



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

El factor de elongación citosólico Tef4 se encuentra en la mitocondria de *Saccharomyces cerevisiae*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Valeria Vania Pluma Ortiz

TUTORA PRINCIPAL:
Dra. Xóchitl Pérez Martínez
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
Dr. Leonardo Peraza Reyes
[Instituto de Fisiología Celular](#)
Dra. Sobeida Sánchez Nieto
[Facultad de Química, UNAM](#)

Ciudad Universitaria, CD. MX., marzo 2024



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.

Agradecimientos

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 204 oriente del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la asesoría de la Dra. Xóchitl Pérez Martínez.

Se agradece por su enseñanza, apoyo, paciencia y consejos a mi tutora, la doctora Xóchitl Pérez Martínez.

Se agradece por su apoyo y asesoría técnica a la Dra. Yolanda Camacho Villasana del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular en este trabajo.

Se agradece la asesoría, consejos y comentarios a mi comité tutorial conformado por:

Dr. Leonardo Peraza Reyes
Dra. Sobeida Sánchez Nieto

Instituto de Fisiología Celular
Facultad de Química, UNAM

Se agradece a la Dra. Ariann Elizabeth Mendoza Martínez, al Dr. Roberto Coria Ortega y la Dra. María Teresa Lara Ortiz por su asesoría técnica.

Se agradece a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Molecular

Este trabajo fue apoyado por los financiamientos:

PAPIIT: IN202720 y IN223623

Durante los estudios de maestría conté con una beca otorgada con CONAHCYT.

Se agradece el apoyo otorgado por el PAEP para asistir al congreso de la Sociedad Mexicana de Bioquímica XXIII Reunión Bioenergética y Biomembranas.

Contenido

Agradecimientos.....	2
Abreviaturas	5
Resumen	6
Introducción	7
La mitocondria.....	7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudio	7
Morfología mitocondrial.....	8
Importación de proteínas mitocondriales.....	9
Síntesis de proteínas: diferencias entre la traducción mitocondrial y la citosólica.	11
Iniciación.....	11
Elongación	12
Terminación.....	13
Factor de elongación eEF1By.....	13
La estructura de eEF1By	15
Funciones no canónicas de eEF1By	17
Tef4 y la mitocondria.....	18
Justificación	20
Hipótesis.....	22
Objetivo	22
Objetivos particulares.....	22
Metodología	23
Lista de cepas utilizadas en este estudio.....	23
Medios de cultivo	23
Oligonucleótidos utilizados en este estudio.....	24
Anticuerpos utilizados en este estudio	25
Creación de la mutante sencilla $\Delta tef3$ y la doble mutante $\Delta tef3/4$	25
Inmunodetección de Tef4 por medio de inmunorréplica tipo <i>Western Blot</i>	26
Verificación de la localización mitocondrial de Tef4.....	27

Visualización de la red mitocondrial	28
Ensayo de sensibilidad a peróxido de hidrógeno	29
Ensayo de proteinasa K (Modificado de Fujiki y col., 1982).....	29
Predicción de la sub-localización mitocondria de Tef4	30
Predicción de cruces transmebranales de Tef4	30
Análisis de las proteínas que interaccionan física y genéticamente con Tef4	30
Resultados	31
Tef4 se localiza en la superficie de la membran externa mitocondrial.....	31
La delección tanto de Tef4 como de Tef3 no afecta el crecimiento en medios respiratorios	33
La delección de Tef4 no afecta la morfología mitocondrial en comparación con su homóloga en humano	36
Análisis de las proteínas que interaccionan física y genéticamente con Tef4	40
Discusión.....	43
La proteína Tef4 se encuentra en la mitocondria de la levadura <i>S. cerevisiae</i>	43
El dominio Glutación S-Transferasa no actúa en la vía de eliminación del peróxido de hidrógeno en la cepa de laboratorio D273-10b	45
La proteína Tef4 no regula la morfología de la red mitocondrial	46
Conclusiones.....	49
Perspectivas.....	49
Referencias	50
Anexos	62
Anexo 1. Inmunodetección de la proteína Tef4	62
Anexo 2. Plásmido Pvt100U-mtGFP	62
Anexo 3. Alineamiento del DNA genómico del gen TEF4 de las cepas D273-10b y BY4741 con Clustal Omega (Goujon et al., 2010).....	63
Anexo 4. Resultados de los predictores transmembranales DeepTMHMM y DAS	63
Anexo 5. Interacciones genéticas de proteínas mitocondriales con Tef4.	67
Anexo 6. Interacciones físicas de proteínas mitocondriales con Tef4.	71

Abreviaturas

3' UTR	Región 3' no traducida del mRNA
5' UTR	Región 5' no traducida del mRNA
ATP	Adenosín trifosfato
GTP	Guanosín trifosfato
DO _{600nm}	Densidad óptica a 600 nm
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ER	Retículo endoplásmico (<i>Endoplasmic Reticulum</i>)
ERMES	complejo de estructura de encuentro entre el retículo endoplasmático y la mitocondria (ERMES por sus siglas en inglés)
mtDNA	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
nt	Nucleótido
IMM	Membrana interna mitocondrial (<i>inner membrane</i>)
IMS	Espacio intermembranal (<i>intermembrane space</i>)
LSU	Subunidad grande del ribosoma (<i>large subunit</i>)
SSU	Subunidad pequeña del ribosoma (<i>small subunit</i>)
OMM	Membrana externa mitocondrial (<i>outer membrane</i>)
MOS	Superficie de la membrana externa mitocondrial (<i>mitochondrial outer membrane surface</i>)
eEF1	Factor de elongación 1
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	RNA mensajero
tRNA	RNA de transferencia
siRNA	RNA de interferencia (<i>small interference RNA</i>)
RPB	Proteína de unión a RNA
GST	Glutación S-transferasa
GSH	Glutación
O/N	<i>Over night</i>
ET	Extracto total
MC	Extracto de mitocondria cruda
M	Extracto de mitocondria purificada
TOM	Translocasa de la membrana externa (<i>translocase of the outer membrane</i>)
SAM	Maquinaria de clasificación y ensamblaje (<i>Sorting and Assembly Machinery</i>)
MPP	Procesadora de la matriz mitocondrial
TC	Complejo ternario (<i>ternary complex</i>)
PIC	Complejo de preiniciación (<i>preinitiation complex</i>)
PTC	Centro peptidiltransferasa (<i>petidiltransferase center</i>)

Resumen

El factor de elongación eucarionte 1 β (eEF1 β) es parte del factor intercambiador de nucleótidos de guanina eEF1B, perteneciente al complejo de elongación 1 (eEF1), cuya función es entregar aminoácidos a los ribosomas durante la traducción citosólica. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* este factor es codificado por dos genes: *TEF3* y *TEF4*. La delección de ambas isoformas no tiene impacto en la traducción por lo que se sugiere que su principal función es asegurar el andamiaje adecuado de las diferentes subunidades en el complejo eEF1B al interactuar con la subunidad eEF1B α .

En proteomas mitocondriales reportados recientemente se han encontrado diversos factores que canónicamente participan en la traducción citosólica, lo que nos lleva a preguntarnos cuál es su función en el organelo. Uno de estos factores es la isoforma Tef4 (eEF1 β), el cual es objeto de estudio de este trabajo. Su ortólogo en humano, eEF1 β , se ha localizado en mitocondria, siendo su función co-localizar al mRNA de la vimentina para su traducción. Sin embargo, en levadura, aunque esta reportado en diferentes proteomas, aún no se ha confirmado de forma experimental su localización mitocondrial, ni la función que pudiera tener en el organelo.

En este trabajo se confirmó que Tef4 es una proteína mitocondrial que se localiza en la superficie de la membrana externa mitocondrial.

Para conocer la función de Tef3 y Tef4 se evaluó el crecimiento de las mutantes nulas de cada gen y de la doble mutante en medios respiratorios y fermentativos y a diferentes temperaturas. No se encontraron diferencias entre el crecimiento de las tres mutantes y la cepa silvestre isogénica en ambos tipos de fuentes de carbono y a diferentes temperaturas. También se evaluó el efecto de la eliminación de los factores en la morfología mitocondrial, ya que el silenciamiento del ortólogo eEF1 β en humanos genera fragmentación. La morfología mitocondrial en ausencia de Tef3 y Tef4 no se ve significativamente alterada. Finalmente se evaluó la sensibilidad de las mutantes al peróxido de hidrógeno ya que ambos factores presentan un dominio de glutatión-S-transferasa, el cual participa en procesos de protección a agentes xenobióticos. No se encontraron diferencias en el crecimiento de las cepas mutantes y la cepa silvestre en presencia de H₂O₂. Estos datos sugieren que la inactivación de Tef3 y Tef4 no genera efectos drásticos en el crecimiento de la célula. Aunque no se haya encontrado la función de Tef4 en mitocondria, es probable que su papel siga siendo como factor citosólico co-localizado en la superficie mitocondrial.

Introducción

La mitocondria

La mitocondria es en una estructura de doble membrana, con la membrana interna mitocondrial (IMM) y la membrana externa mitocondrial (OMM). El espacio entre ambas membranas se conoce como espacio intermembranal (IMS), y el espacio acuoso rodeado por la IMM se denomina matriz mitocondrial. En la IMM se encuentran los complejos respiratorios necesarios para la producción de adenosín trifosfato (ATP) mediante la fosforilación oxidativa (Fox, 2012).

Anteriormente se creía que la mitocondria era un organelo prácticamente independiente de la célula y su principal función era proporcionar energía en forma de ATP, mediante la fosforilación oxidativa (Pagliarini & Rutter, 2013). Sin embargo, se ha descubierto que la mitocondria establece una amplia comunicación con el resto de la célula. Además de su participación en diversas rutas metabólicas, como el ciclo de Krebs, la β -oxidación y la síntesis de hemo y fosfolípidos, la mitocondria desempeña un papel relevante en procesos de señalización y apoptosis (McBride et al., 2006).

Saccharomyces cerevisiae como modelo de estudio

Saccharomyces cerevisiae es una levadura ampliamente utilizada como modelo de estudio en el ámbito de la investigación. El cultivo de *S. cerevisiae* presenta ventajas significativas en comparación con otros modelos, debido a su bajo costo y su rápida duplicación, lo que permite obtener biomasa fácilmente para llevar a cabo diversos experimentos. Al ser una levadura anaerobia facultativa, tiene la capacidad de generar energía a través de la fermentación de diversas fuentes de carbono, así como mediante la fosforilación oxidativa. Esta característica implica que solo unos pocos genes que codifican para proteínas mitocondriales son esenciales para la supervivencia de la levadura, lo que facilita la creación de mutantes *knock-out* y el estudio de diferentes genes mitocondriales (Altmann et al., 2007). Además, *S. cerevisiae* es la única especie en la que se puede modificar de manera altamente controlada el DNA mitocondrial mediante técnicas basadas en la recombinación homóloga (Bonney & Fox, 2007).

Además, se ha estimado que más del 31 % de los genes humanos asociados a enfermedades tienen un homólogo presente en *S. cerevisiae* (Foury, 1997). Esto convierte a esta levadura en un modelo de estudio representativo y extrapolable, hasta cierto punto, a otros organismos eucariontes, lo que proporciona una valiosa herramienta para investigar y comprender los mecanismos subyacentes de diversas enfermedades humanas.

Morfología mitocondrial

La mitocondria no es un organelo aislado, sino que forma una red mitocondrial cuya morfología se regula mediante procesos de motilidad, fusión y fisión (McBride et al., 2006). Estos eventos son esenciales para una adecuada segregación del DNA mitocondrial (mtDNA) y, por lo tanto, para una correcta biogénesis y homeostasis mitocondrial (Aretz et al., 2020).

La mitocondria adopta una red tubular que se extiende por todo el citoplasma. Sin embargo, esta distribución no es azarosa, lo que asegura que todas las mitocondrias sean suplementadas de forma eficiente con las proteínas sintetizadas en mitocondria y citosol, así como el mtRNA y mtDNA (Aretz et al., 2020)

La fusión mitocondrial depende de dos proteínas con dominios GTPasas, la primera en la membrana externa de la mitocondria, Fzo1 y la segunda anclada a la membrana interna mitocondrial, Mgm1. Estas proteínas interactúan físicamente con Ugo1, proteína de la membrana externa mitocondrial, la cual es esencial para la fusión mitocondrial. Dado a que Ugo1 pertenece a una familia transportadora de ácidos grasos a través de membrana, se cree que su función es la de facilitar la fusión de los lípidos en el sitio de fusión (Aretz et al., 2020; Labbé et al., 2014).

Durante la fisión mitocondrial, las GTPasas citosólicas, Dnm1 en levadura, son reclutadas a la mitocondria donde forman complejos homomultiméricos que envuelven sitios de corte y provocan constricción. Por otra parte, se ha visto que se requieren sitios de contacto con el retículo endoplásmico, para que se realice la fisión. Estos sitios están formados por el complejo ERMES (*Endoplasmatic Reticulum Mitochondria Encounter Structure*), el cual consta de dos proteínas mitocondriales: Mdm10 y Mdm34. Una proteína citosólica, Mdm12 y una anclada a retículo endoplásmico, Mmm1 (Aretz et al., 2020). La proteína que regula al complejo ERMES es Gem1 y se ha visto que su delección forma estadios intermedios de la fusión, por lo que se sugiere que su función es necesaria para la resolución eficiente de las puntas mitocondriales recién formadas (Aretz et al., 2020; Labbé et al., 2014).

Al ser un proceso dinámico, las redes mitocondriales pueden sufrir fragmentación por diversos factores como: pérdida del potencial de membrana, decremento de la respiración, cambios en el metabolismo y aumento en la formación de especies reactivas de oxígeno (Ježek et al., 2018)

La fisión mitocondrial puede ser un paso previo a la mitofagia (autofagia selectiva para mitocondrias), la cual ayuda a eliminar a las mitocondrias excedentes o dañadas y así

previene una producción excesiva de ROS, lo que contribuye a una correcta homeostasis mitocondrial (Innokentev & Kanki, 2021)

Importación de proteínas mitocondriales

Aunque el genoma mitocondrial de levadura codifica únicamente para ocho proteínas, se han encontrado alrededor de 1000 proteínas en los proteomas mitocondriales (Flores-Mireles et al., 2023; Reinders et al., 2006; Renvoisé et al., 2014; Schulte et al., 2023a; Sickmann et al., 2003). Esto se debe a que la mayoría de las proteínas son sintetizadas en el citosol e importadas a la mitocondria.

