



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

Estudio funcional sobre la interacción genética de los genes *BTT1* y *SAM37* de *Saccharomyces cerevisiae*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

LIBB José Ernesto Bravo Arévalo

TUTORA PRINCIPAL:

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

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Alexander de Luna Fors
LANGEBIO, CINVESTAV-IPN Irapuato

Dra. Alicia González Manjarrez
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Ciudad de México



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

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

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

La Dra. Alicia González Manjarrez del Instituto de Fisiología Celular, UNAM

El Dr. Alexander de Luna Fors del LANGEBIO, CINVESTAV-IPN Irapuato

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

Este trabajo forma parte del proyecto de investigación apoyado por donativos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (número de proyecto: 58550), así como por los donativos IN207518 y IN208921 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA, UNAM).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar los estudios de maestría (CVU: 1033319).

A las Dras. Ariann Elizabeth Mendoza Martínez, Yolanda Camacho Villasana y Paola Moreno Álvarez por las sugerencias y toda la ayuda técnica brindada durante el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Laura Ongay Larios, a la Biól. Guadalupe Códiz Huerta y a la M. en C. Minerva Mora Cabrera, miembros de la Unidad de Biología Molecular del IFC (UNAM), por la síntesis de desoxioligonucleótidos y las secuenciaciones de DNA requerida en este proyecto.

Al Ing. Aurey Gaván Lobato y al Ing. Manuel Ortíz Benavides del Taller de Mantenimiento del IFC (UNAM), por su ayuda técnica.

AGRADECIMIENTOS

Reconocimientos	I
Agradecimientos	II
Índice	III
1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1 Origen evolutivo y fraccionamiento del genoma mitocondrial	2
2.2 Elementos moleculares que participan en la importación mitocondrial	4
2.2.1 Generalidades del proceso de importación de proteínas	7
2.2.2 Las señales de importación presentes en las proteínas mitocondriales	8
2.2.3 Vías de importación mitocondrial	12
2.3 Modelos de importación mitocondrial	18
2.3.1 Modelo de importación postraduccional	18
2.3.2 Modelo de importación cotraduccional	21
2.3.3 Importación asistida por el Retículo Endoplásmico	22
2.4 El Complejo Asociado a Polipéptidos Nacientes	23
2.4.1 NAC de <i>S. cerevisiae</i> y su participación en la importación cotraduccional de proteínas a la mitocondria	26
3. Planteamiento del proyecto	29
4. Pregunta de investigación	31
5. Hipótesis	31
6. Objetivo general	31
7. Objetivos particulares	31
8. Materiales y Métodos	32
8.1 Construcción de cepas mutantes de <i>S. cerevisiae</i>	32
8.2 Crecimiento de las cepas mutantes para validación de las etiquetas de hemaglutinina	35
8.3 Obtención de extractos proteicos totales y electroforesis desnaturalizante de proteínas	35
8.3 Ensayo de inducción en presencia o ausencia de MG-132 para la determinación de modificaciones postraduccionales en β_2 -NAC	36
8.4 Inmunoprecipitación de proteínas etiquetadas con HA	37
8.5 Inmunodetección	37
9. Resultados	39

9.1 La eliminación de <i>SAM37</i> impacta diferencialmente a los niveles proteicos de β_1 - y β_2 -NAC.....	39
9.2 β_2 -NAC puede ser blanco de modificación postraducciona y de degradación proteolítica	41
9.3 Es posible la inducción de la expresión de β_2 -NAC al cambiar de un metabolismo respiratorio a uno fermentativo	43
9.4 La adición del inhibidor del proteosoma MG-132 favorece la aparición de formas de mayor y menor peso molecular de β_2 -NAC.....	45
9.5 La disminución de β_2 -NAC en ausencia de Sam37 no es debida a la acción del sistema ubiquitina-proteosoma	47
10. Discusión	55
11. Conclusiones.....	60
12. Perspectivas	60
13. Apéndice.....	61
13.1 Medios de cultivo.....	61
13.2 Soluciones y amortiguadores	61
14. Referencias	60

1. RESUMEN

El proceso de importación de proteínas a la mitocondria se puede dividir en dos fases: el transporte de proteínas desde el citosol a la mitocondria y la translocación de éstas a los diferentes compartimentos mitocondriales. Los años de estudios sobre las translocasas mitocondriales y sus mecanismos han detallado con gran precisión el orden de sucesos y los actores moleculares que llevan a cabo la distribución del proteoma mitocondrial a cada compartimento del organelo. No obstante, poco se conoce sobre la primera fase de la importación.

Uno de los modelos generados para conceptualizar algunos aspectos del transporte de proteínas a la mitocondria es el de importación cotraduccional. En éste, algunas proteínas son translocadas a la mitocondria al mismo tiempo que ocurre su traducción en los ribosomas citosólicos. En este contexto, un agente que ha ganado relevancia en este modo de importación es el Complejo Asociado a polipéptidos Nacientes (NAC), el cual es un heterodímero compuesto por las subunidades α -NAC y β -NAC que se asocia al túnel de salida de los ribosomas. En los últimos años se ha determinado que NAC participa en el reconocimiento de algunos sustratos de importación a la mitocondria.

En *Saccharomyces cerevisiae*, a causa de un evento de duplicación genética ocurrido durante su historia evolutiva, existen dos subunidades β -NAC parálogas (β_1 - y β_2 -NAC, codificadas por los genes *EGD1* y *BTT1* respectivamente) las cuales se han implicado diferencialmente en el proceso de importación mitocondrial. En línea con lo anterior, se ha reportado que existe una interacción genética entre los genes *BTT1* y *SAM37*, el cual que codifica para una proteína citosólica del complejo SAM encargado del ensamblaje de proteínas con estructura de barril β en la membrana externa mitocondrial.

Este estudio encontró que la eliminación del gen *SAM37* afecta negativamente los niveles proteicos de β_2 -NAC, mientras que la subunidad paróloga β_1 -NAC no se ve afectada. Asimismo, se especula que la ausencia de Sam37 puede alterar el tipo y el número de modificaciones postraduccionales de que puede ser blanco β_2 -NAC. Finalmente, se determinó que la reducción en los niveles proteicos de β_2 -NAC no es debida a la acción del sistema ubiquitina-proteosoma, por lo que algún otro mecanismo posiblemente module los niveles proteicos de esta subunidad en ausencia de Sam37.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 *Origen evolutivo y fraccionamiento del genoma mitocondrial*

Las mitocondrias son organelos con genoma propio que se cuentan dentro de las características definitorias de los eucariotas y su aparición en estas células marca un hito en la historia evolutiva de las células nucleadas (Dacks et al., 2016). Estas estructuras participan en funciones celulares tales como los metabolismos de lípidos y aminoácidos, la biosíntesis del grupo hemo y de los centros Fe-S y, como rasgo característico, la biosíntesis de la mayor parte del ATP celular mediante el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa (Pfanner, Warscheid, & Wiedemann, 2019).

Uno de los rasgos principales de estos organelos es su peculiar estructura. Si bien la mayoría de los organelos de las células eucariotas se encuentran delimitados por una bicapa lipídica (p.ej., retículo endoplásmico, lisosomas/vacuola, endosomas tempranos, aparato de Golgi, etc.), las mitocondrias poseen una estructura de doble membrana (externa e interna; ME y MI respectivamente) la cual delimita dos espacios acuosos (el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial; EIM y MM, respectivamente) (Pfanner et al., 2019). Esta arquitectura contribuye a diferenciar la composición de los dos compartimentos acuosos del citosol y además permite la distribución de las funciones metabólicas de las mitocondrias. De este modo, los procesos como la fosforilación oxidativa se pueden llevar a cabo en la MI, mientras que el metabolismo de nitrógeno o el ciclo de Krebs se realizan en la fase acuosa de la MM (Toth et al., 2020; Wallace, 2005).

La presencia de la doble membrana mitocondrial se explica por su origen evolutivo como una α -proteobacteria ancestral (Roger, Muñoz-Gómez, & Kamikawa, 2017). Durante la eucariogénesis, el proceso evolutivo que llevó a la formación de las células eucariotas modernas, se especula que ocurrió un evento de endosimbiosis en el que un ancestro de una arquea del supergrupo Asgard, con una temprana capacidad fagocítica, engulló a una bacteria posiblemente relacionada con las α -proteobacterias modernas (Dacks et al., 2016; Lane, 2014; Mills, 2020). Dicho evento desencadenó un reparto paulatino de funciones metabólicas de tal modo que la α -proteobacteria asumió tareas dedicadas a la producción de energía y de cofactores, mientras que el hospedero arqueano asumió el control de la biosíntesis de proteínas y lípidos del

endosimbionte (Avendaño-Monsalve, Ponce-Rojas, & Funes, 2020; Dacks et al., 2016; Lane, 2014).

Ahora bien, un hecho crucial que dio paso a tal reparto de funciones fue el rearrreglo de los genomas arqueano y bacteriano (Archibald, 2015; Dacks et al., 2016; Mills, 2020). Durante la coevolución del endosimbionte con su hospedero arqueano, el genoma bacteriano sufrió una reducción significativa de su tamaño a causa de la relocalización de genes en el genoma del hospedero, así como a la pérdida de genes por acumulación de mutaciones (Kurland & Andersson, 2000). En consecuencia, el hospedero asumió el control de la mayor parte del proteoma bacteriano que, en las células eucariotas modernas, supone un 99 % de las proteínas, mientras que el 1 % restante se encuentra codificado en el genoma del organelo (Spang et al., 2019). Como vestigios de dicho proceso de reparto y asimilación de funciones, en las mitocondrias actuales ha quedado un genoma organelar reducido el cual codifica solamente algunas proteínas altamente hidrofóbicas de la cadena de transporte de electrones y la presencia de dos bicapas lipídicas reminiscentes de las dos membranas celulares de las bacterias Gram negativas.

El rearrreglo de los genomas bacteriano y arqueano debió suponer un enorme reto y una gran presión de selección para las células eucariotas en formación debido al cambio en la forma en que llegan las proteínas a la mitocondria (Schneider, 2020). La transferencia de secciones del genoma bacteriano al naciente genoma nuclear automáticamente implicó la biosíntesis de proteínas en el citosol celular. En consecuencia, elementos celulares citosólicos y membranales, tales como chaperonas, receptores de membrana o proteínas de reconocimiento de RNA, tanto originarios del hospedero arqueano como del endosimbionte bacteriano, fueron adaptados para asegurar que las proteínas mitocondriales sintetizadas en el citosol llegasen a su subcompartimento funcional (Priesnitz & Becker, 2018; Schneider, 2020; Song, Herrmann, & Becker, 2021). Esto, junto con la adición de secuencias de localización mitocondrial a las proteínas mitocondriales codificadas en el genoma nuclear, dio paso al surgimiento del proceso de importación mitocondrial (Hansen & Herrmann, 2019). La importancia de este proceso para la vida eucariótica se pone en evidencia por la letalidad y por la inducción de la respuesta a proteínas mal plegadas ante un fallo o mutación de los sistemas implicados en dicho fenómeno (den Brave, *et al.*, 2021; Wallace, 2005).

2.2 Elementos moleculares que participan en la importación mitocondrial

Desde su aparición como un endosimbionte bacteriano, las nacientes mitocondrias ganaron y cedieron funciones en esa larga interrelación que tuvieron con su hospedero arqueano (Mills, 2020; Spang et al., 2019). Si bien las funciones características de estos organelos son las relacionadas con la generación de ATP por medio de la fosforilación oxidativa (Enríquez, 2016; Schmidt, Pfanner, & Meisinger, 2010), funciones ya presentes en el endosimbionte bacteriano (Lane, 2014), las mitocondrias también adquirieron un papel central en aquellos procesos que definen y distinguen a las células eucariotas (Dacks et al., 2016; Fenton, Jongens, & Holzbaur, 2021; Pfanner et al., 2019). Tales son la autofagia, las vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis, la regulación del ciclo celular y la determinación sexual de algunos organismos. Asimismo, en estos organelos también ocurren fenómenos esenciales para toda célula como lo son el control de calidad de proteínas (proteóstasis), la regulación del estado oxidoreductor, el mantenimiento y remodelación del retículo endoplásmico, la respuesta al estrés oxidante y la biosíntesis de centros Fe-S (Figura 1).

Una de las consecuencias más importantes de la asimilación del endosimbionte bacteriano durante el surgimiento de la célula eucariota fue la transferencia de genes bacterianos al genoma nuclear. Esto fue puesto en evidencia en estudios filogenéticos en los que se observa la agrupación de genes nucleares eucarióticos dentro de familias génicas presentes en las bacterias modernas (Kurland & Andersson, 2000). Aunque la presencia de algunos de estos genes se puede explicar por transferencias genéticas horizontales a diferentes tiempos durante la evolución de las células nucleadas (Dacks et al., 2016), la evidencia es clara sobre la transferencia génica del genoma del endosimbionte bacteriano al genoma del hospedero arqueano. Como resultado, solamente una fracción de los genes bacterianos originales se retuvo en el empequeñecido genoma mitocondrial, principalmente de proteínas transmembranales hidrofóbicas de la cadena de transporte de electrones y algunos tRNAs (M. Ott, Amunts, & Brown, 2016).

Ahora bien, la gran versatilidad de funciones descrita de las mitocondrias (Figura 1) es resultado del actuar de su proteoma, el cual además de estar codificado en dos genomas distintos, está compuesto por proteínas que participan en varios procesos celulares y está modulado por el estado metabólico celular (Gerbeth et al., 2013;

Kayikci & Nielsen, 2015; Priesnitz & Becker, 2018) (Figura 2). Si a esta complejidad se le suma el hecho de tener que coordinar la síntesis de más del 95 % de proteínas mitocondriales en el citosol con la síntesis de aquéllas codificadas en el genoma mitocondrial (Harbauer et al., 2014; Priesnitz & Becker, 2018), se hace evidente la presión de selección que llevó al desarrollo de un sistema de importación capaz de localizar eficientemente el proteoma mitocondrial en los cuatro compartimentos mitocondriales (Schneider, 2020).

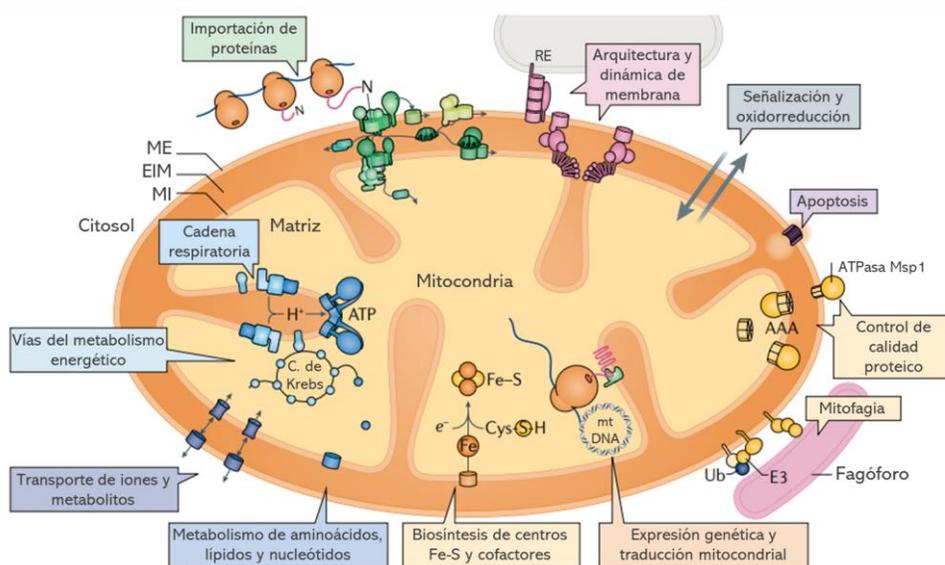


Figura 1. La mitocondria como punto en común de muchos procesos esenciales para la vida eucariótica. Se indican los diversos procesos celulares en los que la mitocondria participan, así como los compartimentos en que son llevados a cabo. La mayoría de dichas funciones son el resultado de la adaptación de las funciones bioquímicas bacterianas al nuevo entorno citosólico luego de ser fagocitada. Igualmente, algunas funciones como la mitofagia o la importación de proteínas son resultado de la asimilación del endosimbionte como un organelo bajo control del núcleo celular. AAA: proteasas dependientes de ATP de la MI, Fe-S: centros hierro-azufre, E3: ligasa de ubiquitina; mtDNA: DNA mitocondrial, RE: retículo endoplásmico, Ub: ubiquitina. Imagen adaptada de Pfanner et al., 2019.

Conviene señalar que el sistema de importación de proteínas a la mitocondria surgió como una adaptación del sistema de organización proteica del endosimbionte bacteriano ante el nuevo entorno intracelular y como consecuencia del fraccionamiento en la codificación del proteoma mitocondrial (Funes, Kauff, Van Der Sluis, Ott, & Herrmann, 2011; Kurland & Andersson, 2000; Preuss, Ott, Funes, Luirink, & Herrmann, 2005; Schneider, 2020). En este aspecto, el sistema de organización de proteínas del endosimbionte tuvo que adaptarse a la incorporación de elementos de

origen exclusivamente eucariótico entre las que se incluyen, por ejemplo, la adición de transportadores de metabolitos en la MI de la mitocondria (como el intercambiador ATP/ADP), o la adición proteínas transmembranales de la ME ancladas por el extremo C terminal (Roger et al., 2017). Estas últimas involucradas en el control de la proteóstasis y la remodelación del organelo (Fenton et al., 2021; Frank et al., 2012). Es posible que tales incorporaciones al sistema de organización proteica se dieran como una forma de control de la célula hospedera sobre las actividades metabólicas y la biogénesis del endosimbionte. Por lo tanto, elementos de origen bacteriano como adiciones de origen eucariótico fueron piezas esenciales para la transición de un endosimbionte bacteriano autónomo hacia un organelo cuya biogénesis y regulación se encuentran bajo control del núcleo celular eucariótico (Roger et al., 2017; Schneider, 2020).

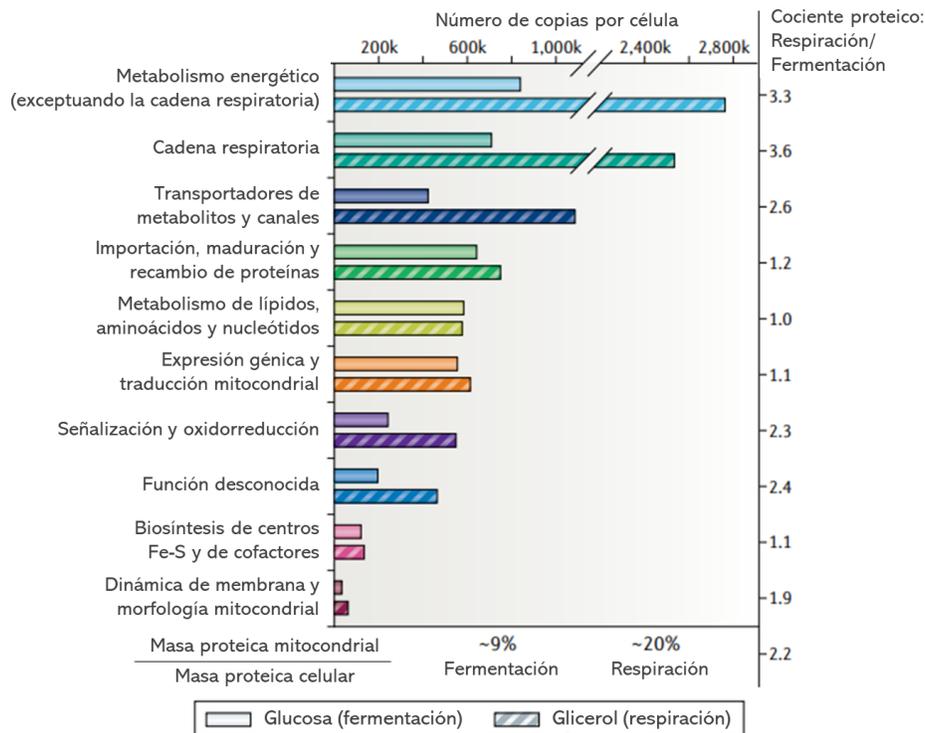


Figura 2. Modulación del proteoma mitocondrial en respuesta a cambios en la actividad metabólica de las células. Ejemplo de *S. cerevisiae* de los cambios en abundancia proteica de los elementos que participan en los procesos mitocondriales. Resalta la modulación en la abundancia proteica ante un cambio de metabolismo de los procesos del metabolismo energético (3.3 veces), de la cadena de transporte de electrones (cadena respiratoria, 3.6 veces) y del transporte de metabolitos (2.6 veces). Se indica también el incremento proporcional de la masa proteica mitocondrial respecto a la masa proteica celular ante un cambio de metabolismo en el que se induce la biogénesis mitocondrial. Imagen adaptada de: Pfanner et al., 2019.

2.2.1 Generalidades del proceso de importación de proteínas

Todo sistema de importación de proteínas presente en los tres dominios de la vida (arqueano, bacteriano y eucariótico) posee las mismas características generales ya que surgieron como respuesta a la necesidad temprana de organizar los proteomas a través de las membranas biológicas (Hansen & Herrmann, 2019; Mulkidjanian, Galperin, & Koonin, 2009; Renthal, 2010). Éstas se pueden resumir en los siguientes puntos:

1. La síntesis de proteínas por ribosomas en un entorno acuoso.
2. El reconocimiento de motivos estructurales en el mRNA o en las proteínas a importar por factores solubles generales o específicos.
3. La transferencia de las proteínas a importar a su membrana destino.
4. La translocación de proteínas a través de translocadores presentes en la membrana o la inserción directa de las proteínas a la membrana del compartimento de destino.

Dichos fenómenos se consideran resultado de adaptaciones moleculares tempranas a uno de los rasgos definitorios de toda célula viva: la delimitación y distinción de espacios acuosos por medio de membranas lipídicas. Este contraste entre fases acuosas y lipídicas en las células tempranas puso en escena una gran variedad de entornos fisicoquímicos en los cuales los nacientes proteomas tuvieron que operar y adaptarse para llevar a cabo los procesos bioquímicos esenciales (Mulkidjanian et al., 2009; Renthal, 2010). Como una solución para distinguir aquellas fracciones de los proteomas cuya funcionalidad dependía de la inserción o de la translocación a través de membranas biológicas, las proteínas evolucionaron cuatro tipos de señales topogénicas determinantes de su localización subcelular (Hansen & Herrmann, 2019):

1. Secuencias señal que inician la translocación proteica a compartimentos membranosos (membrana plasmática, retículo endoplásmico, ME mitocondrial, etc.).
2. Señales de paro-transferencia que frenan la translocación proteica y permiten la liberación lateral de segmentos hidrofóbicos a la membrana destino.

3. Secuencias señal que permiten la unión del blanco a factores generales o específicos de destino proteico (chaperonas, proteínas adaptadoras o motoras, etc.).
4. Secuencias de inserción que facilitan unión de las proteínas directamente a las membranas biológicas.

