol. Biol. Cell* *18*, 3414–3428.
- Bihlmaier, K., Bien, M., and Herrmann, J.M. (2008). *In vivo* import of proteins into isolated mitochondria. In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 457: Membrane Trafficking, A. Vancura, ed. (Totowa, NJ, USA: Humana Press), pp. 85–94.
- Bloss, T.A., Witze, E.S., and Rothman, J.H. (2003). Suppression of CED-3-independent apoptosis by mitochondrial betaNAC in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *424*, 1066–1071.
- Bolliger, L., Junne, T., Schatz, G., and Lithgow, T. (1995). Acidic receptor domains on both sides of the outer membrane mediate translocation of precursor proteins into yeast mitochondria. *EMBO J.* *14*, 6318–6326.
- Boos, F., Krämer, L., Groh, C., Jung, F., Haberkant, P., Stein, F., Wollweber, F., Gackstatter, A., Zöller, E., van der Laan, M., et al. (2019). Mitochondrial protein-induced stress triggers a global adaptive transcriptional programme. *Nat. Cell Biol.* *21*, 442–451.
- Brix, J., Dietmeier, K., and Pfanner, N. (1997). Differential recognition of preproteins by the purified cytosolic domains of the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70. *J. Biol. Chem.* *272*, 20730–20735.

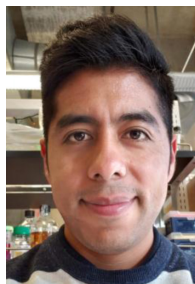
- Brix, J., Rüdiger, S., Bukau, B., Schneider-Mergener, J., and Pfanner, N. (1999). Distribution of binding sequences for the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70 in a presequence-carrying preprotein and a non-cleavable preprotein. *J. Biol. Chem.* *274*, 16522–16530.
- Burri, L., Vascotto, K., Gentle, I.E., Chan, N.C., Beilharz, T., Stapleton, D.J., Ramage, L., and Lithgow, T. (2006). Integral membrane proteins in the mitochondrial outer membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J.* *273*, 1507–1515.
- Buxbaum, A.R., Haimovich, G., and Singer, R.H. (2015). In the right place at the right time: visualizing and understanding mRNA localization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *16*, 95–109.
- Chacinska, A., Koehler, C.M., Milenkovic, D., Lithgow, T., and Pfanner, N. (2009). Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* *138*, 628–644.
- Costa, E.A., Subramanian, K., Nunnari, J., and Weissman, J.S. (2018). Defining the physiological role of SRP in protein-targeting efficiency and specificity. *Science* *359*, 689–692.
- del Alamo, M., Hogan, D.J., Pechmann, S., Albanese, V., Brown, P.O., and Frydman, J. (2011). Defining the specificity of cotranslationally acting chaperones by systematic analysis of mRNAs associated with ribosome-nascent chain complexes. *PLoS Biol.* *9*, e1001100.
- Deng, J. and Behringer, R.R. (1995). An insertional mutation in the *BTF3* transcription factor gene leads to an early postimplantation lethality in mice. *Transgenic Res.* *4*, 264–269.
- Deshaies, R.J., Koch, B.D., Werner-Washburne, M., Craig, E.A., and Schekman, R. (1988). A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature* *332*, 800–805.
- Dimmer, K. and Rapaport, D. (2010). The enigmatic role of Mim1 in mitochondrial biogenesis. *Eur. J. Cell Biol.* *89*, 212–215.
- Dock-Bregeon, A., Lewis, K.A., and Conte, M.R. (2019). The La-related proteins: structures and interactions of a versatile superfamily of RNA binding proteins. *RNA Biol.*, DOI:10.1080/15476286.2019.1695712.
- Döring K., Ahmed N., Riemer T., Suresh H.G., Vainshtein Y., Habich M., Riemer J., Mayer M.P., O'Brien E.P., Kramer G., and Bukau B. (2017). Profiling Ssb-nascent chain interactions reveals principles of Hsp70-assisted folding. *Cell* *170*, 298–311.
- Eliyahu, E., Pnueli, L., Melamed, D., Scherrer, T., Gerber, A.P., Pines, O., Rapaport, D., and Arava, Y. (2010). Tom20 mediates localization of mRNAs to mitochondria in a translation-dependent manner. *Mol. Cell Biol.* *30*, 284–294.
- Fan, A.C., Bhangoo, M.K., and Young, J.C. (2006). Hsp90 functions in the targeting and outer membrane translocation steps of Tom70-mediated mitochondrial import. *J. Biol. Chem.* *281*, 33313–33324.
- Fazal, F.M., Han, S., Parker, K.R., Kaewsapsak, P., Xu, J., Boettiger, A.N., Chang, H.Y., and Ting, A.Y. (2019). Atlas of subcellular RNA localization revealed by APEX-Seq. *Cell* *178*, 473–490.
- Fünfschilling, U. and Rospert, S. (1999). Nascent polypeptide-associated complex stimulates protein import into yeast mitochondria. *Mol. Biol. Cell* *10*, 3289–3299.
- Gadir, N., Haim-Vilmsky, L., Kraut-Cohen, J., and Gerst, J.E. (2011). Localization of mRNAs coding for mitochondrial proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* *17*, 1551–1565.
- Gamerding, M., Hanebuth, M., Frickey, T., and Deuerling, E. (2015). The principle of antagonism ensures protein targeting specificity at the endoplasmic reticulum. *Science* *348*, 201–207.
- Gamerding, M., Kobayashi, K., Wallisch, A., Kreft, S.G., Sailer, C., Schlömer, R., Sachs, N., Jomaa, A., Stengel, F., Ban, N., et al. (2019). Early scanning of nascent polypeptides inside the ribosomal tunnel by NAC. *Mol. Cell* *75*, 996–1006.
- Gao, J., Schatton, D., Martinelli, P., Hansen, H., Pla-Martin, D., Barth, E., Becker, C., Altmueller, J., Frommolt, P., Sardiello, M., et al. (2014). CLUH regulates mitochondrial biogenesis by binding mRNAs of nuclear-encoded mitochondrial proteins. *J. Cell Biol.* *207*, 213–223.
- Garcia, M., Darzacq, X., Delaveau, T., Jourden, L., Singer, R., and Jacq, C. (2007). Mitochondria-associated yeast mRNAs and the biogenesis of molecular complexes. *Mol. Biol. Cell.* *18*, 362–368.
- García-Rodríguez, L.J., Gay, A., and Pon, L.A. (2007). Puf3p, a Pumilio family RNA binding protein, localizes to mitochondria and regulates mitochondrial biogenesis and motility in budding yeast. *J. Cell Biol.* *176*, 197–207.
- Garg, S.G. and Gould, S.B. (2017). The role of charge in protein targeting evolution. *Trends Cell Biol.* *27*, 894–905.
- George, R., Beddoe, T., Landl, K., and Lithgow, T. (1998). The yeast nascent polypeptide-associated complex initiates protein targeting to mitochondria *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *95*, 2296–2301.
- George, R., Walsh, P., Beddoe, T., and Lithgow, T. (2002). The nascent polypeptide-associated complex (NAC) promotes interaction of ribosomes with the mitochondrial surface *in vivo*. *FEBS Lett.* *516*, 213–216.
- Gerber, A.P., Herschlag, D., and Brown, P.O. (2004). Extensive association of functionally and cytotopically related mRNAs with Puf family RNA-binding proteins in yeast. *PLoS Biol.* *2*, E79.
- Gold, V.A., Chrosicki, P., Bragoszewski, P., and Chacinska, A. (2017). Visualization of cytosolic ribosomes on the surface of mitochondria by electron cryo-tomography. *EMBO Rep.* *18*, 1786–1800.
- Gratzer, S., Lithgow, T., Bauer, R., Lamping, E., Paltauf, F., Kohlwein, S., Haucke, V., Junne, T., Schatz, G., and Horst, M. (1995). Mas37p, a novel receptor subunit for protein import into mitochondria. *J. Cell Biol.* *129*, 25–34.
- Hansen, K.G., Aviram, N., Laborenz, J., Bibi, C., Meyer, M., Spang, A., Schuldiner, M., and Herrmann, J.M. (2018). An ER surface retrieval pathway safeguards the import of mitochondrial membrane proteins in yeast. *Science* *361*, 1118–1122.
- Harkness, T., Nargang, F., van der Klei, I., Neupert, W., and Lill, R. (1994). A crucial role of the mitochondrial protein import receptor MOM19 for the biogenesis of mitochondria. *J. Cell Biol.* *124*, 637–648.
- Harmey, M.A., Hallermayer, G., Korb, H., and Neupert, W. (1977). Transport of cytoplasmically synthesized proteins into the mitochondria in a cell free system from *Neurospora crassa*. *Eur. J. Biochem.* *81*, 533–544.
- Haucke, V., Horst, M., Schatz, G., and Lithgow, T. (1996). The Mas20p and Mas70p subunits of the protein import receptor of yeast mitochondria interact via the tetratricopeptide repeat motif in Mas20p: evidence for a single hetero-oligomeric receptor. *EMBO J.* *15*, 1231–1237.
- Herrmann, J.M. (2003). Converting bacteria to organelles: evolution of mitochondrial protein sorting. *Trends Microbiol.* *11*, 74–79.
- Hines, V. and Schatz, G. (1993). Precursor binding to yeast mitochondria. A general role for the outer membrane protein Mas70p. *J. Biol. Chem.* *268*, 449–454.
- Hines, V., Brandt, A., Griffiths, G., Horstmann, H., Brüttsch, H., and Schatz, G. (1990). Protein import into yeast mitochondria is accelerated by the outer membrane protein MAS70. *EMBO J.* *9*, 3191–3200.

- Hönlinger, A., Kübrich, M., Moczko, M., Gärtner, F., Mallet, L., Bussereau, F., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Dietmeier, K., and Jacquet, M. (1995). The mitochondrial receptor complex: Mom22 is essential for cell viability and directly interacts with preproteins. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 3382–3389.
- Hoseini, H., Pandey, S., Jores, T., Schmitt, A., Franz-Wachtel, M., Macek, B., Buchner, J., Dimmer, K., and Rapaport, D. (2016). The cytosolic cochaperone Sti1 is relevant for mitochondrial biogenesis and morphology. *FEBS J.* *283*, 3338–3352.
- Hu, G.-Z. and Ronne, H. (1994). Yeast BTF3 protein is encoded by duplicated genes and inhibits the expression of some genes in vivo. *Nucleic Acids Res.* *22*, 2740–2743.
- Ishikawa, D., Yamamoto, H., Tamura, Y., Moritoh, K., and Endo, T. (2004). Two novel proteins in the mitochondrial outer membrane mediate β -barrel protein assembly. *J. Cell Biol.* *166*, 621–627.
- Itakura, E., Zavodszky, E., Shao, S., Wohlever, M.L., Keenan, R.J., and Hegde, R.S. (2016). Ubiquilins chaperone and triage mitochondrial membrane proteins for degradation. *Mol. Cell* *63*, 21–33.
- Jan, C.H., Williams, C.C., and Weissman, J.S. (2014). Principles of ER cotranslational translocation revealed by proximity-specific ribosome profiling. *Science* *346*, 1257521.
- Jiang, H., Guan, W., and Gu, Z. (2010). Tinkering evolution of post-transcriptional RNA regulons: Puf3p in fungi as an example. *PLoS Genet.* *6*, e1001030.
- Jores, T., Klinger, A., Groß, L.E., Kawano, S., Flinner, N., Duchardt-Ferner, E., Wöhnert, J., Kalbacher, H., Endo, T., Schleiff, E., et al. (2016). Characterization of the targeting signal in mitochondrial β -barrel proteins. *Nat. Commun.* *7*, 12036.
- Jores, T., Lawatscheck, J., Beke, V., Franz-Wachtel, M., Yunoki, K., Fitzgerald, J.C., Macek, B., Endo, T., Kalbacher, H., Buchner, J., et al. (2018). Cytosolic Hsp70 and Hsp40 chaperones enable the biogenesis of mitochondrial β -barrel proteins. *J. Cell Biol.* *217*, 3091–3108.
- Kaltimbacher, V., Bonnet, C., Lecoeuvre, G., Forster, V., Sahel, J.-A., and Corral-Debrinski, M. (2006). mRNA localization to the mitochondrial surface allows the efficient translocation inside the organelle of a nuclear recoded ATP6 protein. *RNA* *12*, 1408–1417.
- Kellems, R. and Butow, R. (1972). Cytoplasmic-type 80 S ribosomes associated with yeast mitochondria. I. Evidence for ribosome binding sites on yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* *247*, 8043–8050.
- Kellems, R. and Butow, R. (1974). Cytoplasmic type 80 S ribosomes associated with yeast mitochondria. III. Changes in the amount of bound ribosomes in response to changes in metabolic state. *J. Biol. Chem.* *249*, 3304–3310.
- Kellems, R., Allison, V., and Butow, R. (1974). Cytoplasmic type 80S ribosomes associated with yeast mitochondria. II. Evidence for the association of cytoplasmic ribosomes with the outer mitochondrial membrane *in situ*. *J. Biol. Chem.* *249*, 3297–3303.
- Kellems, R., Allison, V., and Butow, R. (1975). Cytoplasmic type 80S ribosomes associated with yeast mitochondria. IV. Attachment of ribosomes to the outer membrane of isolated mitochondria. *J. Cell Biol.* *65*, 1–14.
- Kershaw, C.J., Costello, J.L., Talavera, D., Rowe, W., Castelli, L.M., Sims, P.F., Grant, C.M., Ashe, M.P., Hubbard, S.J., and Pavitt, G.D. (2015). Integrated multi-omics analyses reveal the pleiotropic nature of the control of gene expression by Puf3p. *Sci. Rep.* *5*, 15518.
- Kiebler, M., Pfaller, R., Söllner, T., Griffiths, G., Horstmann, H., Pfanner, N., and Neupert, W. (1990). Identification of a mitochondrial receptor complex required for recognition and membrane insertion of precursor proteins. *Nature* *348*, 610–616.
- Kiebler, M., Keil, P., Schneider, H., van der Klei, I.J., Pfanner, N., and Neupert, W. (1993). The mitochondrial receptor complex: a central role of MOM22 in mediating preprotein transfer from receptors to the general insertion pore. *Cell* *74*, 483–492.
- Knox, C., Sass, E., Neupert, W., and Pines, O. (1998). Import into mitochondria, folding and retrograde movement of fumarase in yeast. *J. Biol. Chem.* *273*, 25587–25593.
- Komiya, T., Rospert, S., Schatz, G., and Mihara, K. (1997). Binding of mitochondrial precursor proteins to the cytoplasmic domains of the import receptors Tom70 and Tom20 is determined by cytoplasmic chaperones. *EMBO J.* *16*, 4267–4275.
- Kozjak, V., Wiedemann, N., Milenkovic, D., Lohaus, C., Meyer, H.E., Guiard, B., Meisinger, C., and Pfanner, N. (2003). An essential role of Sam50 in the protein sorting and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane. *J. Biol. Chem.* *278*, 48520–48523.
- Künkele, K.-P., Juin, P., Pompa, C., Nargang, F.E., Henry, J.-P., Neupert, W., Lill, R., and Thieffry, M. (1998). The isolated complex of the translocase of the outer membrane of mitochondria. Characterization of the cation-selective and voltage-gated preprotein-conducting pore. *J. Biol. Chem.* *273*, 31032–31039.
- Lauffer, S., Mäbert, K., Czupalla, C., Pursche, T., Hoflack, B., Rödel, G., and Krause-Buchholz, U. (2012). *Saccharomyces cerevisiae* porin pore forms complexes with mitochondrial outer membrane proteins Om14p and Om45p. *J. Biol. Chem.* *287*, 17447–17458.
- Lee, C.-D. and Tu, B.P. (2015). Glucose-regulated phosphorylation of the PUF protein Puf3 regulates the translational fate of its bound mRNAs and association with RNA granules. *Cell Rep.* *11*, 1638–1650.
- Lesnik, C., Cohen, Y., Atir-Lande, A., Schuldiner, M., and Arava, Y. (2014). OM14 is a mitochondrial receptor for cytosolic ribosomes that supports co-translational import into mitochondria. *Nat. Commun.* *5*, 5711.
- Li, J., Qian, X., Hu, J., and Sha, B. (2009). Molecular Chaperone Hsp70/Hsp90 prepares the mitochondrial outer membrane translocon receptor Tom71 for preprotein loading. *J. Biol. Chem.* *284*, 23852–23859.
- Lithgow, T., Junne, T., Suda, K., Gratzer, S., and Schatz, G. (1994). The mitochondrial outer membrane protein Mas22p is essential for protein import and viability of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *91*, 11973–11977.
- Liu, J.M. and Liu, D.R. (2007). Discovery of a mRNA mitochondrial localization element in *Saccharomyces cerevisiae* by nonhomologous random recombination and *in vivo* selection. *Nucleic Acids Res.* *35*, 6750–6761.
- Luk, E., Yang, M., Jensen, L.T., Bourbonnais, Y., and Culotta, V. (2005). Manganese activation of superoxide dismutase 2 in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *280*, 22715–22720.
- Maccacchini, M., Rudin, Y., Blobel, G., and Schatz, G. (1979a). Import of proteins into mitochondria: precursor forms of the extramitochondrially made F1-ATPase subunits in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *76*, 343–347.
- Maccacchini, M., Rudin, Y., and Schatz, G. (1979b). Transport of proteins across the mitochondrial outer membrane. A precursor form of the cytoplasmically made intermembrane enzyme cytochrome c peroxidase. *J. Biol. Chem.* *254*, 7468–7471.