La expresión de los genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales comienza con la transcripción de los RNA mensajeros (mRNA). La síntesis de estas proteínas puede ocurrir tanto en polisomas asociados a la mitocondria como en polisomas libres (Fox, 2012).

Se ha descubierto que la proteína periférica de la membrana externa mitocondrial (OMM), Puf3, es una proteína de unión al RNA (RBP) que se asocia con regiones 3'UTR de los mRNA mediante su dominio homólogo pumilio. Puf3 tiende a unirse principalmente a los transcritos de genes mitocondriales (Gerber et al., 2004). En condiciones fermentativas, cuando se une a la región 3'UTR, Puf3 promueve la deadenilación del mRNA, evitando así la síntesis de estos transcritos (Lapointe et al., 2015; Lee & Tu, 2015; Wang et al., 2019). Por otro lado, en condiciones respiratorias, Puf3 se asocia con los polisomas y estimula la traducción de ciertos mRNA al colocarlos en proximidad de la mitocondria, gracias a la asociación mencionada anteriormente (García-Rodríguez et al., 2007; Schatton & Rugarli, 2018). Se cree que este mecanismo compartido no es excluyente y podría estar mediado por la subunidad Tom20 del complejo de translocasa externa mitocondrial (TOM)(Eliyahu et al., 2010).

Después de ser traducidas, las proteínas mitocondriales son guiadas por chaperonas citosólicas hacia el complejo TOM (translocasa de la membrana externa) o pueden ser co-traducidas e importadas directamente a través del complejo TOM. Estas proteínas se importan a través del canal del complejo TOM, el cual es formado por la subunidad Tom40, hacia el espacio intermembranal (IMS) de la mitocondria. Una vez en el espacio intermembrana, el procesamiento de las proteínas importadas varía dependiendo del tipo de proteína (Qiu et al., 2013).

La mayoría de las proteínas que se importan a la mitocondria contienen una presecuencia en el amino terminal, la cual actúa como una señal para que los precursores proteicos se dirijan a la mitocondria. Una vez que los precursores ingresan a la matriz mitocondria, esta

presecuencia se escinde generalmente mediante la acción de la peptidasa procesadora de la matriz mitocondrial (MPP), antes de adquirir su conformación final (Busch et al., 2023).

Otra vía de importación es la utilizada por los metabolitos acarreadores hidrofóbicos y las proteínas de membrana interna mitocondrial. Estas proteínas cuentan con elementos internos, los cuales tienen secuencias cargadas positivamente y residuos hidrofóbicos. Estos elementos son reconocidos, después de entrar por el complejo TOM, por las chaperonas conocidas como pequeñas proteínas TIM, las cuales guían a los precursores al espacio intermembranal, donde son aceptados por TIM22 e insertados a la membrana interna mitocondrial (Busch et al., 2023; Eaglesfield & Tokatlidis, 2021a).

Por otra parte, las proteínas del espacio intermembranal contienen motivos de cisteínas, los cuales entran a través del complejo TOM en su forma reducida. Al llegar al espacio intermembranal forman un puente disulfuro transitorio con la subunidad oxido-reductasa Mia40, proteína que funciona como un receptor del espacio intermembranal y la cual es el componente esencial del complejo MIA, que se encarga de oxidar a las proteínas importadas (Busch et al., 2023; Eaglesfield & Tokatlidis, 2021a)

Si la proteína a importar tiene una conformación barril β , sus precursores igualmente son ingresados mediante el complejo TOM, para después ser asistidos por las pequeñas chaperonas Tim hacia la maquinaria de clasificación y ensamblaje (SAM por sus siglas en inglés). El complejo SAM ayuda en el plegamiento y la integración de las proteínas barril β a la OMM (Busch et al., 2023; Ellenrieder et al., 2017; Kundu & Pasrija, 2020)

Existen proteínas localizadas en la superficie de la mitocondria que actúan como un sistema de control de calidad de proteínas mitocondriales a ser importadas. El sistema ubiquitina-proteasoma juega un papel central en la degradación de las proteínas con algún defecto. Por ejemplo, si la proteína no se encuentra desplegada antes de la importación, su paso a través del canal de TOM se bloquea, por lo que la proteína no puede ser importada y por ende entra en la vía de degradación. La mayoría de las proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo, son importadas de manera postraducciona, siendo que las chaperonas Hsp70 y Hsp90 guían a los precursores proteicos del ribosoma a la superficie mitocondrial para que sean reconocidas por la subunidad Tom70 (den Brave et al., 2021; Schulte et al., 2023a)

Además de las secuencias ya antes mencionadas que dirigen a las proteínas a la mitocondria, se han identificado codones de inicio no canónicos que dirigen ciertas proteínas hacia la mitocondria. Estos codones de inicio no canónicos pueden ubicarse río arriba o río abajo del codón de inicio estándar, y algunos conservan el codón AUG, mientras que otros solo difieren por una letra (*CTG*, *TTG*, *GTG*, *ACG*, *ATC*, *ATA* y *ATT*). Además, algunos de estos codones de inicio no canónicos confieren a la proteína una presecuencia

mitocondrial, mientras que otras proteínas no contienen señales reconocibles que las dirijan a la mitocondria (Monteuuis et al., 2019).

Síntesis de proteínas: diferencias entre la traducción mitocondrial y la citosólica.

Debido al origen endosimbionte de las mitocondrias, la maquinaria de traducción en este organelo presenta similitudes con el sistema bacteriano y diferencias significativas con la maquinaria de traducción citosólica. Una de las principales diferencias entre la síntesis de proteínas en citosol y en la mitocondria, es el uso de codones, del cual se han encontrado al menos 27 diferencias con respecto al código genético universal en el sistema de traducción mitocondrial de diversos eucariontes (García-Guerrero et al., 2016) Sin embargo, en ambos compartimentos la síntesis de proteínas mitocondriales ocurre en tres etapas distintas: iniciación, elongación y terminación (García-Guerrero et al., 2016; Kummer & Ban, 2021; Ott et al., 2016).

Iniciación

La primera diferencia importante entre la traducción citosólica y mitocondrial se da en cómo el ribosoma reconoce el codón de inicio. Los ribosomas citosólicos se unen al mRNA en la región 5' UTR y escanean en dirección 3', inspeccionando el mRNA en busca del codón de inicio AUG. Aunque en la traducción en mamíferos, el contexto Kozak es relevante para identificar el codón de inicio, en levadura, parece tener menos relevancia (Dever et al., 2016). En las mitocondrias de levadura, la interacción entre el mRNA y los activadores traduccionales ayudan a que se inicie la traducción (Dennerlein et al., 2017; Kummer & Ban, 2021; Priesnitz & Becker, 2018). Estos activadores traduccionales presentan diferentes mecanismos, algunos promueven la traducción de los mRNA mitocondriales al unirse a su región 5' UTR, mientras que otros estabilizan el transcrito o interactúan con el ribosoma (Dennerlein et al., 2017; Kummer & Ban, 2021; Priesnitz & Becker, 2018)

Al inicio, el mRNA está unido a la subunidad pequeña del ribosoma (SSU), y el codón de inicio es reconocido por el tRNA de inicio en el sitio P del ribosoma. En la mitocondria este tRNA acarrea una metionina formilada (fMet-tRNA^{Met}), a diferencia de la traducción citosólica donde el tRNA utiliza una metionina sin ninguna modificación (Dever et al., 2016; García-Guerrero et al., 2016). Los factores de iniciación involucrados en esta etapa en la traducción mitocondrial son Ifm1 y Aim23, mientras que en la traducción citosólica existen 11 diferentes factores de inicio codificados por 24 genes (Dever et al., 2016; García-Guerrero et al., 2016). Ifm1, posee actividad GTPasa, forma un complejo con el formil metionina-tRNA y facilita su unión a la SSU en el sitio P, donde se reconoce el codón de inicio. Aim23, por otro lado, disocia el ribosoma en sus subunidades LSU y SSU. Luego de

que el codón de inicio es reconocido, las subunidades ribosomales se vuelven a asociar, se hidroliza el GTP unido a If2mt y los factores de iniciación se disocian (Fox, 2012; Kummer & Ban, 2021; Ott et al., 2016). En cuanto a la traducción citosólica en levadura, para que inicie la traducción, primero el factor eIF2 se une a GTP y al Met-tRNA_i^{met}, formando un complejo ternario (TC), que se asocia con la subunidad ribosomal 40S, junto con los factores eIF1, eIF1A, eIF3 y posiblemente eIF5, para formar el complejo de preiniciación 43S (PIC). Por otra parte, la familia de factores eIF4 prepara al mRNA para asociarse con el complejo 43S PIC y así formar el complejo 48S PIC. El siguiente paso es el escaneo del codón de inicio, que va acompañado de la hidrólisis de GTP por parte del factor eIF2 y la liberación de los factores de inicio. Finalmente, el factor eIF5B promueve la unión de la subunidad 60S para formar el ribosoma 80S. Una vez que ambas subunidades se unen, se hidroliza el GTP por parte del factor eIF5B, lo que provoca la liberación de este factor del monosoma 80S (Dever et al., 2016).

Elongación

Durante esta etapa, la cadena polipeptídica se elonga hasta que el ribosoma reconoce el codón de termino. Esta etapa consiste en ciclos de tres pasos y es el paso más conservado de la traducción entre citosol y mitocondrias (García-Guerrero et al., 2016):

- a) Correcto apareamiento del codón del mRNA, con el aminoacil tRNA (decodificación)
- b) Formación del enlace peptídico catalizada por el centro peptidiltransferasa (PTC), presente en la subunidad grande del ribosoma.
- c) Translocación del peptidil-tRNA al sitio P

En la mitocondria, para que un nuevo aminoacil-tRNA (aa-tRNA) pueda ingresar al sitio A, este debe estar asociado al factor de elongación Tuf1 (eEF1A en citosol), que se une a GTP y actúa como una GTPasa. Este complejo se une al sitio A del ribosoma y, si hay afinidad de unión, se producen cambios conformacionales que activan la GTPasa, liberando al factor de elongación Tuf1-GDP (eEF1A-GDP) y permitiendo al aa-tRNA su localización en el sitio A. Cuando el extremo aminoacil del tRNA del sitio A ingresa al PTC, la formación del enlace peptídico ocurre rápida y espontáneamente. Formándose un estado híbrido P/E y A/P con los extremos aceptores de los tRNA en los sitios E y P, mientras que los bucles de los anticodones permanecen en los sitios P y A respectivamente. Por lo que para que la elongación continúe, el tRNA desacilado P al sitio E para que eventualmente sea expulsado del ribosoma, mientras que el peptidil-tRNA tiene que moverse del sitio A al sitio P. Para esto el factor Mef1-GTP (eEF2-GTP) promueve la translocación al hidrolizar al GTP, dejando el sitio A libre y expulsando al tRNA desacilado. Mientras que el factor Tuf1 se recicla para

entrar en una nueva ronda de traducción al regenerar el GTP. (Dever et al., 2016; Kummer & Ban, 2021; Ott et al., 2016; Ramakrishnan, 2002).

Terminación

La etapa de terminación en la traducción, tanto citosólica como mitocondrial, comienza cuando se encuentra un codón de terminación. En levadura, este proceso implica la participación de un factor de liberación llamado Mrf1 en mitocondria. En cambio, en citosol el factor liberación es eRF1, el cual se une al ribosoma junto con el factor eRF3. La interacción entre ambos factores es crítica para el reconocimiento del codón de término, siendo la hidrólisis del GTP por parte del factor eRF3 lo que facilita la identificación del codón de término, así como la liberación del péptido. Una vez que se hidroliza el GTP, eRF3 se disocia dejando al factor eRF1 en el sitio A (Dever et al., 2016; García-Guerrero et al., 2016; Ott et al., 2016).

Una vez que el codón de terminación es reconocido, se libera el polipéptido recién sintetizado. En este punto, el ribosoma se convierte en un sustrato para los factores de reciclaje Rrf1 y Mef2 en mitocondria. Estos factores se encargan de separar las subunidades ribosomales para que puedan volver a entrar en el ciclo de traducción y participar en la síntesis de nuevas proteínas (García-Guerrero et al., 2016; Ott et al., 2016). En tanto que en citosol el factor que promueve la separación de las subunidades ribosomales es Rli1 (Dever et al., 2016)

Factor de elongación eEF1B γ

En la elongación citosólica participa el complejo factor de elongación 1 (eEF1). En *S. cerevisiae*, el complejo consta de dos unidades: el factor de elongación 1A (eEF1A) y el factor de elongación 1B (eEF1B) el cual se subdivide en las subunidades α y γ . La subunidad eEF1A, cuando está unida a GTP, se asocia y entrega tRNA al sitio A del ribosoma. Si la unión codón-anticodón es correcta, ocurre un cambio conformacional en el ribosoma y esto da paso a la hidrólisis del GTP, por lo que se libera eEF1A-GDP (Figura 1) (Sasikumar et al., 2012). Se sabe que el dominio carboxilo terminal de la subunidad eEF1B α está involucrada en la unión eEF1A-GTP y su actividad de intercambio de nucleótidos de guanina (Jeppesen et al., 2003). Por otra parte, el dominio amino terminal de eEF1B α se une fuertemente a la interfase de la proteína estructural eEF1B γ . Dado que la delección de eEF1B γ no es letal, al contrario de lo que se observa en la delección de eEF1A y eEF1B α , se cree que esta subunidad tiene una función únicamente estructural (Olaewaju et al., 2004; Sasikumar et al., 2012). Se ha sugerido que la subunidad γ mejora la velocidad de recambio de los nucleótidos de guanina en humanos (Trosiuk et al., 2016). Este último factor, eEF1B γ (codificado por los genes *TEF3* y *TEF4*), es el objeto de estudio de esta tesis. Para el

desarrollo de este estudio, se trabajó con ambas proteínas, por lo que de ahora en adelante para referirnos al factor eEF1By, se utilizará la nomenclatura Tef3 o Tef4.