2.2.2 Las señales de importación presentes en las proteínas mitocondriales

El proceso de importación mitocondrial es un caso particular entre los eucariontes debido a que la mitocondria es un organelo con dos membranas biológicas funcional y estructuralmente distintas (ME y MI). Estas membranas delimitan dos espacios acuosos (EIM y MM) cuya composición difiere sustancialmente del entorno citosólico. Sumado a ello, la MI forma invaginaciones denominadas crestas las cuales forman subdominios diferenciados y dedicados a la fosforilación oxidativa (Pfanner et al., 2019; Vögtle et al., 2017). Análogamente, las regiones de la MI que no forman crestas se encuentran dedicadas al intercambio de metabolitos, proteínas y lípidos con el resto de la célula. En consecuencia, la transferencia y la organización del proteoma mitocondrial desde el citosol hasta los diferentes compartimentos organelares sólo pudo ser posible mediante la incorporación de información estructural capaz de especificar tanto el sitio de destino como la orientación de cada proteína mitocondrial (Chacinska, Koehler, Milenkovic, Lithgow, & Pfanner, 2009; Fox, 2012).

Como se mencionó antes, un aspecto esencial para el funcionamiento de los sistemas de importación es su capacidad de diferenciar los motivos estructurales adicionales a las proteínas capaces de indicar su localización subcelular. En este aspecto, debido a la particular estructura de las mitocondrias, en el transcurso de la evolución se hizo necesaria la expansión de la información estructural incorporada a las proteínas mitocondriales, hecho que conllevó al incremento en la complejidad del proteoma del organelo (Roger et al., 2017). Dicha complejidad hizo necesaria la adaptación de los sistemas de organización proteica del endosimbionte bacteriano hacia un sistema de importación capaz de distinguir las distintas señales incorporadas a aquellas proteínas mitocondriales sintetizadas desde el citosol (Schneider, 2020). A continuación, se detallan algunas generalidades sobre los motivos estructurales más comúnmente encontrados en las proteínas mitocondriales.

- *Presecuencias y variaciones*

Las presecuencias son el tipo de motivo estructural más común en los precursores de las proteínas mitocondriales y generalmente especifican a la matriz mitocondrial como sitio de destino, aunque también pueden encontrarse en algunas proteínas de la MI y al EIM (Tabla 1). Estos motivos son secuencias ubicadas en el extremo N-terminal de las proteínas y forman hélices α anfipáticas de entre 8 y 80 residuos aproximadamente. Son ricas en aminoácidos con cargas positivas y en aminoácidos hidrofóbicos, los cuales se encuentran organizados de modo que una cara de la hélice posee carga positiva mientras que la otra adquiere un carácter hidrofóbico. Dicha configuración les permite ser transportadas a través de las membranas mitocondriales por un efecto electroforético generado por el potencial electroquímico negativo de la MI mitocondrial (Chacinska et al., 2009; Fox, 2012; Hansen & Herrmann, 2019).

Tabla 1. Secuencias señal editables en las proteínas mitocondriales

Presecuencias y variaciones		Sitio de destino
Presecuencia: α -hélice anfipática editable	<p>The diagram shows an N-terminal region with three positive charges (+ + +) above a wavy line representing an alpha-helix. A red vertical line labeled 'Proteasa' indicates a cleavage site. The C-terminal end is labeled 'C'.</p>	Matriz mitocondrial
Presecuencia + segmento transmembranal	<p>The diagram shows an N-terminal region with three positive charges (+ + +) above a wavy line representing an alpha-helix. This is followed by a yellow rectangular segment representing a transmembrane domain. A red vertical line labeled 'Proteasa' indicates a cleavage site. The C-terminal end is labeled 'C'.</p>	Membrana interna
Presecuencia + segmento transmembranal editable	<p>The diagram shows an N-terminal region with three positive charges (+ + +) above a wavy line representing an alpha-helix. This is followed by a yellow rectangular segment representing a transmembrane domain. Two red vertical lines labeled 'Proteasa' indicate cleavage sites. The C-terminal end is labeled 'C'.</p>	Espacio intermembranal

Basado en: Chacinska et al., 2009.

Generalmente, estos motivos estructurales están sucedidos por sitios de corte de proteasas de la matriz mitocondrial encargadas de escindir las presecuencias una vez que la proteína arribó a su sitio de destino, proceso conocido como maduración del precursor (Fox, 2012). En algunos casos, estas secuencias están seguidas de segmentos transmembranales y señales de paro-transferencia que pausan la translocación a la matriz mitocondrial y permiten la liberación lateral de la proteína a la MI (Hansen & Herrmann, 2019; Ieva et al., 2014). Una vez en el plano de la membrana, se escinden las presecuencias expuestas a la matriz mitocondrial y el segmento transmembranal funge como ancla para la proteína que ahora se encuentra de cara al EIM. Además, en algunos casos estas secuencias poseen un sitio de corte adicional en seguida del

segmento transmembranal, el cual es blanco de corte para proteasas de la MI. De este modo, proteínas ancladas a la MI por el proceso anterior son separadas del segmento transmembranal y son liberadas al EIM.

- *Secuencias internas y segmentos no escindibles*

En algunos casos, las proteínas mitocondriales no son sintetizadas con presecuencias editables que guíen su importación. En cambio, la información necesaria para su importación y localización se encuentra en forma de motivos estructurales presentes en las formas maduras de las proteínas a importar (Tabla 2). Este tipo de señales de localización, denominadas como señales internas, están presentes principalmente en proteínas de la MI con segmentos transmembranales y en todas las proteínas de la ME. Asimismo, aunque en menor medida, se pueden encontrar en algunas proteínas de la matriz y de las MI y ME mitocondriales (Chacinska et al., 2009; Fox, 2012).

Tabla 2. Secuencias señal no editables en las proteínas mitocondriales

Secuencias internas y segmentos no escindibles		Sitio de destino
Láminas y señales β	N —————  C	Membrana externa (barriles β)
Ancla N-terminal	N  ————— C	Membrana externa (anclas de α -hélices)
Ancla C-terminal	N —————  C	
Señal hidrofóbica interna	N —————  ————— C	
Señales internas múltiples	N  C	Membrana interna (Transportadores de metabolitos)
Pseudopresecuencias	N —————  C	Membrana interna o matriz mitocondrial

Basado en: Chacinska et al., 2009.

El primer tipo de señales internas son las encontradas en los transportadores de metabolitos de la MI, cuyos principales ejemplos son el intercambiador de ADP/ATP y el transportador de fosfato (Chacinska et al., 2009; Pfanner et al., 2019). Éstos son considerados como una innovación eucariótica que surgió durante la transición del endosimbionte bacteriano a la mitocondria moderna ya que no se han encontrado homólogos de estas proteínas en los linajes procarióticos estudiados hasta la fecha

(Roger et al., 2017). Típicamente, dicha clase de proteínas contienen seis cruces transmembranales circundados por señales internas de aproximadamente 10 aminoácidos de longitud. Dichas señales internas son reconocidas por chaperonas citosólicas y son sitio de unión de los receptores de la ME mitocondrial y de las proteínas Tim pequeñas (Tim 8, 9, 10, 12 y 13) en el EIM (Chacinska et al., 2009; Hansen & Herrmann, 2019).

Otro tipo de señales internas son las presentes en las proteínas de la ME que poseen estructura de barriles β , tales como el poro de translocación Tom40 o la porina con actividad de canal aniónico regulado por voltaje Por1 (Becker, Song, & Pfanner, 2019; Takeda et al., 2021). En este tipo de proteínas, la señal interna necesaria para indicar su localización organelar se encuentra en forma de un asa de láminas β en el extremo C-terminal la cual es esencial para la interacción con el complejo SAM y para su liberación lateral a la membrana lipídica (Takeda et al., 2021). Adicionalmente, existen ciertas señales internas de estructura variada a lo largo de la proteína las cuales son necesarias para la interacción con los receptores del poro de translocación TOM y para la interacción con las proteínas Tim pequeñas en su trayecto desde el EIM hasta la ME (Chacinska et al., 2009).

Algunas proteínas de la ME poseen señales formadas por hélices α hidrofóbicas. En la mayoría de los casos, este tipo de señales se encuentran tanto en el extremo N-terminal como en el C-terminal, y funcionan de anclas transmembranales que permiten a las proteínas posicionarse en la ME mitocondrial mientras exponen sus dominios funcionales al citosol celular (Becker et al., 2019; Doan et al., 2020). Algunos ejemplos de esto son los receptores del poro de translocación Tom20 y Tom70 con anclas en su extremo N-terminal o Fis1, proteína esencial para la remodelación mitocondrial, con un ancla en su extremo C-terminal (Fox, 2012). Asimismo, existen algunos casos en que las señales internas se encuentran como una o varias hélices α transmembranales en la región interna de las proteínas destinadas a la ME (Doan et al., 2020). La inserción de estas tres clases de proteínas parece depender de una acción coordinada del receptor del poro de translocación Tom70, del complejo MIM de la ME y del complejo SAM, aunque algunas proteínas con anclas en el extremo C-terminal pueden insertarse sin la necesidad de éstos (Becker et al., 2019; Doan et al., 2020). Por lo que las rutas de inserción a la ME más bien depende del tipo particular de proteína de que se trate, puesto que existen ejemplos de cada clase de proteínas cuya inserción sólo depende uno o dos de los complejos arriba mencionados.

Finalmente, cierto tipo de proteínas destinadas a la matriz y al EIM mitocondrial poseen segmentos helicoidales semejantes a las presecuencias editables del extremo N terminal (pseudopresecuencias). Estas señales les permiten a las proteínas que las poseen utilizar las vías de importación clásicas de aquellas proteínas con presecuencias fidedignas, inclusive en ausencia de una presecuencia editable (Backes et al., 2018).

- *Señales moduladas por oxidorreducción*

Este tipo de señales internas se encuentran en la mayoría de las proteínas destinadas al EIM y poseen la particularidad de que están conformadas por hélices α anfipáticas internas adyacentes a motivos de cisteínas oxidables (Tabla 3) (Chatzi, Manganas, & Tokatlidis, 2016; Habich, Salscheider, & Riemer, 2019). La oxidación de estas cisteínas conlleva a la formación de puentes disulfuro intramoleculares necesarios para la retención de las proteínas importadas en el EIM. Dicho proceso es denominado plegamiento oxidativo y es catalizado por el complejo MIA (complejo conformado por Mia40 y Erv1 en levadura) de modo semejante a los procesos de plegamiento oxidativo del periplasma de las bacterias Gram negativas (Chatzi et al., 2016; Habich et al., 2019). Algunos tipos de proteínas que se importan al EIM desde el citosol de esta manera son las proteínas Tim pequeñas mencionadas con anterioridad y las proteínas en las que la coordinación química de cofactores como el grupo Hemo o la formación y ruptura de puentes disulfuro es esencial para su función (Fox, 2012).

Tabla 3. Secuencias señal moduladas por oxidorreducción

Señales moduladas por oxidorreducción	Sitio de destino
Motivos de cisteínas 	Espacio intermembranal

Basado en: Chacinska et al., 2009.

2.2.3 Vías de importación mitocondrial

La mayoría de las proteínas mitocondriales tienen que atravesar alguna de las dos membranas del organelo para llegar a su sitio de destino en consecuencia de su

traducción citosólica (Wasilewski, Chojnacka, & Chacinska, 2017). De hecho, cuatro de las cinco vías principales de importación transitan necesariamente a través de la ME (Figura 3). Es por ello por lo que existen diferentes complejos proteicos encargados de acompañar y direccionar a los precursores mitocondriales a lo largo de estas vías con el objetivo de localizar al proteoma mitocondrial hasta su compartimento de destino (Chacinska et al., 2009).

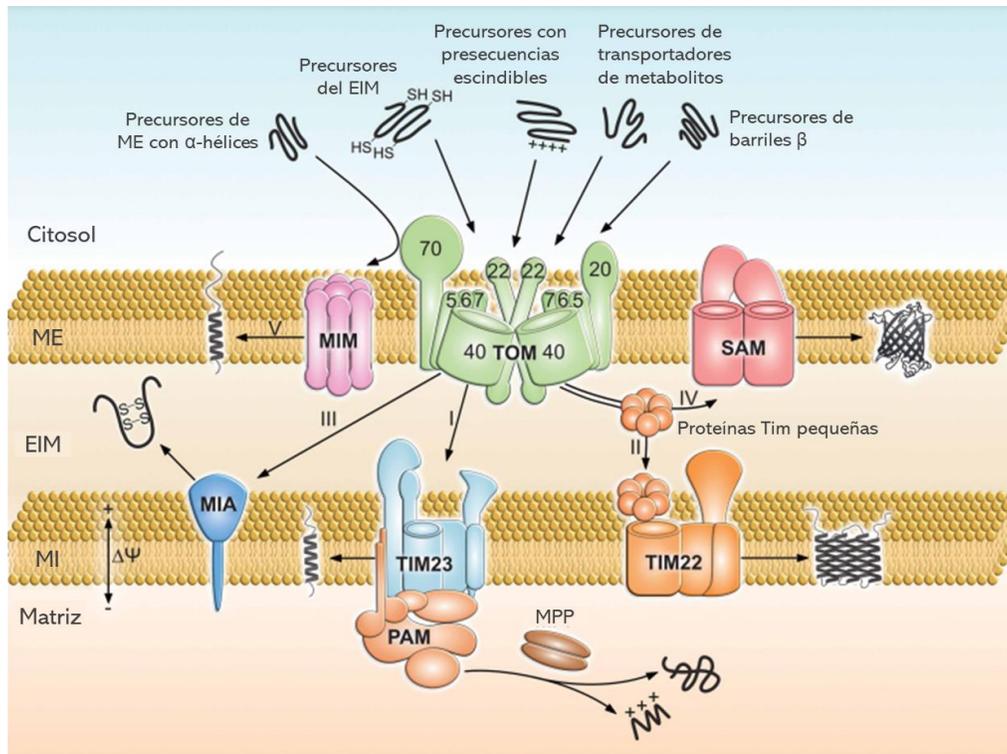


Figura 3. Vías de importación de proteínas a la mitocondria. En la Vía I las proteínas con presecuencias editables son conducidas desde el citosol a través del complejo TOM hasta TIM23 en donde pueden ser liberadas lateralmente a la MI o translocadas hacia la matriz mitocondrial. En la Vía II, los precursores son translocados por TOM hacia el EIM en donde son unidos por las proteínas Tim las cuales los conducen hasta el complejo TIM22 para ser insertados en la MI. A través de la Vía III, los precursores con motivos de cisteínas son translocados por TOM hacia el EIM en donde el sistema MIA los oxida para formar puentes disulfuro intramoleculares a través del proceso de relevo de puentes disulfuro. Por la vía IV se conducen las proteínas con estructura de barril β hacia la membrana externa a través de su unión con las proteínas Tim pequeñas y la acción del complejo SAM. En la Vía V, se insertan directamente a la ME gracias a sus propiedades fisicoquímicas o por la acción del complejo MIM y Tom70. Imagen adaptada de: den Brave et al., 2021.

El primer componente del sistema de importación mitocondrial es la translocasa de la membrana externa TOM, por sus siglas en inglés. Esta translocasa es un complejo multiproteico que posee por dos receptores periféricos, Tom20 y Tom70,

encargados del reconocimiento de las proteínas a importar (Endo & Yamano, 2010). Dichos receptores reconocen diferentes conjuntos de proteínas mitocondriales de modo que Tom20 se une preferencialmente a proteínas con presecuencias editables, mientras que Tom70 forma los primeros contactos con las secuencias internas de proteínas con varios cruces transmembranales de la MI y la ME (Endo & Yamano, 2010; Wasilewski et al., 2017). Adicionalmente, Tom70 reconoce las pseudopresecuencias en algunas proteínas y forma interacciones con chaperonas de las familias Hsp70 y 90 que acompañan a los precursores mientras se encuentran parcialmente desplegados en el citosol (Backes et al., 2018; Young, Hoogenraad, & Hartl, 2003). Otro componente central del complejo TOM es Tom22, cuya función es la de recibir a los precursores mitocondriales previamente reconocidos por Tom20 y Tom70 para transferirlos a Tom40 (Avendaño-Monsalve et al., 2020; Becker et al., 2019; Yamamoto et al., 2011). Esta última proteína forma el poro de translocación de la membrana externa gracias a su estructura de barril β , la cual le permite ser el canal por el que los precursores mitocondriales transitan al interior de la mitocondria (Neupert & Herrmann, 2007). Por último, las proteínas Tom pequeñas transmembranales (Tom 5, 6 y 7) regulan estructuralmente al complejo TOM al modular la estequiometría entre los receptores y el poro de translocación, particularmente al definir si la unidad funcional de TOM estará compuesta por dos o tres canales de translocación (Endo & Yamano, 2010; Pfanner et al., 2019). Asimismo, los segmentos transmembranales de algunas Tom pequeñas participan en la transferencia de los precursores mitocondriales desde el citosol hasta el EIM durante su tránsito por la ME.

La vía más utilizada por las proteínas mitocondriales para arribar a su sitio de destino es la vía de las presecuencias (indicada como I en la Figura 3) debido a que, a través de ella, ocurre la importación de aproximadamente el 60 % del proteoma mitocondrial (Pfanner et al., 2019). La razón de tan alto número es debido a que la mayor parte del proteoma mitocondrial es sintetizado con presecuencias editables y sus variaciones antes mencionadas (Vögtle et al., 2009). Un ejemplo de ello puede apreciarse en la Figura 2, particularmente en las clases denominadas como “Metabolismo energético” y “Cadena respiratoria” que, además de ser los dos procesos mitocondriales con la mayor abundancia proteica, ocurren tanto en la matriz mitocondrial como en la MI y el EIM.

Esta vía de importación comienza cuando los precursores con presecuencias arriban al complejo TOM en donde son reconocidos por Tom20 y transferidos a Tom22 para ser insertados a través de Tom40. Una vez en el EIM, los precursores son reconocidos por el complejo TIM23, una de las dos translocasas de la membrana interna, el cual los transporta hacia la matriz mitocondrial. Este transporte hacia el espacio de la matriz es llevado a cabo por TIM23 gracias a dos procesos que actúan en concordancia. El primero de ellos es la presencia del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$) generado por la cadena de transporte de electrones a través de la MI. De este modo, la acumulación de cargas negativas dentro de la matriz induce un movimiento electroforético de los precursores con presecuencias cargadas positivamente a través de TIM23. El segundo es el funcionamiento del motor PAM (de las siglas en inglés de Motor Asociado a la translocasa de Presecuencias) asociado a TIM23 por el lado de la matriz mitocondrial. El principal agente de este motor es la chaperona mitocondrial Hsp70 (mtHsp70) dependiente de ATP. Junto con sus cochaperonas, ésta se une cíclicamente a los precursores mitocondriales conforme emergen del poro de translocación de TIM23 y promueve el movimiento unidireccional de éstos hacia la matriz mitocondrial. Una vez ahí, las presecuencias son escindidas por la proteasa de procesamiento mitocondrial (MPP, por sus siglas en inglés) (Chacinska et al., 2009; Pfanner et al., 2019; Wasilewski et al., 2017).

Luego de la edición de la presecuencia, algunos precursores mitocondriales importados por esta vía pueden ser integrados a la MI o liberados al EIM. Para ello existen dos vías generales por las cuales estos precursores transitan hacia dicho compartimento las cuales están denominadas como “vía de paro y transferencia” e “importación conservativa” (Bohnert et al., 2010; Wasilewski et al., 2017). En la primera, aquellas proteínas que poseen segmentos transmembranales y secuencias de paro-transferencia son retenidas por el complejo TIM23 y luego son insertadas lateralmente a la MI por Mgr2, una subunidad periférica de TIM23 encargada de reconocer la fidelidad de las secuencias de paro-transferencia en los precursores mitocondriales (Ieva et al., 2014; Mirzalieva et al., 2019). Las proteínas insertadas de este modo pueden poseer un sitio de corte adicional el cual puede ser editado por proteasas residentes del EIM las cuales liberan los dominios solubles a este compartimento mitocondrial (Chacinska et al., 2009). La segunda vía es principalmente utilizada por proteínas de la MI con varios cruces transmembranales. En ésta, luego de la edición de la

presecuencia y de su transferencia a la matriz mitocondrial, las proteínas son conducidas hacia la insertasa Oxa1 la cual integra las diferentes regiones transmembranales de las proteínas cliente hasta que adoptan su conformación final (Bohnert et al., 2010; Meier, Neupert, & Herrmann, 2005; Pfanner et al., 2019).

Otra vía de importación mitocondrial es la dedicada a la importación de proteínas con varios cruces transmembranales de la MI tales como los transportadores de metabolitos (indicada como II en la Figura 3). Estas proteínas comienzan su viaje a la mitocondria desde el citosol, donde se asocian con chaperonas de las familias Hsp70 y 90 (Becker et al., 2019; Hansen & Herrmann, 2019). Debido a que estas proteínas poseen numerosos segmentos hidrofóbicos, la acción de estas chaperonas es crucial para evitar su agregación durante su tránsito del citosol a las translocasas mitocondriales. Una vez en el complejo TOM, el receptor Tom70 interactúa con las señales internas hidrofóbicas de los precursores mitocondriales, así como con las Hsp70 y 90 que las acompañan (Endo & Yamano, 2010; Young et al., 2003). Luego de esta interacción, dichas chaperonas son liberadas al citosol y los precursores mitocondriales son transferidos en conformación de asas hacia Tom40 para su translocación. Ya en el EIM, las proteínas Tim pequeñas se asocian a los precursores en tránsito para evitar la agregación de los dominios hidrofóbicos transmembranales nuevamente expuestos a un entorno acuoso. Estas mismas Tim pequeñas guían a los precursores al complejo translocasa TIM22, el cual inserta los diferentes segmentos transmembranales en la MI con una marcada dependencia del $\Delta\psi$ (Chacinska et al., 2009; Pfanner et al., 2019; Wasilewski et al., 2017).

La principal clase de proteínas del EIM está conformada por aquellas que poseen motivos de cisteínas oxidables (Chatzi et al., 2016; Habich et al., 2019). Estas proteínas llegan al complejo TOM (indicado como III en la Figura 3) y son transportadas a través de Tom40 hasta el EIM. Ahí, las proteínas interactúan con el sistema MIA (de las siglas en inglés del sistema de importación y Ensamblaje del espacio Intermembranal Mitocondrial) anclado en la MI el cual consta de la oxidorreductasa Mia40 y de la oxidasa de sulfhidrilos Erv1 (Stojanovski, Bragoszewski, & Chacinska, 2012). Al llegar al EIM, esta clase de precursores mitocondriales interactúan con MIA, la cual a través de oxidaciones y reducciones secuenciales en cisteínas internas de Mia40, oxida las cisteínas de los precursores para la formación de puentes disulfuro intramoleculares. Al establecimiento de estos puentes disulfuro necesarios para el

plegamiento correcto del precursor mitocondrial se le denomina “plegamiento oxidativo” (Chatzi et al., 2016). Las cisteínas reducidas de Mia40 a causa de la oxidación del precursor mitocondrial son nuevamente oxidadas por Erv1, lo que lleva a la regeneración de los puentes disulfuro originales. Posteriormente, Erv1 transfiere los electrones tomados de la oxidación de Mia40 hasta el citocromo *c*, lo que regenera sus puentes disulfuro originales. Este fenómeno da como resultado neto la transferencia de puentes disulfuro de Erv1 a Mia40 y de ahí a los precursores mitocondriales del EIM, proceso denominado como “relevo de disulfuros” (Fischer & Riemer, 2013).