- Marc, P., Margeot, A., Devaux, F., Blugeon, C., Debrinski, M., and Jacq, C. (2002). Genome-wide analysis of mRNAs targeted to yeast mitochondria. *EMBO Rep.* **3**, 159–164.
- Margeot, A., Blugeon, C., Sylvestre, J., Vialette, S., Jacq, C., and Debrinski, M. (2002). In *Saccharomyces cerevisiae*, ATP2 mRNA sorting to the vicinity of mitochondria is essential for respiratory function. *EMBO J.* **21**, 6893–6904.
- Marksich, D., Gajewski, K., Nazimiec, M., and Beckingham, K. (2000). Bicaudal encodes the *Drosophila* beta NAC homolog, a component of the ribosomal translational machinery. *Development* **127**, 559–572.
- Mårtensson, C.U., Priesnitz, C., Song, J., Ellenrieder, L., Doan, K., Boos, F., Floerchinger, A., Zufall, N., Oeljeklaus, S., Warscheid, B., et al. (2019). Mitochondrial protein translocation-associated degradation. *Nature* **569**, 679–683.
- Matsumoto, S., Nakatsukasa, K., Kakuta, C., Tamura, Y., Esaki, M., and Endo, T. (2019). Msp1 clears mistargeted proteins by facilitating their transfer from mitochondria to the ER. *Mol. Cell Biol.* **39**, 191–205.
- Mayer, A., Nargang, F., Neupert, W., and Lill, R. (1995). MOM22 is a receptor for mitochondrial targeting sequences and cooperates with MOM19. *EMBO J.* **14**, 4204–4211.
- Melin, J., Kilisch, M., Neumann, P., Lytovchenko, O., Gomkale, R., Schendzielorz, A., Schmidt, B., Liepold, T., Ficner, R., Jahn, O., et al. (2015). A presequence-binding groove in Tom70 supports import of Mdl1 into mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1853**, 1850–1859.
- Milenkovic, D., Kozjak, V., Wiedemann, N., Lohaus, C., Meyer, H.E., Guiard, B., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2004). Sam35 of the mitochondrial protein sorting and assembly machinery is a peripheral outer membrane protein essential for cell viability. *J. Biol. Chem.* **279**, 22781–22785.
- Miller, M.A., Russo, J., Fischer, A.D., Leban, F.A., and Olivas, W.M. (2014). Carbon source-dependent alteration of Puf3p activity mediates rapid changes in the stabilities of mRNAs involved in mitochondrial function. *Nucleic Acids Res.* **42**, 3954–3970.
- Mitchell, S.F., Jain, S., She, M., and Parker, R. (2013). Global analysis of yeast mRNPs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 127–133.
- Moczko, M., Dietmeier, K., Söllner, T., Segui, B., Steger, H.F., Neupert, W., and Pfanner, N. (1992). Identification of the mitochondrial receptor complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **310**, 265–268.
- Moczko, M., Ehmann, B., Gärtner, F., Hönliger, A., Schäfer, E., and Pfanner, N. (1994). Deletion of the receptor MOM19 strongly impairs import of cleavable preproteins into *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *J. Biol. Chem.* **269**, 9045–9051.
- Moczko, M., Bömer, U., Kübrich, M., Zufall, N., Hönliger, A., and Pfanner, N. (1997). The intermembrane space domain of mitochondrial Tom22 functions as a trans binding site for preproteins with N-terminal targeting sequences. *Mol. Cell Biol.* **17**, 6574–6584.
- Model, K., Prinz, T., Ruiz, T., Radermacher, M., Krimmer, T., Kühbrandt, W., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2002). Protein translocase of the outer mitochondrial membrane: role of import receptors in the structural organization of the TOM complex. *J. Mol. Biol.* **316**, 657–666.
- Olivas, W. and Parker, R. (2000). The Puf3 protein is a transcript-specific regulator of mRNA degradation in yeast. *EMBO J.* **19**, 6602–6611.
- Opaliński, Ł., Song, J., Priesnitz, C., Wenz, L-S., Oeljeklaus, S., Warscheid, B., Pfanner, N., and Becker, T. (2018). Recruitment of cytosolic J-proteins by TOM receptors promotes mitochondrial protein biogenesis. *Cell Rep.* **25**, 2036–2043.
- Palade, G.E. (1952). The fine structure of mitochondria. *Anat. Rec.* **114**, 427–451.
- Papić, D., Elbaz-Alon, Y., Koerdts, S., Leopold, K., Worm, D., Jung, M., Schuldiner, M., and Rapaport, D. (2013). The role of Djpl in import of the mitochondrial protein Mim1 demonstrates specificity between a cochaperone and its substrate protein. *Mol. Cell Biol.* **33**, 4083–4094.
- Paschen, S.A., Waizenegger, T., Stan, T., Preuss, M., Cyrklaff, M., Hell, K., Rapaport, D., and Neupert, W. (2003). Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins. *Nature* **426**, 862–866.
- Ponce-Rojas, J., Avendaño-Monsalve, M., Yañez-Falcón, A., Jaimes-Miranda, F., Garay, E., Torres-Quiroz, F., Deluna, A., and Funes, S. (2017). $\alpha\beta$ -NAC cooperates with Sam37 to mediate early stages of mitochondrial protein import. *FEBS J.* **284**, 814–830.
- Popov-Čeleketić, J., Waizenegger, T., and Rapaport, D. (2008). Mim1 functions in an oligomeric form to facilitate the integration of Tom20 into the mitochondrial outer membrane. *J. Mol. Biol.* **376**, 671–680.
- Quenault, T., Lithgow, T., and Traven, A. (2011). PUF proteins: repression, activation and mRNA localization. *Trends Cell Biol.* **21**, 104–112.
- Ramage, L., Junne, T., Hahne, K., Lithgow, T., and Schatz, G. (1993). Functional cooperation of mitochondrial protein import receptors in yeast. *EMBO J.* **12**, 4115–4123.
- Reid, G. and Schatz, G. (1982). Import of proteins into mitochondria. Yeast cells grown in the presence of carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone accumulate massive amounts of some mitochondrial precursor polypeptides. *J. Biol. Chem.* **257**, 13056–13061.
- Reimann, B., Bradsher, J., Franke, J., Hartmann, E., Wiedmann, M., Prehn, S., and Wiedmann, B. (1999). Initial characterization of the nascent polypeptide-associated complex in yeast. *Yeast* **15**, 397–407.
- Rimmer, K.A., Foo, J., Ng, A., Petrie, E.J., Shilling, P.J., Perry, A.J., Mertens, H.D., Lithgow, T., Mulhern, T.D., and Gooley, P.R. (2011). Recognition of mitochondrial targeting sequences by the import receptors Tom20 and Tom22. *J. Mol. Biol.* **405**, 804–818.
- Roger, A.J., Muñoz-Gómez, S.A., and Kamikawa, R. (2017). The origin and diversification of mitochondria. *Curr. Biol.* **27**, 1177–1192.
- Saibil, H. (2013). Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 630–642.
- Saint-Georges, Y., Garcia, M., Delaveau, T., Jourdain, L., Crom, S., Lemoine, S., Tanty, V., Devaux, F., and Jacq, C. (2008). Yeast mitochondrial biogenesis: a role for the PUF RNA-binding protein Puf3p in mRNA localization. *PLoS One* **3**, e2293.
- Sakaue, H., Shiota, T., Ishizaka, N., Kawano, S., Tamura, Y., Tan, K., Imai, K., Motono, C., Hirokawa, T., Taki, K., et al. (2019). Porin associates with Tom22 to regulate the mitochondrial protein gate assembly. *Mol. Cell Biol.* **39**, 1044–1055.
- Sass, E., Karniely, S., and Pines, O. (2003). Folding of fumarate during mitochondrial import determines its dual targeting in yeast. *J. Biol. Chem.* **278**, 45109–45116.
- Schatton, D. and Rugarli, E.I. (2019). A concert of RNA-binding proteins coordinates mitochondrial function. *Crit. Rev. Biochem. Biol.* **53**, 652–666.

- Schlossmann, J., Dietmeier, K., Pfanner, N., and Neupert, W. (1994). Specific recognition of mitochondrial preproteins by the cytosolic domain of the import receptor MOM72. *J. Biol. Chem.* *269*, 11893–11901.
- Schlossmann, J., Lill, R., Neupert, W., and Court, D.A. (1996). Tom71, a novel homologue of the mitochondrial preprotein receptor Tom70. *J. Biol. Chem.* *271*, 17890–17895.
- Shi, X., Parthun, M.R., and Jaehning, J.A. (1995). The yeast *EGD2* gene encodes a homologue of the α NAC subunit of the human nascent-polypeptide-associated complex. *Gene* *165*, 199–202.
- Shiota, T., Mabuchi, H., Tanaka-Yamano, S., Yamano, K., and Endo, T. (2011). *In vivo* protein-interaction mapping of a mitochondrial translocator protein Tom22 at work. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *108*, 15179–15183.
- Shiota, T., Imai, K., Qiu, J., Hewitt, V.L., Tan, K., Shen, H.-H., Sakiyama, N., Fukasawa, Y., Hayat, S., Kamiya, M., et al. (2015). Molecular architecture of the active mitochondrial protein gate. *Science* *349*, 1544–1548.
- Slobodin, B. and Gerst, J.E. (2010). A novel mRNA affinity purification technique for the identification of interacting proteins and transcripts in ribonucleoprotein complexes. *RNA* *16*, 2277–2290.
- Söllner, T., Griffiths, G., Pfaller, R., Pfanner, N., and Neupert, W. (1989). MOM19, an import receptor for mitochondrial precursor proteins. *Cell* *59*, 1061–1070.
- Söllner, T., Pfaller, R., Griffiths, G., Pfanner, N., and Neupert, W. (1990). A mitochondrial import receptor for the ADP/ATP carrier. *Cell* *62*, 107–115.
- Spang, A., Stairs, C.W., Dombrowski, N., Eme, L., Lombard, J., Caceres, E.F., Greening, C., Baker, B.J., and Ettema, T.J. (2019). Proposal of the reverse flow model for the origin of the eukaryotic cell based on comparative analyses of Asgard archaeal metabolism. *Nat. Microbiol.* *4*, 1138–1148.
- Steger, H., Söllner, T., Kiebler, M., Dietmeier, K., Pfaller, R., Trülsch, K., Tropschug, M., Neupert, W., and Pfanner, N. (1990). Import of ADP/ATP carrier into mitochondria: two receptors act in parallel. *J. Cell Biol.* *111*, 2353–2363.
- Stein K.C., Kriel A., and Frydman J. (2019). Nascent polypeptide domain topology and elongation rate direct the cotranslational hierarchy of Hsp70 and TRIC/CCT. *Mol. Cell* *75*, 1117–1130.
- Stojanovski, D., Guiard, B., Kozjak-Pavlovic, V., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2007). Alternative function for the mitochondrial SAM complex in biogenesis of α -helical TOM proteins. *J. Cell Biol.* *179*, 881–893.
- Suissa, M. and Schatz, G. (1982). Import of proteins into mitochondria. Translatable mRNAs for imported mitochondrial proteins are present in free as well as mitochondria-bound cytoplasmic polysomes. *J. Biol. Chem.* *257*, 13048–13055.
- Sylvestre, J., Margeot, A., Jacq, C., Dujardin, G., and Corral-Debrinski, M. (2003). The role of the 3' untranslated region in mRNA sorting to the vicinity of mitochondria is conserved from yeast to human cells. *Mol. Biol. Cell* *14*, 3848–3856.
- Thornton, N., Stroud, D.A., Milenkovic, D., Guiard, B., Pfanner, N., and Becker, T. (2010). Two modular forms of the mitochondrial sorting and assembly machinery are involved in biogenesis of α -helical outer membrane proteins. *J. Mol. Biol.* *396*, 540–549.
- Tucker, K. and Park, E. (2019). Cryo-EM structure of the mitochondrial protein-import channel TOM complex at near-atomic resolution. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *26*, 1158–1166.
- Vornlocher, H.-P., Hanachi, P., Ribeiro, S., and Hershey, J.W. (1999). A 110-kilodalton subunit of translation initiation factor eIF3 and an associated 135-kilodalton protein are encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* *TIF32* and *TIF31* genes. *J. Biol. Chem.* *274*, 16802–16812.
- Waizenegger, T., Habib, S.J., Lech, M., Mokranjac, D., Paschen, S.A., Hell, K., Neupert, W., and Rapaport, D. (2004). Tob38, a novel essential component in the biogenesis of beta-barrel proteins of mitochondria. *EMBO Rep.* *5*, 704–709.
- Waizenegger, T., Schmitt, S., Zivkovic, J., Neupert, W., and Rapaport, D. (2005). Mim1, a protein required for the assembly of the TOM complex of mitochondria. *EMBO Rep.* *6*, 57–62.
- Wang, X. and Chen, X. (2015). A cytosolic network suppressing mitochondria-mediated proteostatic stress and cell death. *Nature* *524*, 481–484.
- Wang, X., Zamore, P.D., and Hall, T. (2001). Crystal structure of a Pumilio homology domain. *Mol. Cell* *7*, 855–865.
- Wang, X., McLachlan, J., Zamore, P.D., and Hall, T. (2002). Modular recognition of RNA by a human Pumilio-homology domain. *Cell* *110*, 501–512.
- Wang, M., Ogé, L., Perez-Garcia, M.-D., Hamama, L., and Sakr, S. (2018). The PUF protein family: overview on PUF RNA targets, biological functions, and post transcriptional regulation. *Int. J. Mol. Sci.* *19*, 410.
- Wang, Z., Sun, X., Wee, J., Guo, X., and Gu, Z. (2019). Novel insights into global translational regulation through Pumilio family RNA-binding protein Puf3p revealed by ribosomal profiling. *Curr. Genet.* *65*, 201–212.
- Wegrzyn, R.D., Hofmann, D., Merz, F., Nikolay, R., Rauch, T., Graf, C., and Deuring, E. (2006). A conserved motif is prerequisite for the interaction of NAC with ribosomal protein L23 and nascent chains. *J. Biol. Chem.* *281*, 2847–2857.
- Weidberg, H. and Amon, A. (2018). MitoCPR – a surveillance pathway that protects mitochondria in response to protein import stress. *Science* *360*, eaan4146.
- Wenz, L.-S., Ellenrieder, L., Qiu, J., Bohnert, M., Zufall, N., van der Laan, M., Pfanner, N., Wiedemann, N., and Becker, T. (2015). Sam37 is crucial for formation of the mitochondrial TOM-SAM supercomplex, thereby promoting β -barrel biogenesis. *J. Cell Biol.* *210*, 1047–1054.
- Wiedemann, N., Kozjak, V., Chacinska, A., Schönfisch, B., Rospert, S., Ryan, M.T., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2003). Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature* *424*, 565–571.
- Williams, C.C., Jan, C.H., and Weissman, J.S. (2014). Targeting and plasticity of mitochondrial proteins revealed by proximity-specific ribosome profiling. *Science* *346*, 748–751.
- Wrobel, L., Topf, U., Bragoszewski, P., Wiese, S., Sztolsztener, M.E., Oeljeklaus, S., Varabyova, A., Lirski, M., Chroscicki, P., Mroczek, S., et al. (2015). Mistargeted mitochondrial proteins activate a proteostatic response in the cytosol. *Nature* *524*, 485–488.
- Wu, Y. and Sha, B. (2006). Crystal structure of yeast mitochondrial outer membrane translocon member Tom70p. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 589–593.
- Yamano, K., Yatsukawa, Y., Esaki, M., Hobbs, A.E., Jensen, R.E., and Endo, T. (2008). Tom20 and Tom22 share the common signal recognition pathway in mitochondrial protein import. *J. Biol. Chem.* *283*, 3799–3807.