Tef4, tiene una isoforma en levadura denominada Tef3 (Toss Kinzy et al., 1994). Se sabe que ambas isoformas se expresan en condiciones normales, ambas tienen la capacidad de unirse a eEF1B α , y si un gen es eliminado, el otro continúa expresándose. Por otra parte, no se ha visto que las isoformas interactúen entre ellas (Gavin et al., 2002a; Olarewaju et al., 2004). Sin embargo, se ha propuesto que cada isoforma interactúa consigo misma formando homodímeros, dimerizando al complejo eEF1 (Jeppesen et al., 2003)

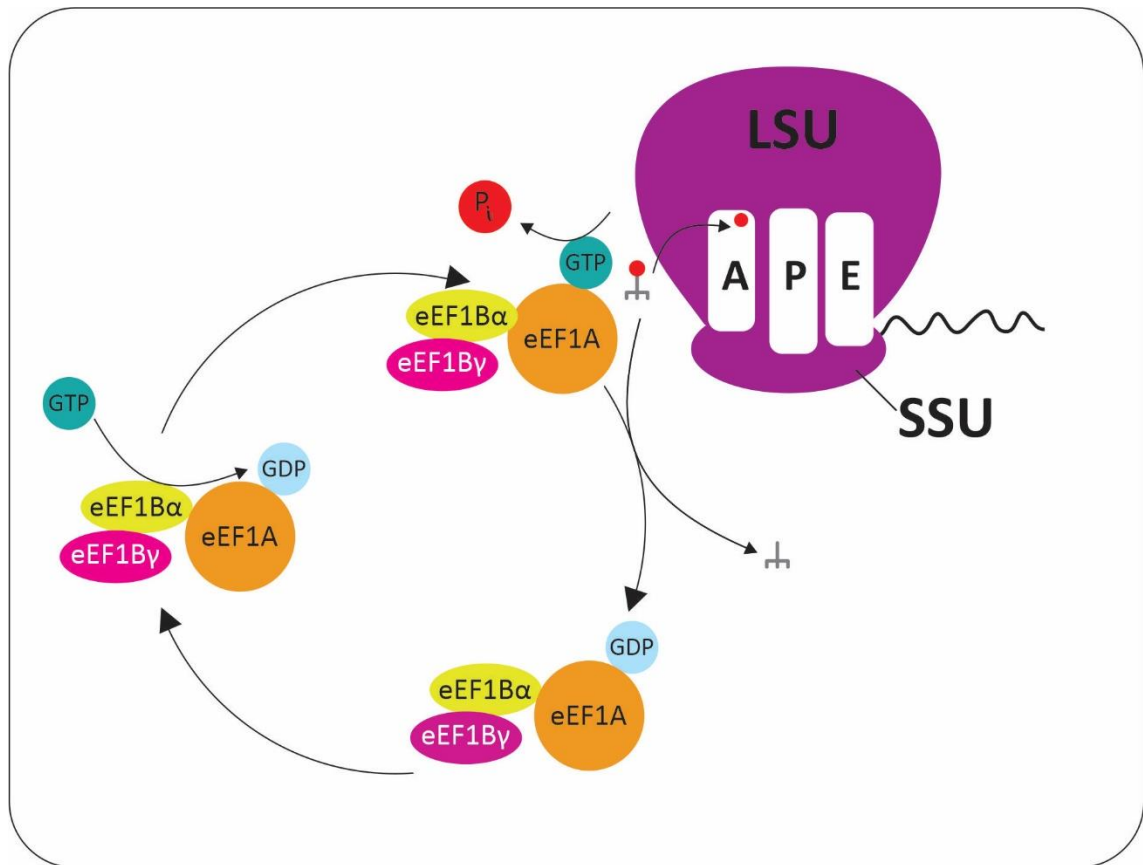


Figura 1. Primer paso de la elongación: función del complejo eEF1. El complejo de elongación eucariótico consta de dos subunidades, la eEF1A y eEF1B (eEF1B α y eEF1B γ). La subunidad eEF1A se asocia y entrega los tRNA (círculo rojo) al sitio A del ribosoma. Cuando la asociación entre codón y anti-codón es correcta ocurre un cambio conformacional en el ribosoma, lo que da paso a la hidrólisis del GTP a GDP, dando como resultado un fosfato inorgánico (Pi). El complejo eEF1B, en específico la subunidad eEF1B α intercambia GTP por GDP.

La estructura de eEF1By

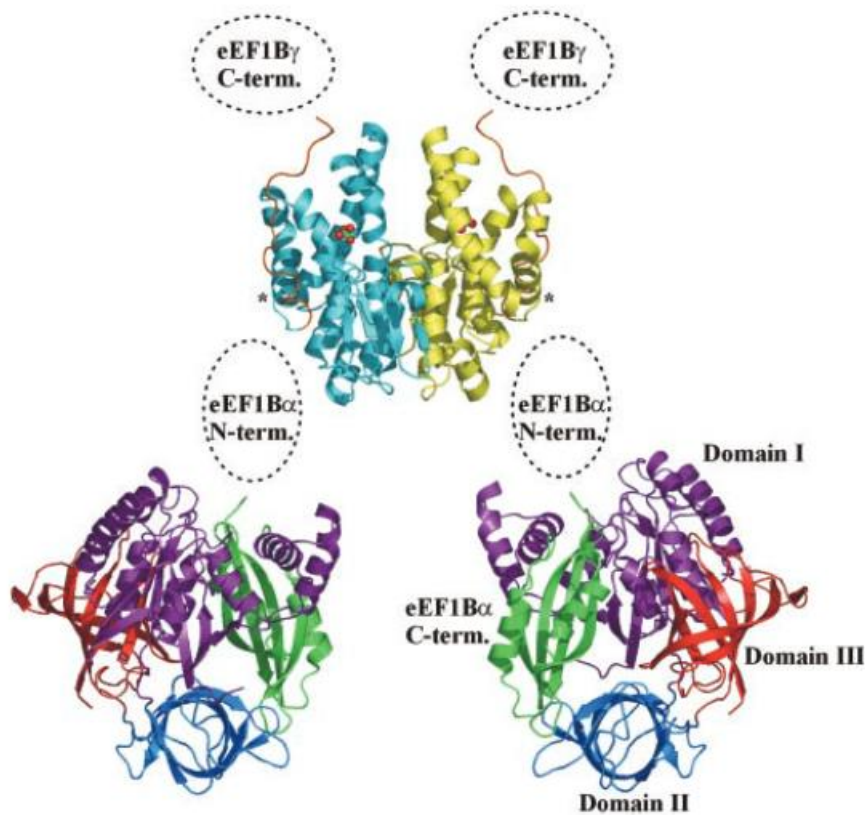


Figura 2. Modelo hipotético de eEF1 en levadura basado en estudios estructurales y experimentos de filtración en gel. Se propone que las tres subunidades eEF1A, eEF1B α y eEF1B γ (Tef3) constituyen un complejo de la forma [eEF1A · eEF1B α · eEF1B γ]₂. Se cree que EF1A (no se muestra en la figura) está unido con el carboxilo terminal de eEF1B α de *S. cerevisiae*, el cual se muestra en la parte inferior. El dominio de unión a nucleótidos I (púrpura) de eEF1A y el dominio II (azul) interactúan con el carboxilo terminal de eEF1B α (verde). El dominio III de eEF1A aparece rojo. El dominio similar a GST de eEF1B γ , codificado por el gen *TEF3*, se postula que media la dimerización del complejo. El sitio que se sugiere que interactúa eEF1B α con eEF1B γ , está marcado con asteriscos. Imagen tomada y pie de figura tomados de (Jeppesen et al., 2003)

Se ha propuesto un modelo hipotético en levadura del complejo eEF1, donde las tres subunidades eEF1A, eEF1B α y eEF1B γ forman un complejo dimérico de la forma [eEF1A · eEF1B α · eEF1B γ]₂, donde la región amino terminal de la subunidad α interactúa con la región amino terminal de la subunidad γ . Siendo esta última la que dimeriza al complejo (Jeppesen et al., 2003) (Figura 2). El dominio carboxilo terminal consiste en una conformación α/β que frecuentemente se encuentra en proteínas ribosomales y otros factores de elongación (Renou et al., 2022) y no presenta cruces transmembranales.

Sin embargo, se ha postulado que la subunidad γ en humanos es la responsable de anclarse a la membrana del retículo endoplásmico mediante el dominio carboxilo terminal,

colocalizando la traducción de proteínas membranales y haciendo más eficiente su traducción (Achilonu et al., 2018; Sanders et al., 1996; Sasikumar et al., 2012)

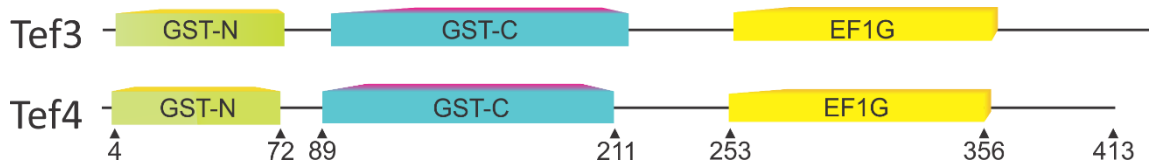


Figura 3. Dominios de las proteínas Tef3 y Tef4. Ambas proteínas son isoformas del factor de elongación eEF1By. Poseen un dominio glutatión S-transferasa (GST) amino (N) y carboxilo en su región amino terminal y un dominio del factor de elongación G en su carboxilo terminal. Para más detalles leer el texto. Search ID: QM3-qcdsearch-12FDCB819B0C98DA

La estructura obtenida por cristalografía de rayos X del amino terminal (219 residuos; dominio 1) del eEF1By codificada por el gen *TEF3*, tiene un dominio similar al de las enzimas glutatión S-transferasa (GST) (Figura 3). Las enzimas GST catalizan la adición nucleofílica del tripéptido glutatión (GSH) a compuestos electrófilos, los cuales son típicamente sustancias tóxicas para la célula, como las ROS (Bchini et al., 2021; Silverman, 2002). Entre las diversas clases de GST, se destaca la clase θ , que presenta un residuo de serina en su sitio activo, crucial para la estabilización del grupo tiol del GSH mediante un puente de hidrógeno (Board et al., 1995; Rossjohn et al., 1998). La isoforma codificada por el gen *TEF3* carece de este aminoácido, mientras que la isoforma codificada por el gen *TEF4* lo posee en la posición número once. Esta observación ha llevado a la hipótesis de que la subunidad y podría tener una función catalítica en la detoxificación celular. Los estudios *in vitro* utilizando proteínas recombinantes de eEF1By de arroz y humano (hseEF1By) han demostrado actividad catalítica (Achilonu et al., 2014; Kobayashi et al., 2001). Sin embargo, la isoforma recombinante de *S. cerevisiae* codificada por el gen *TEF3*, no exhibe actividad catalítica de GST (Jeppesen et al., 2003). Es posible que, la actividad catalítica únicamente sea presentada por la isoforma codificada por el gen *TEF4*, ya que, en ensayos de sensibilidad a peróxido y arsénico, se ha demostrado que la mutante nula $\Delta tef4$, a diferencia de la mutante $\Delta tef3$, es sensible a estos compuestos (Todorova et al., 2007).

Por otra parte, el dominio glutatión S-transferasa está ampliamente conservado en hongos, así como en humano (Figura 4), por lo que se ha propuesto que la actividad GST tiene una función regulatoria en respuesta al estrés oxidativo en la traducción. Además de que la delección de los genes *TEF3* y *TEF4* en *S. cerevisiae* conlleva a la acumulación de proteínas oxidadas, presentando defectos en la degradación de proteínas al someterlas a estrés oxidativo (Esposito & Kinzy, 2010a; Grant, 2011; Renou et al., 2022).

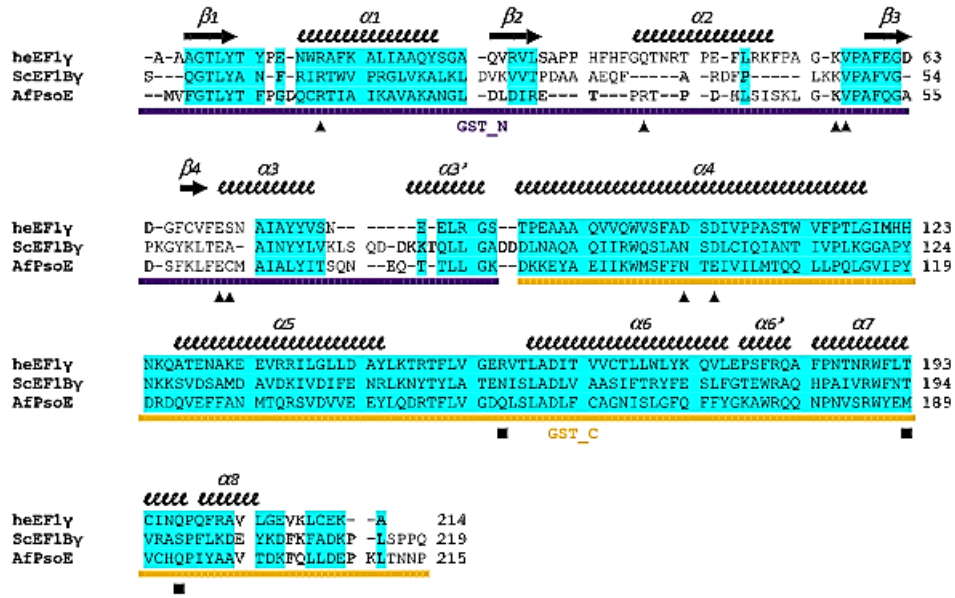


Figura 4. Alineamiento del extremo amino terminal de eEF1By de humano (heEF1γ), de *S. cerevisiae* (Tef3; ScEF1By) y *Aspergillus fumigatus* (AfPsoE). Se muestran las estructuras secundarias usando flechas (hojas β) y garabatos (hélices). Las regiones comunes se muestran en azul. Los residuos involucrados en la unión con glutatión se marcan con cabezas de flecha. Los residuos que participan en la estabilización del heterocomplejo eEF1Bγ-eEF1Bα se señalan con cuadrados. Además, se distingue la región GST amino (GST_N) y la región GST carboxilo (GST_C). Imagen tomada de (Renou et al., 2022)

Por último, se sabe que ambos genes se expresan globalmente de forma abundante y de igual manera en condiciones normales (Olarewaju et al., 2004; Renou et al., 2022). En condiciones de estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno (0.2 mM), ambas subunidades disminuyen su eficiencia de traducción. Lo que podría implicar que en condiciones de estrés la traducción se está inhibiendo y por ende la expresión de estos factores de traducción.