La cuarta vía (IV en la Figura 3) es la dedicada a la inserción de proteínas con estructura de barril β a la ME (Höhr, Straub, Warscheid, Becker, & Wiedemann, 2015). De un modo semejante a como llegan las proteínas de la vía II al EIM, aunque con una interacción inicial con Tom20, estas proteínas se translocan a través de Tom40 hasta el EIM y se asocian por las proteínas Tim pequeñas para evitar su agregación en el entorno acuoso de este compartimento. Posteriormente, son conducidas hasta la Maquinaria de Distribución y Ensamblaje (SAM, por sus siglas en inglés) en donde son translocadas a través de Sam50, otra proteína formadora de poro con estructura de barril β , y liberadas lateralmente a la ME (Pfanner et al., 2019). Esta liberación a la ME depende de la presencia de un asa de láminas β denominada “señal β ” la cual es necesaria para el ensamblaje del barril β entrante y para la apertura de Sam50 hacia el plano de la membrana (Takeda et al., 2021).

La última vía (V en la Figura 3) está encargada de la inserción de proteínas con cruces transmembranales en la ME mitocondrial (Chacinska et al., 2009; Doan et al., 2020). De modo general, ninguna de estas proteínas hace uso del poro de translocación de Tom40. En cambio, en lo que respecta a las proteínas ancladas por la región N-terminal o con varios cruces transmembranales, su inserción a la membrana depende de su reconocimiento inicial por Tom70 y de su posterior liberación lateral a la ME por la Maquinaria de Importación Mitocondrial (MIM, por sus siglas en inglés). No obstante, existen casos en los que la dependencia de Tom70 para su inserción no es estrictamente necesaria (Doan et al., 2020; Wasilewski et al., 2017). En el caso de las proteínas con anclas hidrofóbicas en el extremo C-terminal, hasta la fecha no se ha identificado ninguna insertasa de cuya función dependa la inserción en la membrana. En contraste, la inserción membranar de estas proteínas parece más bien depender de la composición local de lípidos de la ME la cual resulta suficiente para

permitir la inserción de las anclas transmembranales al plano de la membrana (Kemper et al., 2008; Renthall, 2010; Wasilewski et al., 2017).

2.3 Modelos de importación mitocondrial

Otro rasgo esencial para el proceso de importación mitocondrial es el trayecto que toman las proteínas desde su sitio de síntesis hasta los complejos de translocación de la mitocondria. Este proceso, al igual que otros casos como los del retículo endoplásmico o el de importación de proteínas al núcleo celular, toma provecho de diferentes factores citosólicos y chaperonas para asegurar el arribo de las proteínas hasta los receptores del sitio de destino (Avendaño-Monsalve et al., 2020; Gemmer & Förster, 2020; Jiang, Cheng, Mandon, & Gilmore, 2008).

En general, existen dos modos en que las células eucariotas llevan a cabo la transferencia de proteínas hasta su sitio de inserción: la importación cotraduccional y la importación postraduccional (Hansen & Herrmann, 2019). A continuación, se discutirán ambos modelos de importación en el contexto de la mitocondria, así como un modelo reciente en el que la transferencia de proteínas por la superficie del retículo endoplásmico es necesaria para la localización de algunos precursores mitocondriales (Figura 4).

2.3.1 Modelo de importación postraduccional

Este modelo es el responsable de la importación de cerca de dos tercios del proteoma mitocondrial que culmina su síntesis en el citosol antes de llegar a su compartimento mitocondrial (Becker et al., 2019). Dicho modo de importación depende de la acción de chaperonas de la familia Hsp70 las cuales acompañan a los precursores mitocondriales desde su salida del túnel ribosomal hasta su deposición en la translocasa del complejo TOM (Hartl, Bracher, & Hayer-Hartl, 2011; Young et al., 2003). La participación de estas chaperonas es gracias a su capacidad de unir tramos de secuencias hidrofóbicas en las proteínas mitocondriales que, de modo dependiente de ATP, previenen su agregación al estar expuestas al entorno acuoso del citosol, hecho particularmente relevante para las proteínas transmembranales de la ME y de la MI (Becker et al., 2019; den Brave et al., 2021).

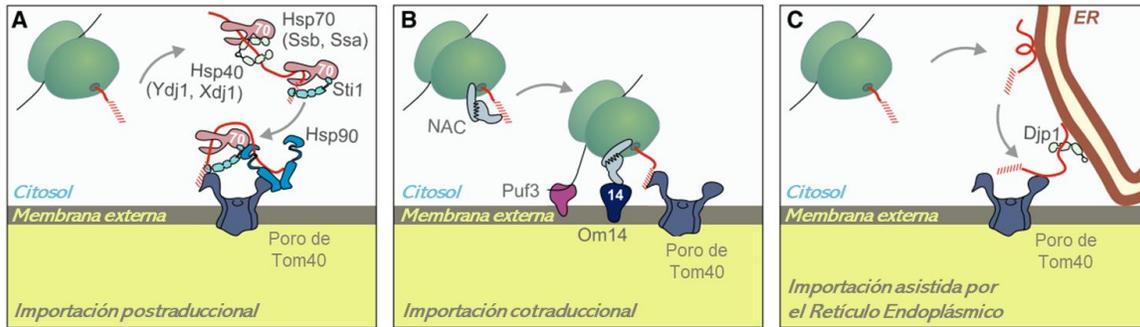


Figura 4. Modelos de las fases iniciales del proceso de importación mitocondrial. A) En el modelo de importación postraduccional, los precursores mitocondriales completamente sintetizados son unidos por chaperonas citosólicas de las familias Hsp40, 70 y 90, y son conducidos hasta el poro de translocación de Tom40 gracias a la asociación física entre dichas chaperonas y los receptores del complejo TOM. B) Modelo de importación cotraduccional en el que la translocación a través del poro de Tom40 ocurre simultáneamente a la traducción de los precursores mitocondriales. Se destaca la acción de los receptores del complejo TOM que unen las presecuencias mitocondriales, así como de la proteína de unión a RNA Puf3 y de la chaperona NAC anclada al túnel de salida del ribosoma. C) En este modelo, los precursores mitocondriales completamente sintetizados se unen a la superficie del retículo endoplásmico y son transferidos a TOM con la ayuda de la chaperona Hsp40 Djp1. Imagen adaptada de Hansen & Herrmann, 2019.

Ahora bien, el trayecto desde el ribosoma hasta la superficie mitocondrial de cualquier proteína importada de este modo comienza con su reconocimiento por el Complejo Asociado al Ribosoma o RAC, por sus siglas en inglés. Éste es un complejo proteico anclado al túnel de salida del ribosoma el cual está conformado por chaperonas de las familias Hsp70 y 40 el cual tiene la propiedad de asociarse a los péptidos nacientes conforme emergen del ribosoma, y el cual se ha determinado que es capaz de estimular la importación de algunos precursores mitocondriales *in vitro* (den Brave et al., 2021; Deuerling, Gamerdinger, & Kreft, 2019; Gribling-Burrer et al., 2019). Posterior a su reconocimiento por RAC, los precursores mitocondriales son transferidos a chaperonas Hsp70 o Hsp90 del citosol las cuales los mantienen en un estado conformacional permisivo para su translocación a través de Tom40. Dicha asociación de los precursores con este tipo de chaperonas es esencial para la direccionalidad del transporte hacia la mitocondria a causa de la capacidad de estas proteínas de reconocer e interactuar físicamente con el receptor Tom70 (Young et al., 2003). Tal interacción es posible gracias a un dominio de repeticiones de tetratricopéptidos presente en la región citosólica de Tom70 el cual es reconocido por la región C-terminal de las Hsp70 y Hsp90 (Becker et al., 2019). Una vez realizada la interacción chaperona-receptor, tanto Tom70 como Tom20 pueden detectar las señales de importación de las

proteínas enganchadas por las chaperonas y conducir las por su ruta de importación adecuada al tiempo que las chaperonas culminan su ciclo de hidrólisis de ATP y liberan los precursores para su translocación (Becker et al., 2019; Hansen & Herrmann, 2019; Hartl et al., 2011).

Un punto importante por recalcar es que las chaperonas involucradas en este tipo de transporte son factores generales celulares cuyo funcionamiento no solamente es aprovechado por la importación de proteínas a la mitocondria. Éstas participan también en el plegamiento general de proteínas, en el mantenimiento de la proteóstasis, en el ensamblaje de ribosomas y hasta en la extrusión de vesículas membranales, por lo que la especificidad necesaria para este tipo de importación debe recaer en algún otro elemento molecular (Becker et al., 2019; Hartl et al., 2011; Masser et al., 2019; Rosenzweig, Nillegoda, Mayer, & Bukau, 2019).

Recientemente, se ha considerado que la incorporación de cochaperonas de la familia Hsp40 al proceso de importación subsana la inespecificidad de las Hsp70 y 90 (Becker et al., 2019; Jores et al., 2018). Este tipo de proteínas, también llamadas proteínas J por su homología con la chaperona DnaJ, además de estimular la actividad de ATPasa de las Hsp70 al asociarse físicamente a ellas, se unen a distintos sustratos mitocondriales a través de un dominio de unión a sustratos (Jores et al., 2018). De esta clase de cochaperonas resaltan cuatro (Ydj1, Sis1, Djp1 y Xdj1) que en levadura son capaces de unir precursores mitocondriales y de facilitar su asociación a las chaperonas principales para su transporte a la mitocondria (Avendaño-Monsalve et al., 2020; Hansen & Herrmann, 2019). Así pues, se ha determinado que Ydj1 y Sis1 son capaces de interactuar con segmentos hidrofóbicos de los precursores de barriles β de la ME, así como algunas presecuencias. En lo que respecta a Djp1 y Xdj1, se ha determinado que ambas cochaperonas se unen preferencialmente a algunos precursores hidrofóbicos de las ME y MI, entre ellos elementos importantes de los complejos MIM y TOM tales como Mim1 y Tom22. Por lo tanto, la adición de estos elementos moleculares al sistema de transferencia basado en chaperonas Hsp70 y 90 que acompaña a los precursores mitocondriales desde el ribosoma hasta la superficie mitocondrial, le brinda la especificidad necesaria para identificar a los sustratos de importación (Becker et al., 2019). Si bien a la fecha todavía no se conoce con exactitud qué tipo de secuencias o motivos están involucrados en el reconocimiento de los sustratos por parte de las

cochaperonas, es claro que éstas últimas le brindan robustez y fidelidad al sistema de importación postraducciona mitocondria.

2.3.2 Modelo de importación cotraducciona

Este modelo parte de que la traducción de las proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo puede ocurrir concomitantemente a su inserción al organelo por parte de las translocasas mitocondriales. Dicho modelo toma como base estudios de microscopía y de fraccionamiento celular en los que se han encontrado tanto mRNAs de proteínas mitocondriales como ribosomas traduccionalmente activos en la vecindad de las mitocondrias, fenómeno que se especula como análogo a la inserción cotraducciona de proteínas de la vía de secreción en el retículo endoplásmico o al sistema de exportación de proteínas al periplasma bacteriano (Avendaño-Monsalve et al., 2020; Gadir, Haim-Vilmovsky, Kraut-Cohen, & Gerst, 2011; Hansen & Herrmann, 2019; Lesnik, Golani-Armon, & Arava, 2015; Williams, Jan, & Weissman, 2014).

El mecanismo que subyace a este modelo está basado en la interacción conocida de las presecuencias de la región N-terminal con el receptor Tom20 de la ME mitocondria (Yamamoto et al., 2011). Al ser éstas las primeras regiones que emergen del ribosoma, existe la posibilidad de que las presecuencias se asocien directamente con Tom20 y procedan a su translocación a través de Tom40, al mismo tiempo que continúa la traducción del mRNA que codifica la proteína mitocondria. La evidencia que apoya este supuesto está basada en la coprecipitación de mRNAs codificantes para proteínas de ancestría procariótica, en particular de precursores mitocondriales con presecuencias, así como subunidades de la cadena de transporte de electrones (Becker et al., 2019).

Además de la interacción de Tom20 con las presecuencias, dos fenómenos parecen también estar implicados de este tipo de importación: el anclaje de los mRNAs a la superficie mitocondria y la asociación de los ribosomas citosólicos a los complejos de importación a través del Complejo Asociado a Polipéptidos Nacientes (NAC, por sus siglas en inglés) (Avendaño-Monsalve et al., 2020; Gadir et al., 2011; Hansen & Herrmann, 2019). En el primero de ellos, se ha resaltado la participación de Puf3, una proteína con capacidad de unión a RNA. En este aspecto, algunos estudios han detallado que Puf3 tiene la capacidad de localizarse en la superficie de la ME y que aproximadamente el 50 % de los mRNAs mitocondriales poseen sitios de unión a esta

proteína en su región 3' no traducida (Becker et al., 2019). Asimismo, se ha encontrado en la levadura que la eliminación simultánea de Puf3 y Tom20, ambos implicados en este modo de importación, afecta severamente el crecimiento en condiciones respiratorias, situación en que la biogénesis y el funcionamiento mitocondrial son de sustancial importancia. No obstante, la eliminación simple de Puf3 no afecta de manera significativa el crecimiento ni la importación de precursores mitocondriales como cabría esperar de un elemento esencial de este tipo de proceso (Avendaño-Monsalve et al., 2020; Becker et al., 2019). El anclaje de los ribosomas a los complejos de translocación a través de NAC podría explicar por qué la ausencia exclusiva de Puf3 no tiene mayores repercusiones en el proceso de importación cotraduccional, por lo que su estructura, funcionamiento y participación en este modo de importación se discutirán con detalle en próximos apartados.

2.3.3 Importación asistida por el Retículo Endoplásmico

Las mitocondrias son organelos altamente dinámicos los cuales forman contactos físicos con otras estructuras membranosas tales como el retículo endoplásmico, los peroxisomas, los lisosomas/vacuola y la membrana plasmática (Murley & Nunnari, 2016). El caso de las interacciones con el retículo endoplásmico salta a la vista puesto que este organelo forma parte de una vía de importación de algunas proteínas mitocondriales. En estudios recientes, se determinó que la superficie del retículo endoplásmico desempeña un papel importante para la importación de Oxa1, una translocasa de la MI mitocondrial codificada en el núcleo celular (Hansen et al., 2018). En esta vía, éste y otros precursores hidrofóbicos culminan su traducción y se asocian físicamente con la superficie del retículo. Ahí, la cochaperona Djp1 (implicada también en el modelo de importación postraduccional) los conduce hasta los sitios de contacto entre el retículo y la mitocondria hasta arribar al receptor Tom70 del complejo TOM, el cual comienza su translocación hacia el interior del organelo (Hansen et al., 2018; Hansen & Herrmann, 2019). Si bien esta vía no es estrictamente esencial para la importación de las proteínas mencionadas, se especula que la asociación con la membrana reticular brinda un área superficial amplia la cual sirve para estabilizar los segmentos hidrofóbicos de los precursores mitocondriales y de ese modo se previene su agregación o un plegamiento aberrante que comprometería la proteóstasis celular (Becker et al., 2019).

Sin embargo, los detalles moleculares y los elementos que participan en esta vía siguen bajo estudio.

2.4 El Complejo Asociado a Polipéptidos Nacientes

El Complejo Asociado a polipéptidos Nacientes o NAC, por sus siglas en inglés, forma parte de un grupo particular de chaperonas las cuales se asocian física- y transitoriamente al túnel de salida ribosomal (Deuerling et al., 2019). Dichas chaperonas se unen a las regiones nacientes de las proteínas en traducción y previenen su plegamiento aberrante al conducir a las proteínas nacientes hacia las chaperonas Hsp60, 70 y 90 del citosol (Hartl et al., 2011; Koplin et al., 2010). Estas últimas guiarán el proceso de plegamiento de las proteínas en traducción hasta su conformación nativa.

Ahora bien, NAC es una chaperona que en eucariontes está conformada por un heterodímero en el que se asocian físicamente una subunidad α y una subunidad β (ambas denominadas como α - y β -NAC a partir de aquí). Dicha asociación es llevada a cabo a través de un dominio de dimerización homólogo presente en ambas subunidades el cual adopta una estructura de barril β aplanado y el cual es rico en aminoácidos hidrofóbicos en su interior (Liu, Hu, Li, Niu, & Teng, 2010; Spreter, Pech, & Beatrix, 2005; Wang et al., 2010) (Figura 5). Además del dominio de dimerización, tanto α - como β -NAC poseen elementos estructurales únicos que las diferencian entre sí y que están involucradas en su función. Así, mientras que α -NAC posee en su región C-terminal un dominio similar a ubiquitina (UBA, por sus siglas en inglés) formado por un haz compacto de tres hélices, β -NAC está caracterizada por poseer un dominio de unión a ribosomas en su extremo N-terminal en el cual un motivo de lisinas y argininas es esencial para su funcionamiento (Möller et al., 1998; Spreter et al., 2005; Wegrzyn et al., 2006). No obstante, recientemente se ha determinado que algunas secciones de α - y de β -NAC, distintas de las antes mencionadas, también interactúan físicamente con el ribosoma y son relevantes para unirse a los péptidos nacientes (Gamerding et al., 2019; Shen et al., 2019).

NAC se asocia a los ribosomas físicamente a través de la interacción de β -NAC con las proteínas ribosomales uL23 y eL31 ubicadas en las inmediaciones del túnel de salida ribosomal. Del mismo modo, α -NAC participa en la asociación física con el ribosoma mediante la formación de contactos físicos transitorios con la proteína uL29

la cual se encuentra en la cercanía del túnel de salida del ribosoma, hecho reforzado por la presencia de un tracto de aminoácidos alcalinos recientemente encontrados en esta proteína (Deuerling et al., 2019; Gamerding et al., 2019).

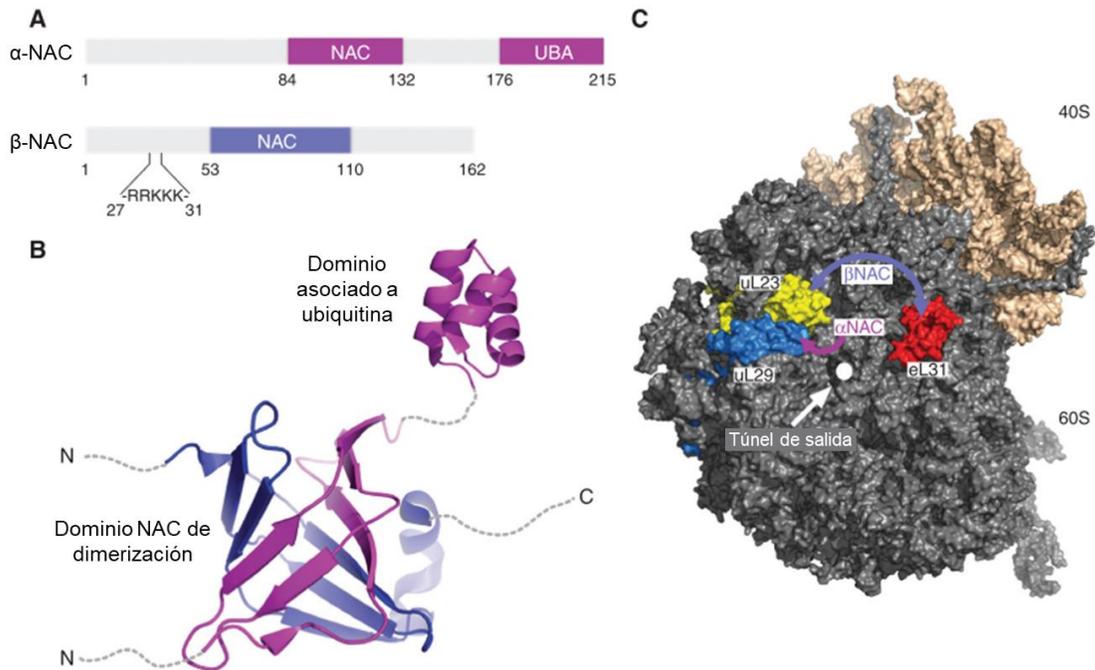


Figura 5. Elementos estructurales del Complejo Asociado a polipéptidos Nacientes. A) Representación esquemática de los elementos estructurales de las subunidades α - y de β -NAC humanos. En ambas subunidades se destaca la presencia del dominio NAC de dimerización, así como el dominio asociado a ubiquitina (UBA, por sus siglas en inglés) de α -NAC y el motivo alcalino de unión a ribosomas de β -NAC. B) Compilado de los elementos estructurales de NAC (morado: α -NAC, azul: β -NAC) de los cuales se han obtenido estructuras tridimensionales. Se destacan el dominio NAC de dimerización tomado del NAC humano (PDB: 3MCB) y el dominio UBA (PDB: 1TR8), tomado del NAC arqueano. Las regiones punteadas en cada caso representan regiones flexibles de las cuales no se ha podido determinar su estructura. C) Representación de superficie electrónica del ribosoma 80S de levadura indicado en colores gris y trigo. Se indican en rojo, amarillo y azul las proteínas con las que interactúan las dos subunidades de NAC (referidas con flechas morada y azul). Se indica como perspectiva el túnel de salida del ribosoma. Imagen adaptada de: Deuerling et al., 2019.

Una de las características más notables de NAC es que se expresa equimolarmente a los ribosomas citosólicos y se une a éstos en una estequiometría de 1:1, lo cual resalta su participación como una chaperona importante para la proteóstasis celular (del Alamo et al., 2011; Deuerling et al., 2019; Kramer, Boehringer, Ban, & Bukau, 2009). Dicha afirmación es apoyada por la evidencia encontrada en *Caenorhabditis elegans*, *Drosophilla melanogaster* y *Mus musculus* en donde la eliminación de los genes

codificantes de NAC deriva en un fenotipo de letalidad embrionaria en estos tres organismos modelo (Bloss, Witze, & Rothman, 2003; Bull, 1966; Deng & Behringer, 1995).

Ahora bien, la función clásica atribuida a NAC es la de la regulación de la importación cotraduccional de proteínas al retículo endoplásmico (del Alamo et al., 2011; Wiedmann, Sakai, Davis, & Wiedmann, 1994). Dicha función se especuló en estudios sobre NAC en los que la eliminación de este complejo proteico llevaba a la inducción de la respuesta a proteínas mal plegadas del retículo y al reconocimiento inespecífico de algunas proteínas por parte de la Partícula de Reconocimiento de Señal (SRP, por sus siglas en inglés), una ribonucleoproteína que tiene por función el reconocimiento de las secuencias de importación en las proteínas del retículo endoplásmico (del Alamo et al., 2011; Gamerdinger et al., 2019; Möller et al., 1998; Wiedmann et al., 1994). Recientemente, se determinó que NAC impide la unión inespecífica de los ribosomas a Sec61, el translocón presente en la membrana del retículo endoplásmico. Al bloquear dicha interacción, NAC previene la importación errónea de proteínas nacientes a este organelo y le brinda especificidad al transporte de proteínas al permitir que sólo aquellas proteínas con las secuencias de localización del retículo endoplásmico pueden ser reconocidas por SRP e importadas hacia este organelo a través de la interacción de esta ribonucleoproteína con su receptor adyacente a Sec61 (Gamerdinger, Hanebuth, Frickey, & Deuerling, 2015).