- Yano, M., Terada, K., and Mori, M. (2003). Mitochondrial import receptors Tom20 and Tom22 have chaperone-like activity. *J. Biol. Chem.* *279*, 10808–10813.
- Yogev, O., Karniely, S., and Pines, O. (2007). Translation-coupled translocation of yeast fumarase into mitochondria *in vivo*. *J. Biol. Chem.* *282*, 29222–29229.
- Young, J.C., Hoogenraad, N.J., and Hartl, F.U. (2003). Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell* *112*, 41–50.
- Zabehzinsky, D., Slobodin, B., Rapaport, D., and Gerst, J.E. (2016). An essential role for COPI in mRNA localization to mitochondria and mitochondrial function. *Cell Rep.* *15*, 540–549.
- Zanphorlin, L.M., Lima, T.B., Wong, M.J., Balbuena, T.S., Minetti, C.A., Remeta, D.P., Young, J.C., Barbosa, L.R., Gozzo, F.C., and Ramos, C.H. (2016). Heat shock protein 90 kDa (Hsp90) has a second functional interaction site with the mitochondrial import receptor Tom70. *J. Biol. Chem.* *291*, 18620–18631.
- Zaremba-Niedzwiedzka, K., Caceres, E.F., Saw, J.H., Bäckström, D., Juzokaite, L., Vancaester, E., Seitz, K.W., Anantharaman, K., Starnawski, P., Kjeldsen, K.U., et al. (2017). Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity. *Nature* *541*, 353–358.
- Zhang, Y., Chen, Y., Gucek, M., and Xu, H. (2016). The mitochondrial outer membrane protein MDJ promotes local protein synthesis and mtDNA replication. *EMBO J.* *35*, 1045–1057.
- Zhu, Q., Hulen, D., Liu, T., and Clarke, M. (1997). The *cluA*-mutant of *Dictyostelium* identifies a novel class of proteins required for dispersion of mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *94*, 7308–7313.



José Carlos Ponce-Rojas

Department of Molecular, Cellular, and Developmental Biology, University of California at Santa Barbara, Santa Barbara, CA 93106-9625, USA

José Carlos Ponce-Rojas earned his PhD at UNAM studying protein targeting to the mitochondria. Currently, he is a postdoctoral fellow at the University of California at Santa Barbara, California, investigating how stress responses arise in eukaryotic cells to stabilize internal composition imbalances.



Soledad Funes

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n Ciudad Universitaria Coyoacán, México, Cd.Mx. 04510, Mexico, sfunes@ifc.unam.mx, <https://orcid.org/0000-0003-1815-1977>

Soledad Funes is an associate professor in the Department of Molecular Genetics of the Cell Physiology Institute at UNAM. Her research focuses on different aspects of mitochondrial biogenesis including the function of the NAC complex during mitochondrial protein import.

Bionotes



Maria Clara Avendaño-Monsalve

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n Ciudad Universitaria Coyoacán, México, Cd.Mx. 04510, Mexico

Maria Clara Avendaño-Monsalve was born in Medellín, Colombia. She is a Biological Engineer by the National University of Colombia-Campus Medellín. She moved to Mexico City and earned a master's degree in Biochemical Sciences by the National Autonomous University of Mexico (UNAM). She is currently doing a PhD at the same university studying how mitochondrial proteins arrive to the mitochondrial surface with the help of the ribosomal-associated chaperone NAC.

$\alpha\beta'$ -NAC cooperates with Sam37 to mediate early stages of mitochondrial protein import

José Carlos Ponce-Rojas¹, María Clara Avendaño-Monsalve¹, Armando Roberto Yañez-Falcón¹, Fabiola Jaimes-Miranda¹, Erika Garay², Francisco Torres-Quiroz³, Alexander DeLuna² and Soledad Funes¹

¹ Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

² Unidad de Genómica Avanzada (Langebio), Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Irapuato, Mexico

³ Departamento de Bioquímica y Biología Estructural, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

Keywords

mitochondria; mitochondrial biogenesis; nascent-polypeptide associated complex; protein import; Sam37

Correspondence

S. Funes, Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n Ciudad Universitaria, Coyoacán, Cd. Mx. 04510, Mexico City, Mexico

Fax: +52 55 56225611

Tel: +52 55 56225679

E-mail: sfunes@ifc.unam.mx

(Received 3 August 2016, revised 20 December 2016, accepted 18 January 2017)

doi:10.1111/febs.14024

The mitochondrial proteome is mostly composed of nuclear-encoded proteins. Such polypeptides are synthesized with signals that guide their intracellular transport to the surface of the organelle and later within the different mitochondrial subcompartments until they reach their functional destination. It has been suggested that the nascent-polypeptide associated complex (NAC) – a cytosolic chaperone that recognizes nascent chains on translationally active ribosomes – has a role in the import of nuclear-encoded mitochondrial proteins. However, the molecular mechanisms that regulate the NAC-mediated cotranslational import are still not clear. Here, we show that a particular NAC heterodimer formed by subunits α and β' in *Saccharomyces cerevisiae* is specifically involved in the process of mitochondrial import and functionally cooperates with Sam37, an outer membrane protein 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. We propose that $\alpha\beta'$ -NAC and Sam37 are members of the system that recognizes mitochondrial proteins at early stages of their synthesis, escorting them to the import machinery of mitochondria.

Introduction

Mitochondria and mitochondria-derived organelles are essential for eukaryotic cells. They are important in many cellular processes such as signaling, lipid and amino acid metabolism, iron–sulfur-cluster biogenesis, and energy production (reviewed in [1]). To carry out all these functions they require a proteome encoded by genes that are distributed in both the nuclear and the mitochondrial genomes; the proper mitochondrial biogenesis involves the coordinated expression of these separate sets of genes (reviewed in [2]). Mitochondrial ribosomes synthesize a few proteins within the matrix,

mainly hydrophobic components of the oxidative phosphorylation complexes [3], and the majority of mitochondrial proteins (approximately 1000 in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*) are synthesized by cytosolic ribosomes before being directed to and imported into the mitochondria [4]. A large amount of evidence has been accumulated over the past decades on the mitochondrial membrane complexes that ensure the correct translocation and delivery of proteins into the appropriate subcompartment, depending on the signals contained within their amino

Abbreviations

DHFR, dihydrofolate reductase; MTS, mitochondrial targeting signal; NAC, nascent-polypeptide associated complex; PCA, protein-fragment complementation assay; PMS, post-mitochondrial supernatant; RSA, random spore analysis; SAM, sorting and assembly machinery; SGA, synthetic genetic array; TOM, translocase of the outer membrane; UTR, untranslated region.

acid sequences [2,4,5]. However, which proteins assist initial stages of protein recognition and delivery to the mitochondrial surface is still under debate [6]. It was initially postulated that mitochondrial proteins were recognized post-translationally with the help of cytosolic chaperones and that all the signals for proper localization were concealed within the amino acid sequence of a protein [7,8]. However, growing evidence suggests that several signals act before proteins have been fully synthesized and therefore not only the amino acid sequence is important *in vivo*, but also signals such as those present on the mRNAs encoding them [9–12].

One of the cytosolic chaperones that has been proposed to act during these initial steps is the nascent-polypeptide associated complex (NAC): a chaperone associated to nascent chains at the exit tunnel of cytosolic ribosomes in eukaryotic cells [13–16]. This heterodimeric complex is composed of one α and one β subunit, which form a flattened β barrel with both subunits adopting a similar fold [17,18]. The physical association of NAC to translationally active ribosomes occurs through the N-terminal segment of the β subunit, which anchors the complex to the ribosomal proteins uL23 and eL31 in yeast [16,19]. This complex has been involved in several processes such as protecting nascent polypeptides from aggregation and mistargeting to organelles like the endoplasmic reticulum [20,21]. In *S. cerevisiae* the α subunit is encoded by the *EGD2* gene, and there are two genes encoding β subunits as a consequence of the whole-genome duplication: *EGD1* and *BTT1* (β and β' , respectively [22]). Thus, there are two possible NAC heterodimers in yeast: $\alpha\beta$ and $\alpha\beta'$. It is known that, under standard laboratory conditions, β is preferentially expressed and that its level of expression is similar to that of the α subunit; hence it has been suggested that $\alpha\beta$ -NAC is the complex performing the reported NAC functions [23]. It has been previously observed that yeasts mutants lacking $\alpha\beta$ -NAC subunits show defects in the import of mitochondrial matrix proteins such as Mdh1, Fum1 and Mmf1 as well as fusion proteins [24]. In addition, the mitochondrial outer membrane protein Om14 was recently found to physically interact with $\alpha\beta$ -NAC and was therefore proposed as a receptor on the surface of the organelle [25].

In this work we report a functional relationship between $\alpha\beta'$ -NAC and the outer membrane protein Sam37 during mitochondrial protein import. Sam37 is a subunit of the sorting and assembly machinery (SAM) complex and was reported to be responsible for the physical association between the translocase of the outer membrane (TOM) and SAM complexes to ensure an efficient and coordinated insertion of β

barrels into the outer membrane [26,27]. We identified aggravating genetic interactions between *SAM37* and the genes encoding the subunits α - and β' -NAC (*EGD2* and *BTT1*, respectively). Mutants lacking both components showed defects in protein levels of several mitochondrial subcompartments and accumulation of mitochondrial precursor proteins in the cytosol. In addition, we found that α - and β' -NAC physically interact with Sam37. We suggest that $\alpha\beta'$ -NAC cooperates with Sam37 at early stages of recognition of nuclear-encoded mitochondrial proteins.

Results and Discussion

Genes encoding NAC subunits display aggravating genetic interactions with *SAM37*

Mitochondrial import is an essential process for any eukaryotic cell. If NAC plays a relevant role in this process, this component should also be essential. Such is the case for model organisms like nematodes [28], fruit flies [29] and mice [30]. However, it has been observed that yeast strains lacking all genes encoding NAC subunits show a wild-type phenotype under standard laboratory conditions [23]. We thus hypothesized the existence of at least one additional component in *S. cerevisiae*, which is functionally redundant to NAC and assists protein import into mitochondria. If such were the case, a deleterious or lethal phenotype would only be observed when both components are simultaneously deleted. To explore this hypothesis, we decided to carry out a screen for aggravating genetic interactions of NAC using the synthetic genetic array (SGA) methodology [31,32]. This approach was used beforehand to build a genome-scale genetic interaction map [33]. As part of that study, a *Δegd1* mutant was included as bait, but the identification of genetic interactions for NAC could have been hindered by the presence of its *BTT1* paralogue. Since the interactions of NAC have not been addressed in a comprehensive manner, we designed two independent genome-wide screens to expose the genetic interactions of each NAC subunit, i.e. α -NAC or $\beta\beta'$ -NAC, by combining mutations with the single *Δegd2* or double *Δegd1Δbtt1* mutant, respectively.