Funciones no canónicas de eEF1By

Se han descubierto funciones no convencionales en los ortólogos de la proteína eEF1By en otros organismos. Por ejemplo, en células humanas, se ha encontrado que se asocia con regiones no codificantes en el extremo 3'UTR de diversos genes relacionados con el ciclo celular, como Che-1 y p53 en células HeLa (Pisani et al., 2016). Además, se ha observado su unión a mRNA de proteínas estructurales como la vimentina (Vim) en fibroblastos humanos (Al-Maghrebi et al., 2002). También se ha observado su asociación con regiones promotoras de los genes Vim, Che-1 y Tp53 (Pisani et al., 2016). Es importante destacar que la sobreexpresión de la proteína eEF1By en células humanas ha demostrado causar tumores (Lew et al., 1992; Mimori et al., 1995; Veremieva et al., 2014) y se ha relacionado

con diferentes tipos de cáncer como en el cáncer colorrectal metastásico hepático. Además del fenotipo previamente mencionado, la doble mutante $\Delta tef3/4$ en levadura, presenta un defecto en el recambio proteico, así como en la formación de vesículas para la degradación de proteínas (Esposito & Kinzy, 2010b).

También, se ha demostrado que las subunidades del complejo eEF1B se asocian al citoesqueleto (S. Kim & Coulombe, 2010). En particular, se ha visto que eEF1By se asocia al filamento intermedio de queratina mediante una región rica en lisina –tanto *in vivo* como *in vitro* – en células (S. Kim et al., 2007). El silenciamiento de eEF1By aumenta la fracción 80S sin alterar el perfil polirribosomal, lo cual sugiere que hay un cambio en el inicio de la traducción y no en la elongación. Lo que indica que hay una conexión significativa entre la queratina y la maquinaria traduccional, aunque aún no se comprende por completo cómo es que interaccionan (S. Kim et al., 2007).

Por último, en la levadura *S. cerevisiae* se forman gránulos en diferentes condiciones de estrés. Esto con el objetivo de inhibir la traducción y así ahorrar energía que se utiliza para enfrentar condiciones adversas como es el estrés por temperatura. Inicialmente se consideraba que los gránulos de estrés únicamente estaban conformados por factores de inicio de la traducción, sin embargo, se han demostrado que también están constituidos por factores de terminación y de elongación de la traducción. Entre ellos se destacan los factores de terminación eRF3 y eRF1, y el factor de elongación Tef4 (eEF1By), el cual es el objeto de estudio de esta tesis (Grousl et al., 2013).

Tef4 y la mitocondria

La proteína eEF1By se ha encontrado asociada a diversas proteínas de la membrana externa mitocondrial a través de ensayos de proteómica (Figura 5). Por ejemplo, se ha observado su asociación con el complejo SAM (Qiu et al., 2013), que desempeña un papel en el ensamblaje de proteínas barril β en la membrana externa de la mitocondria. El mRNA de Tef4 se ha encontrado asociado a la proteína Puf3 en ensayos de escala masiva (Freeberg et al., 2013). Puf3 es una proteína de unión a RNA, la cual interacciona con la región 3'UTR de los RNA mensajeros para facilitar su traducción e importación a la mitocondria. Además, tiene una interacción genética negativa con la proteína Mdm10 (Usaj et al., 2017), que forma parte del complejo ERMES (sitio de contacto entre la mitocondria y el retículo endoplásmico).

En un experimento de doble híbrido, se ha detectado la asociación de eEF1By con el factor de elongación EF-Tu, que es el ortólogo del complejo de elongación traduccional eEF1 en la mitocondria (Olareswaju et al., 2004). Adicionalmente, en el proteoma reportado por (Schulte et al., 2023a), ambas proteínas comigran en el mismo peso. En estudios realizados

en humanos, se ha observado que la inhibición del factor de elongación 1B γ (heEF1B γ) mediante un RNA de interferencia (siRNA), conduce a una red mitocondrial con un fenotipo fragmentado (Pisani et al., 2016). Y mediante microscopía de fluorescencia, se ha observado que heEF1B γ colocaliza con la mitocondria (Corbi et al., 2010)

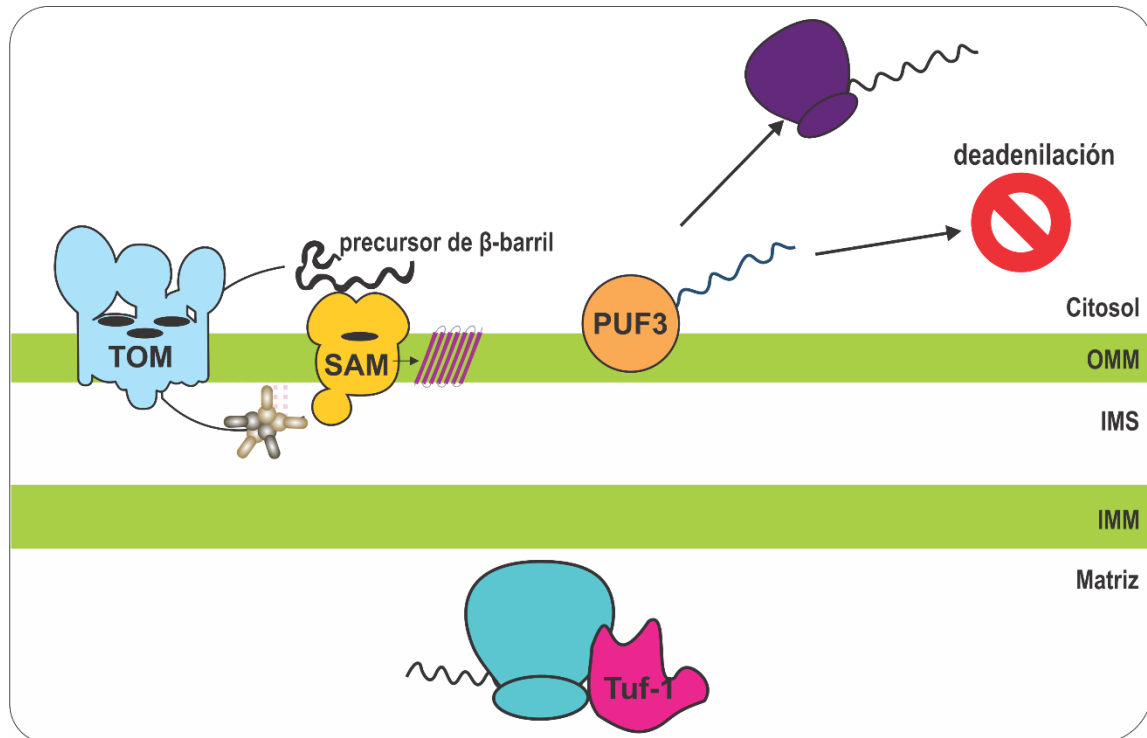


Figura 5. Proteínas mitocondriales con las que interactúa Tef4. La proteína Tef4 (no aparece en la figura) interactúa físicamente con la subunidad Sam50 del complejo SAM y con el factor de elongación traduccional mitocondrial Tuf1, mientras que el mRNA de Tef4 interactúa con la proteína de unión a RNA, Puf3, cuya función está involucrada en la biogénesis mitocondrial. Para más información leer el texto.

En *S. cerevisiae*, la proteína Tef4, y no su isoforma Tef3, se encuentra reportada en diversos proteomas mitocondriales derivados de experimentos utilizando diferentes fuentes de carbono y cepas de laboratorio (Tabla 1). De manera adicional, se ha reportado que Tef4 mantiene una expresión constitutiva, sin cambios en su nivel de abundancia, tanto en glucosa (medio fermentativo), galactosa (fermentativo sin represión de la biogénesis mitocondrial) y lactato (medio respiratorio) (Renvoisé et al., 2014).

En cuanto a la correlación que nos muestran los proteomas, Tef4 parece estar comigrando en mitocondria con Msf1, la cual es una fenilalanina aminoacil-tRNA sintetasa mitocondrial; con Tef1 y Tef2, parálogos que codifican para el factor de elongación citosólico eucarionte eEF1B α (descrito arriba), y con la proteína de elongación traduccional mitocondrial Tuf1 (Schulte et al., 2023a).

Estos datos nos sugieren que la proteína Tef4 tiene una localización mitocondrial, y que podría tener una función en este organelo.

Tabla 1. Condiciones en las que se ha reportado que la proteína Tef4 pertenece al proteoma mitocondrial. Todas las levaduras se cosecharon en fase exponencial.

Cepa de laboratorio	Fuente de carbono	Referencia
W303	Glucosa, galactosa y lactato	(Renvoisé et al., 2014)
BY4741 y YPH499	Glucosa, sacarosa, galactosa y glicerol	(Schulte et al., 2023a)
YPH499	Glicerol	(Sickmann et al., 2003)
YPH499	Glicerol	(Reinders et al., 2006)
BY4742 y D273-10b	Galactosa	(Flores-Mireles et al., 2023)

Justificación

La expresión coordinada de genes nucleares y la traducción mitocondrial parece ser unidireccional en levadura. Cuando hay un cambio en la fuente de carbono, de un medio fermentable a uno respiratorio, se ha observado que el aumento en los mRNA de las subunidades de la cadena de transporte de electrones, codificadas en el núcleo, ocurre de manera más rápida que las codificadas en el genoma mitocondrial (Couvillion et al., 2016). Además, se ha descubierto que la traducción mitocondrial no está regulada directamente por la fuente de carbono en la que se encuentra la célula, sino por la traducción citosólica. De hecho, la traducción mitocondrial es inhibida cuando se bloquea la importación de proteínas mitocondriales sintetizadas en el citosol (Couvillion et al., 2016). Si se inhibe la traducción citosólica, se afecta la traducción de los mRNA mitocondriales, lo que resulta en alteraciones en la síntesis de proteínas mitocondriales. Este patrón de regulación, impulsado por la inhibición de la traducción citosólica, se mantiene independientemente de si la fuente de carbono es fermentable o respiratoria (Couvillion et al., 2016).

En un estudio realizado por nuestro grupo de trabajo, se ha observado que el factor de traducción citosólico eIF4G1 (codificado por el gen *TIF4631*) puede regular la síntesis de la proteína Cox1, la cual es codificada y traducida en la mitocondria (García-Cordero et al., sin publicar). En células de ratón se ha comprobado que, aunque eIF4G1 no se localiza en mitocondria, sí afecta indirectamente la traducción mitocondrial y por ende la respiración (S. H. Kim et al., 2023). Sin embargo, en levadura hay reportes de que eIF4G1 forma parte

del proteoma mitocondrial (Reinders et al., 2006; Sickmann et al., 2003) lo que sugiere que puede tener otra función en el organelo además de la ya reportada en otros organismos. Por lo tanto, decidimos investigar si existen otros factores de traducción citosólica que se asocian físicamente con la mitocondria y que, al igual que eIF4G1, desempeñan alguna función en dicho organelo. Al revisar los proteomas mitocondriales, identificamos a los factores de traducción citosólica eIF5A – cuya localización en mitocondria ya se confirmó (Díaz-Granados & Pérez-Martínez, 2022) – y eEF1B γ (codificado por el gen *TEF4* en levadura) (Flores-Mireles et al., 2023; Reinders et al., 2006; Renvoisé et al., 2014; Schulte et al., 2023a; Sickmann et al., 2003), siendo este último el foco principal de estudio en esta tesis.

Por otra parte, se considera que la mitocondria es la principal generadora de ROS mediante la cadena de transporte de electrones, en especial por el complejo III, y a la vez, también contribuye a la homeostasis, ya que se ha visto que existen mutantes no respiratorias que son más sensibles a compuestos como peróxido de hidrógeno (Grant et al., 1997; Ježek et al., 2018; Khalimonchuk et al., 2007). Además, hay una estrecha relación entre la morfología de la red mitocondrial y el estrés oxidativo. Al haber un aumento de la concentración de ROS, la mitocondria se fisiona y comienza un proceso denominado mitofagia, el cual es un proceso selectivo de autofagia que promueve la degradación de mitocondrias (Innokentev & Kanki, 2021; Kurihara et al., 2012; Liu et al., 2023), con lo cual se busca reducir los niveles de ROS y así preservar supervivencia de la célula. Cuando los niveles de estrés oxidativo son demasiado altos, la célula entra en un proceso de muerte celular conocido como apoptosis (B. Kim & Song, 2016; Redza-Dutordoir & Averill-Bates, 2021).

Dado a que las enzimas GST son las enzimas antioxidantes más abundantes (Ježek et al., 2018), Todorova en 2007 realizó un ensayo bioinformático donde reunió a todos los genes de *S. cerevisiae* con un dominio GST, con el fin de encontrar proteínas que fungieran como detoxificantes. Entre los genes que estudió se encuentran *TEF3* y *TEF4*. Al eliminarlos en la cepa BY4742, reportó que la mutante nula, $\Delta tef4$, muestra sensibilidad al peróxido de hidrógeno, mientras que $\Delta tef3$ no presentó sensibilidad al compuesto. Este hallazgo nos llevó a preguntarnos: ¿puede la localización de Tef4 en la mitocondria y la sensibilidad al H₂O₂ previamente reportada sugerir que su función en este organelo está relacionada con la regulación o la percepción del estrés oxidativo?

Otra interrogante que surge es por qué la célula codifica para dos isoformas de la misma proteína, eEF1B γ (Tef3 y Tef4). Por lo que es importante diferenciar la función que cumple cada proteína en un contexto tanto global como mitocondrial.

Hipótesis

Tef4 tiene una localización mitocondrial en *S. cerevisiae* y regula la morfología mitocondrial.

Objetivo

Verificar la localización mitocondrial de la proteína Tef4 en levadura, así como estudiar el fenotipo de la mutante $\Delta tef4$ al visualizar la morfología de la red mitocondrial y su sensibilidad a peróxido de hidrógeno. Además de comparar el fenotipo con la mutante nula de su isoforma Tef3.

Objetivos particulares

- Etiquetar a la proteína Tef4 en el extremo carboxilo terminal con el epítotope 3xHA para poder detectarla por inmunorreplica tipo *Western Blot*.
- Verificar la localización mitocondrial de la proteína Tef4 reportada en los proteomas mitocondriales.
- Si se confirma la localización de Tef4 en el organelo, determinar su localización submitocondrial mediante un ensayo de proteinasa K.
- Visualizar la red mitocondrial de mutantes carentes de Tef4 y Tef3 en un medio con glucosa y galactosa.
- Realizar ensayos de sensibilidad a peróxido de hidrógeno en las mutantes de Tef3 y Tef4
- Diferenciar el crecimiento de las mutantes $\Delta tef3$, $\Delta tef4$ y la doble mutante $\Delta tef3/4$ en un medio un medio fermentativo (glucosa) y en dos medios respiratorios (lactato y etanol-glicerol).
- Analizar las interacciones mitocondriales, tanto físicas como genéticas de Tef4, reportadas en la literatura.