Otras funciones atribuidas a NAC son la protección de las cadenas nacientes de la degradación citosólica y la asistencia al plegamiento temprano de proteínas. En el primer caso, dicha acción la realiza al unirse físicamente a los péptidos nacientes y al prevenir su ubiquitinación temprana, lo cual evita su degradación por el sistema ubiquitina-proteosoma. El segundo caso se ve apoyado por estudios en levadura en que la eliminación de NAC favorece la agregación proteica y por estudios donde se determinó que este complejo es necesario para el crecimiento cuando se suministran análogos de prolina conocidos por favorecer el plegamiento aberrante de las proteínas en los que se incorporan (Deuerling et al., 2019; Koplin et al., 2010).

2.4.1 NAC de *S. cerevisiae* y su participación en la importación cotraduccional de proteínas a la mitocondria

La participación de NAC en el proceso de la importación mitocondrial se puede trazar hasta algunos estudios realizados en *C. elegans* y *S. cerevisiae* en los que se encontraron precursores mitocondriales glicosilados cuando se suprimía a β -NAC en el nemátodo, así como una reducción de proteínas mitocondriales en mutantes nulas de NAC en la levadura. Además, la ausencia de NAC desencadena en células humanas un fenotipo de disfunción mitocondrial. Asimismo, en ensayos *in vitro* de importación de proteínas mitocondriales se encontró una translocación menos eficiente ante la ausencia de NAC (Avendaño-Monsalve et al., 2020; Gamerdinger et al., 2015; George, Walsh, Beddoe, & Lithgow, 2002). No obstante, la letalidad que supone la eliminación o las mutaciones de los componentes de NAC en algunos organismos modelo ha complicado el estudio de la participación de este complejo proteico en el proceso de importación mitocondrial y solamente ciertas evidencias indirectas, como las antes mencionadas, han dado información sobre ello. De modo contrastante con lo que ocurre en otros eucariontes, en la levadura *S. cerevisiae* no se presenta el fenotipo de letalidad en la ausencia de NAC y, en este organismo, solamente se han reportado algunas repercusiones celulares como lo es la acumulación menor de proteínas agregadas o mal plegadas (Deuerling et al., 2019; Franke, Reimann, Hartmann, Köhlerl, & Wiedmann, 2001; Ponce-Rojas et al., 2017). Gracias a esto, la mayor parte de los estudios sobre la participación de NAC en la importación de mitocondrial se han llevado a cabo en esta levadura.

Ahora bien, *S. cerevisiae* es una levadura cuyo origen se remonta a un evento de aloploidización ancestral en el que levaduras de dos clados evolutivamente distanciados se fusionaron genética y estructuralmente (Marcet-Houben & Gabaldón, 2015). Dicha fusión derivó en un linaje híbrido del que desciende una gran parte de la familia *Saccharomycetaceae* de levaduras cuyo rasgo principal es la presencia de secciones del genoma completamente duplicadas (Dujon & Louis, 2017). En consecuencia, *S. cerevisiae*, al ser parte de la mencionada familia de levaduras, posee genes parálogos que codifican para proteínas involucradas en la mayoría de sus procesos celulares (Escalera-Fanjul, Quezada, Riego-Ruiz, & González, 2019). NAC es un ejemplo de ello. Debido a la aloploidización referida, en *S. cerevisiae* se encuentran dos genes que codifican para dos subunidades β -NAC parálogos: los genes *EGDI*

y *BTT1*, que codifican respectivamente a las subunidades β_1 - y β_2 -NAC. De modo semejante a otros eucariontes, la subunidad α -NAC se encuentra codificada por un solo gen el cual es nombrado como *EGD2* (del Alamo et al., 2011; Hu & Ronne, 1994; A. K. Ott, Locher, Koch, & Deuerling, 2015). En consecuencia, debido a que los tres genes de NAC de *S. cerevisiae* poseen el mismo dominio de dimerización homólogo antes mencionado, es posible la formación de dos poblaciones de heterodímeros, $\alpha\beta_1$ -NAC y $\alpha\beta_2$ -NAC, así como de poblaciones de homodímeros de cada una de las subunidades.

En los estudios sobre NAC realizados en *S. cerevisiae* se han encontrado diferencias tanto estructurales como funcionales entre ambas subunidades β -NAC, y por extensión, entre los dos tipos de heterodímeros que se pueden formar con la subunidad α -NAC (del Alamo et al., 2011; George et al., 2002; Hu & Ronne, 1994; Lesnik, Cohen, Atir-Lande, Schuldiner, & Arava, 2014; A. K. Ott et al., 2015; Ponce-Rojas et al., 2017). Un rasgo que destacar es que las subunidades β_1 - y β_2 -NAC poseen los mismos elementos estructurales (esto es, un dominio conservado de unión a ribosomas basado en un motivo de lisinas y argininas en el extremo N-terminal y el dominio de dimerización de láminas β) pese a tener una similitud e identidad de secuencia del 64.3 % y 46.5 %, respectivamente. Igualmente destacable es que ambas proteínas poseen una marcada diferencia de expresión en la que, tanto a nivel de mRNA como de abundancia proteica, existe una relación aproximada de 100:1 entre β_1 - y β_2 -NAC. De esta diferencia tácita de expresión y abundancia se asume que la población predominante de heterodímeros que lleva a cabo las funciones clásicas de NAC es la conformada por $\alpha\beta_1$ -NAC.

En estudios realizados al precipitar los ribosomas a los que se encontraban unidos los heterodímeros de NAC, se encontró que hay una asociación diferencial de los heterodímeros con subpoblaciones de ribosomas traducionalmente activos (del Alamo et al., 2011). En este aspecto, se encontró la asociación de $\alpha\beta_1$ -NAC con ribosomas encargados de la traducción de proteínas citosólicas y de la vía de secreción mientras que a $\alpha\beta_2$ -NAC se lo encontró asociado con poblaciones de ribosomas en la traducción de proteínas de los diferentes compartimentos mitocondriales. Esto mismo se corroboró en estudios realizados por escrutinio genético en los que se encontraron interacciones sintéticas negativas entre el gen *BTT1* y algunos genes codificantes de proteínas mitocondriales (Ponce-Rojas et al., 2017).

Existen reportes en los que ambos heterodímeros de NAC participan en el proceso de importación cotraduccional mitocondrial a modo de nexo entre la ME mitocondrial y los ribosomas en traducción (Lesnik et al., 2014; Ponce-Rojas et al., 2017). En el primero de ellos se destaca la participación de la abundante proteína de ME mitocondrial OM14 la cual funge como un receptor de $\alpha\beta_1$ -NAC y posee interacciones físicas con proteínas ribosomales expuestas al citosol.

El segundo de los estudios destaca las interacciones física y genética de $\alpha\beta_2$ -NAC con Sam37, una proteína periférica de la cara citosólica del complejo SAM la cual está involucrada en la asociación de este complejo con la translocasa TOM. La relevancia de las interacciones entre $\alpha\beta_2$ -NAC y Sam37 se ve reflejada en que la ausencia simultánea de los genes que codifican a cada uno de estos elementos disminuye la eficiencia de importación de algunos precursores mitocondriales tales como Oxa1 o Sod2. No obstante, los detalles sobre el modo en que NAC puede reconocer los sustratos de importación y el modo en que se llevan a cabo las interacciones con las proteínas de la ME mitocondrial se desconocen y continúan en estudio.

Se ha determinado que los componentes de $\alpha\beta_1$ -NAC son sujetos de ubiquitinación y que dicha modificación postraduccional es necesaria para su funcionamiento normal y estabilidad (Panassenko, David, & Collart, 2009). Asimismo, se han reportado ubiquitinaciones en β_2 -NAC (Swaney et al., 2013). Si este tipo de modificación postraduccional es relevante para el funcionamiento de β_2 -NAC en la importación cotraduccional de proteínas a la mitocondria es campo abierto de estudio.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROYECTO

NAC es una chaperona cuya función se ha asociado con la asistencia del plegamiento temprano de proteínas y más recientemente con la importación cotraduccional de proteínas a la mitocondria. En *S. cerevisiae*, levadura descendiente de un evento de duplicación genética ancestral (Marcet-Houben & Gabaldón, 2015), NAC posee genes parálogos que codifican para dos subunidades β -NAC, lo cual contrasta con lo que ocurre en otros eucariontes donde solamente existe una de estas subunidades (Hu & Ronne, 1994). Un fenómeno común en las duplicaciones génicas es la divergencia de la función y de la regulación génica, fenómeno usualmente nombrado como neofuncionalización (Conant & Wolfe, 2008). A la fecha, existen reportes de que las subunidades parálogas β_1 - y β_2 -NAC de *S. cerevisiae* muestran funciones diferenciadas tanto por su asociación con distintos subgrupos de ribosomas, como por sus diferencias de expresión y de interacción con proteínas de la membrana externa mitocondrial (del Alamo et al., 2011; Lesnik et al., 2014; Ponce-Rojas et al., 2017; Wiedmann & Prehn, 1999).

En trabajos previos se determinó que β_2 -NAC posee un perfil de regulación dependiente de la fuente de carbono que contrasta con el perfil de expresión constitutivo que muestra β_1 -NAC. En este aspecto, β_2 -NAC ve aumentados sus niveles proteicos en presencia de fuentes de carbono fermentables como la glucosa, mientras que en fuentes de carbono no fermentables como el glicerol o el lactato sus niveles proteicos disminuyen. Por esta razón es posible suponer que las interacciones de β_2 -NAC puedan ser moduladas en función de las condiciones fisiológicas de la célula y la subsecuente adaptación de su proteoma ante las variaciones del entorno. En línea con esto, se ha demostrado la existencia de una interacción genética y física entre *SAM37* y *BTT1* y sus productos codificados (*Sam37* y β_2 -NAC respectivamente), la cual repercute negativamente en la importación de algunas proteínas mitocondriales (Ponce-Rojas et al., 2017). No obstante, poco se conoce sobre la naturaleza funcional de esta interacción.

Se ha determinado que los genes que presentan una interacción genética y cuyos productos codificados forman parte de complejos proteicos pueden ver alterados sus niveles de expresión ante la eliminación de uno de sus miembros (Braberg et al., 2020). Hasta la fecha no se ha determinado si la ausencia *Sam37* tiene algún efecto

sobre el heterodímero $\alpha\beta_2$ -NAC. Por lo tanto, estudiar la interacción de las proteínas β_2 -NAC y Sam37 resulta importante para entender la divergencia funcional entre los parálogos β -NAC de *S. cerevisiae* y para entender de mejor manera la interacción de NAC con las proteínas de la membrana externa mitocondrial.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué impacto tiene la ausencia de Sam37 sobre β_2 -NAC?

5. HIPÓTESIS

La ausencia de Sam37, en una cepa nula *sam37 Δ* , puede afectar los niveles proteicos de β_2 -NAC, así como su participación en la importación de precursores mitocondriales.

6. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la ausencia de Sam37 (*sam37 Δ*) sobre los niveles proteicos de β_2 -NAC.

7. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Etiquetar a los genes *EGDI* y *BTTI* con regiones codificantes de epítomos de hemaglutinina en el contexto genético de la mutante *sam37 Δ* .
2. Evaluar los niveles proteicos de β_1 -NAC-HA y β_2 -NAC-HA en el contexto genético silvestre y el de la mutante *sam37 Δ* .
3. Determinar si existen modificaciones postraduccionales en β_2 -NAC-HA y si las hubiere, cuál es su efecto sobre sus niveles proteicos.
4. Analizar por inmunoprecipitación de HA el impacto de la ausencia de Sam37 sobre los niveles proteicos de β_2 -NAC y sus modificaciones postraduccionales.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Construcción de cepas mutantes de *S. cerevisiae*

En este estudio se utilizaron dos cepas silvestres de *S. cerevisiae*, esto con el objetivo de corroborar que las observaciones obtenidas en la cepa estándar de laboratorio BY4741 no sean atribuibles a artificios experimentales. Asimismo, se utilizó a una cepa nula *sam37* Δ para estudiar el efecto que tiene la ausencia de este gen sobre las subunidades β_1 y β_2 de NAC. En la Tabla 4 se indican los genotipos de las cepas antes referidas.

Tabla 4. Cepas parentales de *S. cerevisiae*

Cepa	Genotipo	Referencia
BY4741	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Brachmann et al, 1998
YPS128	MATa <i>ho::HphMX ura3::KanMX</i>	Cubillos F.A. et al, 2009
Δ <i>sam37</i>	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 sam37Δ0::KanMX4</i>	Construida en el laboratorio

Para la construcción de las mutantes con los genes *EGD1* y *BTT1* fusionados a secuencias que codifican etiquetas con epítomos de hemaglutinina (HA), se amplificaron por PCR las regiones codificantes para tres y seis epítomos de hemaglutinina, y para los módulos de resistencia a higromicina (*3HA::hphNT1*) y a cloNAT (*6HA::natNT2*) contenidas respectivamente en los plásmidos pYM24 y pYM17 (Janke et al., 2004).

La amplificación se llevó a cabo con el kit *Phusion High-Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer*; se ajustaron las condiciones de reacción siguiendo las instrucciones del proveedor y los amplicones se verificaron por electroforesis en gel de agarosa. Se utilizaron los siguientes desoxioligonucleótidos para obtener los amplicones para etiquetar, por separado, a *EGD1* y a *BTT1*.

Tabla 5. Desoxioligonucleótidos para etiquetar a *EGD1* y *BTT1*

Nombre	Gen objetivo	Cepa objetivo	Secuencia
Jab01 (F)	<i>EGD1</i>	YPS128, <i>Asam37</i>	5'-AGA-GTT-AGT-TGA-AGG-TCA-AAC-TTT-TGA-TGC-TGA-CGT-CGA-ATA-CCC-ATA-CGA-TGT-TCC-TGA-CTA-TG-3'

Jab02hph (R)	<i>EGDI</i>	<i>Δsam37</i>	5'-GTG-TTT-TTT-TAT-TTA-ACG-TTA-AAA-TTA-AAG-ATT-AAG-TTA-TTA-AAG-CCT-TCG-AGC-GTC-CCA-AAA-CC-3'
Jab02nat (R)	<i>EGDI</i>	YPS128	5'-GTG-TTT-TTT-TAT-TTA-ACG-TTA-AAA-TTA-AAG-ATT-AAG-TTA-TAC-AAC-AGG-TGT-TGT-CCT-CTG-3'
Jab05 (F)	<i>BTT1</i>	YPS128 <i>Δsam37</i>	5'-CGA-CAG-ATG-CAG-CGA-GAC-AAA-ACA-ACA-AGT-GAT-GAA-TAG-CTA-CCC-ATA-CGA-TGT-TCC-TGA-CTA-TG-3'
Jab06hph (R)	<i>BTT1</i>	<i>Δsam37</i>	5'-CAC-TAG-CTA-TAA-CGT-TTA-CTG-GCA-ATT-ATT-ATG-AAC-TAT-GTT-AAA-GCC-TTC-GAG-CGT-CCC-AAA-AC-3'
Jab06nat (R)	<i>BTT1</i>	YPS128	5'-CAC-TAG-CTA-TAA-CGT-TTA-CTG-GCA-ATT-ATT-ATG-AAC-TAT-GAC-AAC-AGG-TGT-TGT-CCT-CTG-3'

Una vez obtenidos los amplicones, éstos se utilizaron para transformar a las cepas YPS128 y *Δsam37*. De este protocolo de transformación se excluyó a la cepa parental BY4741 debido a que, en trabajos previos del laboratorio, se construyeron las cepas etiquetadas con el módulo *3HA::hphNT1* en los genes *EGDI* y *BTT1*. Brevemente, se tomó 1.5 mL de cultivo celular con una DO₆₀₀ entre 0.7 y 1.0 unidades. Este volumen se centrifugó a 8 600 g por dos minutos. El sobrenadante se retiró, se lavó el botón celular con 1 mL de H₂O estéril y las células se recuperaron por centrifugación con los mismos parámetros. Después, el botón celular se resuspendió e incubó con LiAc 0.1 M durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se recolectaron las células y se trataron secuencialmente con las siguientes soluciones: 240 μL de PEG 3 500 al 50 % (p/v), 36 μL de LiAc 1.0 M, 10 μL de ADN de esperma de salmón 10 mg/mL, 45 μL de reacción de PCR y 29 μL de agua estéril grado Biología Molecular. Se resuspendió el botón celular y durante 45 minutos se sometió a choque térmico a 42 °C. Las células se recuperaron por centrifugación y se sembraron en medio YPD no selectivo. 48 horas de crecimiento a 30 °C más tarde, los céspedes celulares se replicaron al medio de selección YPD + Higromicina o YPD + cloNAT, según fuera el caso, y se dejaron crecer por 48 horas más a 30 °C. Una vez que se obtuvieron colonias resistentes al medio de selección, éstas se propagaron de nueva cuenta en medio selectivo para su evaluación por PCR y electroforesis en gel de agarosa.

Para validar si las colonias obtenidas presentaban las fusiones *EGDI-3HA::hphNT1*, *BTT1-3HA::hphNT1*, *EGDI-6HA::natNT2* o *BTT1-6HA::natNT2*, se extrajo ADN genómico total siguiendo el protocolo reportado en Johnson, Smith, & Schneider, 2014. Con el ADN obtenido, se realizaron reacciones de PCR con el kit *NZYTaq II 2x Green Master Mix* y se ajustaron condiciones de amplificación de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. Los desoxioligonucleótidos Butb1 y

Flyb2, dirigidos a la región 5' no traducida de los genes en cuestión, fueron utilizados para validar las fusiones en el gen *EGD1* (*EGD1-3HA::hphNT1*, *EGD1-6HA::natNT2*) y en el gen *BTT1* (*BTT1-3HA::hphNT1*, *BTT1-6HA::natNT2*), respectivamente. Para completar el par necesario para la amplificación se utilizaron los desoxioligonucleótidos hphRev y natRev dirigidos a los módulos de resistencia *hphNT1* y *natNT2* respectivamente. En la tabla siguiente se indica su direccionalidad, la región a la que van dirigidos, así como su secuencia de nucleótidos.

Tabla 6. Desoxioligonucleótidos para validar las fusiones en los genes *EGD1* y *BTT1*

Nombre	Región objetivo	Secuencia 5' – 3'
Butb1 (F)	5' no traducida de <i>EGD1</i>	5'-GGG-GCG-GCC-GCC-GGT-TAT-GAA-TTA-ATC-TCT-TGG-3'
Flyb2 (F)	5' no traducida de <i>BTT1</i>	5'-GCG-GCG-GCC-GCC-TTT-CCA-ATC-CAA-ATA-ATC-CG-3'
hphRev (R)	Módulo de resistencia <i>hphNT1</i>	5'-GCA-ATC-GCG-CAT-ATG-AAA-TC-3'
natRev (R)	Módulo de resistencia <i>natNT2</i>	5'-GTT-GTT-TAT-GTT-CGG-ATG-TG-3'

Las cepas mutantes etiquetadas obtenidas por la metodología descrita anteriormente se resumen a continuación:

Tabla 7. Cepas de *S. cerevisiae* con los genes *EGD1* y *BTT1* etiquetados

Nombre	Fondo silvestre	Genotipo
BY ^{β1}	BY4741	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 EGD1-3HA::hphNT1</i>
BY ^{β2}	BY4741	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 BTT1-3HA::hphNT1</i>
NtAm ^{β1}	YPS128	MATa <i>ho::hphMX ura3::KanMX EGD1-6HA::natNT2</i>
NtAm ^{β2}	YPS128	MATa <i>ho::hphMX ura3::KanMX BTT1-6HA::natNT2</i>
Δ <i>sam37</i> ^{β1}	BY4741	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 sam37Δ0::KanMX4 EGD1-3HA::hphNT1</i>
Δ <i>sam37</i> ^{β2}	BY4741	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 sam37Δ0::KanMX4 BTT1-3HA::hphNT1</i>

8.2 *Crecimiento de las cepas mutantes para validación de las etiquetas de hemaglutinina*

Las cepas mutantes se crecieron inicialmente en 5 mL de medio YPD durante 16 horas a 30 °C con agitación. Posteriormente, se midió la DO₆₀₀ de cada cultivo y se realizaron las siguientes diluciones a 0.3 unidades de DO₆₀₀ final en 5 mL de medio YPD. Al llegar los cultivos a una DO₆₀₀ entre 0.7 y 1.0 unidades se recolectaron 2 unidades de DO₆₀₀ y se procesaron para la obtención de extractos proteicos totales los cuales fueron analizados por inmunodetección con anticuerpos contra HA.

8.3 *Obtención de extractos proteicos totales y electroforesis desnaturizante de proteínas*

Para la extracción de proteínas totales se tomaron 2 unidades de DO₆₀₀ de células provenientes de cultivos crecidos en las diferentes condiciones evaluadas. Esta cantidad de células se recuperó por centrifugación a 8 609 g por 2 minutos, se lavó con 1 mL de H₂O desionizada estéril y se volvió a centrifugar con los parámetros mencionados. Los botones celulares se resuspendieron en 250 µL de Tris-HCl 50 mM pH 8.0, se les agregó 50 µL de solución de extracción (NaOH 0.3 N, β-mercaptoetanol 176 mM y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, por sus siglas en inglés) 3.5 mM) y se incubaron durante 10 minutos en hielo. Posteriormente, se adicionó ácido tricloroacético hasta una concentración final de 12 % v/v y se incubó por 30 minutos a -20 °C. Luego, se centrifugó por 30 minutos a 18 000 g y 4 °C, y se descartó el sobrenadante. Los botones celulares se resuspendieron en 1 mL de acetona a -20 °C y se volvió a centrifugar con los mismos parámetros. Se desecharon los sobrenadantes y los botones celulares se resuspendieron en 50 µL y de amortiguador Laemmli (Tris-HCl 60 mM pH: 6.8, glicerol 10 %, SDS 2 %, β-mercaptoetanol 5 % y azul de bromofenol 0.02 % p/v) para obtener una concentración final de 4 unidades de DO₆₀₀/mL.

Una vez terminada la extracción de proteínas totales, se cargaron 10 µL de los extractos totales en geles desnaturizantes de poliacrilamida (16 % de acrilamida y 0.2 % de bis-acrilamida) y se realizó la electroforesis durante dos horas a 120 V y 35 mA por gel en amortiguador de corrida (glicina 385 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8.0 y SDS 0.1% p/v).