First, we verified that each of the bait strains ($\Delta\alpha$ and $\Delta\beta\beta'$) showed no growth defect on fermentable or non-fermentable media as previously reported [23,25,34,35] (Fig. 1). This was also the case for all mutants of components of NAC, including single, double and the triple *Δegd1Δegd2Δbtt1* (Δnac), tested at 25, 30 or 37 °C. In our genetic background, even on synthetic media at 37 °C, we did not detect any

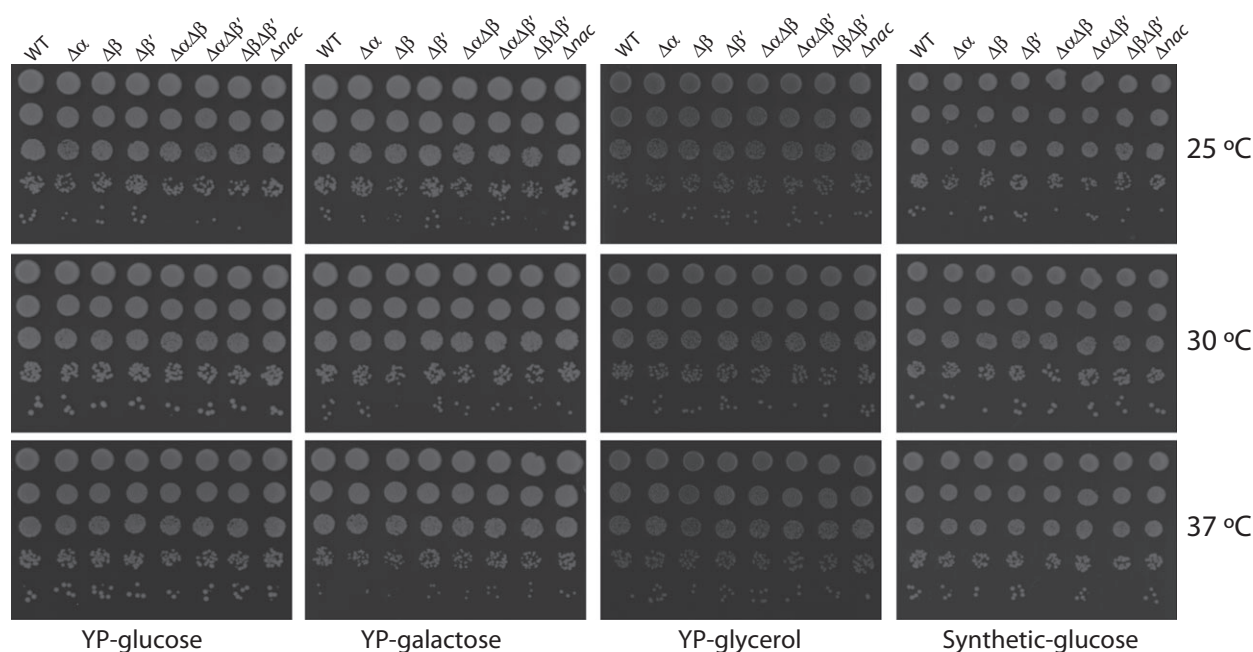


Fig. 1. NAC is not essential in *Saccharomyces cerevisiae* under standard laboratory growth conditions. Single, double and triple NAC mutants were grown to logarithmic phase and serial 1 : 10 dilutions were spotted on rich solid media with the indicated carbon source or synthetic medium with glucose. Plates were incubated at 25, 30 or 37 °C as indicated.

growth differences in contrast to what was reported before at higher temperature (42 °C; Fig. 1) [23]. Then, after generating the two independent sets of double $\Delta\alpha\Delta x$ and triple $\Delta\beta\Delta\beta'\Delta x$ mutants (where Δx represents any of the 4844 viable deletion mutants from the BY4741 yeast deletion collection), we were able to identify 131 and 76 aggravating genetic interactions of genes with the α -NAC and $\beta\beta'$ -NAC components, respectively (Tables S1 and S2). Our results showed the interaction between NAC and some cellular processes that had been already suggested, like the ubiquitin-proteasome system and mitochondrial biogenesis [15,17,25,36,37]. Some previously reported synthetic-lethal genetic interactions such as *UBP14* and *TOM1* with components of NAC were also confirmed (Fig. 2A) [33]. Additional genetic interactions with other cytosolic chaperones were also detected. That was the case for *SSZ1*, an Hsp70 chaperone whose function has been related to protein biogenesis and folding [38–41].

Within the list of hits, we noticed a strong aggravating genetic interaction when combining the $\Delta\beta\Delta\beta'$ and Δsam37 mutations. *SAM37* is a gene whose encoded protein is located in the mitochondrial outer membrane and facilitates the assembly of β barrel proteins in the outer membrane as part of the SAM complex [26,42,43]. In addition Sam37 was initially proposed as

a receptor for mitochondrial proteins [44]; therefore, we decided to explore this relationship in detail. First, we verified the genetic interaction by random spore analysis (RSA) [32]. As it has been previously reported that a Δsam37 strain shows growth defects at high temperatures (Fig. 2B) [44], we decided to evaluate the growth of the resulting double or triple mutants at the standard growth temperature of 30 °C as well as the described permissive temperature of 25 °C. This RSA test not only confirmed the genetic interaction observed in the SGA (Fig. 2C, right panel), but also showed an aggravating genetic interaction of *SAM37* with *EGD2*, the gene encoding α -NAC (Fig. 2C, left panel). This indicated that *SAM37* was a false negative in the SGA performed with the $\Delta\alpha$ strain. The fact that the genetic interaction was similar when using either mutant as bait gave us good confidence that the relationship observed was linked to a function of assembled NAC and not of their individual subunits. Additionally, we evaluated the previously identified genetic interaction with *TOM70*, a receptor of the TOM complex [45–47]. *TOM70* was not tested in the original screen because the double deletion was lost during the initial selection steps in our SGA screen; however, its homologue *TOM71* was a positive hit in the SGA screen performed with the Δegd2 strain (Table S1). We analyzed the genetic interaction of

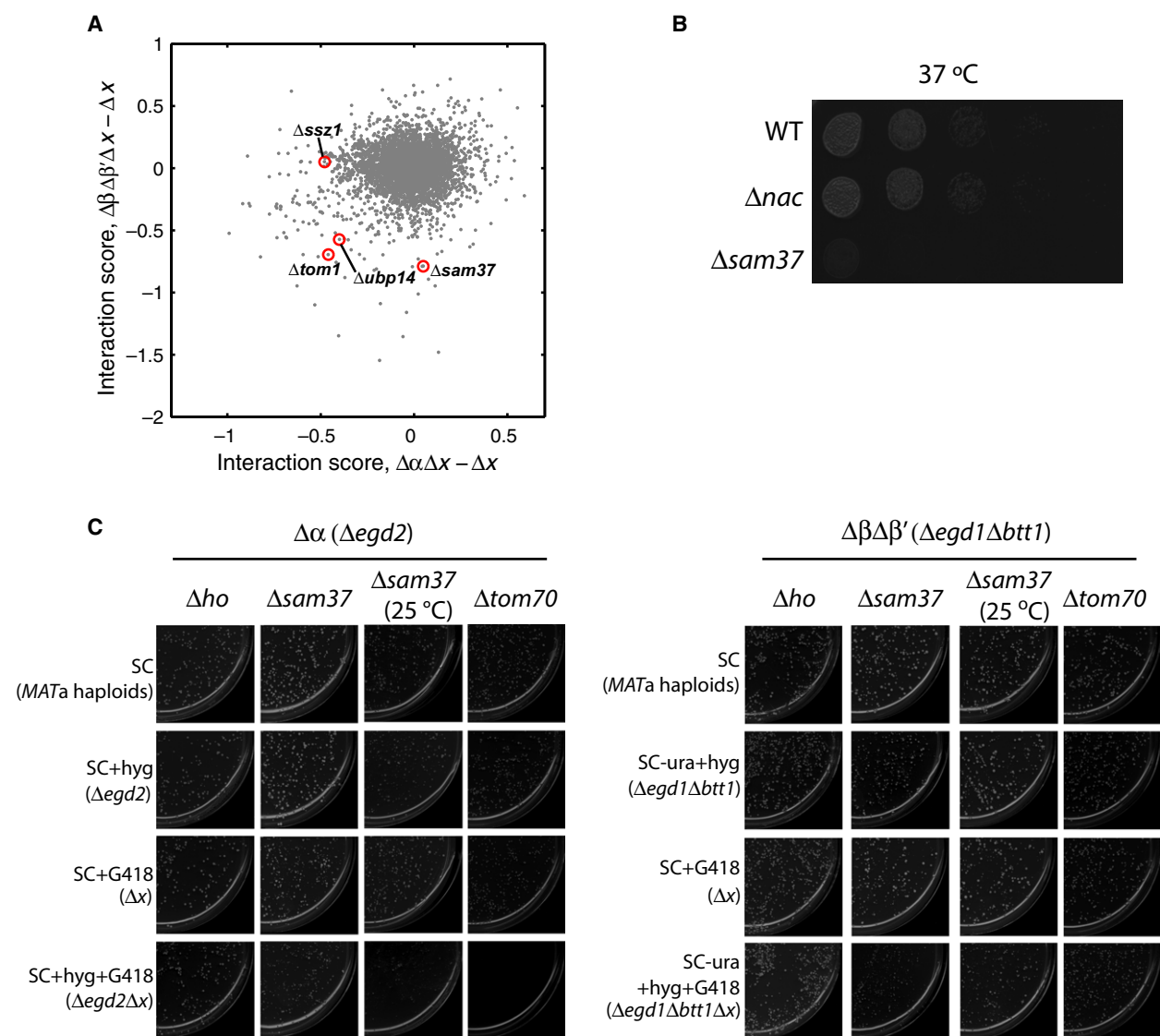


Fig. 2. NAC-encoding genes show synthetic genetic interactions with *SAM37*. (A) Scatter plot shows the interaction scores of two independent SGA screens of Δx prey mutants with the $\Delta\alpha$ on the x-axis, and the $\Delta\beta\Delta\beta'$ mutants on the y-axis. Red circles indicate selected hits from Tables S1 and S2. (B) Wild-type, Δnac and Δsam37 strains were grown to logarithmic phase and serial 1 : 10 dilutions were spotted on rich solid medium with 2% glucose. Plates were incubated at 37 °C for 60 h. (C) Aggravating genetic interactions between *EGD2* and *EGD1/BTT1* and *SAM37* or *TOM70* shown by RSA. $\Delta\alpha$ and $\Delta\beta\Delta\beta'$ mutants were mated with a Δsam37 or a Δtom70 strain and the progeny was plated onto the indicated selection medium and incubated at 25 or 30 °C as indicated to analyze the growth of the resulting single, double and triple mutants. As control, the experiment was carried out with the Δho neutral knockout.

TOM70 in our RSA and corroborated the synthetic-lethal genetic interaction between *TOM70* and *EGD2*, but not with *EGD1/BTT1* (Fig. 2C) [33]. Other non-essential genes encoding subunits of the TOM complex such as *TOM5*, *TOM6* and *TOM7* were included in the screening but did not show any aggravating genetic interaction with either of the NAC-encoding genes.

From all the interactions observed we decided to focus first on the specific relation of NAC genes with

SAM37. Up to this point, the double mutant $\Delta\beta\Delta\beta'$ ($\Delta\text{egd1}\Delta\text{btt1}$) was used to follow the function of both β subunits; therefore, we next asked if the epistasis of *SAM37* with each NAC-encoding gene is the same. To answer this question, we generated double and triple *nac-sam37* mutants (Table S3) and analyzed their growth phenotype on solid media under standard laboratory conditions using fermentable or respiratory carbon sources (Fig. 3A). As expected, the single Δsam37

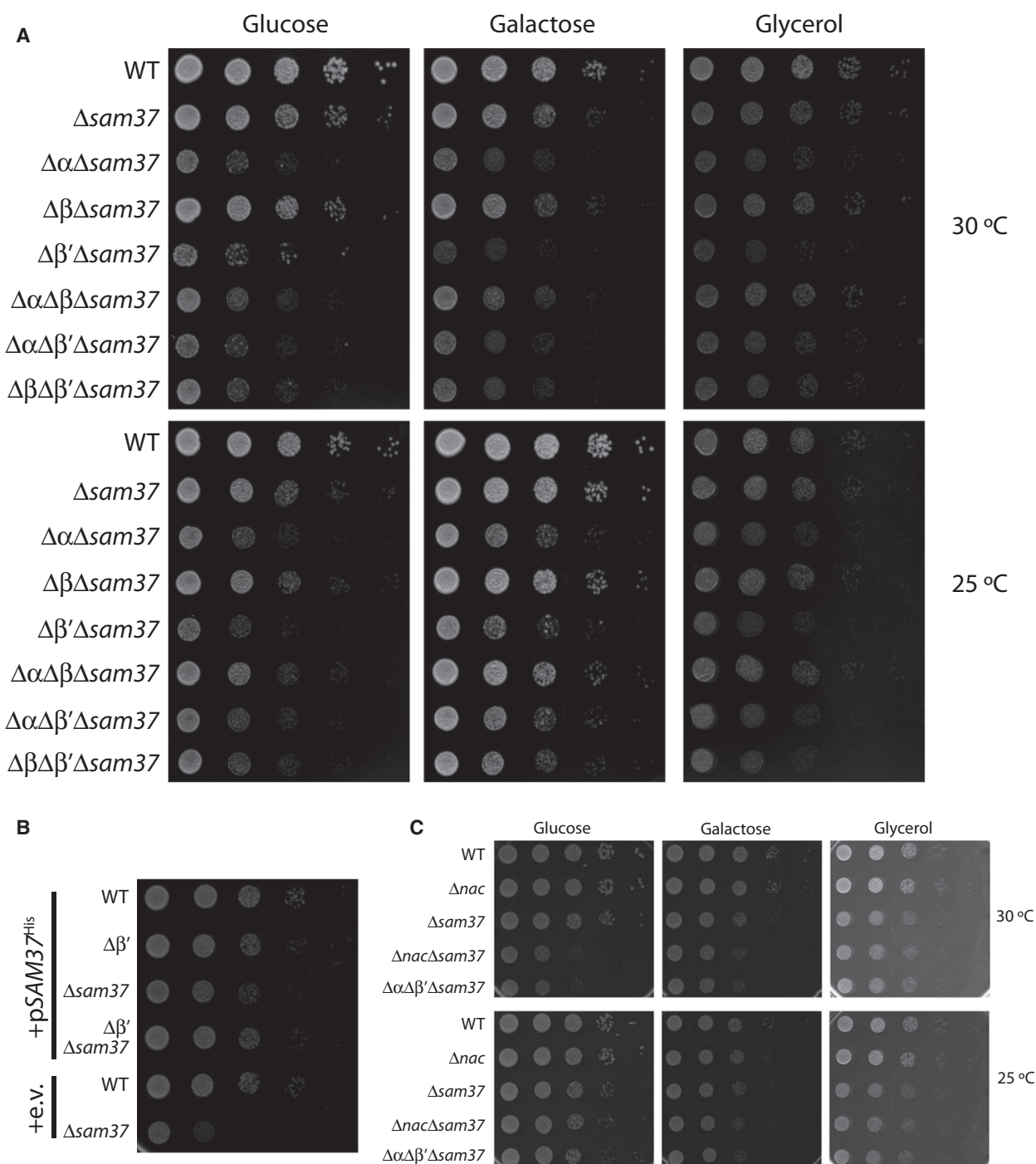


Fig. 3. The genetic interaction observed between NAC genes and *SAM37* is specific for genes encoding the subunits α (*EGD2*) and β' (*BTT1*). (A) Double or triple mutants between the three genes encoding NAC subunits and *SAM37* were generated, grown to logarithmic phase and spotted on rich solid media. Plates were incubated at 25 or 30 °C for 1.5 days on glucose, 2 days on galactose or 3 days on glycerol as indicated. (B) The aggravating phenotype observed in the $\Delta\beta'\Delta sam37$ strain is restored by the ectopic expression of *SAM37* under the control of the *GAL1* promoter cloned in the pRS316 vector [57]. Serial dilutions were spotted onto synthetic medium lacking uracil with glucose as carbon source. (C) The synthetic effect observed between *EGD2/BTT1* and *SAM37* is not the result of an aberrant function of *EGD1* when expressed alone. Strains lacking *EGD1*, *EGD2* and *BTT1* (Δnac), *SAM37* ($\Delta sam37$), a quadruple mutant $\Delta nac \Delta sam37$ or the triple $\Delta\alpha\beta' \Delta sam37$ were grown to logarithmic phase and serial 1 : 10 dilutions were spotted on rich solid media with the indicated carbon source. Plates were incubated at 25 or 30 °C. Growth assays in this figure were all made as described above.

showed a mild growth phenotype, particularly on fermentable media with glucose or galactose as carbon source, but notably, this effect was strongly aggravated in mutants lacking *SAM37* in combination with α - and/or β '-NAC. We confirmed that this effect was specific for the lack of *SAM37*, since its ectopic expression from a centromeric plasmid restored the wild-type growth phenotype (Fig. 3B). The double mutant $\Delta\beta\Delta\text{sam}37$ showed the same phenotype as the single $\Delta\text{sam}37$ mutant. This result highlights for the first time a genetic phenotype involving the $\alpha\beta$ '-NAC complex.