Metodología

Lista de cepas utilizadas en este estudio

Tabla 2. Listas de cepas utilizadas en este estudio

Nombre	Genotipo nuclear (mitocondrial)	Referencia
BY4742	<i>Mat α, his3-delta1, leu2-delta0, lys2-delta0, ura3-delta0, BY4742(ρ⁺)</i>	YKO Matx Strain Collection – Glycerol Stocks (Open Biosystem)
NB40-36a	<i>Mat α, arg8 ::hisG, ura4-52, leu2-3,112, D273-10B (ρ⁺)</i>	(Perez-Martinez et al., 2003)
VP1, VP2	<i>Mat α, arg8 ::hisG, ura4-52, leu2-3,112, tef4-delta ::KanMX4, D273-10B (ρ⁺)</i>	Este estudio
VP7	<i>Mat α, arg8 ::hisG, ura4-52, leu2-3,112, D273-10B (ρ⁺), TEF4 3xHA</i>	Este estudio
YC219	<i>Mat α, arg8 ::hisG, ura4-52, leu2-3,112, tef4-delta ::KanMX4, tef3-delta ::NatMx6, D273-10B (ρ⁺)</i>	Este estudio
YC218	<i>Mat α, arg8 ::hisG, ura4-52, leu2-3,112, tef3-delta ::NatMx6, D273-10B (ρ⁺)</i>	Este estudio
XPM202	<i>Mata, lys2, arg8::hisG, ura3-52, leu2-3,112, (Δ⁺, Δ^Σ ai, COX2-62)</i>	(Shingú-Vázquez et al., 2010)

Medios de cultivo

Tabla 3. Medios de cultivo utilizados en este estudio. A los medios sólidos se les agregaron 20 g de agar. Todos los medios se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 120 °C.

Medio	Composición para 1L de medio	
YPD	Extracto de levadura	10 g
	Peptona	20 g
	Dextrosa	20 g
YPEG	Extracto de levadura	10 g
	Peptona	20 g
	Dextrosa	20 g
	Glicerol	30 mL
	Extracto de levadura	10 g

YPGal	Peptona	20 g
	Galactosa	20 g
Medio "Drop-out"	Base nitrogenada sin aminoácidos	6.7 g
	Glucosa o galactosa	20 g
	Medio Drop-out	Ver indicaciones del producto
YPLac	Extracto de levadura	10 g
	Peptona	10 g
	Sulfato de amonio	1.2 g
	Fosfato dipotásico	1 g
	Ácido láctico	23.5 mL
	NaOH	Ajustar pH 5.5

Oligonucleótidos utilizados en este estudio

Tabla 4 Oligonucleótidos utilizados en la etiqueta de *TEF4* con HA. Se etiquetó el gen *TEF4* en el carboxilo terminal.

Oligonucleótido	Secuencia 5' a 3'
TEF4-3XHA-Fw	TGTTGTTGTCAATGGCGAAGATAAGGAAATTGTTGACGGTAAGGTTTT GAAAAGGGAACAAAAGCTGG
TEF3-3XHA-Rv	TTGTTTGACTCTTATGTATATTGGGAAGAAAATATGGAAGAAGAGTT ATTGAGACTATAGGGCGAATTGGG

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en la eliminación del gen *TEF3*. *Donado por el laboratorio de la doctora Soledad Funes

Oligonucleótido	Secuencia 5' a 3'
TEF3-Fw2	CAGATGTAAAGAACAACCGTATCAAGTGG
TEF3-Rv2	GGATCAATGTGGTTAACAGGTTATTC
TEF3nat-Fw	CCCTCCTTGTTATTGTATTTTCTGTTATTAGAGCATACAGCCAGCTGAAG CTTCGTACGC
TEF3nat-Rv	GGCGACATGAAGGATAGTACGAAGAGATTATTTTAAGACCTCGATGAA TTCGAGCTCGTT
NAT Rev*	GTTGTTTATGTTCCGGATGTG

Tabla 6. Plásmidos utilizados en este estudio.

Plásmido	Referencia
pMPY-3xHA	(B. L. Schneider et al., 1995)
pVT100U-mtGFP	(Westermann & Neupert, 2000)
pAG25	(Goldstein & McCusker, 1999)

Anticuerpos utilizados en este estudio

Tabla 7. Anticuerpos utilizados en este estudio.

Anticuerpo	Fuente	Dilución
Cdc28	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
VDAC	Abcam	1:5000
HA-HPR	Roche	1:2000
Tom20	Donado por el laboratorio de la Doctora Soledad Funes	1:5000
CS	Donado por Tom Fox	1:1000

Creación de la mutante sencilla $\Delta tef3$ y la doble mutante $\Delta tef3/4$

Se diseñaron los oligonucleótidos TEF3nat-Fw y TEF3nat-Rv (Tabla 5) para amplificar la secuencia del gen *natMX6* en el plásmido pAG25, y a este par de oligonucleótidos se les añadió una secuencia homóloga a los UTR del gen *TEF3* con el objetivo de que recombinara en estos sitios y así poder eliminar al gen *TEF3* por transformación integrativa utilizando el método de acetato de litio (Burke Dan, 2000). Además, se diseñaron los oligonucleótidos TEF3-Fw2 y TEF3-Rv2 para verificar la correcta delección del gen.

Inmunodetección de Tef4 por medio de inmunorréplica tipo *Western Blot*

Se incubó toda la noche (O/N) a 30 °C con agitación constante un precultivo de 2 mL de YPGal de la cepa etiquetada con 3xHA. Se extrajo proteína total como se describe a continuación. Se centrifugaron 2 mL del medio y el botón se resuspendió en 1 mL de H₂O. Se añadieron 150 µL, recién preparados, de 1.85 M NaOH, 7.4 % de beta mercaptoetanol, PMSF 10 mM. La mezcla se homogeneizó en el vórtex y se incubó en hielo durante 15 min. Después se añadieron 150 µL de ácido tricloroacético al 50 %, y se mezcló invirtiendo el tubo. Nuevamente se dejó incubando en hielo por 20 min. Posteriormente se centrifugó durante 10 min a 4 °C, y se quitó el sobrenadante con la punta de una micropipeta. A continuación, se lavó el botón con 1.5 mL de acetona fría (-20 °C). Se centrifugó la mezcla durante 5 min a 4 °C; se quitó el sobrenadante, y se dejó secar el botón para eliminar todo rastro de acetona. Por último, el botón celular se disolvió en 50 µL de amortiguador SDS (SDS 5 %, NH₄OH 1 %). Se desnaturalizaron las proteínas por 5 min a 65 °C. Y se procedió a cargar el gel para electroforesis.

Se preparó un gel de poliacrilamida con la composición indicada en la Tabla 8. Se tomaron 50 µL de las muestras y se corrieron en una cámara de electroforesis con amortiguador de corrida (Tris-HCl pH 8.3, 0.250 M, glicina 2.5 M y SDS 1 %), durante 2 h a 110 V.

Tabla 8. Composición de un gel de acrilamida para SDS-PAGE

Reactivo	Gel separador (12 %)	Gel apilador (4 %)
Acrilamida 30 %/ Bisacrilamida 0.8 %	4.0 mL	0.65 mL
Tris-HCl pH 8.8 2 M	1.86 mL	-
Tris-HCl pH 6.8 2 M	-	312.15 µL
SDS 20 %	50 µL	25 µL
Agua destilada	4 mL	4 mL
APS 10 %	50 µL	50 µL
TEMED	5 µL	5 µL

Posteriormente los geles se colocaron en una cámara de transferencia semi-seca, para ser transferidos a una membrana de PVDF (Bio-Rad) con el amortiguador de transferencia (amortiguador de corrida, metanol 20 %), durante 1 h 30 min a 10 V y 95 mA. Las membranas se bloquearon con la solución de bloqueo (leche descremada 10 %, Tris-HCl pH 7.6 50 mM, NaCl 150 mM) durante toda la noche a 4 °C con agitación constante. Al día siguiente se retiró la solución de bloqueo y se incubó con el anticuerpo correspondiente (Tabla 7), en una solución de réplica (leche descremada 1 %, Tris-HCl pH 7.6 10 mM, NaCl

100 mM, EDTA pH 8.0 1 mM, Tween-20 0.1 %). Las membranas se lavaron 3 veces con solución de lavado (Tris pH 7.6 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA pH 8.0 1 mM, Tween-20 0.1%) durante 10 min a temperatura ambiente y con agitación constante, y se incubaron con un anticuerpo secundario según sea el caso. Para la detección se utilizó el reactivo Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad) y se reveló con el escáner para Western Blot LI-COR C-DiGit utilizando la sensibilidad máxima.

Verificación de la localización mitocondrial de Tef4

Se etiquetó a Tef4 el extremo del carboxilo terminal con 3xHA, según el método de (B. L. Schneider et al., 1995) con el objetivo de poder detectarla con inmunodetección.

Se extrajo proteína total de las muestras y se realizó una inmunorréplica tipo *Western Blot* para detectar a la proteína Tef4 etiquetada con 3xHA (Anexo 1). Por último, se mandó a secuenciar la cepa y no se encontró ninguna mutación.

Para verificar la localización de Tef4 en mitocondria, se realizó un fraccionamiento celular para aislar a las mitocondrias y después se procedió a purificar el extracto crudo mitocondrial mediante un gradiente de *nycodenz*. La metodología se describe a continuación:

- Se inculó una colonia de levadura en 2 mL de medio YPGal y dejar crecer O/N a 30 °C con agitación constante.
- Se incularon 750 µL del medio saturado en 1 L de galactosa (se utilizaron 2 litros en total). Se inculó O/N a 30 °C con agitación constante hasta que se obtuvo una densidad óptica de entre 0.8-0.9.
- Se centrifugó a 2800 x g durante 5 min a 4 °C
- Se juntó el botón con agua fría y destilada en un solo tubo de centrifuga previamente pesado.
- Se centrifugó a 2800 x g durante 5 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se pesó
- Se resuspendió el botón en amortiguador TD (2 mL/g de peso húmedo)
- Se agitó durante 10 min a 30 °C.
- Se centrifugó durante 5 min a 2000 x g a 4 °C.
- Se resuspendió el botón en amortiguador MPZ (7 mg/g de peso húmedo), y se adicionó zimoliasa-20T (3 mg/g de peso húmedo).
- Se agitó durante 1 hora a 30 °C y revisó la formación de esferoplastos.
- Se centrifugó a 1100 x g durante 5 min a 4 °C.
- Se resuspendió el *botón* en 40 mL de amortiguador Dounce.
- Se homogeneizó 15 veces utilizando el homogenizador y pistilo de vidrio.

- Se centrifugó 5 min a 2000 x g a 4 °C y se recuperó el sobrenadante. Este paso se realizó dos veces
- Se centrifugó 12 min a 17400 x g a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y se guardó el botón celular, que es donde se encuentran las mitocondrias crudas.
- El botón se resuspendió en 2 mL de amortiguador SEH. Este paso se realizó con punta cortada y se homogeneizó suavemente.
- Después se realizó un un gradiente de *nycodenz* utilizando el protocolo de (Boldogh & Pon, 2007) con el objetivo de purificar las mitocondrias obtenidas.
- Con las fracciones celulares obtenidas se cuantificaron mediante el método de Lowry, diluyendo las muestras 1:10.

Posteriormente se utilizaron muestras de extractos totales (ET), extractos citosólicos (C), extractos mitocondriales crudos (MC) y extractos mitocondriales purificados (M). Se utilizó el anticuerpo anti-HA peroxidasa, para detectar la presencia de la proteína Tef4 etiquetada con 3xHA. Como control citosólico se utilizó el anticuerpo contra Hog1 y al anticuerpo contra VDAC como control mitocondrial.

Visualización de la red mitocondrial

Se transformaron a las cepas WT, $\Delta tef4$, $\Delta tef3$, $\Delta tef3/4$ y $\Delta fzo1$ con el plásmido pVT100U-mtGFP (Westermann & Neupert, 2000), el cual dirige a la proteína verde fluorescente (GFP) a la mitocondria. Las cepas con el plásmido integrado crecen en el medio *drop-out* -URA.

Para visualizar la morfología de la red mitocondrial, se siguió el siguiente protocolo:

- Se inoculó a la cepa correspondiente en 2 mL de medio -URA con glucosa y se dejó crecer O/N a 30 °C con agitación constante.
 - Se inocularon 20 μ L del cultivo saturado a 10 mL de medio -URA con glucosa y se dejó crecer hasta llegar a la fase exponencial (DO 600 nm entre 0.6-<1.0).
 - Se agregó paraformaldehído con PBS al 3.7 % al medio y se dejó incubando durante 30 min a 30 °C con agitación constante. Después, se lavó tres veces con PBS y se resuspendió con 100 μ L de agua.
- * Nota: cuando se utilizó galactosa se puso un precultivo de dos O/N.

Por último, se visualizó la morfología de la red mitocondrial mediante el microscopio de epifluorescencia marca Olympus BX51 (IFC-UNAM). Se comparó a la cepa WT con las mutantes $\Delta tef4$ (objetivo 100x). Como control positivo se utilizó a la mutante nula del

gen *FZO1*, cuya morfología mitocondrial está fragmentada (Westermann & Neupert, 2000).

El conteo de células de acuerdo con su morfología mitocondrial se realizó utilizando image J (C. A. Schneider et al., 2012)

Ensayo de sensibilidad a peróxido de hidrógeno

Se prepararon cajas de YPD con 6 mM de peróxido de hidrógeno. Después se realizaron diluciones seriadas con las cepas WT, $\Delta tef4$, $\Delta tef3$, $\Delta tef3/4$ y la cepa $\Delta cox2$ como control positivo al estrés con peróxido de hidrógeno.