Luego, se realizó una electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa (*Amershan Protran 0.2 μm NC, GE Healthcare Life Sciences*) en cámara semiseca con amortiguador de transferencia (glicina 191.8 mM, Tris-HCl 24.7 mM, SDS 0.1% p/v y metanol 20 % v/v). Se validó la transferencia de las proteínas a las membranas de nitrocelulosa por medio de una tinción con rojo de Ponceau (ácido acético glacial 1 % v/v y pigmento rojo de Ponceau 1 % p/v).

8.3 Ensayo de inducción en presencia o ausencia de MG-132 para la determinación de modificaciones postraduccionales en β_2 -NAC

Las cepas en las que fue etiquetado el gen *BTT1* con epítomos de HA se crecieron en 30 mL de medio YPD o YPGli por 16 horas a partir de colonias individuales tomadas de medio YPD sólido. Pasado el tiempo indicado, se realizaron diluciones con medio YPD fresco a 0.3 de DO_{600} final para las cepas $BY^{\beta 2}$ y $NtAm^{\beta 2}$ y a 0.4 de DO_{600} final para la cepa $\Delta sam37^{\beta 2}$. Para realizar estas diluciones se midió la DO_{600} de los cultivos crecidos en YPGli luego de las 16 horas de crecimiento, se calculó el volumen necesario de cultivo para obtener una cantidad de células que, resuspendidas en 30 mL de medio fresco, tuvieran una DO_{600} final de 0.3 o 0.4 según fuera el caso. Una vez calculado dicho volumen, se transfirió a tubos graduados de 50 mL y se centrifugó a 3 900 g por 5 minutos para quitar el medio YPGli. Descartado el sobrenadante, cada botón celular se resuspendió en 30 mL de medio YPD fresco y se transfirió a matraces de 250 mL, que se incubaron durante tres horas a 30 °C con agitación. Finalmente, para determinar si la inhibición del sistema ubiquitina-proteosoma tenía algún efecto sobre las supuestas modificaciones postraduccionales de β_2 -NAC, se agregó MG-132 (52.56 mM en DMSO) hasta una concentración final de 50 μ M a un grupo de matraces; como control se incluyó un grupo idéntico de cultivos al que se le agregó DMSO en el mismo volumen que el agregado de MG-132 al grupo anterior.

Para recolectar las muestras correspondientes al $t = 0$ h de cultivo, se tomaron 2 unidades de DO_{600} de los cultivos en medio YPD fresco de las cepas $BY^{\beta 2}$ y $\Delta sam37^{\beta 2}$. De modo semejante, en los $t = 1, 2$ y 3 h se recolectaron 2 DO_{600} de células luego de medir la densidad óptica de los cultivos en incubación. Cada muestra de células se procesó para la elaboración de extractos proteicos totales como se detalla en la sección previa.

8.4 Inmunoprecipitación de proteínas etiquetadas con HA

Partiendo de cultivos en fase exponencial con o sin la adición de MG-132, se recolectaron equivalentes a 2, 4 o 6 unidades de DO_{600} de células en tubos graduados de 50 mL por centrifugación a 3 900 g durante 5 minutos. Luego, se lavaron los botones celulares obtenidos con 1 mL de agua desionizada y se transfirieron a tubos de 1.5 mL, se centrifugaron a 10 000 g por dos minutos y se descartaron los sobrenadantes. Posteriormente, se resuspendieron los botones en 250 μ L de AL+, se agregó el equivalente a 250 μ L de volumen de perlas de vidrio y se rompieron las células en vórtex a máxima potencia con 8 pulsos de 20 segundos. Se recuperaron los lisados celulares en tubos de 1.5 mL por centrifugación a 10 000 g por 10 segundos a 4 °C y se añadieron cuatro volúmenes de AL- para reducir la concentración de SDS de la suspensión del 0.5 % al 0.1 %. Luego, se agregaron 30 μ L de resina α -HA (previamente lavada con 1 mL de AL- durante 20 minutos a 4 °C y rotación; la resina se recuperó por centrifugación a 600 g por 2 minutos y 4 °C) y se incubó durante dos horas a 4 °C en rotación.

Posteriormente, se centrifugaron los tubos 600 g durante dos minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se lavó la resina en 800 μ L de AL-. Este paso se repitió dos veces más. Finalmente, se añadieron 20 μ L de amortiguador Laemmli y se calentó cada muestra a 60 °C por 10 minutos con agitación vigorosa.

8.5 Inmunodetección

Primeramente, las membranas de nitrocelulosa salidas de la electrotransferencia y teñidas con rojo de Ponceau, se incubaron con solución de bloqueo (TBS 1x + leche 5 % p/v) durante una hora a temperatura ambiente y agitación. Posteriormente, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios respectivos toda la noche a 4 °C y agitación. A continuación, se indican las concentraciones, los organismos de los que se obtuvieron y las soluciones en las que se diluyeron los anticuerpos:

- α -Hog1: 1:5 000, conejo, TBS 1x + leche 5 % p/v
- α -Pgk1: 1:5 000, ratón, TBS 1x + leche 5 % p/v
- α -Ubiquitina: 1:1 000, ratón, TBS-Tween 0.1 % + leche 5 % p/v

- α -HA: 1:3 000, ratón acoplado a HRP, TBS 1x + leche 5 % p/v; dado que este anticuerpo está acoplado a la enzima HRP, solamente se incubaron las membranas deseadas durante dos horas a 4 °C con agitación y se procedió al revelado en cuarto oscuro.

Las membranas incubadas con los primeros tres anticuerpos se lavaron secuencialmente al día siguiente del siguiente modo:

1. TBS 1x Tween-20 0.1 %, 4 °C, agitación y 10 minutos
2. TBS 1X, 4 °C, agitación y 10 minutos
3. TBS 1X, 4 °C, agitación y 10 minutos

Luego del lavado, se incubaron las membranas con los siguientes anticuerpos según fuera el caso:

- α -conejo: 1:5 000, acoplado a HRP, TBS 1x + leche 5 % p/v
- α -ratón: 1:10 000, acoplado a HRP, TBS 1x + leche 5 % p/v

Finalmente, estos anticuerpos junto con el α -HA se lavaron como se indica arriba y se revelaron las membranas con el sustrato *Inmobilon* (Millipore) para su detección por quimioluminiscencia.

9. RESULTADOS

9.1 La eliminación de SAM37 impacta diferencialmente a los niveles proteicos de β_1 -y β_2 -NAC

S. cerevisiae es una levadura modelo ampliamente usada en el campo biológico, por lo que la utilización de cepas estándar es común para el desarrollo del trabajo experimental. Una característica que presentan las cepas de laboratorio es su facilidad de manejo, la cual se ha logrado a través de la cruce selectiva y la introducción de mutaciones. No obstante, como ha ocurrido en varios organismos modelo, existen variaciones en los resultados experimentales entre diferentes cepas las cuales son atribuibles a las modificaciones introducidas a los organismos del laboratorio o a la variación natural inherente de las cepas parentales con las que se desarrollaron las cepas estándar. Con ello en mente, se aprovechó a la cepa YPS128, proveniente de una colección de aislados naturales de *S. cerevisiae* (Cubillos, Louis, & Liti, 2009), que funcionó en este estudio para contrastar los resultados obtenidos en la cepa estándar de laboratorio BY4741. Ya que la cepa YPS128 forma parte de un linaje silvestre de *S. cerevisiae* que crece en los robles norteamericanos, a partir de ahora se le denominará como NtAm para mayor facilidad.

En trabajos previos del laboratorio, se reportó la existencia de una interacción genética negativa entre los genes que codifican al heterodímero $\alpha\beta_2$ -NAC (*EGD2* y *BTT1*) y el gen *SAM37* (Ponce-Rojas et al., 2017). Dicha interacción resulta interesante puesto que, en ausencia de los tres genes, algunas proteínas mitocondriales ven afectada su importación a la mitocondria. Puesto que la proteína Sam37 es un componente soluble de la región citosólica del complejo SAM, encargado del ensamblaje de proteínas de la ME mitocondrial cuya conformación tridimensional es de barril β , se especula que puede actuar como una plataforma de anclaje del heterodímero $\alpha\beta_2$ -NAC, situación semejante a la reportada para $\alpha\beta_1$ -NAC y la proteína OM14 (Lesnik et al., 2014).

Debido a que no se conoce cómo afecta la ausencia de Sam37 directamente a los heterodímeros de NAC, se etiquetaron cromosómicamente a los genes de las subunidades β_1 - y β_2 -NAC para que estas últimas contengan etiquetas de HA en su extremo 3' tanto en las cepas silvestres BY4741 y NtAm como en la mutante nula $\Delta sam37$.

Las etiquetas se verificaron por inmunodetección con anticuerpos específicos contra HA (Figura 6).

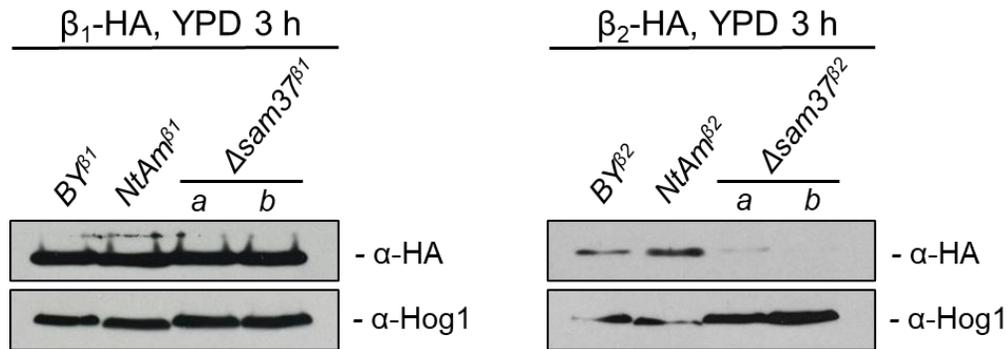


Figura 6. Verificación del etiquetado con HA en las subunidades β_1 -NAC y β_2 -NAC por inmunodetección. Cultivos de las cepas indicadas se crecieron hasta la fase de crecimiento exponencial en medio rico con glucosa y 0.4 unidades de DO_{600} de extractos proteicos totales fueron analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida. La subunidad β -NAC etiquetada se muestra como superíndice en el nombre de la cepa analizada. Se evaluaron dos colonias independientes (a, b) de cada experimento de etiquetado de la mutante $\Delta sam37$. Hog1 se utilizó como control de carga del experimento. El experimento en que se reveló a β_1 -NAC se expuso durante 10 segundos mientras que el experimento para β_2 -NAC se expuso durante 25 minutos.

De este experimento se puede concluir que se logró etiquetar exitosamente a las cepas NtAm y $\Delta sam37$ con etiquetas de HA en las subunidades β_1 - y β_2 -NAC. Además, se puede observar una clara diferencia en los niveles proteicos entre ambas subunidades β -NAC, evidenciada por el distinto tiempo de exposición requerido para revelar las inmunodetecciones (10 segundos para β_1 -NAC y 25 minutos para β_2 -NAC). Tal diferencia de señal proteica se puede explicar por la abundancia diferencial de los transcritos de ambos parálogos los cuales, como se ha reportado previamente (Wiedmann & Prehn, 1999), se encuentran en una relación aproximada de 100:1 en donde la subunidad mayoritaria es β_1 -NAC. Asimismo, se puede apreciar que no hay diferencias en la señal observada de β_1 -NAC entre las diferentes cepas evaluadas. Por el contrario, β_2 -NAC muestra niveles más elevados en la cepa NtAm $^{\beta_2}$, así como más disminuidos en las dos colonias analizadas de la cepa $\Delta sam37^{\beta_2}$ al compararlas con la cepa BY, en cuyo fondo genético se construyeron las mutantes $\Delta sam37$. En conclusión, hay un efecto diferencial de la eliminación de *SAM37* entre las subunidades β -NAC, siendo los niveles proteicos de β_2 -NAC los que se afectan negativamente en ausencia de Sam37 en las cepas del fondo genético BY4741. Además, la mayor

cantidad de señal que se observa de β_2 -NAC en la cepa NtAm ^{β_2} indica que podría haber diferencias cepa-específicas que impacten la regulación de esta subunidad.

9.2 β_2 -NAC puede ser blanco de modificación postraduccional y de degradación proteolítica

Durante la optimización y ejecución de réplicas experimentales para corroborar los resultados mostrados en la sección anterior, se observó la aparición de bandas de mayor y menor peso molecular que la banda esperada de 20.3 kDa de β_2 -NAC en extractos proteicos de NtAm ^{β_2} (Figura 7). Al igual que antes, se aprecia una clara diferencia en los niveles proteicos de β_2 -NAC en donde la cepa NtAm ^{β_2} muestra niveles altos de la proteína mientras que $\Delta sam37^{\beta_2}$ muestra niveles más bajos y la cepa BY ^{β_2} niveles intermedios. Con esto, la Figura 7 refuerza las afirmaciones hechas sobre el impacto diferencial de la ausencia de Sam37 sobre las subunidades parálogas β -NAC.

La aparición de bandas adicionales a la esperada de β_2 -NAC en la cepa NtAm ^{β_2} permite suponer que esta subunidad puede ser blanco de alguna modificación postraduccional que podría favorecer su degradación, premisa apoyada por estudios masivos en los que se ha detectado una ubiquitinación y una fosforilación en el extremo C-terminal de esta subunidad (Lanz et al., 2021; Swaney et al., 2013).

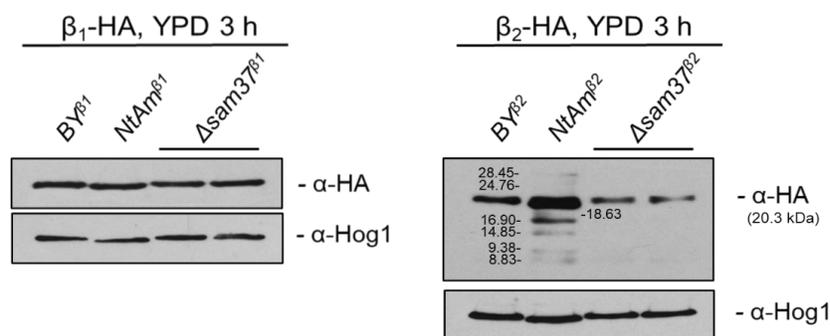


Figura 7. β_2 -NAC posiblemente es blanco de modificaciones postraduccionales y de degradación proteolítica. Cultivos de las cepas indicadas se crecieron hasta la fase de crecimiento exponencial en medio rico con glucosa. Luego, 0.2 y 0.4 unidades de DO₆₀₀ de extractos proteicos totales fueron analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida en los paneles izquierdo y derecho, respectivamente. En los carriles indicados con $\Delta sam37$ se analizaron dos colonias obtenidas durante el mismo experimento de transformación. Se indica el peso molecular estimado de la proteína β_2 -NAC etiquetada, así como el peso molecular de las bandas adicionales encontradas en el carril NtAm ^{β_2} .

La detección de una banda de 28.4 kDa, la cual es ~8 kDa más pesada que la banda de 20.3 kDa de β_2 -NAC, permite suponer que en la Figura 7 se detectó la adición de un residuo de ubiquitina (~8.5 kDa) a β_2 -NAC y su posible marcaje para degradación por el sistema ubiquitina-proteosoma (Finley, Ulrich, Sommer, & Kaiser, 2012). Para descartar que la detección de estas bandas no fuese resultado de un artificio experimental atribuible a la larga exposición para obtener la señal de la subunidad β_2 -NAC, se llevó a cabo una inmunodetección en la que se comparó la señal proveniente de extractos proteicos obtenidos de las cepas parentales sin etiquetar (Tabla 4) con la señal de las cepas en las que se etiquetó β_1 - y β_2 -NAC (Figura 8).

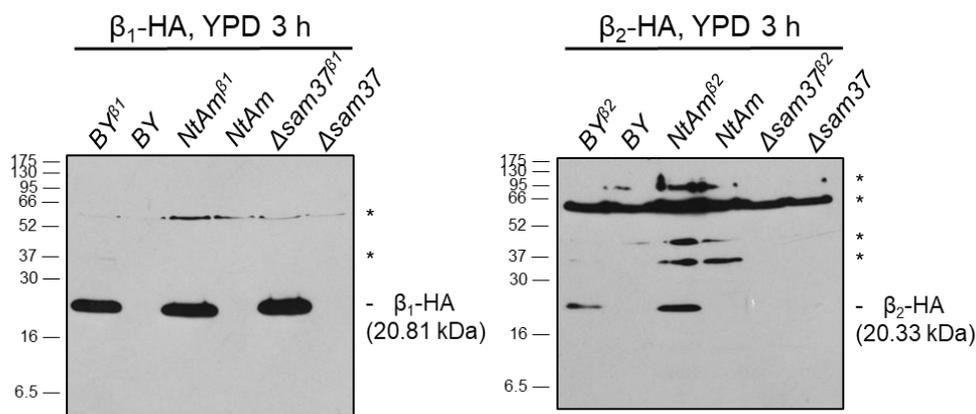


Figura 8. Se encuentran patrones de bandeo inespecíficos en la inmunodetección de las etiquetas HA. Cultivos de las cepas indicadas se crecieron hasta la fase de crecimiento exponencial en medio rico con glucosa. Luego, 0.2 y 0.4 unidades de DO_{600} de extractos proteicos totales fueron analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida en los paneles izquierdo y derecho, respectivamente. Los pesos moleculares de las proteínas β -NAC etiquetadas se indican a la derecha de cada panel. Los asteriscos (*) indican bandas inespecíficas.

Como se puede apreciar en el panel izquierdo, se corrobora una vez más que no hay diferencia entre los niveles proteicos de las subunidades β_1 -NAC en las diferentes cepas evaluadas. De igual modo, en el panel derecho se observa que la cepa $NtAm^{\beta_2}$ muestra una mayor señal de β_2 -NAC en comparación con la cepa BY^{β_2} como se ha visto anteriormente. En el caso de este experimento, no se detectó señal de esta subunidad de NAC en la cepa $\Delta sam37^{\beta_2}$, posiblemente debido a los bajos niveles proteicos de β_2 -NAC se han observado en esta mutante. Cumpliendo el propósito de este experimento, se pudieron detectar una serie de bandas en ambas inmunodetecciones las cuales se pueden considerar como inespecíficas debido a su aparición tanto en los

carriles en los que se analizaron cepas parentales como en los que se analizaron cepas etiquetadas. Sin embargo, no se logró detectar la aparición de las bandas observadas en la Figura 7, por lo que no se pudo descartar que se tratase algún tipo artificio experimental.

9.3 Es posible la inducción de la expresión de β_2 -NAC al cambiar de un metabolismo respiratorio a uno fermentativo

En trabajos previos del laboratorio se determinó que β_2 -NAC muestra un perfil de expresión diferencial que depende de la fuente de carbono, de modo que β_2 -NAC solamente puede ser detectada en cepas crecidas en fuentes de carbono fermentables como la glucosa o la galactosa. Por lo contrario, esta proteína se vuelve indetectable cuando se analizan extractos proteicos de cepas crecidas en fuentes de carbono no fermentables como el glicerol o el lactato. Con ello en mente, nos preguntamos si las bandas de mayor y menor peso molecular de β_2 -NAC corresponden a algún mecanismo de regulación que incide sobre esta proteínas. Una estrategia comúnmente realizada para la detección de modificaciones postraduccionales y para la determinación de cinéticas de expresión es la inducción controlada de la expresión de la proteína bajo análisis. Por tal motivo, se diseñó el experimento mostrado en la Figura 9 y detallado en el apartado 8.3 de este trabajo como una manera de estudiar la aparición de las bandas no identificadas de β_2 -NAC (Figura 7).

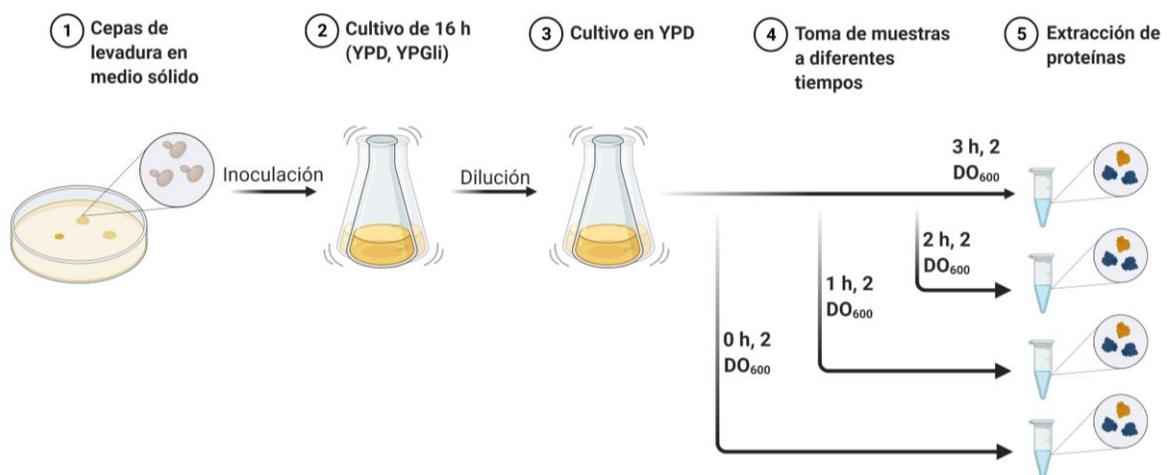


Figura 9. Descripción gráfica del experimento de inducción de β_2 -NAC para detectar la aparición de posibles modificaciones postraduccionales. Los detalles experimentales se muestran en el apartado 8.3. Ilustración realizada en BioRender.com.

Debido a que las bandas en cuestión se encontraron en la cepa silvestre NtAm, la estrategia mencionada se llevó a cabo en las cepas $BY^{\beta 2}$ y $\Delta sam37^{\beta 2}$ para determinar si dichas bandas son un fenómeno exclusivo de la primera cepa o si son resultado de algún proceso regulatorio que incide sobre β_2 -NAC. Asimismo, la incorporación de la cepa $\Delta sam37^{\beta 2}$ permitiría aseverar si los niveles disminuidos de β_2 -NAC están de algún modo relacionados con la aparición de las bandas de mayor y menor peso molecular. Se realizaron los crecimientos iniciales de las cepas en medio rico con glucosa o con glicerol como fuentes de carbono con el fin de contrastar lo que sucede con β_2 -NAC cuando las cepas transitan de un metabolismo que comienza a adaptarse a un modo respiratorio (YPD, ~16 h), o de uno plenamente adaptado (YPGli), a uno fermentativo en el que se da el fenómeno de la represión catabólica (YPD fresco). Los resultados de esta estrategia se muestran en la Figura 10.