It was reported that the β -NAC subunit is predominant since its expression is higher under laboratory conditions (100 : 1 with respect to β '-NAC [23]), and hence every NAC function studied so far has been linked to the $\alpha\beta$ -NAC complex. Our results indicated that NAC genes *EGD2* (α -NAC) and *BTT1* (β '-NAC), but not *EGD1* (β -NAC), are functionally related to *SAM37*. In order to rule out a possible deleterious dominant phenotype caused by the remaining β -NAC subunit in our baits, we also analyzed the growth phenotype of a $\Delta\text{nac}\Delta\text{sam}37$ mutant where all the NAC-encoding genes are absent. This mutant showed the same phenotype as the mutant $\Delta\alpha\Delta\beta'\Delta\text{sam}37$ confirming that the effect observed was only the result of the absence of those proteins and not an aberrant function of β -NAC (Fig. 3C). Since mitochondrial activity in *S. cerevisiae* increases in respiratory conditions, it seems surprising that the observed growth defect is stronger on fermentable carbon sources (glucose and galactose) than on a non-fermentable carbon source (glycerol). However, it is likely that the effects caused by the deletion of $\alpha\beta$ '-NAC and Sam37 are more evident in fermentation because the process of mitochondrial import is already diminished and additional mutations aggravate the scenario. In contrast, under respiration conditions, the induced activity of the TOM receptors (and general mitochondrial biogenesis) can compensate the effect of the mutations in $\alpha\beta$ '-NAC and Sam37 [48,49].

Mitochondrial protein biogenesis is affected in a mutant lacking $\alpha\beta$ '-NAC and *SAM37*

Based on previously reported characteristics of Sam37 and our results presented above, we hypothesized that $\alpha\beta$ '-NAC and Sam37 could be involved in mitochondrial protein import, specifically during early steps of mitochondrial protein recognition in the cytosol. To test this hypothesis, we analyzed the steady-state levels of several mitochondrial proteins located in different subcompartments of the organelle. In cells grown at 30 °C, mitochondrial proteins like Tom40, Oxa1, Nfs1 and

Sod2 were strongly affected in the $\Delta\alpha\Delta\text{sam}37$, $\Delta\beta'\Delta\text{sam}37$, $\Delta\alpha\Delta\beta'\Delta\text{sam}37$, $\Delta\beta\Delta\beta'\Delta\text{sam}37$ and $\Delta\text{nac}\Delta\text{sam}37$ mutants (Fig. 4A). This effect was consistent with the observed growth phenotypes in the same strains (Fig. 3A). In contrast, other proteins like Tom20, Mdm38 and mtHsp70 were apparently unaltered in every strain analyzed. When the strains were grown at 25 °C there was no such defect observed, showing a specific temperature-sensitive impact of NAC and *SAM37* mutations for these proteins (Fig. 4B). As was previously observed in the growth phenotypes, this effect was not due to a detrimental effect of free β -NAC subunits in the mutants, since the $\Delta\text{nac}\Delta\text{sam}37$ strain shows similar steady state levels to the $\Delta\beta'\Delta\text{sam}37$ strain (Fig. 4C). From these results, we concluded that the heterodimer $\alpha\beta$ '-NAC plays a crucial role in mitochondrial protein biogenesis, and that this function is at least partially redundant with Sam37.

It has been previously reported that the $\alpha\beta$ -NAC complex assists protein delivery to mitochondria, and Om14 was recently identified as the receptor for the complex at the outer mitochondrial membrane [15,24,25,36,50]. In addition, it was observed that different NAC complexes associate with ribosomes translating different mRNAs and that mRNAs encoding mitochondrial proteins are preferentially bound by complexes containing β '-NAC [51]. Different NAC complexes, i.e. $\alpha\beta$ -NAC and $\alpha\beta$ '-NAC, could be involved in mitochondrial protein biogenesis probably by binding different substrates. However, $\alpha\beta$ '-NAC seems to play a more specific role for mitochondrial proteins since it is the one preferentially bound to active ribosomes translating mitochondrial proteins [51]. Its importance is strengthened by the growth defect produced by its simultaneous deletion along with *SAM37*. In contrast, the deletion of $\alpha\beta$ -NAC and its mitochondrial receptor Om14 does not produce any observable phenotype [25]. In agreement, our analysis either by SGA or by RSA showed no genetic interactions between any of the NAC-encoding genes and *OM14* (Tables S1 and S2, data not shown).

It has been reported that the lack of Sam37 impairs to some extent the function of the SAM complex during assembly of β barrel proteins in the mitochondrial outer membrane [26,43,52]. This directly affects Tom40, the central subunit of the TOM complex, and the total amount of assembled TOM complex. However, in these previous reports it was observed that even when TOM has decreased levels, the presence of mitochondrial proteins from the intermembrane space, the inner membrane, or the matrix is not affected, and thus this reduced amount of TOM seems to be

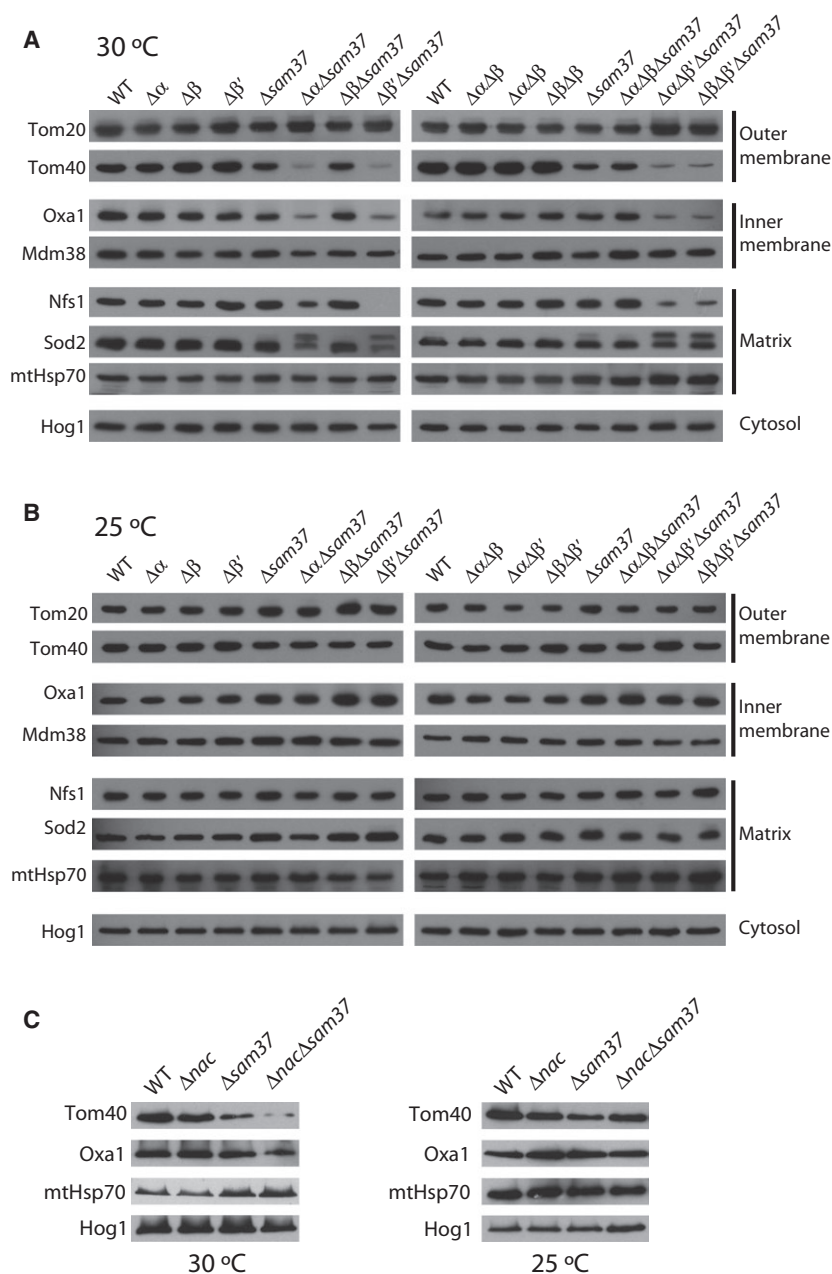


Fig. 4. $\alpha\beta'$ -NAC and Sam37 are important for efficient import of some mitochondrial proteins. Cultures from the indicated strains were grown at 30 °C (A) or 25 °C (B) before whole-cell protein extracts were purified and 25 μg of proteins loaded onto SDS/PAGE gels. Proteins from each mitochondrial compartment were separated by denaturing electrophoresis and probed using specific antibodies. The cytosolic protein Hog1 was analyzed as loading control. (C) The decrease in the steady state levels of Tom40 and Oxa1 observed in mutants lacking α , β' and Sam37 is not the result of an aberrant function of β -NAC when expressed alone. Cultures from the indicated strains were grown at 30 or 25 °C before whole-cell protein extracts were purified and 25 μg of proteins loaded onto SDS/PAGE gels. Proteins from each mitochondrial compartment were separated by denaturing electrophoresis and probed using specific antibodies. The cytosolic protein Hog1 was analyzed as loading control.

sufficient to ensure protein import into the organelle [26,52]. Our results presented above indicated that the simultaneous lack of $\alpha\beta'$ -NAC and Sam37 affects the

steady state levels of Tom40, and therefore one possibility was that the other effects we were observing were an indirect effect caused by the decrease in the

TOM complex. To verify this scenario, we analyzed the levels of assembled TOM by blue native electrophoresis followed by western blot (Fig. 5A). In our hands, the $\Delta sam37$ strain also showed lower levels of TOM complex relative to the wild-type, as previously reported (Fig. 5A) [26,52]. An even stronger decrease in the TOM levels was observed in mutants where either α - or β -NAC was also deleted (Fig. 5A, right panel, light green, dark green, dark blue and violet bars). In contrast, no further defects in the amount of TOM were detected when β -NAC was deleted together

with *SAM37* (Fig. 5A, right panel, light blue bars). By performing the same analysis with cells grown at 25 °C, the $\Delta sam37$ strain still displayed lower levels of assembled TOM complex compared with the wild-type, as was described previously [52] (Fig. 5A, left panel). Notably, in this condition the effect on the detected levels of TOM complex in mutants involving α - or β -NAC and *SAM37* was the same at either 25 or 30 °C. We observed similar levels of assembled TOM complex in the $\Delta sam37$, $\Delta\alpha\Delta\beta\Delta sam37$ and $\Delta\beta\Delta sam37$ strains. This could be explained by the

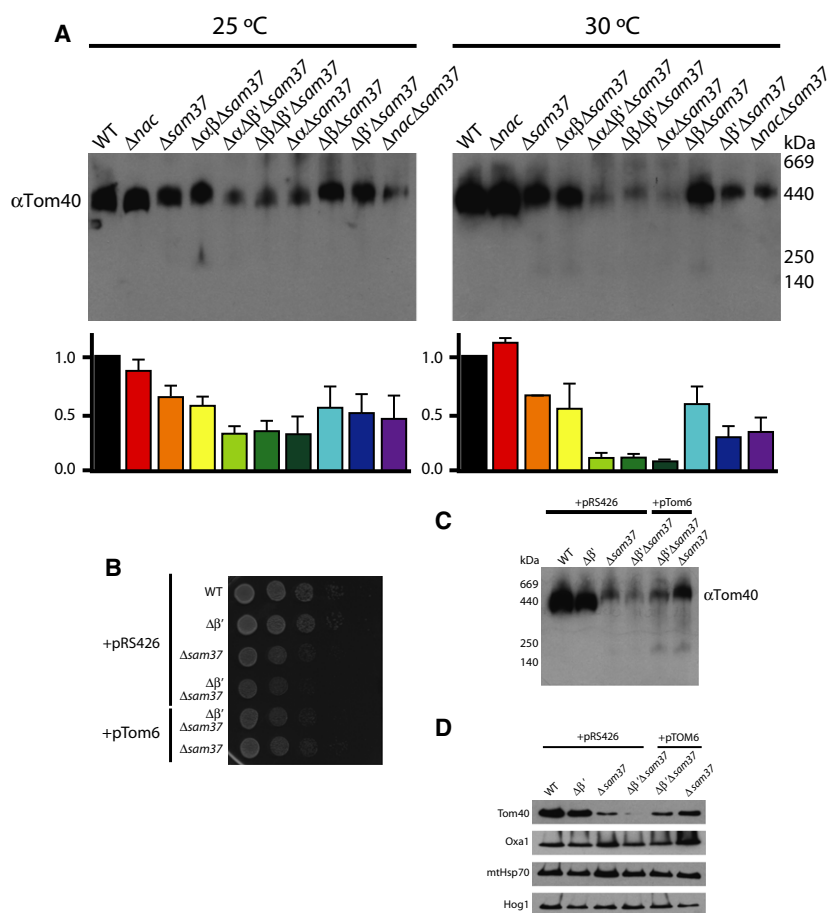


Fig. 5. Assembly of the TOM complex is affected by the absence of $\alpha\beta$ -NAC and *SAM37* and in this condition is not completely restored by the overexpression of *TOM6*. (A) Mitochondria from the indicated strains grown at either 25 °C (left panel) or 30 °C (right panel) were purified and solubilized with digitonin before 100 μ g was loaded onto a native polyacrylamide gel, 5–13%. The formation of the TOM complex was analyzed using a specific antibody for the central subunit Tom40. Quantification of the signals from three independent experiments using Prism 6.0 is shown at the bottom, where each color represents a different strain, and bars indicate standard deviation. (B, C) Overexpression of *TOM6* in strains lacking *SAM37* (i.e. $\Delta sam37$ and $\Delta\beta'\Delta sam37$) partially restores the growth phenotype (B) and the formation of TOM complex (C). (D) The overexpression of *TOM6* partially restores the steady state levels of Tom40, but not of Oxa1, observed in mutants lacking β' and Sam37. Cultures from the indicated strains were grown at 30 °C before whole-cell protein extracts were purified and 25 μ g of proteins loaded onto SDS/PAGE gels. Proteins from each mitochondrial compartment were separated by denaturing electrophoresis and probed using specific antibodies. The cytosolic protein Hog1 was analyzed as loading control. Apparent molecular mass of the assembled TOM complex was compared with ferritin (440 kDa) of the Amersham High Molecular Weight Calibration Kit for native electrophoresis, and other proteins observed in this kit are also marked.

ability of the remaining β' -NAC, alone or in complex with α -NAC, to act as chaperone and to support biogenesis of the TOM complex. The different effect observed on the levels of assembled TOM complex in the $\Delta\alpha\Delta sam37$ mutant is probably due to the heterodimerization of β - and β' -NAC, which is normally not observed in wild-type cells where α -NAC is present. This would mean that the $\beta\beta'$ -NAC heterodimer is unable to perform the same function as the $\alpha\beta'$ -NAC complex. Finally, in the case of the $\Delta\beta\Delta\beta'\Delta sam37$ mutant the effect observed can be explained by the inability of the residual α -NAC subunit to bind to the ribosomes and, therefore, to support cotranslational steps during protein biogenesis.