Las diluciones seriadas se realizaron de la siguiente manera:

1. Se cultivaron las cepas de interés en 2 mL de YPD a 30 °C O/N
2. Al día siguiente se pesaron microtubos de volumen 1.5 mL con una balanza analítica. Se registraron los pesos de cada tubo.
3. Se centrifugó 1 mL de cada cultivo en los microtubos previamente pesados a 14000 rpm/1 min. Eliminar sobrenadante.
4. Se pesaron los tubos con el precipitado de células y se estimó el peso del mismo.
5. Se diluyeron las muestras con agua estéril a una concentración de 0.02 g/mL.
6. Se colocaron, en una caja estéril con 96 pozos, 136 μ L de agua estéril con una pipeta multicanal hasta la columna número 6 comenzando con la columna 2 (A2, A3, A4... B2, B3, etc)
7. En la columna 1 (A1, B1, C1...), se agregaron 150 μ L de la solución de cultivo.
8. Con una pipeta multicanal de 15 μ L, se tomó este volumen de la columna 1 de cada fila y se transfirió a la siguiente columna (se homogeneizó en cada paso). Se repitió este paso hasta que se llegó a la columna 6.
9. Se esterilizó el replicador sumergiéndolo en una caja Petri con etanol. Se puso en contacto con la flama y se dejó enfriar por unos segundos.
10. Se sumergió el replicador en los pozos que contienen las diluciones.
11. Se imprimó el replicador en los medios correspondientes.

Ensayo de proteinasa K (Modificado de Fujiki y col., 1982)

1. Para cada tratamiento descrito en la tabla 6, se utilizaron 100 μ g de mitocondrias crudas, las cuales se resuspendieron en el amortiguador SH (Sorbitol 0.6 M, HEPES 20 mM).
2. Todos los tratamientos se incubaron durante 30 min en hielo.

3. Después se agregaron 2 μ L de PMSF (200 mM) para detener la actividad de la proteinasa K (PK).
4. Se centrifugó por 5 min a 13000 rpm.
5. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 500 μ L de SH con PMSF (200 mM)
6. Se centrifugó por 5 min a 13000 rpm a 4 °C
7. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 20 μ L de solución digestora de Laemmli (Tris 0.125 M, SDS 4%, glicerol 20 %, beta mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 100 mg para 50 mL de amortiguador.
8. Se analizó mediante una electroforesis (SDS-PAGE)

Tabla 9. Ensayo de proteinasa K

Tratamiento	Mitocondria cruda	Mitocondria + PK	Mitocondria + PK + T- x100
Proteinasa K 10 mg/mL	-	+	+
Tritón x 100 (2 %)	-	-	+

Predicción de la sub-localización mitocondria de Tef4

Para calcular la probabilidad de que Tef4 tenga una presecuencia mitocondrial, se utilizó el predictor MitoFate (<http://web.pasteur.fr/packages/pack@MitoFates@1.2>) Para predecir la localización subcelular de Tef4 se utilizó al predictor DeepMito (<http://busca.biocomp.unibo.it/deepmito/>)

Predicción de cruces transmembranales de Tef4

Para calcular la probabilidad de que Tef4 contenga segmentos transmembranales, se utilizaron a los predictores DeepTMHMM (Hallgren et al., 2022)(Hallgren et al., 2022) (<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM>) y Orient TM (Liakopoulos et al., 2001)(<http://athina.biol.uoa.gr/orienTM/>). Como control, se utilizaron a las proteínas Tom20 (1 cruce transmembranal) y Mdl1 (6 cruces transmembranales)

Análisis de las proteínas que interaccionan física y genéticamente con Tef4

A través de la base de datos Saccharomyces Genome Database (SGD) y Go Slim Mapper (<https://www.yeastgenome.org/goSlimMapper>) se analizaron las interacciones reportadas, tanto genéticas, como físicas de la proteína Tef4. Las proteínas fueron catalogadas de acuerdo con su localización celular.

Resultados

Tef4 se localiza en la superficie de la membrana externa mitocondrial

Con el objetivo de conocer si el factor de elongación citosólico Tef4 se localiza en la mitocondria tal como se ha reportado en diversos proteomas (Flores-Mireles et al., 2023; Gonczarowska-Jorge et al., 2017; Reinders et al., 2006; Renvoisé et al., 2014; Schulte et al., 2023; Sickmann et al., 2003), se crecieron células en un medio con galactosa y se obtuvieron mitocondrias puras. Se realizó un ensayo de inmunorréplica tipo *Western Blot* con muestras de extracto total (ET), de la fracción citosólica (C), y la fracción mitocondrial purificada (M). Como control mitocondrial, se utilizó un anticuerpo contra la porina VDAC, proteína de la membrana externa mitocondrial y contra la citrato sintasa (CS), proteína de la matriz mitocondrial; como control citosólico y nuclear se utilizó un anticuerpo contra la ciclina Cdc28. El resultado de la inmunodetección nos indicó que las mitocondrias obtenidas fueron purificadas con éxito, ya que no se detectó al control Cdc28 en el carril de la fracción mitocondrial (Figura 6). Tef4 se detectó en todas las fracciones, incluso en la fracción mitocondrial, aunque en menor cantidad (Figura 6). Como era de esperarse, los controles de proteínas mitocondriales, VDAC y citrato sintasa, se enriquecieron en la fracción mitocondrial. Con este experimento se confirmó la presencia de Tef4 en la mitocondria de la levadura.

Para determinar la localización submitocondrial de Tef4, se realizó un ensayo de incubación con proteinasa K (PK) seguido de una inmunorréplica tipo *Western Blot*. La proteinasa K es

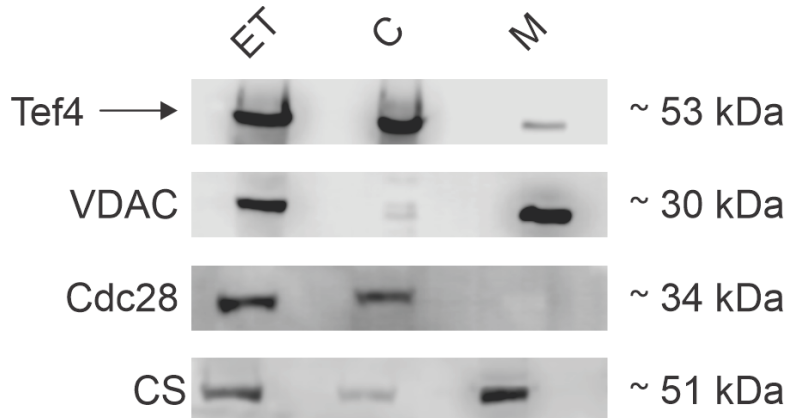


Figura 6. Western blot contra Tef4-HA. Para detectar a la proteína Tef4, se utilizó un anticuerpo contra HA peroxidasa; α -VDAC como control de carga; α -Cdc28 como control citosólico y α -CS como control mitocondrial; ET = extracto total; C = citosol; M = mitocondrias puras

una enzima que hidroliza los enlaces peptídicos. En este ensayo, se añade PK a las mitocondrias crudas con el propósito de eliminar cualquier proteína que se encuentre en la periferia de la mitocondria o sobre la superficie mitocondrial y, por lo tanto, esté expuesta a la acción de la proteasa. En contraste, aquellas proteínas que se localizan dentro de la mitocondria estarán protegidas de la acción enzimática gracias a las bicapas lipídicas mitocondriales.

En el primer carril (Figura 7) se utilizaron mitocondrias crudas (MC), sin ningún tratamiento adicional, lo que permitió la detección de todas las proteínas: Tef4, Tom20 y CS. En el segundo carril (Figura 7 B y D), se trató a las mitocondrias con PK. Este tratamiento hidrolizó a las proteínas que se encontraban en la superficie de la mitocondria, por lo que no se detectó a la proteína Tom20 (proteína de la OMM). Tef4 tampoco fue detectada. CS sí se detectó, ya que, al ser una proteína localizada en la matriz mitocondrial, ésta se encontraba protegida de la acción de la PK por la doble membrana mitocondria. En el último carril (Figura 7 C y D), las mitocondrias se trataron con Tritón X-100, un detergente que rompe las membranas lipídicas. En combinación con la PK, este tratamiento hidrolizó todas las proteínas, por lo que en este carril no se detectó ninguna proteína. Lo que indica un correcto funcionamiento de la PK. Dado que Tef4 se perdió debido a la acción de la PK, podemos concluir que esta proteína se encuentra por fuera de la mitocondria, localizada hacia el citosol, pero asociada a la superficie mitocondrial.

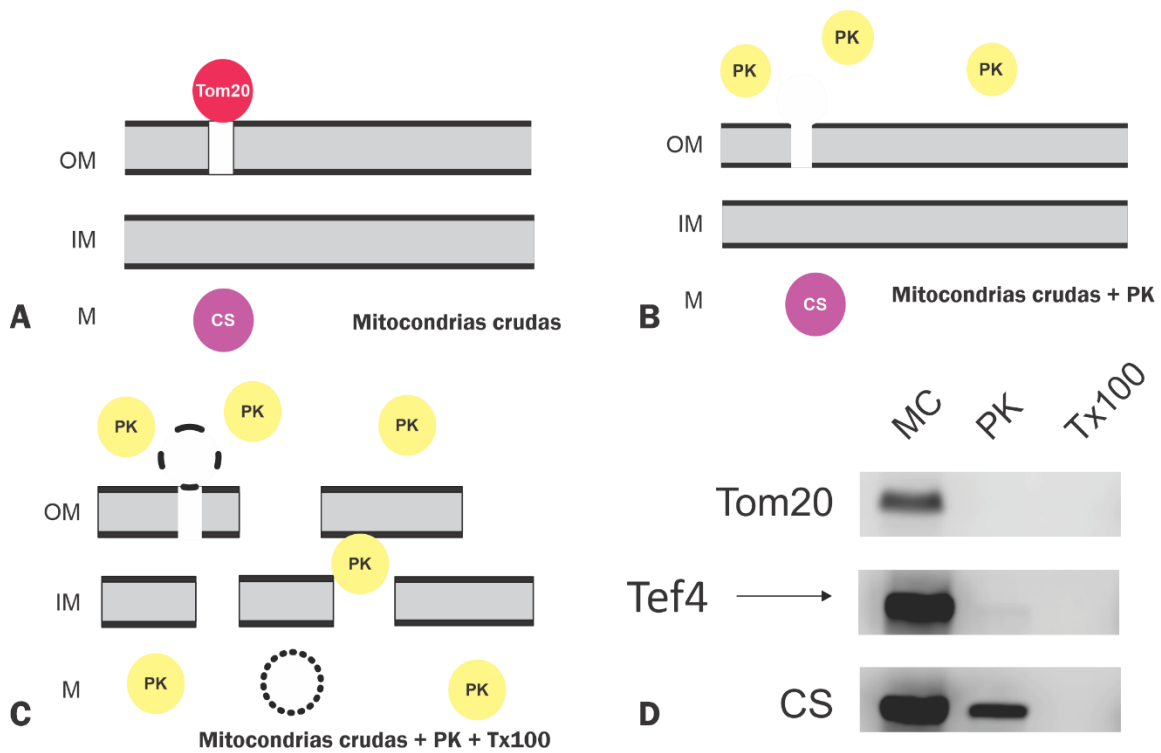


Figura 7. Ensayo de proteinasa K. A) Mitocondrias crudas sin ningún tratamiento. B) Mitocondrias crudas con PK, la cual hidroliza a las proteínas que se encuentran en la superficie de la membrana C) Mitocondrias con PK y tritón x 100 (Tx100). El Tx100 es un detergente que rompe la membrana lipídica mitocondrial, por lo cual la PK puede hidrolizar el enlace peptídico de todas las proteínas mitocondriales. D) Inmunorreplicación tipo *Western Blot* del ensayo de PK. Se cargaron 100 µg de proteína. MC: mitocondria cruda sin ningún tratamiento; MC + PK: mitocondria cruda con proteinasa K y MC + PK + Tx100: mitocondria cruda con tritón x100 y proteinasa K. n=3

La delección tanto de Tef4 como de Tef3 no afecta el crecimiento en medios respiratorios

En levadura, los genes *TEF3* y *TEF4* codifican el factor de elongación eEF1By. Ambos genes se expresan de manera constitutiva y forman parte del complejo de traducción eEF1, (Gavin et al., 2002b; Olarewaju et al., 2004). Sin embargo, solo se ha confirmado la localización de Tef4 en la superficie de la mitocondria, mientras que no hay evidencia de que Tef3 se localice en mitocondria. Esta observación sugiere que estas isoformas pueden desempeñar funciones distintas en la célula, en especial en la mitocondria

Por lo que se decidió eliminar a ambos genes con el fin de comparar la función de ambas isoformas. Para esto se realizaron diluciones seriadas con las cepas WT y las mutantes $\Delta tef3$, $\Delta tef4$ y $\Delta tef3/4$ cambiando las variables temperatura y fuente de carbono (Figura 8). Como medio fermentativo se utilizó glucosa, mientras que los medios respiratorios utilizados fueron lactato y etanol-glicerol; las temperaturas utilizadas fueron la de

crecimiento óptimo, 30 °C, y temperaturas que se consideran condiciones de estrés, 25 °C y 37 °C.

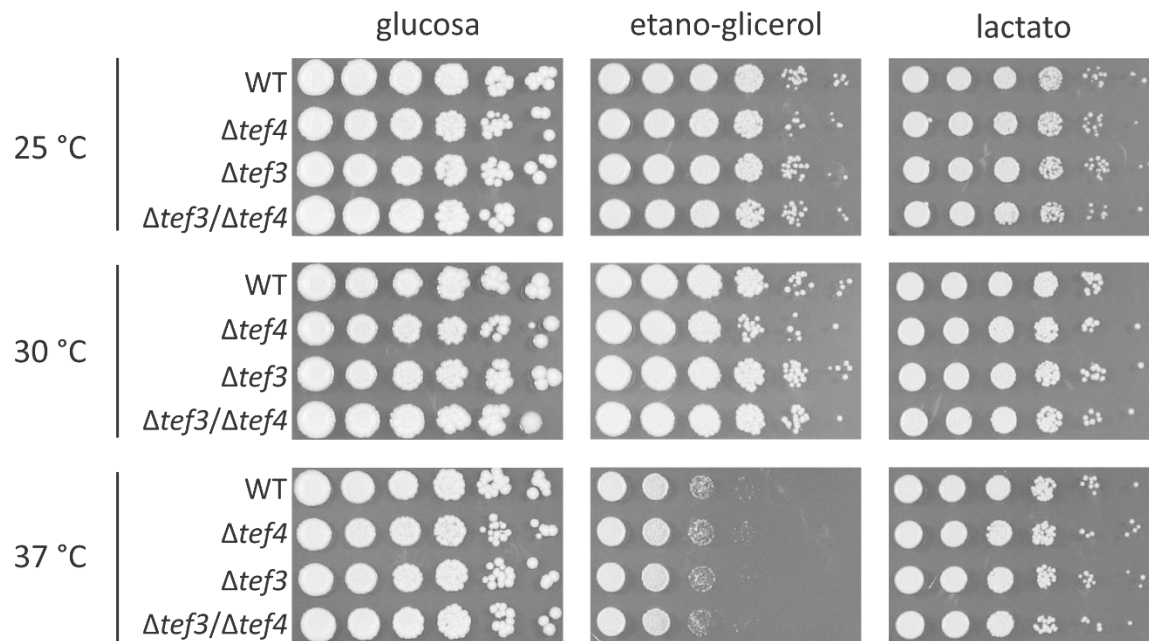


Figura 8. La delección del gen *TEF3* no afecta la función mitocondrial ni global de la levadura. Se realizaron diluciones seriadas de las cepas WT (D273-10b), *Δtef4*, *Δtef3* y la doble mutante *Δtef3/Δtef4* en los medios glucosa, etanol-glicerol y lactato; a diferentes temperaturas: 25°C, 30°C y 37°C. Fotos del quinto día de crecimiento. n=3

No se observaron fenotipos distintos entre las cepas WT y las mutantes *Δtef3*, *Δtef4* y *Δtef3/4* en ninguna de las variables probadas (Figura 8) (temperatura y medio de cultivo). Esto nos indica que, al menos en las condiciones estudiadas, la delección del gen *TEF4*, ni de su isoforma *TEF3* afectan la función respiratoria mitocondrial evaluado por el crecimiento en lactato y glicerol, y tampoco parece afectar la función global de la levadura (evaluado por su crecimiento en glucosa).