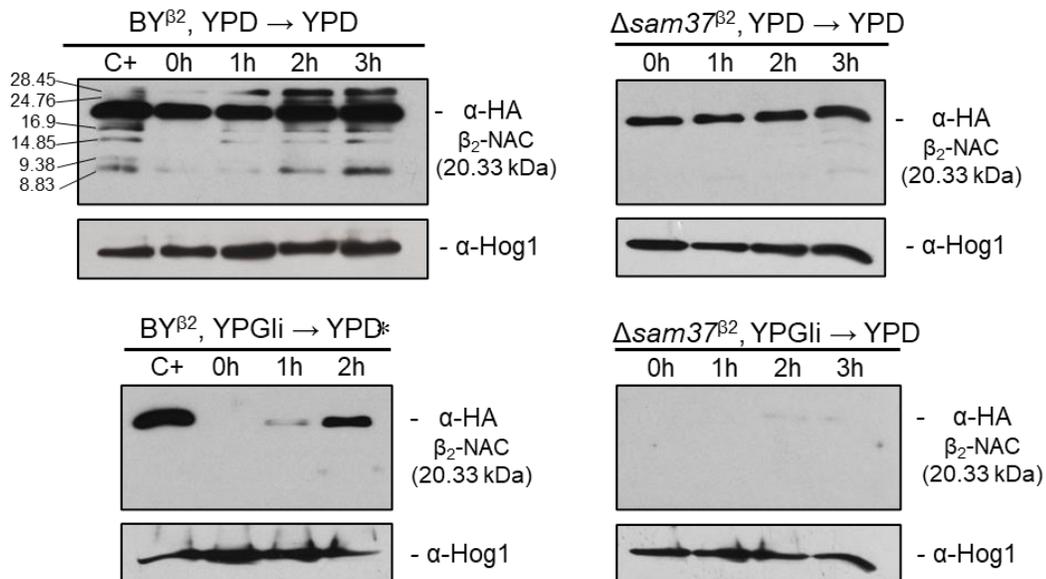


Figura 10. La inducción de la expresión de β_2 -NAC es posible por medio de un cambio de fuente de carbono no fermentable a una fermentable. Precultivos de las cepas indicadas se crecieron en YPD o YPGli durante toda la noche y posteriormente se diluyeron a 0.3 unidades de DO_{600} en medio YPD. Luego, se tomó el volumen equivalente a 2.0 unidades de DO_{600} de células para la obtención de extractos proteicos totales a las 0, 1, 2 y 3 h. Dichos extractos proteicos fueron analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida e inmunodetección contra la etiqueta HA; Hog1 se utilizó como control de carga. Como control positivo se incluyó un extracto proteico total de la cepa $BY^{\beta 2}$ obtenido a las 3 h en medio YPD en un experimento independiente. Los pesos moleculares estimados de las bandas no identificadas asociadas a β_2 -NAC se muestran en el panel superior izquierdo. * Carril en el que no pudo detectar la señal de la inmunodetección.

Del panel superior izquierdo se pueden destacar dos observaciones: la primera es la aparición de las mismas bandas encontradas en la Figura 2 pero ahora en la cepa $BY^{\beta 2}$; y la segunda es que tales bandas muestran un incremento de intensidad conforme transcurre el tiempo en que crece la cepa $BY^{\beta 2}$ en medio YPD fresco.

En el panel inferior izquierdo se muestran los resultados de crecer previamente a la cepa $BY^{\beta 2}$ en medio rico con glicerol como fuente de carbono. En este experimento se muestra que a las 0 h del cambio a medio con glucosa no se aprecia banda alguna de β_2 -NAC; sin embargo, conforme avanza el tiempo de cultivo, esta proteína comienza a aparecer y a aumentar la intensidad de su señal, recapitulando un fenómeno de inducción de la expresión. Se puede vislumbrar la aparición de las bandas de mayor y menor peso molecular bajo análisis, pero la calidad del experimento no permite afirmarlo con seguridad debido a que no se obtuvo señal del $t = 3h$ posiblemente por errores experimentales.

Respecto a lo que ocurre con la cepa $\Delta sam37^{\beta 2}$, en el panel superior derecho no se notan cambios significativos en la intensidad de la señal de β_2 -NAC, pero sí se detecta la aparición de bandas de menor peso molecular a las 3 horas del cambio a medio rico con glucosa. En el panel inferior derecho se observa que, al realizar el cambio del precultivo en medio con glicerol al medio con glucosa, la aparición de la banda correspondiente a β_2 -NAC se da hasta las 2 h de cultivo y con muy baja intensidad de señal. El cambio de intensidad de las bandas correspondientes a β_2 -NAC a partir de esta figura en adelante en todos los carriles puede deberse a la optimización del proceso de revelado de los experimentos. Finalmente, con estos resultados se puede confirmar este método como una opción para evaluar la inducción y la modulación de β_2 -NAC cuando se realiza la transición de un metabolismo respiratorio a uno fermentativo.

9.4 La adición del inhibidor del proteosoma MG-132 favorece la aparición de formas de mayor y menor peso molecular de β_2 -NAC

Existen reportes de que las subunidades que conforman a NAC son sujeto de modificaciones postraduccionales, en particular de fosforilaciones y ubiquitinaciones (Lanz et al., 2021; Swaney et al., 2013). Estas últimas saltan a la vista puesto que se ha asociado a las ubiquitinaciones como una marca de degradación por medio del sistema

ubiquitina-proteosoma, aunque también se les ha atribuido un papel en la regulación de la función y la localización de las proteínas modificadas (Finley et al., 2012; Ye & Rape, 2009). En el caso particular de NAC de *S. cerevisiae*, un estudio determinó que las subunidades α - y β_1 -NAC son ubiquitinadas por el complejo Ccr4-Not y que dichas modificaciones afectan el sitio de unión al ribosoma y afectan la estabilidad de NAC (Panasencko et al., 2009). No obstante, en dicho trabajo no se evaluó la situación de β_2 -NAC ni su estado de ubiquitinación. Con este antecedente y sobre la hipótesis de que cierto tipo de ubiquitinaciones pueden favorecer la degradación proteica a través del sistema ubiquitina-proteosoma (Finley et al., 2012), es posible que la disminución de β_2 -NAC observada en la cepa $\Delta sam37^{\beta 2}$ se deba a una degradación incrementada a causa de una ubiquitinación excesiva.

Para determinar lo antes dicho, se analizó a β_2 -NAC con el método de inducción detallado en la sección anterior, partiendo de cepas crecidas en medio YPGli respiratorio con la adición del inhibidor del proteosoma MG-132 en el $t = 0$ h hasta una concentración final de 50 μ M. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 11.

En el panel superior donde se muestra el experimento realizado con la cepa $BY^{\beta 2}$ se aprecia que el MG-132 favorece la aparición de la banda correspondiente a β_2 -NAC luego de la primera hora de cultivo, en contraste con lo que ocurre en la condición sin MG-132 en donde β_2 -NAC aparece hasta la segunda hora. De manera semejante, la aparición de bandas de menor peso molecular ocurre una hora antes en presencia de MG-132 que en su ausencia. En el análisis de la cepa $\Delta sam37^{\beta 2}$ no se aprecia un efecto considerable del MG-132 y solamente se observa que a las tres horas de cultivo en presencia de esta molécula las bandas de menor peso molecular aparecen con mayor intensidad respecto a la condición carente del inhibidor del proteosoma. La presencia de señal de las bandas de menor peso molecular en el carril del control negativo (C-) del panel superior de la Figura 11 es probable que se deba a un paso del extracto proteico total del control positivo. A pesar de que no se aprecia una diferencia de intensidad en las bandas en los experimentos con las cepas $BY^{\beta 2}$ y $\Delta sam37^{\beta 2}$, atribuible a los diferentes tiempos de exposición, de estos resultados se concluye que puede haber un efecto positivo del MG-132 sobre la estabilidad de β_2 -NAC y es dependiente de la presencia de Sam37.

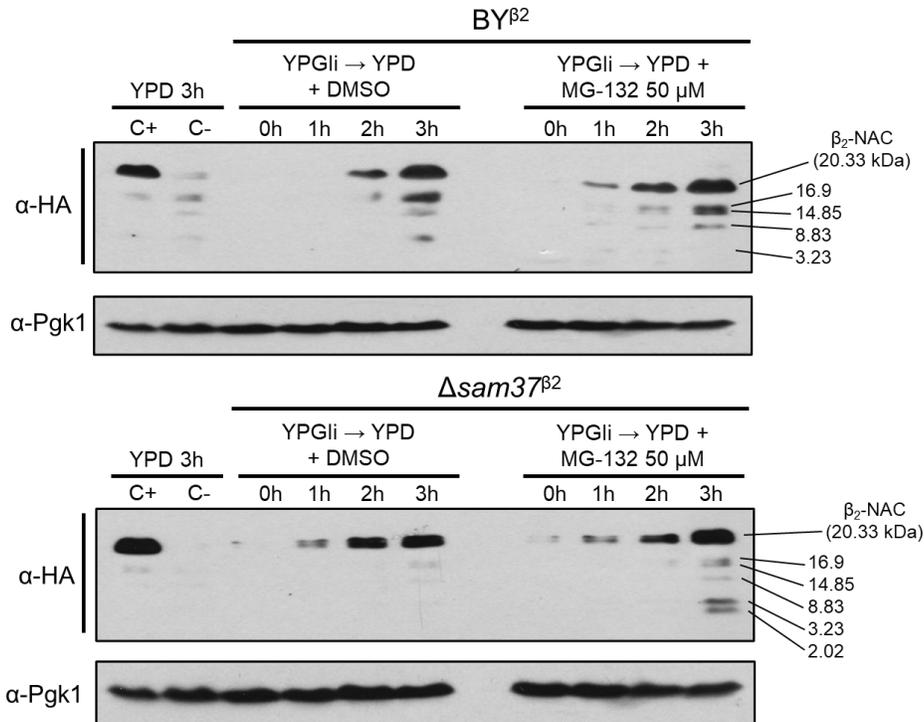


Figura 11. La adición de 50 μM de MG-132 favorece la aparición de formas de mayor y menor peso molecular de $\beta_2\text{-NAC}$ durante su inducción por cambio de fuente de carbono. Precultivos de las cepas indicadas se crecieron en YPGli durante toda la noche y posteriormente se diluyeron a 0.3 unidades de DO_{600} en medio YPD. Luego, se tomó el volumen equivalente a 2.0 unidades de DO_{600} de células para la obtención de extractos proteicos totales a las 0, 1, 2 y 3 h. Dichos extractos proteicos fueron analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida e inmunodetección contra la etiqueta HA; Pgk1 se utilizó como control de carga. Como control positivo se incluyó un extracto proteico total de la cepa $\text{BY}\beta^2$ obtenido a las 3 h en medio YPD en un experimento independiente. Se incluye un control negativo donde se analiza un extracto proteico total de la cepa $\text{BY}4741$ (carente de señal de HA) crecida en las mismas condiciones que el control positivo. Los pesos moleculares estimados de las bandas no identificadas asociadas a $\beta_2\text{-NAC}$ se muestran a la derecha de cada panel.

9.5 La disminución de $\beta_2\text{-NAC}$ en ausencia de *Sam37* no es debida a la acción del sistema ubiquitina-proteosoma

Debido a la falta de un efecto claro del inhibidor MG-132 sobre los niveles proteicos de $\beta_2\text{-NAC}$ en el experimento de la sección anterior, se estandarizó un protocolo de inmunoprecipitación (referido en la sección de Materiales y Métodos) de proteínas etiquetadas con HA. Esto se realizó con el objetivo de analizar de con mayor precisión las bandas de mayor y menor peso molecular asociadas a $\beta_2\text{-NAC}$, así como para descartar aquellas bandas que pudieran deberse a reacciones cruzadas del anticuerpo

contra HA con proteínas de los extractos proteicos totales. Los resultados de esta estandarización se muestran en la Figura 12.

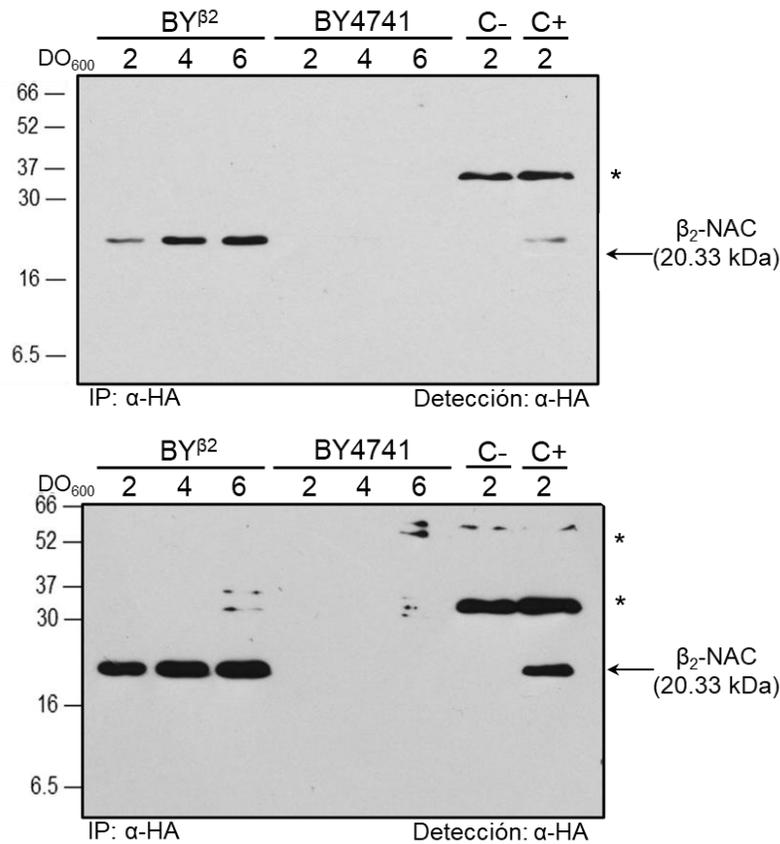


Figura 12. La inmunoprecipitación de β_2 -NAC permite eliminar los patrones de bandeo inespecíficos de la inmunodetección de las etiquetas HA. Se recolectaron 2, 4 y 6 unidades de DO₆₀₀ de células de las cepas indicadas en fase de crecimiento exponencial en medio YPD, se lisaron mecánicamente y se analizaron por electroforesis desnaturizante luego de inmunoprecipitar las etiquetas HA. Se incluye un control positivo de la etiqueta de HA obtenido mediante extracción de proteínas totales de 2 unidades de DO₆₀₀ la cepa BY β^2 , así como un control negativo proveniente de un extracto proteico total de la cepa BY4741. En el panel inferior se muestra una sobreexposición del experimento mostrado en el panel superior. Los asteriscos indican las bandas inespecíficas esperadas.

En esta figura se muestran dos tiempos de exposición del experimento de inmunoprecipitación en los que se aprecia la desaparición de las bandas inespecíficas observadas en los extractos proteicos, así como de las bandas de menor y mayor peso molecular asociadas a la detección de β_2 -NAC (Figuras 7, 10 y 11). Sin embargo, la sobreexposición del experimento de inmunoprecipitación permite apreciar la presencia de una banda de ~37 kDa cuando se analizan 6 unidades de DO₆₀₀ de células de la cepa BY β^2 , la cual parece ser específica de esta cepa puesto que no corresponde con

las observadas en 6 unidades de DO₆₀₀ de la cepa BY4741 sin etiquetar. Aunque este resultado resulta conveniente para analizar a las proteínas etiquetadas con HA sin la

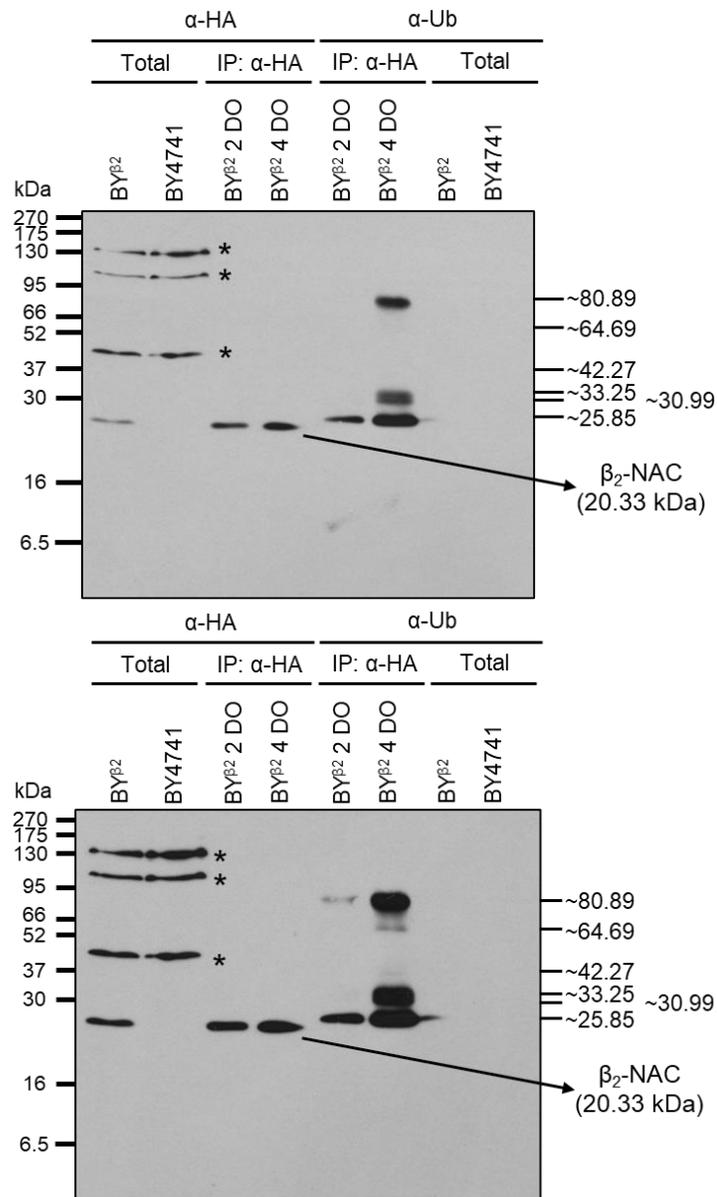


Figura 13 La inmunoprecipitación de β_2 -NAC permite la detección de proteínas de varios pesos moleculares positivas a ubiquitina. Se recolectaron 2 y 4 unidades de DO₆₀₀ de células de las cepas indicadas en fase de crecimiento exponencial en medio YPD, se lisaron mecánicamente y se analizaron por electroforesis desnaturizante e inmunodetección luego de inmunoprecipitar las etiquetas HA. Se incluye un control positivo de la etiqueta de HA (Total BY β^2) obtenido mediante extracción de proteínas totales de 2 unidades de DO₆₀₀ la cepa BY β^2 y un control negativo proveniente de un extracto proteico total de la cepa BY4741 (Total BY4741). En la parte inferior se muestra una sobreexposición del experimento en el panel superior. Se indican los pesos moleculares estimados de las bandas encontradas en la detección con α -Ub. Los asteriscos indican las bandas inespecíficas esperadas.

interferencia de las bandas inespecíficas encontradas en el análisis de extractos de proteínas totales, se contrapone a los resultados mostrados en las Figuras 7, 10 y 11.

Para abordar la hipótesis de la ubiquitinación de β_2 -NAC y tratar de solventar la pérdida de detección de las bandas asociadas a esta subunidad se repitió el experimento de inmunoprecipitación en las mismas condiciones que el mostrado en la Figura 12 y se realizó la inmunodetección con α -HA y α -ubiquitina. Esto con el objetivo de determinar si la subunidad en efecto es blanco de la modificación postraduccional mencionada. Asimismo, en vista de que al analizar 2 y 4 unidades de DO₆₀₀ se puede detectar la banda correspondiente a β_2 -NAC con suficiente intensidad y sin la complicación de patrones de bandeo inespecíficos, solamente se recolectó este número de células en los experimentos subsecuentes. El resultado del experimento mencionado se expone en la Figura 13.

En el experimento referido se observa, al igual que en la Figura 12, la desaparición de los bandeos inespecíficos a pesar de la realización de una sobreexposición de la inmunodetección (panel inferior). Se observan bandas de altos pesos moleculares cuando se realiza la inmunodetección con un anticuerpo contra ubiquitina. Estas bandas tienen unos pesos estimados indicados a la derecha de los paneles de la Figura 13 las cuales se ponen más en evidencia cuando se realiza una sobreexposición del experimento (panel inferior). Cabe mencionar que no se logró detectar la señal de ubiquitinación basal de los extractos proteicos totales, posiblemente debido a la poca cantidad en que se encuentran las especies ubiquitinadas.

Para estimar si las bandas encontradas en la Figura 13 corresponden a posibles ubiquitinaciones se realizó el siguiente cálculo:

$$\beta_2\text{-NAC ubiquitinada} = \text{Peso molecular de } \beta_2\text{-NAC} + (\text{número de ubiquitinaciones} * \text{peso molecular de la ubiquitina})$$

Con base en los pesos moleculares estimados de β_2 -NAC (~20.33 kDa) y de la ubiquitina (~8.5 kDa), de ser solamente ubiquitinada esta subunidad de NAC, deberían poderse observar los siguientes pesos moleculares (las bandas observadas en la Figura 8 más probables de ser ubiquitinaciones se sitúan junto a los pesos moleculares calculados más semejantes):

Especie de β_2 -NAC+Ub	Peso molecular calculado	Bandas observadas
+0Ub	20.33 kDa	
+1Ub	28.83 kDa	~30.99 kDa
+2Ub	37.33 kDa	
+3Ub	45.83 kDa	~42.27 kDa
+4Ub	54.33 kDa	
+5Ub	62.83 kDa	~64.69 kDa
+6Ub	71.33 kDa	
+7Ub	79.83 kDa	~80.89 kDa
+8Ub	88.33 kDa	
+9Ub	96.83 kDa	
+10Ub	105.33 kDa	

En las Figuras 7, 8 y 10 se muestra que la cepa $\Delta sam37^{\beta 2}$ presenta niveles reducidos de β_2 -NAC respecto de las cepas silvestres $BY^{\beta 2}$ y $NtAm^{\beta 2}$. Para determinar si los niveles reducidos que muestra la primera cepa se deben a posibles alteraciones en la ubiquitinación, se realizó un experimento de inmunoprecipitación en la cepa $\Delta sam37^{\beta 2}$ (Figura 14) en las mismas condiciones que el mostrado en la Figura 13.