If the decrease in the TOM complex assembly efficiency were the only reason for the effects we observed, we would have expected the same alterations in the steady-state levels of the mitochondrial proteins at both 25 and 30 °C, which was not the case (Fig. 4A,B). Since the alteration in the TOM complex assembly could be detected in both conditions, we concluded that the lower level of TOM complex is not the direct cause of the observed defects in mitochondrial protein import. Several studies performed with conditional mutants as well as RNAi on the essential subunits of the SAM complex showed that even though the levels of TOM complex are decreased, those levels are sufficient to perform protein import into mitochondria, as shown by the steady state of proteins or by *in vitro* import reactions [26,27,52–55]. Furthermore, to partially suppress the pleiotropic defects caused by the deletion of *SAM37*, we used an overexpression plasmid bearing the *TOM6* gene under regulation of the *TPI* promoter [52]. This plasmid could partially recover the growth defect observed in the $\Delta sam37$ and in the $\Delta\beta'\Delta sam37$ mutants (Fig. 5B). The steady-state levels of the assembled TOM complex in the $\Delta sam37$ were also partially restored; however, this recovery was subtler in the $\Delta\beta'\Delta sam37$ strain (Fig. 5C). The *TOM6* overexpression was also able to compensate Tom40 steady state levels; however, this did not affect the levels of Oxa1 (Fig. 5D). Taken together, these results indicate that the lower levels of TOM complex observed in the absence of $\alpha\beta'$ -NAC and Sam37 are not directly responsible for the observed impairment in the biogenesis of other mitochondrial proteins.

With the limited amount of proteins evaluated in our study, it is not possible to generalize upon the characteristics of the proteins recognized by each NAC, or to explain the growth phenotypes observed, in particular at 25 °C where we detect a growth defect in strains lacking α - or β' -NAC and *SAM37* but not a defect in steady-state levels in any mitochondrial

protein. One possibility is that the growth defect is the result of affected proteins that were not evaluated and remain to be identified.

The lack of $\alpha\beta'$ -NAC and Sam37 triggers an accumulation of precursor proteins in the cytosol from early stages of synthesis

From the results presented above, the nuclear-encoded mitochondrial matrix protein Sod2 was of particular interest, not only because the amount of protein seemed diminished, but also because an additional higher molecular mass band appeared. We reasoned that this could correspond to the precursor protein, i.e. a version of Sod2 that still retains its mitochondrial targeting signal (MTS). Previous reports showed that it was possible to accumulate Sod2 in its precursor form by depleting the mitochondrial membrane potential [56]. To test this hypothesis, we performed a cellular fractionation experiment and separated crude mitochondria from the post-mitochondrial supernatant (PMS), and analyzed the presence of Sod2 in both fractions by western blot (Fig. 6A). In this experiment, we observed that the mature version of Sod2 (mSod2) was always located in the mitochondrial fraction, so as the control mitochondrial protein Oxa1, while the high molecular mass version (pSod2) remains in the supernatant along with cytosolic proteins such as Hog1. This result suggests that the $\Delta\alpha\Delta\beta'\Delta sam37$ and $\Delta\beta\Delta\beta'\Delta sam37$ mutants show defective biogenesis of Sod2, which is not properly imported to the mitochondria. This effect was specific to the combined mutants, confirming the functional link between NAC and Sam37. It is interesting to notice that pSod2 is not degraded even when it is not imported correctly, which could mean that it is associated with some cytosolic chaperone and protected from degradation. To further explore if other NAC substrates were also behaving in the same manner, we performed a similar experiment using Mmf1, a protein previously reported as NAC substrate in protein import (Fig. 6B) [36]. It was clear that also in the case of Mmf1, a precursor form (pMmf1) accumulates in the PMS in the absence of β' -NAC and Sam37 as observed for pSod2. These results suggested that the specific lack of $\alpha\beta'$ -NAC and Sam37 leads to an impairment in protein import and, as a consequence, the precursor proteins are accumulated in the cytosol.

To distinguish if the accumulation of pSod2 was due to a problem in early steps of import by the specific lack of $\alpha\beta'$ -NAC and Sam37 before the precursor protein reached the mitochondrial surface, or if it was the result of a general defect of the TOM complex that is more sensitive to the overdose of the substrate proteins in our system, we cloned the complete *SOD2* and

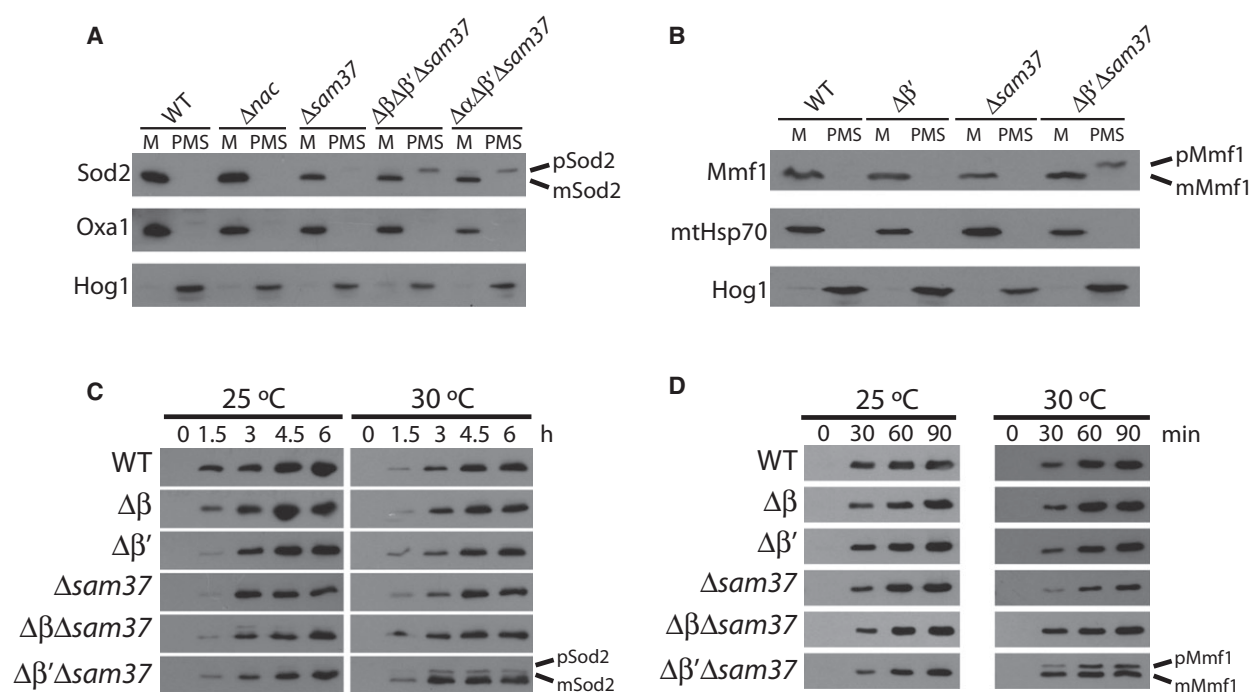


Fig. 6. In the absence of $\alpha\beta$ -NAC and Sam37, Sod2 and Mmf1 accumulate in the cytosol as precursor proteins from early stages of synthesis. Indicated strains expressing *SOD2-HA* (A) or *MMF1-HA* (B) were grown at 30 °C and cells fractionated to mitochondrial pellet (M) and PMS. Fractions were separated by denaturing electrophoresis and probed using specific antibodies. (C, D) Strains expressing *SOD2-HA* (C) or *MMF1-HA* (D) under the control of the *GAL1* promoter were grown on 2% raffinose until an attenuation at 600 nm of 1.0 before the addition of 2% galactose. Samples were taken at the indicated time points and whole-cell extracts were purified, and proteins were separated by denaturing electrophoresis and probed using specific antibodies. pSod2 and mSod2 indicate the precursor and mature forms of Sod2 respectively; pMmf1 and mMmf1 indicate the precursor and mature forms of Mmf1, respectively.

MMF1 open reading frames and 300 bp of their 3' untranslated region (UTR), in the centromeric plasmid pRS316 [57] downstream of the inducible promoter *GAL1*, transformed it into the different mutants, and analyzed the appearance of Sod2 or Mmf1 after different times of induction (Fig. 6C,D). It was possible to observe that the accumulation of pSod2 and pMmf1 in the $\Delta\beta'\Delta\text{sam37}$ strain occurs from early induction times (3 h and 30 min, respectively) when the cultures are incubated at 30 °C. In contrast, the single mutants $\Delta\beta'$ and Δsam37 showed patterns similar to the wild-type strain (Fig. 6A). Since we observe that the precursor form is accumulated in the cytosol in these mutants and that this form appears from the first moments of their detection by western blot, we think that this could imply that protein import is compromised at early stages of protein import. Additionally, the result suggests again that the low level of TOM complex is not the reason for the defects we observed, as the precursor accumulation occurs from early moments of protein biogenesis, when a minimum amount of protein has been synthesized.

α - and β '-NAC subunits present a physical interaction with Sam37

We hypothesized that a physical interaction between $\alpha\beta$ -NAC and Sam37 supporting mitochondrial protein import underlies the observed phenotypic results. We sought to test this idea by performing a protein–protein interaction assay by means of protein–fragment complementation assay (PCA), using mouse dihydrofolate reductase (DHFR) as reporter [58]. Briefly, DHFR was divided into two halves (domains 1–2, and 3) and fused to the 3' end of the ORF of our genes of interest, before the stop codon. Then we analyzed the growth of the resultant strains expressing the chimeric proteins in solid medium with methotrexate. If a physical interaction occurs, then yeast colonies are able to grow in the selection medium. We tested yeast strains expressing each of the NAC genes and either *SAM37*, *TOM70* or *OM14* (Fig. 7A,B). The interactions between α - or β -NAC and Om14 were used as positive control, since they were previously reported as physical interactors [25]. In our hands, these two interactions were observed as described before, but an additional

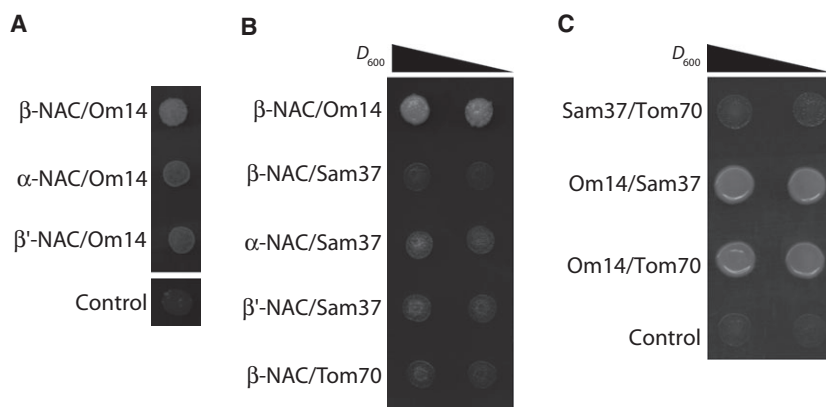


Fig. 7. α - and β' -NAC subunits present a weak physical interaction with Sam37 and Om14. Physical interactions between NAC subunits and Om14 (A) and Sam37 (B) were analyzed by PCA using mouse DHFR as reporter. (C) Interactions between membrane proteins Sam37, Tom70 and Om14 were tested also by PCA. A cell suspension of 2.0 or 1.0 D_{600} was spotted onto synthetic medium supplemented with methotrexate (200 mg·mL⁻¹) and plates were grown at 30 °C.

interaction with β' -NAC was observed (Fig. 7A). In the case of Sam37, we detected growth in the α -NAC–Sam37 and β' -NAC–Sam37 pairs; however, there was no growth in the β -NAC–Sam37 combination. This implies that Sam37 specifically interacts with $\alpha\beta'$ -NAC, but not with β -NAC (Fig. 7B). The apparently weaker $\alpha\beta'$ -NAC–Sam37, in comparison with the $\alpha\beta$ -NAC–Om14 interaction, could be due to the low level of expression of the *BTT1* gene under standard laboratory growth conditions [23,59]. Remarkably, despite the high levels of expression described for *EGDI*, the β -NAC protein was unable to interact with Sam37 indicating a specific functional role of the latter with $\alpha\beta'$ -NAC. The fact that both α -NAC–Sam37 and β' -NAC–Sam37 interactions are equivalently stronger suggests also that it is the $\alpha\beta'$ -NAC heterodimer whose function is related to Sam37 (Fig. 7B) [23,59]. As an additional control, we used the β -NAC–Tom70 pair, where no growth was detected. Finally, since Sam37, Om14 and Tom70 could be working together during NAC-mediated ribosomal recruitment to mitochondria we tested possible physical interactions between these outer membrane proteins (Fig. 7C). We could observe that both Sam37 and Tom70 can physically interact with Om14. Taken together, these results suggest the presence of a ribosomal docking port at the mitochondrial surface.

Sam37 and the 3' untranslated region of *SOD2* mRNA act in parallel during *Sod2* biogenesis

Some mitochondrial proteins encoded in the nuclear genome produce mRNAs that can be found in the vicinity of this organelle guided by their 3'-UTR; it

has been proposed that this localization facilitates import of the corresponding protein [10]. By massive studies, it was shown that *SOD2* mRNA can be found in a peri-mitochondrial localization [60]; furthermore, the import of its encoded protein can only occur in a coupled system where translation and import occur simultaneously [56]. We reasoned that $\alpha\beta'$ -NAC, Sam37 and the 3'-UTR of mRNAs encoding nuclear-encoded mitochondrial proteins are elements involved in early recognition of mitochondrial proteins by the import machinery, and these three components could be acting in parallel. Hence, we decided to test if the import defect observed earlier could be aggravated by the simultaneous deletion of the 3'-UTR in *SOD2* mRNA. For this we cloned a version of *SOD2* without the 3'-UTR and transformed it into the different *nac/sam37* mutants to analyze the steady-state levels of the encoded protein (Fig. 8A). We observed a dramatic decrease in *Sod2* levels due to the elimination of the 3'-UTR in all the strains tested – including the wild-type – independently of the growth temperature of the cultures (25 or 30 °C). This reduction was stronger when Sam37 was not present (Δ *sam37* and $\Delta\beta'\Delta$ *sam37*) at 30 °C and, as previously observed, the accumulation of p*Sod2* only occurred in the $\Delta\beta'\Delta$ *sam37* strain at this temperature. When the cultures analyzed were grown at 25 °C, the 3'-UTR still had a strong impact on *Sod2* levels but Sam37 and β' -NAC had no additional effect (Fig. 8A). Since the 3'-UTR of any mRNA is important for its stability and this could be the reason why the amount of *Sod2* protein is decreased in the mutants mentioned above, we decided to analyze the levels of *SOD2* mRNA by real-time quantitative PCR (Fig. 8B). Even though we observed a decrease in