Tanto la cepa mutante *Δtef3* como la *Δtef4* no son sensibles a peróxido de hidrógeno

En la célula se produce estrés oxidativo cuando los mecanismos de supervivencia celular son incapaces de hacer frente a las especies reactivas de oxígeno (ROS) o al daño causado por estos (Grant, 2011).

Todorova en 2007 realizó un ensayo bioinformático donde reunió a todos los genes de *S. cerevisiae* con un dominio GST, con el fin de encontrar proteínas que fungieran como detoxificantes. Entre los genes que estudió se encuentran *TEF3* y *TEF4*. Al eliminarlos en la

cepa BY4742, reportó que la mutante nula, $\Delta tef4$, muestra sensibilidad al peróxido de hidrógeno, mientras que $\Delta tef3$ no presentó sensibilidad al compuesto.

Con el antecedente de que la mutante nula $\Delta tef4$ (BY4742) es sensible al estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno, y teniendo en cuenta que la proteína Tef4 se localiza en la mitocondria, el principal organelo productor de ROS, nos propusimos verificar en la cepa de laboratorio D273-10b si la sensibilidad al peróxido se repetía en la mutante nula $\Delta tef4$. Por lo tanto, se decidió llevar a cabo un ensayo de sensibilidad a peróxido de hidrógeno (3 mM y 6 mM) con las cepas WT (D273-10b), $\Delta tef4$, $\Delta tef3$, $\Delta tef3\Delta tef4$ y $\Delta cox2$. La cepa $\Delta cox2$ se utilizó como control positivo a la sensibilidad a peróxido de hidrógeno (García-Villegas et al., 2017; Khalimonchuk et al., 2007)

A una concentración de 3 mM de H_2O_2 no se observó sensibilidad de ninguna de las cepas, ni siquiera de la $\Delta cox2$ (Figura 9). A una concentración de 6 mM, se observó que el control positivo, $\Delta cox2$, no creció en comparación con la cepa WT. Sin embargo, las mutantes nulas $\Delta tef4$, $\Delta tef3$ y $\Delta tef3\Delta tef4$ crecieron igual que la WT (Figura 9). Lo que nos indica que la delección de estos genes no hace sensible a la cepa a peróxido de hidrógeno. Siendo un resultado distinto al que se reportó por Todorova, et al., 2007, nos sugiere que el fondo genético nuclear entre las cepas de laboratorio BY4742 y la D273-10b, presenta interacciones genéticas diferentes, lo que conlleva a fenotipos igualmente distintos.

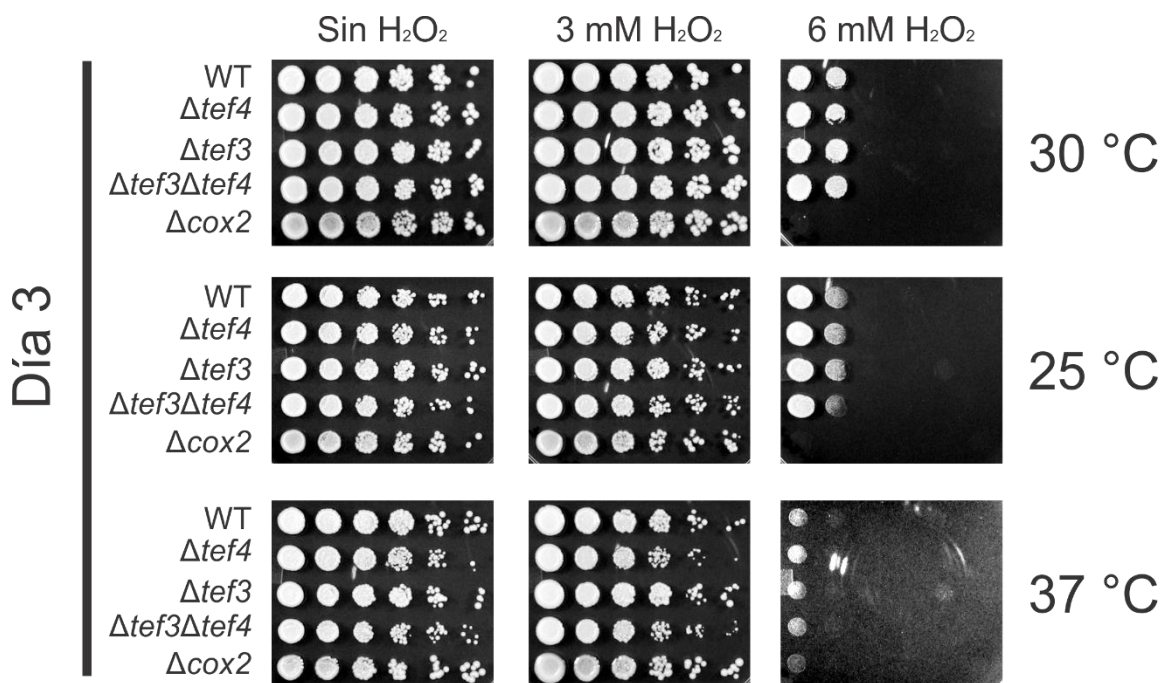


Figura 9. La mutante nula $\Delta tef4$ no presenta sensibilidad a peróxido de hidrógeno. Se realizaron diluciones seriadas de las cepas WT, $\Delta tef4$, $\Delta tef3$, $\Delta tef3\Delta tef4$ y $\Delta cox2$ en un medio con glucosa, sin y con peróxido de hidrógeno (3 mM y 6 mM) a diferentes temperaturas (25, 30 y 37 °C). Fotos al tercer día de crecimiento. n=3

La delección de Tef4 no afecta la morfología mitocondrial en comparación con su homólogo en humano

Pisani en 2016 reportó que el ortólogo de la proteína Tef4 en humano, al expresarse en células HeLa, y después de silenciarse con un siRNA específico para Tef4, mostró una afectación en la morfología de la red mitocondrial. Por lo anterior, se decidió analizar si en las mutantes $\Delta tef4$ y $\Delta tef3$ se repetía este fenotipo. Para ello, se transformó a las cepas WT, $\Delta tef4$, $\Delta tef3$, $\Delta tef3/4$ y $\Delta fzo1$, con un plásmido que contiene a la secuencia de proteína verde fluorescente (GFP) con una presecuencia mitocondrial (Anexo 2), que hace que la proteína GFP se importe a mitocondria (GFPmt). Se utilizó la mutante nula $\Delta tef4$ y $\Delta tef3$, así como la doble mutante, $\Delta tef3/4$, con el fin de conocer la función de cada isoforma en la regulación de la morfología mitocondrial. Mientras que, la cepa $\Delta fzo1$, se utilizó como control positivo de fragmentación (Westermann, 2010).

Previamente, en mi tesis de licenciatura, se había visto que la mutante $\Delta tef4$ presentaba un fenotipo fragmentado en las redes mitocondriales de algunas células. Con el fin de

cuantificar el porcentaje de fragmentación respecto a la cepa WT, se decidió estandarizar la metodología al fijar a las células con paraformaldehído al 3.7 %.

Al observar la morfología mitocondrial en el microscopio de epifluorescencia, en un medio con glucosa, se encontró que las cepas WT, $\Delta tef3$, $\Delta tef4$ presentan una morfología tubular alargada (Figura 10 a, c y d). Mientras que la cepa control, $\Delta fzo1$, presenta una morfología fragmentada y redonda (Figura 10b).

Se contabilizó la morfología mitocondrial de las células clasificándolas en 3 tipos: fragmentada que se refiere a cuando hay algún tipo de división de la red mitocondrial de una célula; tubular, donde la red se muestra elongada sin ninguna fragmentación; y esférica que es cuando se ve una red mitocondrial grande y en forma circular, aunque existan dos o más mitocondrias. La cepa control $\Delta fzo1$ mostró un 100 % de sus mitocondrias con una morfología esférica. Mientras que las demás cepas, aunque sí presentaron redes mitocondriales fragmentadas o esféricas, el porcentaje de redes elongadas fue mayor al 70 %, incluida la WT. Por lo que no parece que los genes *TEF3* y *TEF4* estén regulando la morfología mitocondrial en un medio fermentativo como la glucosa (Figura 11)

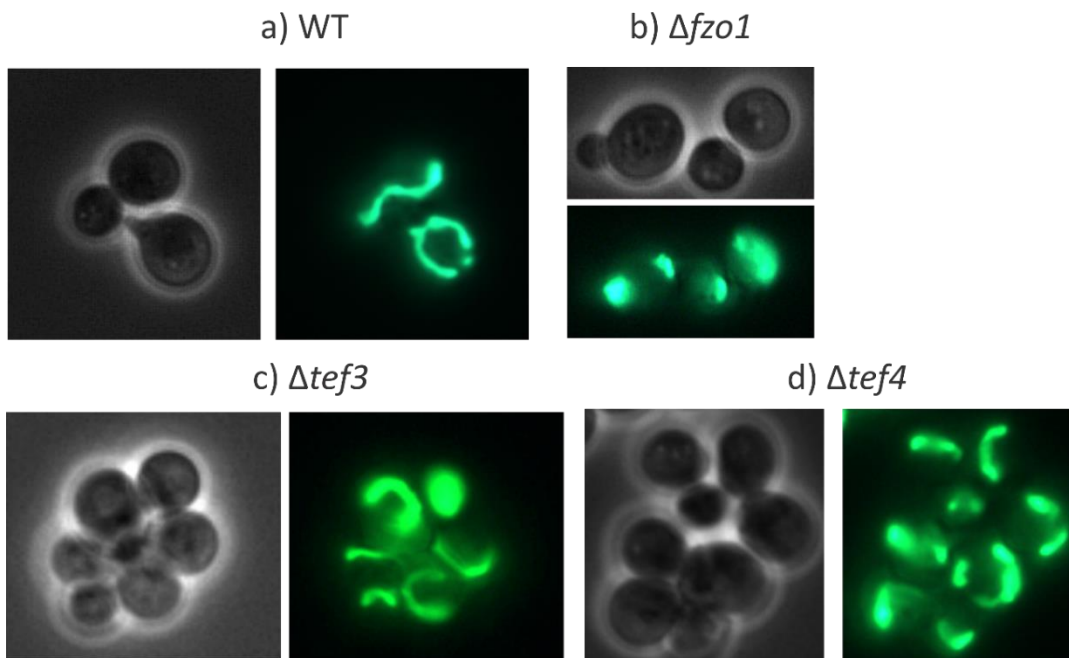


Figura 10. Imágenes representativas de células de levadura en fase exponencial con la expresión constitutiva de la proteína GFP mt. Las células se cultivaron en glucosa (D.O.600nm entre 0.5-0.8). a) La cepa silvestre (WT) presentó una morfología mitocondrial alargada. c) y d) La mutante nula $\Delta tef4$ presentó una morfología mitocondrial alargada al igual que la cepa $\Delta tef3$. b) El control $\Delta fzo1$, presentó una morfología fragmentada donde se visualizan las mitocondrias redondas. Objetivo 100x. n=3

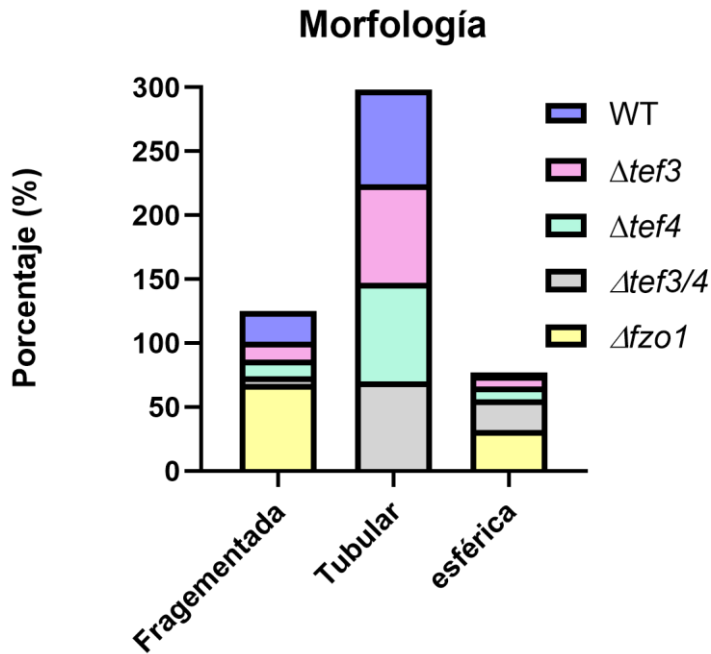


Figura 11 Cuantificación de la morfología mitocondrial de las cepas WT, $\Delta tef3$, $\Delta tef4$, $\Delta tef3/4$, $\Delta fzo1$ en un medio con glucosa. Las redes mitocondriales se clasificaron en fragmentadas, tubulares y esféricas. n = 286 en total. Se utilizó el programa Image J (C. A. Schneider et al., 2012).