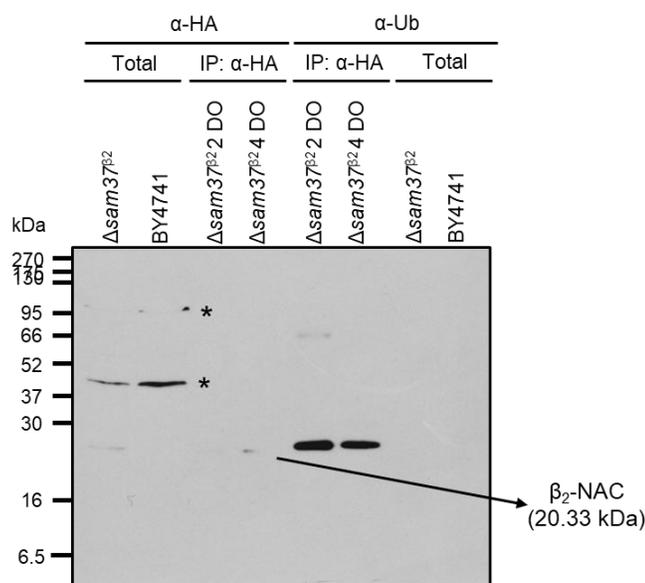


Figura 14. Los niveles proteicos de β_2 -NAC se mantienen reducidos en la cepa $\Delta sam37^{\beta 2}$ pese a la inmunoprecipitación. Se recolectaron 2 y 4 unidades de DO_{600} de células de las cepas indicadas en fase de crecimiento exponencial en medio YPD, se lisaron mecánicamente y se analizaron por electroforesis desnaturalizante luego de inmunoprecipitar las etiquetas HA. Se incluye un control positivo de la etiqueta HA obtenido mediante extracción de proteínas totales de 2 unidades de DO_{600} la cepa $\Delta sam37^{\beta 2}$ y un control negativo de la etiqueta de HA proveniente de un extracto proteico total de la cepa BY4741. Los asteriscos indican las bandas inespecíficas esperadas.

De manera análoga a lo visto en figuras anteriores, la detectabilidad de β_2 -NAC en la cepa $\Delta sam37^{\beta 2}$ es baja pese al enriquecimiento derivado de la inmunoprecipitación de HA. Asimismo, solamente se observó la aparición de una banda de alto peso molecular (~ 64.69 kDa) en el carril 5 del análisis con α -Ub. De nueva cuenta, no se observa señal en el análisis con α -Ub de los extractos totales de las cepas $\Delta sam37^{\beta 2}$. Con los resultados de las Figuras 13 y 14, apoyados en el cálculo de los pesos moleculares estimados de las ubiquitinaciones de β_2 -NAC, se refuerza la hipótesis de que esta subunidad es blanco de modificaciones postraduccionales, en particular de ubiquitinaciones. Cabe la posibilidad de que durante la inmunoprecipitación de β_2 -NAC se hayan recuperado otras proteínas tales como α -NAC. De ser esto cierto, es posible que la presencia de las bandas de ~ 25 kDa que se muestran en las Figuras 13 y 14, y que no se aprecian en el panel α -HA, correspondan a especies de α -NAC unidas a un residuo de ubiquitina (α -NAC: 18.7 kDa + Ub: ~ 8.5 kDa = 27.2 kDa).

Ahora bien, partiendo del supuesto de que las ubiquitinaciones favorecen la degradación proteica por medio del sistema ubiquitina-proteosoma, se evaluó el efecto del inhibidor MG-132 sobre los patrones de bandeo observados durante la inmunoprecipitación de β_2 -NAC. Para ello, se incluyó la adición de 50 μ M de MG-132 a cultivos destinados al protocolo de inmunoprecipitación realizado en las mismas condiciones que los mostrados en las Figuras 13 y 14. Los resultados se muestran en la Figura 15.

En las Figuras 15A, B y D se aprecia que el tratamiento con MG-132 parece disminuir levemente la cantidad de β_2 -NAC que se puede detectar en la cepa $BY^{\beta 2}$ luego de la recuperación de la proteína por inmunoprecipitación o mediante la extracción de proteínas completas. No obstante, esto bien podría deberse a un artificio experimental puesto que no se observa lo mismo en una sobreexposición de la inmunoprecipitación (Figura 15C) o en un experimento independiente del análisis de extractos proteicos totales de la cepa $BY^{\beta 2}$ (Figura 15D, panel derecho). Por otro lado, se puede notar en las Figuras 15B y 10C que los niveles proteicos de β_2 -NAC en la cepa $\Delta sam37^{\beta 2}$ se mantienen reducidos respecto a los mostrados por la cepa $BY^{\beta 2}$ a pesar del tratamiento con MG-132. Esto se corrobora en el panel derecho de la Figura 15D en donde los niveles de β_2 -NAC en $\Delta sam37^{\beta 2}$ disminuyen a causa del tratamiento de MG-132 respecto del tratamiento control con DMSO, aunque no se puede descartar que se deba a algún artificio experimental. En el análisis con el anticuerpo contra ubiquitina muestra que las bandas observadas en la Figura 13 también aparecen cuando se realiza el

experimento de inmunoprecipitación con la cepa silvestre BY4741, lo que descartaría a las bandas analizadas como posibles ubiquitinaciones de la subunidad β_2 -NAC, o bien, proteínas ubiquitinadas que coprecipitan junto con esta subunidad. Sin embargo, se necesita realizar una inmunoprecipitación contra proteínas ubiquitinadas en busca de β_2 -NAC para determinar fehacientemente el estatus de ubiquitinación de esta proteína. En conclusión, esta serie de experimentos permiten afirmar que los niveles

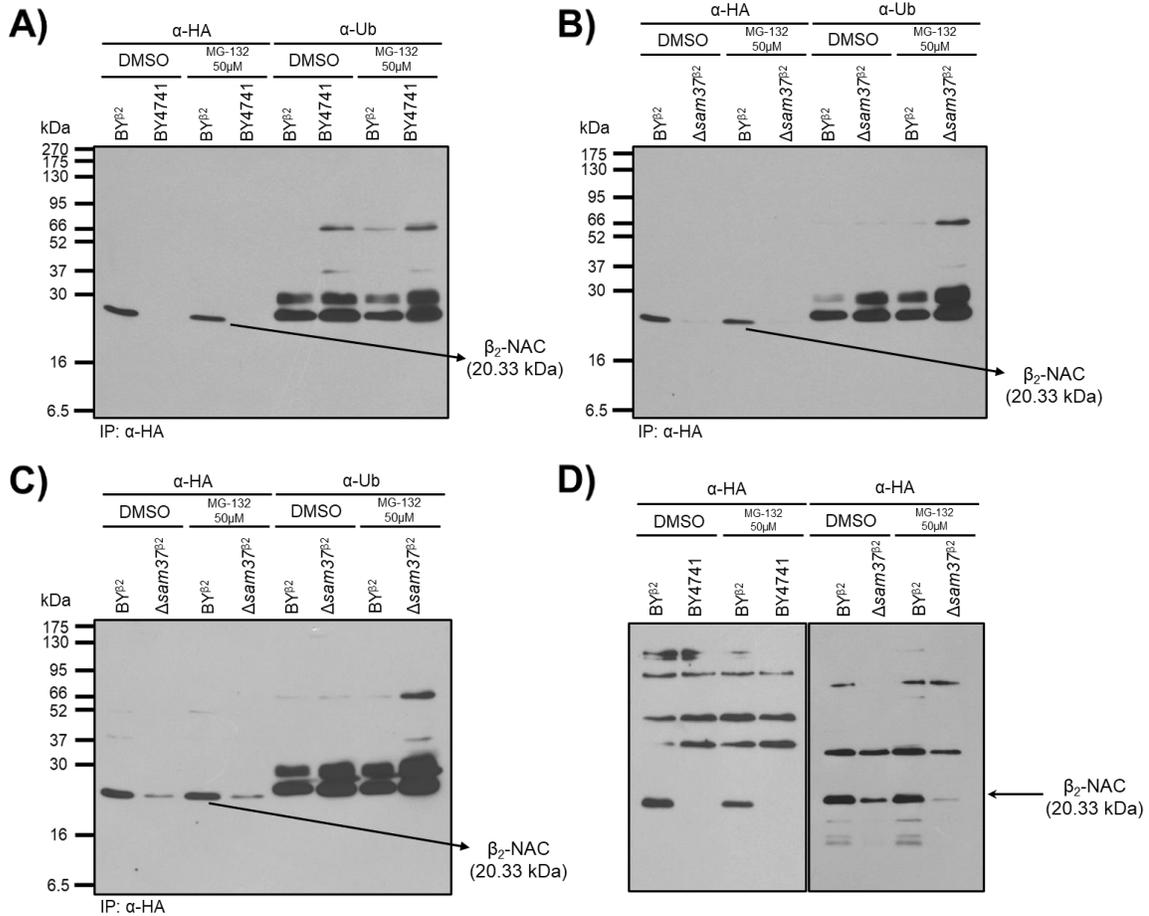


Figura 15. Los niveles disminuidos de β_2 -NAC en el fondo $\Delta sam37^{\beta_2}$ no se deben a la acción del sistema ubiquitina-proteosoma. Análisis de las cepas indicadas crecidas hasta la fase de crecimiento exponencial en medio YPD en presencia o ausencia de 50 μ M de MG-132. Los niveles de β_2 -NAC-HA se evaluaron por electroforesis desnaturizante luego de inmunoprecipitar las etiquetas HA o de una extracción de proteínas totales.

A) Inmunoprecipitación de β_2 -NAC-HA a partir de 4 unidades de DO_{600} de las cepas BY β_2 y BY4741.

B) Inmunoprecipitación de β_2 -NAC-HA a partir de 4 unidades de DO_{600} de las cepas BY β_2 y $\Delta sam37^{\beta_2}$.

C) Sobreexposición del experimento mostrado en B.

D) Análisis de β_2 -NAC-HA a partir de extractos proteicos totales obtenidos de las cepas BY β_2 y $\Delta sam37^{\beta_2}$ con o sin tratamiento de 50 μ M de MG-132; se incluye un control negativo de la etiqueta de HA proveniente de un extracto proteico total de la cepa BY4741.

reducidos de β_2 -NAC ante la falta de Sam37 no se deben a una degradación por medio del sistema ubiquitina-proteosoma, al menos en las condiciones experimentales usadas en este estudio.

10. DISCUSIÓN

En este estudio se exploró el efecto de la mutación *sam37* Δ sobre las subunidades β -NAC de *S. cerevisiae*, en particular sobre la subunidad β_2 -NAC. El mismo partió del reporte en que los genes codificantes de Sam37 y β_2 -NAC muestran una interacción genética negativa que apunta a que ambos podrían estar involucradas en el fenómeno de importación cotraduccional de proteínas a la mitocondria (Ponce-Rojas et al., 2017). Asimismo, este estudio partió de la hipótesis de que la ausencia de Sam37 repercute negativamente sobre los niveles proteicos de β_2 -NAC. En el transcurso de la elaboración de cepas mutantes para el estudio de esta interacción, se encontraron por inmunodetección una serie de bandas de mayor y menor peso molecular que β_2 -NAC (Figuras 7, 10, 11 y 15), las cuales parecen ser específicas de esta proteína puesto que no se encuentran en los análisis de la cepa silvestre. Asimismo, se determinó que la mutación *sam37* Δ no parece tener un efecto sobre los niveles proteicos de β_1 -NAC, escenario que no se repitió en el análisis de esta mutación sobre β_2 -NAC (Figuras 6 y 7). En este último, los niveles proteicos de la subunidad se ven disminuidos ante la ausencia de Sam37. Las dos evidencias mencionadas permitieron plantear la hipótesis de que esta proteína posiblemente es blanco de alguna modificación postraduccional, en particular la ubiquitinación, y que la ausencia de Sam37 de algún modo afecta la susceptibilidad de β_2 -NAC a ser modificada y degradada.

En la literatura existen algunos estudios en donde se ha estudiado la función individual de las subunidades de NAC de *S. cerevisiae* (del Alamo et al., 2011; Nyathi & Pool, 2015; A. K. Ott et al., 2015; Ponce-Rojas et al., 2017), pero uno en particular aborda la modificación postraduccional de las subunidades α - y β_1 -NAC (Panasenko et al., 2009). Brevemente, en este estudio se determinó que las subunidades α - y β_1 -NAC son ubiquitinadas y que esta modificación afecta de manera positiva su asociación con el ribosoma. De igual manera, se estableció que la ubiquitinación de las subunidades se da de manera coordinada entre sí y en función de los niveles de glucosa en el medio, y que existe una interacción física entre la subunidad α -NAC y el proteosoma. A pesar de que en dicho trabajo no se estudió a β_2 -NAC, esta evidencia apoya fuertemente la premisa planteada sobre la modificación postraduccional de esta subunidad y permitió suponer a la ubiquitinación como la causante de los niveles reducidos de β_2 -NAC en ausencia de Sam37.

La ubiquitinación es una modificación postraduccional que se da por la adición de residuos de ubiquitina sobre las lisinas de la proteína blanco. Tradicionalmente, se ha asociado a la ubiquitinación con la degradación del sustrato por medio del sistema ubiquitina-proteosoma (Finley et al., 2012). Si bien esta modificación generalmente destina a las proteínas a ser degradadas (Samant, Livingston, Sontag, & Frydman, 2018), esto depende de la forma en que se unen los residuos de ubiquitina entre sí. En particular, la unión de los residuos de ubiquitina a través de sus lisinas 48 es la que favorece la degradación proteica. Otro tipo de poliubiquitinaciones, tales como aquellas en que los residuos de ubiquitina se encuentran unidos por sus lisinas 11, 62, 6, 27, 29 o 33 forman parte de procesos regulatorios que inciden sobre las proteínas blanco. (Ye & Rape, 2009). Posiblemente ese sea el caso reportado por Panasenکو y colaboradores (Panasenکو et al., 2009), puesto que la eliminación de las lisinas poliubiquitinadas de β_1 -NAC disminuyen la asociación con el ribosoma y alteran el patrón de ubiquitinación en α -NAC. Sin embargo, la premisa de que la ubiquitinación es necesaria para la función normal de α - y β_1 -NAC no necesariamente se extiende a β_2 -NAC. Por tal motivo durante el presente estudio se plantearon dos premisas a seguir: la ubiquitinación como parte del funcionamiento normal de β_2 -NAC o la ubiquitinación como marca de degradación de β_2 -NAC. En vista de que la ausencia de Sam37 disminuye los niveles proteicos de esta subunidad de NAC, se ahondó en la última premisa además de que concordaba con la hipótesis de la que partió este estudio.

Para indagar en ese punto, se determinó el efecto que el inhibidor del proteosoma MG-132 tiene sobre los niveles proteicos de β_2 -NAC. En dicho experimento se tomó provecho del hecho de que β_2 -NAC ve disminuidos sus niveles proteicos hasta niveles indetectables cuando la levadura crece en una fuente de carbono no fermentable, posiblemente debido a algún mecanismo de regulación activo durante el metabolismo respiratorio. Así pues, se encontró que los niveles de β_2 -NAC se ven ligeramente aumentados durante su inducción en presencia de MG-132 tanto en la cepa BY^{β_2} como en la $\Delta sam37^{\beta_2}$ (Figura 11).

Ahora bien, los análisis llevados a cabo con extractos totales de proteínas tuvieron la complicación de que la detección de β_2 -NAC fue muy baja, debido a su bajo nivel de expresión, lo cual a su vez incrementó la variabilidad experimental a causa de los largos tiempos de exposición necesarios para observar a la proteína. Por ello, no se puede descartar que la aparición de bandas de mayor y menor peso molecular o el

efecto detectado del MG-132 podrían ser más bien cambios sutiles o artificios experimentales, que este método de análisis resulta ineficaz a la hora de discernir entre ambas posibilidades. Por estos motivos, se estandarizó un protocolo de inmunoprecipitación contra las etiquetas de HA para evaluar con mayor precisión lo que ocurría con β_2 -NAC.

La inmunoprecipitación de β_2 -NAC permitió descartar algunas hipótesis que se habían planteado, en particular, que la aparición de bandas de mayor y menor peso molecular corresponden a ubiquitinaciones que regulan de algún modo esta subunidad de NAC. Si bien es cierto que las bandas de menor peso molecular detectadas en las Figuras 7, 10 y 11 fueran productos de degradación de β_2 -NAC, y que por ello no se pudieron recuperar durante la inmunoprecipitación, dicho argumento no explica la falta de detección de las bandas de peso molecular más alto en estos experimentos. Aunque se observaron algunas bandas de pesos moleculares altos en las inmunoprecipitaciones reveladas con α -HA de las Figuras 12 y 15, de momento no se puede aseverar que se traten de las mismas bandas que las previamente mencionadas. En consecuencia, la conclusión más probable es que ambos tipos de bandeos sean resultado de un artificio experimental, o bien, de algún otro tipo de modificación postraduccional que modifica la migración de la proteína en el gel. Caso de ello pueden ser las SUMOilaciones, las acetilaciones, las lipidaciones o las glicosilaciones. Para estudiar dicha posibilidad se requiere de métodos con una especificidad distinta a los utilizados en este trabajo.

La posibilidad de la poliubiquitinación de β_2 -NAC también se abordó en este estudio (paneles indicados como α -Ub en las Figuras 13 a 15). Respecto a esto, se obtuvieron resultados poco concluyentes ya que las bandas de pesos moleculares de alto peso molecular detectadas en las Figura 13 y 14, y estudiadas como ubiquitinaciones fehacientes, también se aprecian en los análisis de inmunoprecipitación realizados con la cepa silvestre BY4741. Esto querría decir que toda la señal detectada por el anticuerpo α -Ub es debida a una inespecificidad de éste o a que algunas proteínas ubiquitinadas fueron reconocidas por el anticuerpo utilizado para la inmunoprecipitación de HA. Sobre esto último, cabe la posibilidad de que una especie ubiquitinada de la subunidad α -NAC haya podido recuperarse durante la inmuprecipitación β_2 -NAC. Una opción para afirmar dicha premisa sería realizar los experimentos de inmunoprecipitación en una cepa carente de la subunidad α -NAC y contrastar los resultados de

las figuras 13 y 14. Finalmente, para definir si la ubiquitinación en efecto ocurre en β_2 -NAC y si su estatus está alterado en ausencia de Sam37, se requiere inmunoprecipitar todas las proteínas ubiquitinadas y observar si diferentes formas de β_2 -NAC se encuentran entre ellas.

Como se mencionó antes, la poliubiquitinación es un mecanismo fundamental para la degradación de las proteínas por medio del sistema ubiquitina-proteosoma. Si bien el análisis de ubiquitinación de β_2 -NAC no fue concluyente, los efectos de esta modificación postraduccional también se estudiaron de modo indirecto a través de la inhibición del proteosoma mediante la adición de MG-132 a los cultivos de levadura (Figuras 11 y 15). Aunque el tratamiento de las cepas BY^{β_2} y $\Delta sam37^{\beta_2}$ con MG-132 de la Figura 11 parecía indicar que la inhibición de proteosoma afectaba de manera positiva los niveles de β_2 -NAC durante la inducción de su expresión, evidenciado por la mayor intensidad de las bandas sospechosas de ser productos de degradación, esta observación no se repitió en la Figura 15. En las condiciones experimentales de la Figura 15, el MG-132 parece no tener ningún efecto sobre los niveles proteicos de β_2 -NAC, en particular sobre la cepa $\Delta sam37^{\beta_2}$ en la que se mantienen los niveles reducidos de esta subunidad de NAC respecto de la cepa BY^{β_2} . Esta última observación descartaría al sistema ubiquitina-proteosoma como la causa de los niveles disminuidos de β_2 -NAC en el contexto de la mutación $sam37\Delta$, aunque se necesitan experimentos más detallados para aseverar tal conclusión. Pese a que en este trabajo se abordó la hipótesis de la ubiquitinación como marca de degradación, la posibilidad de que esta modificación cumpla un papel regulatorio resulta igualmente interesante. Se ha reportado que la E3 ligasa Not4 de levadura, un componente crucial del complejo Ccr4-Not involucrado en la estabilidad de los mRNAs y en el control de calidad de péptidos nacientes y del proceso de traducción (Collart, 2016; Miller & Reese, 2012), tiene como blanco a las subunidades α - y β_1 -NAC (Panassenko et al., 2009). De esto último se deriva que estudiar la posible ubiquitinación de β_2 -NAC, tomando en consideración la función de Not4, permitiría determinar si este tipo de modificación postraduccional repercute de algún modo en su participación en la importación mitocondrial.

La disminución de los niveles proteicos de β_2 -NAC en ausencia de Sam37 resulta intrigante puesto que son proteínas que se han relacionado con la importación cotraduccional de proteínas a la mitocondria (Ponce-Rojas et al., 2017). El análisis realizado en este trabajo sobre dicho fenómeno permite decir que la estabilidad de β_2 -NAC

está de alguna manera favorecida por Sam37. No obstante, no se puede obviar el hecho de que la reducción de los niveles proteicos pueda deberse a una disminución de la transcripción de su gen codificante o a una disminución de la traducción de su mRNA. En línea con esto, la reducción en los niveles proteicos explicaría por qué no se observa un efecto sobre la importación mitocondrial en la mutante *sam37Δ* (Ponce-Rojas et al., 2017). Ante la falta de Sam37, es posible que la cantidad restante de β_2 -NAC sea suficiente para solventar la importación cotraduccional de proteínas a la mitocondria. Además, existe evidencia de que β_2 -NAC, ya sea en un estado homodimérico o como heterodímero con α -NAC, no es el único componente de NAC que se ha asociado con la importación cotraduccional. Tanto en levadura como en eucariontes pluricelulares se ha determinado que el heterodímero $\alpha\beta_1$ -NAC también participa en la correcta importación de precursores mitocondriales a su organelo destino y que interactúa físicamente con proteínas de la membrana externa mitocondrial como OM14 (Gamerding et al., 2015; George et al., 2002; Lesnik et al., 2014). Por estos motivos, los efectos sobre la importación mitocondrial solamente son observables dada la ausencia simultánea de Sam37, de β_2 -NAC y de α -NAC, cuya ausencia impide la formación del heterodímero $\alpha\beta_1$ -NAC. Determinar con precisión qué mecanismos inciden sobre β_2 -NAC para regular sus niveles proteicos en función de la fuente de carbono y para reducir sus niveles en ausencia de Sam37, permitiría conocer mejor de qué modo esta proteína participa y se modula dentro del complejo proceso de la importación de proteínas a la mitocondria.

11. CONCLUSIONES

- La ausencia de Sam37 reduce los niveles proteicos de β_2 -NAC.
- Es posible inducir la expresión de β_2 -NAC mediante el cambio de un metabolismo respiratorio a uno fermentativo.
- La disminución de los niveles proteicos de β_2 -NAC en ausencia de Sam37 no es causada por el sistema ubiquitina-proteosoma.
- La ubiquitinación posiblemente tenga un papel regulatorio sobre la función de β_2 -NAC.

12. PERSPECTIVAS

- Determinar el efecto del MG-132 sobre los niveles de β_2 -NAC durante la transición del metabolismo fermentativo al respiratorio. Dicho experimento permitiría determinar si la degradación por medio del sistema ubiquitina-proteosoma está involucrado en la disminución de los niveles de β_2 -NAC observada cuando *S. cerevisiae* se encuentra en un metabolismo respiratorio.
- Realizar experimentos de inmunoprecipitación con anticuerpos antiubiquitina para determinar si en efecto β_2 -NAC es una proteína blanco de estas modificaciones postraduccionales.
- Sustituir las lisinas de β_2 -NAC por alaninas para determinar la posición de aquéllas que podrían ser blanco de ubiquitinación.
- Determinar el efecto de la ausencia de Sam37 sobre la transcripción de los genes *EGD1*, *EGD2* y *BTT1* por RT-qPCR. Esto permitiría evaluar a qué nivel del proceso de la expresión de los genes de NAC repercute la ausencia de Sam37.
- Evaluar la localización celular de las proteínas α -, β_1 - y β_2 -NAC mediante microscopía de fluorescencia. Dicho análisis permitiría estudiar lo que sucede con las subunidades de NAC en los diferentes metabolismos de *S. cerevisiae*, así como la repercusión de la ausencia de Sam37 en la localización celular de éstas.
- Estudiar el efecto que tiene la eliminación de la E3 ligasa Not4 sobre la estabilidad y función de β_2 -NAC.