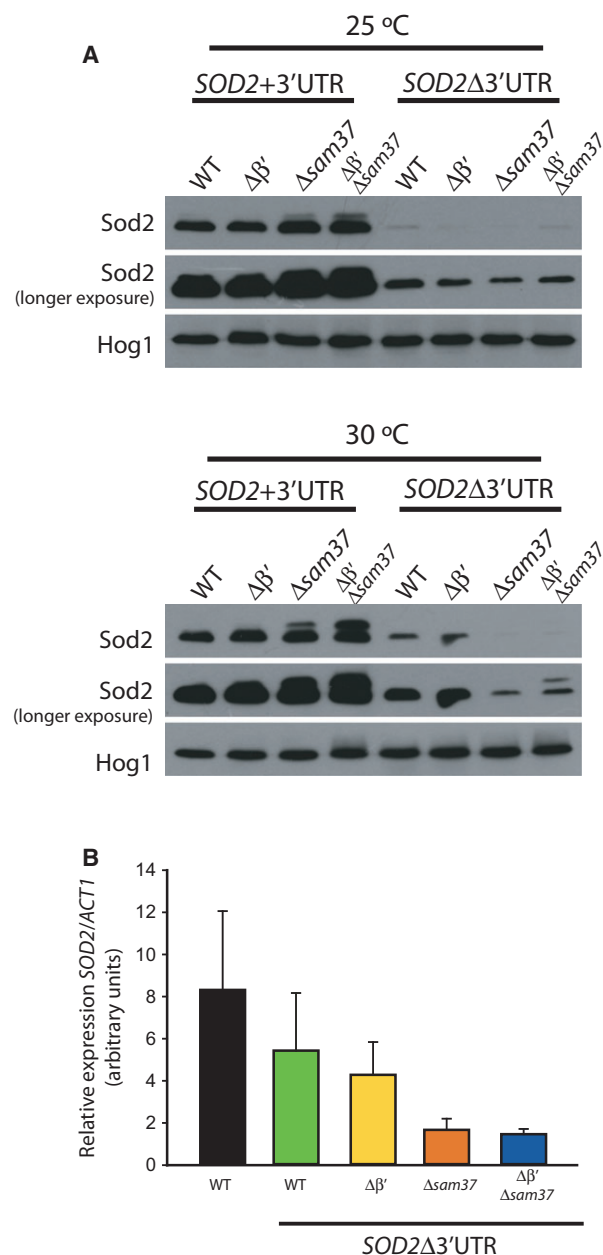


Fig. 8. The 3'-UTR of *SOD2* is important for proper Sod2 biogenesis. (A) Strains lacking *BTT1* ($\Delta\beta'$), *SAM37* ($\Delta sam37$) or a double mutant ($\Delta\beta' \Delta sam37$) were transformed with a plasmid encoding a full version of *SOD2*-HA (3'UTR) or with a version that lacks the 3'-UTR ($\Delta 3'$ UTR). Whole-cell extracts were purified from cultures grown at 25 °C (upper panel) or 30 °C (lower panel), and proteins were separated by denaturing electrophoresis and probed using an antibody recognizing the hemagglutinin tag or Hog1 as control. (B) Total RNA was purified from each of the indicated strains. qPCR was made using SYBR Green as fluorophore as explained in Materials and methods. Data from four independent experiments were analyzed following the $\Delta\Delta C_t$ protocol and relative expression of *SOD2* mRNA is shown compared with that of *ACT1*; bars indicate standard deviations.

mRNA levels on the strains expressing the *SOD2* plasmid lacking its endogenous 3'-UTR compared with the wild-type strain, this decrease was not statistically significant (WT vs. WT $\Delta 3'$ -UTR and $\Delta\beta'$ $\Delta 3'$ -UTR). There was a further decrease in the *SOD2* mRNA level in the $\Delta sam37$ and in the double $\Delta\beta' \Delta sam37$ strains. Since the difference between the mRNA levels in the wild-type strain was not statistically significant, this alone cannot explain the decrease in the resultant Sod2 protein present in each sample. We therefore concluded that the 3'-UTR is important for correct Sod2 biogenesis as previously described [9,10,60] and that this signal and the one guided by $\alpha\beta$ -NAC and Sam37 both contribute to the early steps of the biogenesis of Sod2.

Concluding remarks

In this work we show for the first time that β' -NAC, along with α -NAC and Sam37, plays an important role during cell development. We propose that these three proteins are components that recognize and deliver precursor proteins to mitochondria. It has been proposed before that NAC is involved in cotranslational protein import, as it is important for Fum1 biogenesis [50]. We evaluated the biogenesis of Sod2, another protein whose import is strictly cotranslational [56] and found that its biogenesis is affected, along with other proteins like Tom40, Oxa1 and Nfs1, in cells lacking $\alpha\beta$ -NAC and Sam37. The observed effect is aggravated when the 3'-UTR of *SOD2* mRNA is also missing, indicating that these two elements modulate the Sod2 biogenesis at different stages and cooperate during its proper import into the organelle.

We chose to focus on Sam37 because it was originally described as a possible receptor of the TOM complex [44]. Recently, it was found that Sam37 helps in maintaining the physical contact between SAM and TOM complexes during β barrel protein biogenesis [42]. It could be possible that this physical and functional association between Sam37 and the TOM complex, together with a transient interaction of Sam37 with $\alpha\beta$ -NAC, facilitates the arrival of incoming proteins to the TOM complex. Moreover Om14 by directly interacting with Tom70 and Sam37 can promote the interaction of the ribosome with the mitochondrial outer membrane and thereby enhance the translationally coupled import process (Fig. 9). Further studies are necessary to explain how $\alpha\beta$ -NAC and Sam37 operate in a coordinated manner to guide mitochondrial precursor proteins to the surface of mitochondria.

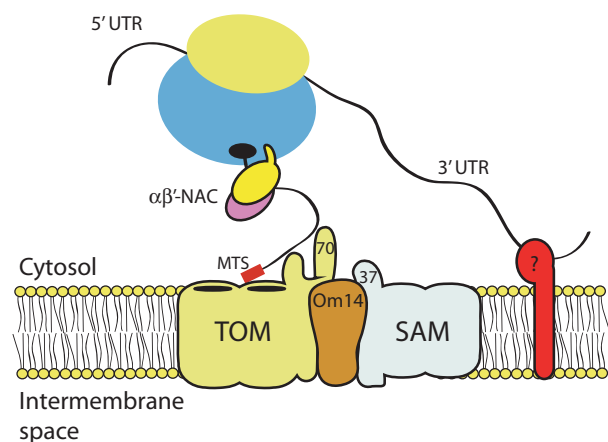


Fig. 9. Import of mitochondrial proteins is modulated at a cotranslational level by several factors like $\alpha\beta$ -NAC, Sam37 and the 3'-UTR of the mRNA encoding it. At early steps of recognition of mitochondrial proteins, various players act together in order to ensure an efficient and error-free process. As soon as a mitochondrial preprotein starts to be synthesized, $\alpha\beta$ -NAC binds to it and triggers the targeting of this complex to the mitochondrial surface also with the help of the 3'-UTR of the loaded mRNA. Receptors at the outer membrane like Sam37 and Om14 cooperate, holding the nascent chain and preventing undesired aggregation. Finally, the successful anchoring of translationally active ribosomes to the TOM complex is sealed by the presence of a MTS.

Materials and methods

Yeast strains and growth conditions

All the strains used in this study were derived from the S288C-derivative parental strain Y8205 [61]. The entire open reading frames of *EGD1*, *BTT1*, *SAM37* and *TOM70* or nucleotides 1–414 of *EGD2* were deleted by homologous recombination with the resistance modules *KanMX4*, *nat1* or *hph* as described before [62,63]. Table S3 shows the genotype of all the strains used. Strains were grown on rich YP [yeast extract 1% (BD, Franklin Lakes, NJ, USA), bacto-peptone 2% (BD)] or synthetic S [yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate 1.7 g·L⁻¹ (BD), (NH₄)₂SO₄ 5 g·L⁻¹ (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)] media, using glucose 2% w/v (Sigma-Aldrich), glycerol 2% v/v (Sigma-Aldrich), galactose 2% w/v (Formedium, Hunstanton, UK) or raffinose 2% w/v (Formedium). Solid medium was made by the addition of 2% w/v agar (BD). After mating strains were sporulated on enriched sporulation medium [potassium acetate 1% w/v (J. T. Baker/Avantor Performance, Center Valley, PA, USA), 0.1% w/v yeast extract, 0.05% w/v glucose, 0.01% w/v dropout for sporulation: 2 g L-histidine (Sigma-Aldrich), 10 g L-leucine (Sigma-Aldrich), 2 g L-lysine (Sigma-Aldrich), 2 g uracil (Sigma-Aldrich)] for 8 days at 22 °C.

Synthetic genetic array analysis

Synthetic genetic interactions were analyzed as previously described [32]. Briefly, *MAT α* query strains ($\Delta\alpha$ or $\Delta\beta\Delta\beta'$) were grown in liquid medium (YPD) to logarithmic phase before being plated onto YPD solid medium to form a lawn. Prey *MAT α* mutants were obtained from the EURO-SCARF BY4741 deletion collection mutants of non-essential genes. A total of 4844 viable mutants were grown in quadruplicate in 384 arrays on solid medium (YPD+G418, Sigma-Aldrich). Both query and prey mutants were pinned onto new plates for mating and diploids were selected in YPD+G418+hygromycin B (Roche, Penzberg, Bavaria, Germany) or SC-URA+G418+hygromycin B medium. Diploid cells were pinned on sporulation medium and incubated for 8 days at 22 °C before they were transferred to selection medium for *MAT α* haploid cells [SC-His/Arg/Lys supplemented with canavanine (Sigma-Aldrich) and thialysine (Sigma-Aldrich)]. Finally, cells were pinned on selection medium with appropriate antibiotics to score for single- and double- or triple-mutant growth. Growth (*G*) on both prey selection medium (+G418) and bait-prey selection medium (SC+G418+hygromycin B or SC-URA+G418+hygromycin B) was scored by obtaining the integrated attenuation of each colony (25 measurements per colony, *D*_{600 nm}) in a 384-well plate reader. Each experiment was performed in triplicate, and an interaction score was defined for each prey strain by subtracting the logarithm of the average growth of the single mutant Δx to that of the corresponding double ($\Delta\alpha\Delta x$) or triple mutant ($\Delta\beta\Delta\beta'\Delta x$), that is, $I_{\alpha x} = \ln(G_{\Delta\alpha\Delta x}) - \ln(G_{\Delta x})$ or $I_{\beta\beta' x} = \ln(G_{\Delta\beta\Delta\beta'\Delta x}) - \ln(G_{\Delta x})$, respectively. Finally, a *Z*-score was assigned to each hit based on the distribution of 384 interaction scores obtained by combining the prey strain with a neutral insertion. Significant aggravating genetic interactions were defined using an arbitrary cut-off of *Z*-score < -3. Random spore analysis was performed for validation of results [32]. Briefly, diploid cells were obtained as described above and plated on sporulation medium. Spores were plated on solid medium with appropriate antibiotics to score for wild-type, single-, double- and triple-mutant growth.

Whole cell protein extracts

Whole cell protein extracts were prepared from cultures grown in synthetic medium with galactose as carbon source to a *D*_{600 nm} between 1.0 and 1.5. A volume containing *D*_{600 nm} of 2.0 was taken from each culture, cells were collected by centrifugation and washed once with distilled water before being lysed using a buffer containing 0.3 M sodium hydroxide (Sigma-Aldrich), 176 mM β -mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) and 3.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma-Aldrich) and incubated for 10 min on ice. Proteins were then precipitated using 12% w/v

trichloroacetic acid (Merck Millipore, Billerica, MA, USA), and washed with cold acetone (Sigma-Aldrich). The resultant protein pellet was resuspended in loading buffer and the volume corresponding to $D_{600\text{ nm}}$ of 0.2 was loaded on 17.5% SDS/polyacrylamide gels. Proteins were electrotransferred onto nitrocellulose membranes (Amersham, GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, USA) and decorated with specific antibodies. For Sod2-2HA and Mmf1-3HA induction, cell cultures were grown on synthetic medium without uracil using raffinose as carbon source to a $D_{600\text{ nm}}$ of 1.0. Galactose was then added to a final concentration of 2% and total protein extracts were prepared at the indicated times and treated as described before.

Cell fractionation

Crude mitochondrial fractions were prepared essentially as described previously [64]. Briefly, yeast strains were grown on synthetic medium with galactose as carbon source to a $D_{600\text{ nm}}$ between 1.0 and 1.5. Cells were pelleted and washed with distilled water. The cell pellet was resuspended and incubated on MP1 buffer [Tris 100 mM (Sigma-Aldrich), dithiothreitol 10 mM pH 11 (Roche)] for 10 min at 30 °C. Cells were pelleted and resuspended in MP2 buffer [sorbitol 1.2 M (Sigma-Aldrich), KH_2PO_4 20 mM (Sigma-Aldrich), zymolyase 20T 3 mg·g⁻¹ wet weight (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA)] and incubated for 1 h with gentle shaking. Spheroplasts were then pelleted and resuspended in homogenization buffer [0.6 M sorbitol, 10 mM Tris pH 7.4, 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich), 0.2% (w/v) fatty acid-free BSA (Roche), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride] and broken with 30 strokes applied with a glass–glass douncer. Cell debris and nuclei were cleared by a first centrifugation at 3900 *g* for 5 min. Supernatant was then centrifuged at 16 000 *g* for 10 min. The mitochondrial pellet was resuspended in SH buffer [0.6 M Sorbitol, 20 mM Hepes pH 7.4 (Sigma-Aldrich)]. Mitochondrial (M) and PMS fractions were stored at –80 °C. The protein concentration in each fraction was determined using the quick-start Bradford kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) following the manufacturer's recommendations.

Blue native electrophoresis

Mitochondrial fractions (250 μg) were pelleted and washed in 250 mM sorbitol and 50 mM Bis-Tris pH 7 (Sigma-Aldrich). The pellet was resuspended in 45 μL of Sample Buffer [aminocaproic acid 750 mM (Sigma-Aldrich), Bis-Tris 50 mM pH 7 (Sigma-Aldrich)]. Five microliters of 10% w/v digitonin (Calbiochem, Merck Millipore, Billerica, MA, USA) were added and samples were incubated for 30 min on ice for solubilization. Samples were centrifuged at 16 000 *g* for 12 min at 4 °C. Supernatant was recovered and 2.5 μL of 5% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva, Heidelberg, Germany), dissolved in sample buffer,

was added. The volume corresponding to 100 μg protein from each sample was loaded on 5–13% polyacrylamide gels. After separation at 4 °C proteins were electrotransferred onto poly(vinylidene difluoride) (Immobilon-P Transfer Membrane, Merck Millipore) membranes, and probed with the specific antisera.

Protein-fragment complementation assay

Physical interactions were tested according to [58], using mouse DHFR as reporter protein. DHFR was amplified by PCR in two different domains (1–2 and 3), and each fragment was integrated into the genomic DNA at the 3' end from each gene of interest by homologous recombination before the stop codon. Haploid cells expressing each one of the DHFR fragments were mated to obtain diploid cells. Physical interactions were analyzed by the *in vivo* reconstitution of DHFR and the ability to grow on solid medium using Noble agar (BioShop, Burlington, ON, Canada) supplemented with 200 mg·mL⁻¹ methotrexate (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). Plates were incubated at 30 °C for 3, 5 or 7 days.

mRNA quantification by real time PCR

Indicated strains were grown on synthetic medium lacking uracil and using galactose as carbon source. Total RNA extraction was performed using Trizol (Ambion, Foster City, CA, USA) following the manufacturer's recommendations after breaking the cells with a porcelain mortar and pestle in the presence of liquid nitrogen. Real time quantitative PCR reactions were set using either cDNA (synthesized using the ProtoScript First Strand cDNA Synthesis Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) followed by reactions using SYBR Green as fluorophore) or RNA as template (using the Kapa Sybr Fast One-Step qTR-PCR; Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA). Data from four independent experiments were analysed following the $\Delta\Delta C_t$ protocol. *ACT1* was used as the housekeeping control gene.

Acknowledgements

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-CB 105631 and 237344 to SF, 164889 to ADL and 238681 to FTQ) and the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM IN215810, IA200813 and IN202715 to SF; and IA200315 to FTQ). SF was a recipient of a L'Oréal fellowship for women in science. JCPR had doctoral fellowships from CONACyT (240128) and DGAPA-UNAM, and data in this work are part of his doctoral dissertation as part of the Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de

México (UNAM). Antisera were a kind gift from Johannes M. Herrmann (University of Kaiserslautern, Germany) and Walter Neupert (Max Plank Institute of Biochemistry, Germany). We would like to thank Doron Rapaport and Kai S. Dimmer (University of Tübingen) for the *TOM6* overexpressing plasmid; Christian R. Landry (Université Laval) for the DHFR-PCA plasmids; and Mayra Furlan-Magaril, Rodrigo Arzate-Mejía, Hober Nuñez and Felix Recillas-Targa for their kind help with the real time PCR experiments. We would also like to thank Xochitl Pérez-Martínez and D. Alejandro Fernández-Velasco for helpful discussions, Miriam Vázquez-Acevedo for her technical support and Diego González-Halphen and his lab for all the support throughout this project. We are also grateful to Diego González-Halphen and Raymond Laboy for critically reading the manuscript.

Author contributions

J CPR, MCAM, ARYF, EG, FTQ, ADL and SF conceived and designed the experiments. J CPR, MCAM, ARYF, FJM and EG performed the experiments. J CPR, MCAM, ARYF, EG, ADL and SF analyzed the data and wrote the manuscript.

References

- Osellame LD, Blacker TS & Duchon MR (2012) Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **26**, 711–723.
- Schmidt O, Pfanner N & Meisinger C (2010) Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 655–667.
- Richter-Dennerlein R, Dennerlein S & Rehling P (2015) Integrating mitochondrial translation into the cellular context. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**, 586–592.
- Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T & Pfanner N (2009) Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* **138**, 628–644.
- Neupert W (2015) A perspective on transport of proteins into mitochondria: a myriad of open questions. *J Mol Biol* **427**, 1135–1158.
- Lesnik C, Golani-Armon A & Arava Y (2015) Localized translation near the mitochondrial outer membrane: an update. *RNA Biol* **12**, 801–809.
- Maccacchini ML, Rudin Y, Blobel G & Schatz G (1979) Import of proteins into mitochondria: precursor forms of the extramitochondrially made F1-ATPase subunits in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 343–347.
- Young JC, Hoogenraad NJ & Hartl FU (2003) Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell* **112**, 41–50.
- Margeot A, Blugeon C, Sylvestre J, Vialette S, Jacq C & Corral Debrinski M (2002) In *Saccharomyces cerevisiae*, *ATP2* mRNA sorting to the vicinity of mitochondria is essential for respiratory function. *EMBO J* **21**, 6893–6904.
- Gadir N, Haim-Vilmovsky L, Kraut-Cohen J & Gerst JE (2011) Localization of mRNAs coding for mitochondrial proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* **17**, 1551–1565.
- Williams CC, Jan CH & Weissman JS (2014) Targeting and plasticity of mitochondrial proteins revealed by proximity-specific ribosome profiling. *Science* **346**, 748–751.
- Weis BL, Schleiff E & Zerges W (2013) Protein targeting to subcellular organelles via mRNA localization. *Biochim Biophys Acta* **1833**, 260–273.
- Wiedmann B, Sakai H, Davis TA & Wiedmann M (1994) A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature* **370**, 434–440.
- 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. *J Cell Biol* **130**, 519–528.
- Fünfschilling U & Rospert S (1999) Nascent polypeptide-associated complex stimulates protein import into yeast mitochondria. *Mol Biol Cell* **10**, 3289–3299.
- Pech M, Spreter T, Beckmann R & Beatrix B (2010) Dual binding mode of the nascent polypeptide-associated complex reveals a novel universal adapter site on the ribosome. *J Biol Chem* **285**, 19679–19687.
- 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. *J Biol Chem* **280**, 15849–15854.
- Wang L, Zhang W, Wang L, Zhang XC, Li X & Rao Z (2010) Crystal structures of NAC domains of human nascent polypeptide-associated complex (NAC) and its α NAC subunit. *Protein Cell* **1**, 406–416.
- Wegrzyn RD, Hofmann D, Merz F, Nikolay R, Rauch T, Graf C & Deuerling E (2006) A conserved motif is prerequisite for the interaction of NAC with ribosomal protein L23 and nascent chains. *J Biol Chem* **281**, 2847–2857.
- Möller I, Jung M, Beatrix B, Levy R, Kreibich G, Zimmermann R, Wiedmann M & Lauring B (1998) A general mechanism for regulation of access to the translocon: competition for a membrane attachment site on ribosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 13425–13430.

- 21 Gamberdinger M, Hanebuth MA, Frickey T & Deuerling E (2015) The principle of antagonism ensures protein targeting specificity at the endoplasmic reticulum. *Science* **348**, 201–207.
- 22 Hu GZ & Ronne H (1994) Yeast *BTF3* protein is encoded by duplicated genes and inhibits the expression of some genes in vivo. *Nucleic Acids Res* **22**, 2740–2743.
- 23 Reimann B, Bradsher J, Franke J, Hartmann E, Wiedmann M, Prehn S & Wiedmann B (1999) Initial characterization of the nascent polypeptide-associated complex in yeast. *Yeast* **15**, 397–407.
- 24 George R, Beddoe T, Landl K & Lithgow T (1998) The yeast nascent polypeptide-associated complex initiates protein targeting to mitochondria in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 2296–2301.
- 25 Lesnik C, Cohen Y, Atir-Lande A, Schuldiner M & Arava Y (2014) OM14 is a mitochondrial receptor for cytosolic ribosomes that supports co-translational import into mitochondria. *Nat Commun* **5**, 5711.
- 26 Wiedemann N, Kozjak V, Chacinska A, Schönfisch B, Rospert S, Ryan MT, Pfanner N & Meisinger C (2003) Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature* **424**, 565–571.
- 27 Waizenegger T, Habib SJ, Lech M, Mokranjac D, Paschen SA, Hell K, Neupert W & Rapaport D (2004) Tob38, a novel essential component in the biogenesis of beta-barrel proteins of mitochondria. *EMBO Rep* **5**, 704–709.
- 28 Bloss TA, Witze ES & Rothman JH (2003) Suppression of CED-3-independent apoptosis by mitochondrial β NAC in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **424**, 1066–1071.
- 29 Markesich DC, Gajewski KM, Nazimiec ME & Beckingham K (2000) bicaudal encodes the *Drosophila* β NAC homolog, a component of the ribosomal translational machinery*. *Development* **127**, 559–572.
- 30 Deng JM & Behringer RR (1995) An insertional mutation in the *BTF3* transcription factor gene leads to an early postimplantation lethality in mice. *Transgenic Res* **4**, 264–269.
- 31 Baryshnikova A, Costanzo M, Dixon S, Vizeacoumar FJ, Myers CL, Andrews B & Boone C (2010) Synthetic genetic array (SGA) analysis in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* **470**, 145–179.
- 32 Tong AHY & Boone C (2006) Synthetic genetic array analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Biol* **313**, 171–192.
- 33 Costanzo M, Baryshnikova A, Bellay J, Kim Y, Spear ED, Sevier CS, Ding H, Koh JLY, Toufighi K, Mostafavi S *et al.* (2010) The genetic landscape of a cell. *Science* **327**, 425–431.
- 34 Koplín A, Preissler S, Ilina Y, Koch M, Scior A, Erhardt M & Deuerling E (2010) A dual function for chaperones SSB-RAC and the NAC nascent polypeptide-associated complex on ribosomes. *J Cell Biol* **189**, 57–68.
- 35 Shi X, Parthun MR & Jaehning JA (1995) The yeast *EGD2* gene encodes a homologue of the alpha NAC subunit of the human nascent-polypeptide-associated complex. *Gene* **165**, 199–202.
- 36 George R, Walsh P, Beddoe T & Lithgow T (2002) The nascent polypeptide-associated complex (NAC) promotes interaction of ribosomes with the mitochondrial surface in vivo. *FEBS Lett* **516**, 213–216.
- 37 Panasencko O, Landrieux E, Feuermann M, Finka A, Paquet N & Collart MA (2006) The yeast Ccr4-Not complex controls ubiquitination of the nascent-associated polypeptide (NAC-EGD) complex. *J Biol Chem* **281**, 31389–31398.
- 38 Gautschi M, Mun A, Ross S & Rospert S (2002) A functional chaperone triad on the yeast ribosome. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 4209–4214.
- 39 Huang P, Gautschi M, Walter W, Rospert S & Craig EA (2005) The Hsp70 Ssz1 modulates the function of the ribosome-associated J-protein Zuo1. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 497–504.
- 40 Peisker K, Braun D, Wölflé T, Hentschel J, Fünfschilling U, Fischer G, Sickmann A & Rospert S (2008) Ribosome-associated complex binds to ribosomes in close proximity of Rpl31 at the exit of the polypeptide tunnel in yeast. *Mol Biol Cell* **19**, 5279–5288.
- 41 Leidig C, Bange G, Kopp J, Amlacher S, Aravind A, Wickles S, Witte G, Hurt E, Beckmann R & Sinning I (2013) Structural characterization of a eukaryotic chaperone—the ribosome-associated complex. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 23–28.
- 42 Wenz L-S, Ellenrieder L, Qiu J, Bohnert M, Zufall N, van der Laan M, Pfanner N, Wiedemann N & Becker T (2015) Sam37 is crucial for formation of the mitochondrial TOM-SAM supercomplex, thereby promoting β -barrel biogenesis. *J Cell Biol* **210**, 1047–1054.
- 43 Paschen SA, Waizenegger T, Stan T, Preuss M, Cyrklaff M, Hell K, Rapaport D & Neupert W (2003) Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins. *Nature* **426**, 862–866.
- 44 Gratzner S, Lithgow T, Bauer RE, Lamping E, Paltauf F, Kohlwein SD, Haucke V, Junne T, Schatz G & Horst M (1995) Mas37p, a novel receptor subunit for protein import into mitochondria. *J Cell Biol* **129**, 25–34.
- 45 Hines V, Brandt A, Griffiths G, Horstmann H, Brüttsch H & Schatz G (1990) Protein import into yeast mitochondria is accelerated by the outer membrane protein MAS70. *EMBO J* **9**, 3191–3200.
- 46 Brix J, Ziegler GA, Dietmeier K, Schneider-Mergener J, Schulz GE & Pfanner N (2000) The mitochondrial import receptor Tom70: identification of a 25 kDa core

- domain with a specific binding site for preproteins. *J Mol Biol* **303**, 479–488.
- 47 Model K, Prinz T, Ruiz T, Radermacher M, Krimmer T, Kühlbrandt W, Pfanner N & Meisinger C (2002) Protein translocase of the outer mitochondrial membrane: role of import receptors in the structural organization of the TOM complex. *J Mol Biol* **316**, 657–666.
- 48 Schmidt O, Harbauer AB, Rao S, Eylich B, Zahedi RP, Stojanovski D, Schönfisch B, Guiard B, Sickmann A, Pfanner N *et al.* (2011) Regulation of mitochondrial protein import by cytosolic kinases. *Cell* **144**, 227–239.
- 49 Gerbeth C, Schmidt O, Rao S, Harbauer AB, Mikropoulou D, Opalińska M, Guiard B, Pfanner N & Meisinger C (2013) Glucose-induced regulation of protein import receptor Tom22 by cytosolic and mitochondria-bound kinases. *Cell Metab* **18**, 578–587.
- 50 Yogev O, Karniely S & Pines O (2007) Translation-coupled translocation of yeast fumarase into mitochondria in vivo. *J Biol Chem* **282**, 29222–29229.
- 51 del Alamo M, Hogan DJ, Pechmann S, Albanese V, Brown PO & Frydman J (2011) Defining the specificity of cotranslationally acting chaperones by systematic analysis of mRNAs associated with ribosome-nascent chain complexes. *PLoS Biol* **9**, e1001100.
- 52 Dukanovic J, Dimmer KS, Bonnefoy N, Krumpe K & Rapaport D (2009) Genetic and functional interactions between the mitochondrial outer membrane proteins Tom6 and Sam37. *Mol Cell Biol* **29**, 5975–5988.
- 53 Kozjak V, Wiedemann N, Milenkovic D, Lohaus C, Meyer HE, Guiard B, Meisinger C & Pfanner N (2003) An essential role of Sam50 in the protein sorting and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* **278**, 48520–48523.
- 54 Meisinger C, Rissler M, Chacinska A, Szklarz LKS, Milenkovic D, Kozjak V, Schönfisch B, Lohaus C, Meyer HE, Yaffe MP *et al.* (2004) The mitochondrial morphology protein Mdm10 functions in assembly of the preprotein translocase of the outer membrane. *Dev Cell* **7**, 61–71.
- 55 Ott C, Ross K, Straub S, Thiede B, Götz M, Goosmann C, Kruschke M, Mueller MJ, Krohne G, Rudel T *et al.* (2012) Sam50 functions in mitochondrial intermembrane space bridging and biogenesis of respiratory complexes. *Mol Cell Biol* **32**, 1173–1188.
- 56 Luk E, Yang M, Jensen LT, Bourbonnais Y & Culotta VC (2005) Manganese activation of superoxide dismutase 2 in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **280**, 22715–22720.
- 57 Sikorski RS & Hieter P (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19–27.
- 58 Tarassov K, Messier V, Landry CR, Radinovic S, Serna Molina MM, Shames I, Malitskaya Y, Vogel J, Bussey H & Michnick SW (2008) An in vivo map of the yeast protein interactome. *Science* **320**, 1465–1470.
- 59 Ott A-K, Locher L, Koch M & Deuerling E (2015) Functional dissection of the nascent polypeptide-associated complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* **10**, e0143457.
- 60 Marc P, Margeot A, Devaux F, Blugeon C, Corral Debrinski M & Jacq C (2002) Genome-wide analysis of mRNAs targeted to yeast mitochondria. *EMBO Rep* **3**, 159–164.
- 61 Tong AHY & Boone C (2007) High-throughput strain construction and systematic synthetic lethal screening in. In *Yeast Gene Analysis*. 2nd edn (Stansfield I & Stark MJR, eds), pp. 369–707. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- 62 Goldstein AL & McCusker JH (1999) Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **15**, 1541–1553.
- 63 Gietz RD & Woods RA (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* **350**, 87–96.
- 64 Herrmann JM, Fölsch H, Neupert W & Stuart RA (1994) Isolation of yeast mitochondria and study of mitochondrial protein translation. In *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. Vol. 1 (Celis JE, ed.), pp. 538–544. Academic Press, New York, NY.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article:

Table S1. Aggravating interactions found using a $\Delta egd2$ strain as bait.

Table S2. Aggravating interactions found using a $\Delta egd1\Delta btt1$ strain as bait.

Table S3. List of strains used in this study.