13. APÉNDICE

13.1 Medios de cultivo

- YPD: Extracto de levadura 1 % p/v, bactopectona 2 % p/v y glucosa 2 % p/v.
- YPGli: Extracto de levadura 1 % p/v, bactopectona 2 % p/v y glicerol 2 % p/v.
- YPD + Higromicina: Extracto de levadura 1 % p/v, bactopectona 2 % p/v, glucosa 2 % p/v e Higromicina B 250 µg/mL.
- YPD + cloNAT: Extracto de levadura 1 % p/v, bactopectona 2 % p/v, glucosa 2 % p/v y cloNAT 100 µg/mL.

Para los mismos medios, pero en estado sólido, se agregó agar hasta el 2 % p/v.

13.2 Soluciones y amortiguadores

Soluciones para electroforesis en gel de agarosa

- TAE 50X: Tris 242 g/L, ácido acético glacial 57.1 mL/L, EDTA (0.5 M pH 8.0) 100 mL/L.
- Amortiguador de carga 6X: Azul de bromofenol 0.25 % p/v, xileno cianol 0.25 % p/v y glicerol 30 % v/v.

Soluciones para electroforesis desnaturizante de proteínas

- Amortiguador de corrida: Glicina 385 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8.0 y SDS 0.1% p/v.
- Amortiguador de transferencia: Glicina 191.8 mM, Tris-HCl 24.7 mM, SDS 0.1% p/v y Metanol 20 % p/v.
- Rojo de Ponceau: Ácido acético glacial 1 % v/v y pigmento rojo de Ponceau 1 % p/v.
- TBS: NaCl 150 mM y Tris-HCl 10 mM pH 7.5.
- TBS-Tween: NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.5 y Tween 20 0.1 % v/v.

Amortiguadores para inmunoprecipitación:

- Amortiguador AL+: Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM pH 8.0, glicerol 0.5 % v/v, DTT 0.5 mM, PMSF 3.3 mM y SDS 0.5 % v/v.
- Amortiguador AL-: Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM pH 8.0, glicerol 0.5 % v/v, DTT 0.5 mM y PMSF 3.3 mM.

14. REFERENCIAS

- Archibald, J. M. (2015, octubre 5). Endosymbiosis and eukaryotic cell evolution. *Current Biology*, Vol. 25, pp. R911–R921.
- 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.
- Backes, S., Hess, S., Boos, F., Woellhaf, M. W., Gödel, S., Jung, M., ... Herrmann, J. M. (2018). Tom70 enhances mitochondrial preprotein import efficiency by binding to internal targeting sequences. *Journal of Cell Biology*, 217(4), 1369–1382.
- Becker, T., Song, J., & Pfanner, N. (2019). Versatility of Preprotein Transfer from the Cytosol to Mitochondria. *Trends in Cell Biology*, Vol. 29, pp. 534–548.
- Bloss, T. A., Witze, E. S., & Rothman, J. H. (2003). Suppression of CED-3-independent apoptosis by mitochondrial β NAC in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, Vol. 424, pp. 1066–1071.
- 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*, 20(13), 1227–1232.
- Braberg, H., Echeverria, I., Bohn, S., Cimermancic, P., Shiver, A., Alexander, R., ... Krogan, N. J. (2020). Genetic interaction mapping informs integrative structure determination of protein complexes. *Science*, 370(6522).
- Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., & Boeke, J. D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*, 14(2), 115–132.
- Bull, A. L. (1966). Bicaudal, a genetic factor which affects the polarity of the embryo in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Zoology*, 161(2), 221–241.
- Chacinska, A., Koehler, C. M., Milenkovic, D., Lithgow, T., & Pfanner, N. (2009). Importing Mitochondrial Proteins: Machineries and Mechanisms. *Cell*, 138(4), 628–644.
- Chatzi, A., Manganas, P., & Tokatlidis, K. (2016). Oxidative folding in the mitochondrial intermembrane space: A regulated process important for cell physiology and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1863(6Part A), 1298.
- Collart, M. A. (2016). The Ccr4-Not complex is a key regulator of eukaryotic gene expression. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 7(4), 438–454.
- Conant, G. C., & Wolfe, K. H. (2008, diciembre). Turning a hobby into a job: How duplicated genes find new functions. *Nature Reviews Genetics*, Vol. 9, pp. 938–950.
- Cubillos, F. A., Louis, E. J., & Liti, G. (2009). Generation of a large set of genetically tractable haploid and diploid *Saccharomyces* strains. *FEMS Yeast Research*, 9(8), 1217–1225.
- Dacks, J. B., Field, M. C., Buick, R., Eme, L., Gribaldo, S., Roger, A. J., ... Devos, D. P. (2016, octubre 15). The changing view of eukaryogenesis - fossils, cells, lineages and how they all come together. *Journal of Cell Science*, Vol. 129, pp. 3695–3703.
- del Alamo, M., Hogan, D. J., Pechmann, S., Albanese, V., Brown, P. O., & Frydman, J. (2011). Defining the specificity of cotranslationally acting chaperones by systematic analysis of mRNAs associated with ribosome-nascent chain complexes. *PLoS Biology*, 9(7), e1001100.
- den Brave, F., Engelke, J., & Becker, T. (2021). Quality control of protein import into mitochondria. *Biochemical Journal*, Vol. 478, pp. 3125–3143.
- Deng, J. M., & Behringer, R. R. (1995). An insertional mutation in the BTF3 transcription factor gene leads to an early postimplantation lethality in mice.

- Transgenic Research*, 4(4), 264–269.
- Deuerling, E., Gamerding, M., & Kreft, S. G. (2019). Chaperone interactions at the ribosome. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 11(11), a033977.
- Doan, K. N., Grevel, A., Mårtensson, C. U., Ellenrieder, L., Thornton, N., Wenz, L. S., ... Becker, T. (2020). The Mitochondrial Import Complex MIM Functions as Main Translocase for α -Helical Outer Membrane Proteins. *Cell Reports*, 31(4), 107567.
- Dujon, B. A., & Louis, E. J. (2017). Genome diversity and evolution in the budding yeasts (Saccharomycotina). *Genetics*, 206(2), 717–750.
- Endo, T., & Yamano, K. (2010). Transport of proteins across or into the mitochondrial outer membrane. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, Vol. 1803, pp. 706–714.
- Enríquez, J. A. (2016). Supramolecular Organization of Respiratory Complexes. *Annual Review of Physiology*, Vol. 78, pp. 533–561.
- Escalera-Fanjul, X., Quezada, H., Riego-Ruiz, L., & González, A. (2019). Whole-Genome Duplication and Yeast's Fruitful Way of Life. *Trends in Genetics*, Vol. 35, pp. 42–54.
- Fenton, A. R., Jongens, T. A., & Holzbaur, E. L. F. (2021). Mitochondrial dynamics: Shaping and remodeling an organelle network. *Current Opinion in Cell Biology*, Vol. 68, pp. 28–36.
- Finley, D., Ulrich, H. D., Sommer, T., & Kaiser, P. (2012). The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 192(2), 319–360.
- Fischer, M., & Riemer, J. (2013). The mitochondrial disulfide relay system: Roles in oxidative protein folding and beyond. *International Journal of Cell Biology*, Vol. 2013.
- Fox, T. D. (2012). Mitochondrial protein synthesis, import, and assembly. *Genetics*, 192(4), 1203–1234.
- Frank, M., Duvezin-Caubet, S., Koob, S., Occhipinti, A., Jagasia, R., Petcherski, A., ... Reichert, A. S. (2012). Mitophagy is triggered by mild oxidative stress in a mitochondrial fission dependent manner. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1823(12), 2297–2310.
- Franke, J., Reimann, B., Hartmann, E., Köhlerl, M., & Wiedmann, B. (2001). Evidence for a nuclear passage of nascent polypeptide-associated complex subunits in yeast. *Journal of cell science*, 114(Pt 14), 2641–2648.
- 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*, Vol. 392, pp. 13–19.
- Gadir, N., Haim-Vilmovsky, L., Kraut-Cohen, J., & Gerst, J. E. (2011). Localization of mRNAs coding for mitochondrial proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*, 17(8), 1551–1565.
- Gamerding, M., Hanebuth, M. A., Frickey, T., & Deuerling, E. (2015). The principle of antagonism ensures protein targeting specificity at the endoplasmic reticulum. *Science*, 348(6231), 201–207.
- Gamerding, M., Kobayashi, K., Wallisch, A., Kreft, S. G., Sailer, C., Schlömer, R., ... Deuerling, E. (2019). Early Scanning of Nascent Polypeptides inside the Ribosomal Tunnel by NAC. *Molecular Cell*, 75.
- Gemmer, M., & Förster, F. (2020). A clearer picture of the ER translocon complex. *Journal of Cell Science*.
- George, R., Walsh, P., Beddoe, T., & Lithgow, T. (2002). The nascent polypeptide-associated complex (NAC) promotes interaction of ribosomes with the mitochondrial surface in vivo. *FEBS Letters*, 516(1–3), 213–216.
- Gerbeth, C., Schmidt, O., Rao, S., Harbauer, A. B., Mikropoulou, D., Opalinska, M., ... Meisinger, C. (2013). Glucose-induced regulation of protein import receptor tom22 by cytosolic and

- mitochondria-bound kinases. *Cell Metabolism*, 18(4), 578–587.
- Gribbling-Burrer, A. S., Chiabudini, M., Zhang, Y., Qiu, Z., Scazzari, M., Wölfle, T., ... Rospert, S. (2019). A dual role of the ribosome-bound chaperones RAC/Ssb in maintaining the fidelity of translation termination. *Nucleic Acids Research*, 47(13), 7018–7034.
- Habich, M., Salscheider, S. L., & Riemer, J. (2019). Cysteine residues in mitochondrial intermembrane space proteins: more than just import. *British Journal of Pharmacology*, Vol. 176, pp. 514–531.
- Hansen, K. G., Aviram, N., Laborenz, J., Bibi, C., Meyer, M., Spang, A., ... Herrmann, J. M. (2018). An ER surface retrieval pathway safeguards the import of mitochondrial membrane proteins in yeast. *Science*, 361(6407), 1118–1122.
- Hansen, K. G., & Herrmann, J. M. (2019). Transport of Proteins into Mitochondria. *Protein Journal*, 38(3), 330–342.
- Harbauer, A. B., Opalińska, M., Gerbeth, C., Herman, J. S., Rao, S., Schönfisch, B., ... Meisinger, C. (2014). Cell cycle-dependent regulation of mitochondrial preprotein translocase. *Science*, 346(6213), 1109–1113.
- Hartl, F. U., Bracher, A., & Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, 475(7356), 324–332.
- Höhr, A. I. C., Straub, S. P., Warscheid, B., Becker, T., & Wiedemann, N. (2015, enero 1). Assembly of β -barrel proteins in the mitochondrial outer membrane. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, Vol. 1853, pp. 74–88.
- Hu, G. zhen, & Ronne, H. (1994). Yeast BTF3 protein is encoded by duplicated genes and inhibits the expression of some genes in vivo. *Nucleic Acids Research* (Vol. 22).
- Ieva, R., Schrempp, S. G., Opaliński, Ł., Wollweber, F., Höß, P., Heißwolf, A. K., ... VanderLaan, M. (2014). Mgr2 functions as lateral gatekeeper for preprotein sorting in the mitochondrial inner membrane. *Molecular Cell*, 56(5), 641–652.
- Janke, C., Magiera, M. M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., ... Knop, M. (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: New fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast*, 21(11), 947–962.
- Jiang, Y., Cheng, Z., Mandon, E. C., & Gilmore, R. (2008). An interaction between the SRP receptor and the translocon is critical during cotranslational protein translocation. *Journal of Cell Biology*, 180(6), 1149–1161.
- Johnson, J. M., Smith, J. S., & Schneider, D. A. (2014). *Yeast Genetics* (J. S. Smith & D. J. Burke, Eds.).
- Jores, T., Lawatscheck, J., Beke, V., Franz-Wachtel, M., Yunoki, K., Fitzgerald, J. C., ... Rapaport, D. (2018). Cytosolic Hsp70 and Hsp40 chaperones enable the biogenesis of mitochondrial β -barrel proteins. *Journal of Cell Biology*, 217(9), 3091–3108.
- Kayikci, Ö., & Nielsen, J. (2015). Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 15(6), fov068.
- Kemper, C., Habib, S. J., Engl, G., Heckmeyer, P., Dimmer, K. S., & Rapaport, D. (2008). Integration of tail-anchored proteins into the mitochondrial outer membrane does not require any known import components. *Journal of Cell Science*, 121(12), 1990–1998.
- Koplin, A., Preissler, S., Llina, 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. *Journal of Cell Biology*, 189(1), 57–68.
- Kramer, G., Boehringer, D., Ban, N., & Bukau, B. (2009). The ribosome as a platform for co-translational processing, folding and targeting of newly synthesized proteins. *Nature Structural and Molecular Biology*, 16(6), 589–597.
- Kurland, C. G., & Andersson, S. G. E.

- (2000). Origin and Evolution of the Mitochondrial Proteome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 786–820.
- Lane, N. (2014). Bioenergetic constraints on the evolution of complex life. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(5).
- Lanz, M. C., Yugandhar, K., Gupta, S., Sanford, E. J., Faça, V. M., Vega, S., ... Smolka, M. B. (2021). In-depth and 3-dimensional exploration of the budding yeast phosphoproteome. *EMBO reports*, 22(2), e51121.
- Lesnik, C., Cohen, Y., Atir-Lande, A., Schuldiner, M., & Arava, Y. (2014). OM14 is a mitochondrial receptor for cytosolic ribosomes that supports co-translational import into mitochondria. *Nature Communications*, 5.
- Lesnik, C., Golani-Armon, A., & Arava, Y. (2015). Localized translation near the mitochondrial outer membrane: An update. *RNA Biology*, 12(8), 801–809.
- Liu, Y., Hu, Y., Li, X., Niu, L., & Teng, M. (2010). The crystal structure of the human nascent polypeptide-associated complex domain reveals a nucleic acid-binding region on the NACA subunit. *Biochemistry*, 49(13), 2890–2896.
- Marcet-Houben, M., & Gabaldón, T. (2015). Beyond the whole-genome duplication: Phylogenetic evidence for an ancient interspecies hybridization in the baker's yeast lineage. *PLoS Biology*, 13(8), e1002220.
- Masser, A. E., Kang, W., Roy, J., Mohanakrishnan Kaimal, J., Quintana-Cordero, J., Friedländer, M. R., ... André Asson, C. (2019). Cytoplasmic protein misfolding titrates Hsp70 to activate nuclear Hsf1. *eLife*, 8.
- Meier, S., Neupert, W., & Herrmann, J. M. (2005). Proline residues of transmembrane domains determine the sorting of inner membrane proteins in mitochondria. *Journal of Cell Biology*, 170(6), 881–888.
- Miller, J. E., & Reese, J. C. (2012). Ccr4-Not complex: The control freak of eukaryotic cells. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 47, pp. 315–333.
- Mills, D. B. (2020). The origin of phagocytosis in Earth history. *Interface Focus*, 10(4).
- Mirzalieva, O., Jeon, S., Damri, K., Hartke, R., Drwesh, L., Demishtein-Zohary, K., ... Peixoto, P. M. (2019). Deletion of Mgr2p affects the gating behavior of the TIM23 complex. *Frontiers in Physiology*, 10.
- Möller, I., Beatrix, B., Kreibich, G., Sakai, H., Lauring, B., & Wiedmann, M. (1998). Unregulated exposure of the ribosomal M-site caused by NAC depletion results in delivery of non-secretory polypeptides to the Sec61 complex. *FEBS Letters*, 441(1), 1–5.
- Mulkidjanian, A. Y., Galperin, M. Y., & Koonin, E. V. (2009). Co-evolution of primordial membranes and membrane proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, Vol. 34, pp. 206–215.
- Murley, A., & Nunnari, J. (2016). The Emerging Network of Mitochondria-Organelle Contacts. *Molecular Cell*, Vol. 61, pp. 648–653.
- Neupert, W., & Herrmann, J. M. (2007). Translocation of proteins into mitochondria. *Annual Review of Biochemistry*, Vol. 76, pp. 723–749.
- Nyathi, Y., & Pool, M. R. (2015). Analysis of the interplay of protein biogenesis factors at the ribosome exit site reveals new role for NAC. *Journal of Cell Biology*, 210(2), 287–301.
- Ott, A. K., Locher, L., Koch, M., & Deuerling, E. (2015). Functional dissection of the nascent polypeptide-associated complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE*, 10(11), 1–19.
- Ott, M., Amunts, A., & Brown, A. (2016). Organization and Regulation of Mitochondrial Protein Synthesis. *Annual Review of Biochemistry*, 85(1), 77–101.
- Panasenko, O. O., David, F. P. A., & Collart, M. A. (2009). Ribosome association and stability of the nascent polypeptide-associated complex is dependent upon its own ubiquitination. *Genetics*, 181(2),

- 447–460.
- Pfanner, N., Warscheid, B., & Wiedemann, N. (2019). Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 20, pp. 267–284.
- Ponce-Rojas, J. C., Avendaño-Monsalve, M. C., Yañez-Falcón, A. R., Jaimes-Miranda, F., Garay, E., Torres-Quiroz, F., ... Funes, S. (2017). $\alpha\beta'$ -NAC cooperates with Sam37 to mediate early stages of mitochondrial protein import. *FEBS Journal*, 284(5), 814–830.
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 280(13), 13004–13011.
- Priesnitz, C., & Becker, T. (2018). Pathways to balance mitochondrial translation and protein import. *Genes and Development*, Vol. 32, pp. 1285–1296.
- Renthal, R. (2010). Helix insertion into bilayers and the evolution of membrane proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol. 67, pp. 1077–1088.
- Roger, A. J., Muñoz-Gómez, S. A., & Kamikawa, R. (2017). The Origin and Diversification of Mitochondria. *Current Biology*, Vol. 27, pp. R1177–R1192.
- Rosenzweig, R., Nillegoda, N. B., Mayer, M. P., & Bukau, B. (2019). The Hsp70 chaperone network. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
- Samant, R. S., Livingston, C. M., Sontag, E. M., & Frydman, J. (2018). Distinct proteostasis circuits cooperate in nuclear and cytoplasmic protein quality control. *Nature*, 563(7731), 407–411.
- Schmidt, O., Pfanner, N., & Meisinger, C. (2010). Mitochondrial protein import: From proteomics to functional mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 11, pp. 655–667.
- Schneider, A. (2020). Evolution of mitochondrial protein import - Lessons from trypanosomes. *Biological Chemistry*, 401(6–7), 663–676.
- Shen, K., Gamerding, M., Chan, R., Gense, K., Martin, E. M., Sachs, N., ... Deuerling, E. (2019). Dual Role of Ribosome-Binding Domain of NAC as a Potent Suppressor of Protein Aggregation and Aging-Related Proteinopathies. *Molecular Cell*, 74(4), 729–741.e7.
- Song, J., Herrmann, J. M., & Becker, T. (2021). Quality control of the mitochondrial proteome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 22, pp. 54–70.
- Spang, A., Stairs, C. W., Dombrowski, N., Eme, L., Lombard, J., Caceres, E. F., ... Ettema, T. J. G. (2019). Proposal of the reverse flow model for the origin of the eukaryotic cell based on comparative analyses of Asgard archaeal metabolism. *Nature Microbiology*, 4(7), 1138–1148.
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 280(16), 15849–15854.
- 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 (BBA) - Molecular Cell Research*, 1823(7), 1142–1150.
- Swaney, D. L., Beltrao, P., Starita, L., Guo, A., Rush, J., Fields, S., ... Villén, J. (2013). Global analysis of phosphorylation and ubiquitylation cross-talk in protein degradation. *Nature Methods*, 10(7), 676–682.
- Takeda, H., Tsutsumi, A., Nishizawa, T., Lindau, C., Busto, J. V., Wenz, L. S., ... Endo, T. (2021). Mitochondrial sorting and assembly machinery operates by β -barrel switching. *Nature*, 590(7844), 163–169.
- Toth, A., Meyrat, A., Stoldt, S., Santiago, R., Wenzel, D., Jakobs, S., ... Ott, M. (2020). Kinetic coupling of the

- respiratory chain with ATP synthase, but not proton gradients, drives ATP production in cristae membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(5), 2412–2421.
- Vögtle, F. N., Burkhart, J. M., Gonczarowska-Jorge, H., Kücükköse, C., Taskin, A. A., Kopczyński, D., ... Meisinger, C. (2017). Landscape of submitochondrial protein distribution. *Nature Communications*, 8(1), 1–10.
- Vögtle, F. N., Wortelkamp, S., Zahedi, R. P., Becker, D., Leidhold, C., Gevaert, K., ... Meisinger, C. (2009). Global Analysis of the Mitochondrial N-Proteome Identifies a Processing Peptidase Critical for Protein Stability. *Cell*, 139(2), 428–439.
- Wallace, D. C. (2005). A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annual review of genetics*, 39, 359–407.
- Wang, L., Zhang, W., Wang, L., Zhang, X. C., Li, X., & Rao, Z. (2010). Crystal structures of NAC domains of human nascent polypeptide-associated complex (NAC) and its α NAC subunit. *Protein and Cell*, 1(4), 406–416.
- Wasilewski, M., Chojnacka, K., & Chacinska, A. (2017, enero 1). Protein trafficking at the crossroads to mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, Vol. 1864, pp. 125–137.
- Wegrzyn, R. D., Hofmann, D., Merz, F., Nikolay, R., Rauch, T., Graf, C., & Deuring, E. (2006). A conserved motif is prerequisite for the interaction of NAC with ribosomal protein L23 and nascent chains. *Journal of Biological Chemistry*, 281(5), 2847–2857.
- Wiedmann, B., & Prehn, S. (1999). The nascent polypeptide-associated complex (NAC) of yeast functions in the targeting process of ribosomes to the ER membrane. *FEBS Letters*, 458(1), 51–54.
- Wiedmann, B., Sakai, H., Davis, T. A., & Wiedmann, M. (1994). A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature*, 370(6489), 434–440.
- Williams, C. C., Jan, C. H., & Weissman, J. S. (2014). Targeting and plasticity of mitochondrial proteins revealed by proximity-specific ribosome profiling. *Science*, 346(6210), 748–751.
- Yamamoto, H., Itoh, N., Kawano, S., Yatsukawa, Y. I., Momose, T., Makio, T., ... Endo, T. (2011). Dual role of the receptor Tom20 in specificity and efficiency of protein import into mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(1), 91–96.
- Ye, Y., & Rape, M. (2009). Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 10, pp. 755–764.
- 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.