Por último, se observaron las redes mitocondriales en un medio con galactosa (Figura 12). La galactosa, a diferencia de la glucosa, no reprime la biogénesis mitocondrial (Rowe et al., 2014; Ulery et al., 1994), por lo cual las redes mitocondriales se observaron más elongadas en todas las cepas (Figura 12). Mientras que la mutante $\Delta fzo1$, continuó con un fenotipo fragmentado y con redes mitocondriales redondas; la cepa WT, presentó una morfología tubular en un 80 %, mientras que en un 11 % presentó un defecto en la red mitocondrial. La cepa control $\Delta fzo1$ presentó una morfología tubular en un 16 % y en un 73 % se visualizó un defecto en su morfología mitocondrial. Por otra parte, las mutantes, en su mayoría fueron tubulares al igual que la WT, por lo que podemos concluir que la delección de los genes *TEF3* y *TEF4* no afectan la morfología de la red mitocondrial en las condiciones empleadas en este trabajo (Figura 13).

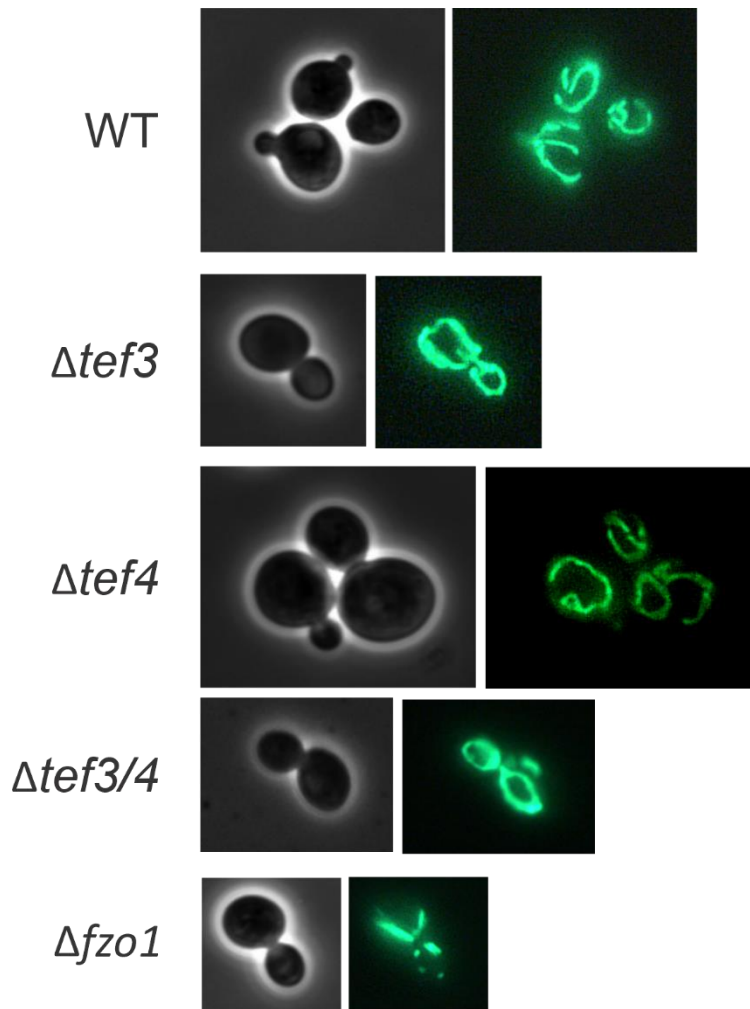


Figura 12. Imágenes representativas de células de levadura en fase exponencial con la expresión constitutiva de la proteína GFP mt. Las células se cultivaron en galactosa (D.O.600nm entre 0.5-0.8). a) La cepa silvestre (WT) presentó una morfología mitocondrial alargada. B), c) y d) La mutante nula $\Delta tef4$ presentó una morfología mitocondrial alargada al igual que la cepa $\Delta tef3$ y $\Delta tef3/4$. E) El control $\Delta fzo1$, presentó una morfología fragmentada donde se visualizan las mitocondrias redondas. Objetivo 100x. n=3

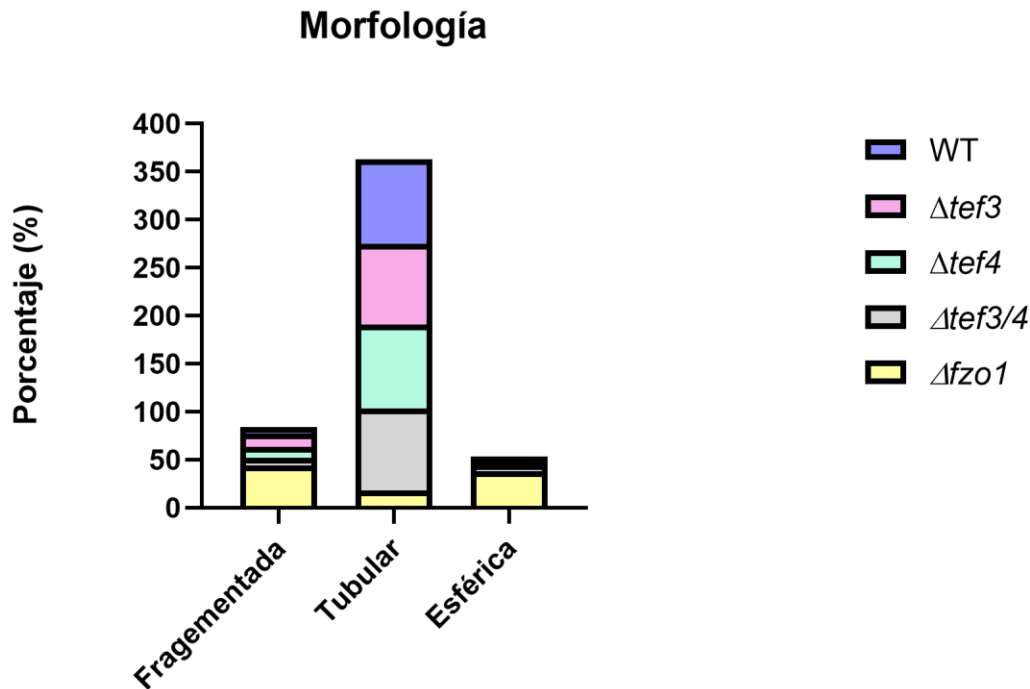


Figura 13 Cuantificación de la morfología mitocondrial de las cepas WT, $\Delta tef3$, $\Delta tef4$, $\Delta tef3/4$, $\Delta fzo1$ en un medio con galactosa. Las redes mitocondriales se clasificaron en fragmentadas, tubulares y esféricas. n = 449 en total. Se utilizó el programa Image J (C. A. Schneider et al., 2012).

Análisis de las proteínas que interactúan física y genéticamente con Tef4

Se confirmó la localización mitocondrial de Tef4 en la superficie de la mitocondria de la levadura. Sin embargo, aún no se ha encontrado un fenotipo que nos hable de su función en este organelo. Con el objetivo de entender en qué contexto se asocia Tef4 a la superficie de la mitocondria, se analizaron las interacciones físicas y genéticas de Tef4 mediante la base de datos SGD (*Saccharomyces Genome Database*). Las proteínas identificadas se clasificaron de acuerdo con su localización en la célula mediante el programa Go Slim Mapper (<https://www.yeastgenome.org/goSlimMapper>). En total, de las 278 proteínas que interactúan genéticamente, 41 se localizan en mitocondria, lo que equivale a un 32 % (Anexo 5.). Mientras que de 100 proteínas que interactúan físicamente con Tef4 (Anexo 6.), únicamente 18 se localizan en mitocondria (Figura 14). Sólo 3 proteínas mitocondriales interactúan tanto físicamente como genéticamente con Tef4 (Tabla 10). De estas 3 proteínas, sólo de dos se ha confirmado su localización mitocondrial de forma experimental, Rpn11 (Hofmann et al., 2009) y Tef2 (Brandina et al., 2006a).

Esta última proteína, también llamada eEF1A, forma parte del complejo de elongación 1 y co-inmunoprecipita con Tef4 (Gavin et al., 2002a). Por lo cual, es probable que la asociación con mitocondria de la proteína Tef4, no sea directa, si no sea mediada por el complejo eEF1.

Por otra parte, es interesante la interacción entre Rpn11 y Tef4, ya que Rpn11 está involucrada en la vía de degradación de proteínas, y la doble mutante $\Delta tef3/4$ presenta un defecto en el recambio proteico durante condiciones de estrés oxidativo (Esposito & Kinzy, 2010b).

Por último, New1 es un factor de terminación de la traducción, cuya localización mitocondrial también se ha reportado en los proteomas mitocondriales (Reinders et al., 2006; Sickmann et al., 2003), mas no se ha confirmado de forma experimental que sea parte de la mitocondria.

Es interesante que de las tres proteínas con las que interacciona tanto física como genéticamente, dos pertenezcan a la maquinaria de traducción citosólico. Lo que nos sugiere que probablemente su función como factor traduccional prevalezca, aunque localizado en la periferia de la mitocondria.

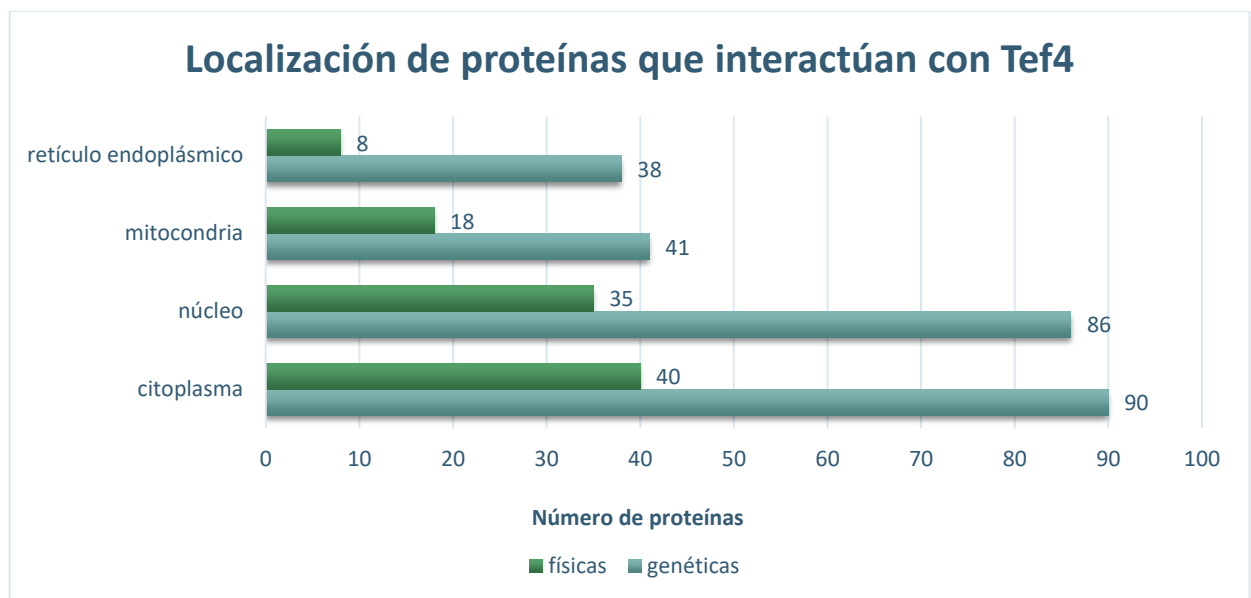


Figura 14. Localización de las proteínas que interactúan con Tef4. Número de proteínas que interaccionan con Tef4 tanto física como genéticamente y su sublocalización celular.

Tabla 10. Genes de proteínas mitocondriales que interactúan física y genéticamente con Tef4.

Gen	Descripción	Referencias interacciones con Tef4
<i>NEW1</i>	Proteína de unión a mRNA y factor de terminación traduccional. Su localización en mitocondria no se ha confirmado manualmente (Reinders et al., 2006; Sickmann et al., 2003).	(Gavin et al., 2002a, 2006; Hoppins et al., 2011)
<i>RPN11</i>	Proteína involucrada en la vía de degradación de proteínas. Las mutantes condicionales de este gen esencial muestran un fenotipo fragmentado de la red mitocondria. Se ha confirmado su localización mitocondrial (Hofmann et al., 2009)	(Costanzo et al., 2016; Guerrero et al., 2006a, 2008a)
<i>TEF2</i>	Gen no esencial que codifica para la proteína eEF1A. Se ha confirmado su localización mitocondrial (Brandina et al., 2006b).	(Costanzo et al., 2016; Gavin et al., 2002a)

Discusión

La proteína Tef4 se encuentra en la mitocondria de la levadura *S. cerevisiae*.

El proteoma mitocondrial de levadura contiene 8 proteína codificadas en el genoma mitocondrial y más de mil codificadas en el genoma nuclear (Flores-Mireles et al., 2023; Gonczarowska-Jorge et al., 2017; Renvoisé et al., 2014; Sasikumar et al., 2012). Lo que implica que la mayoría de las proteínas son importadas desde el citosol. En estos proteomas se han encontrado proteínas citosólicas involucradas en la síntesis de proteínas como es el caso de eIF5A, eIF4G1, New1 y eEF1By (codificada por el gen *TEF4* en levadura).

La mayoría de las proteínas mitocondriales sintetizadas en citosol (alrededor de 60-70 %) contienen una presecuencia señal en el amino terminal que se escinde después de la importación a la mitocondria (Busch et al., 2023). Sin embargo, no se ha identificado ninguna señal de este tipo en ningún factor de traducción citosólica. Por lo tanto, se decidió realizar un estudio *in silico* de la proteína Tef4 utilizando el predictor MitoFates, el cual arrojó una baja probabilidad (0.013) (Tabla 11) de que Tef4 posea una presecuencia mitocondrial. Además, se empleó el predictor DeepMito (Savojardo et al., 2019) para determinar la probabilidad de que Tef4 se localice en cualquier compartimento mitocondrial. El resultado indicó que existe un 31 % de probabilidad que se encuentre en la membrana interna mitocondrial (Tabla 11). Sin embargo, el software no predice la localización de Tef4 se localice en mitocondria debido a que la probabilidad es inferior al 50 %.

Tabla 11. Probabilidad de que la proteína Tef4 contenga una presecuencia mitocondrial o se localice en mitocondria

Programa utilizado	Probabilidad	¿Está en mitocondria?
MitoFates	0.013 de presentar una presecuencia mitocondrial	No
DeepMito	0.31 en membrana interna mitocondrial	No

Se ha reportado que, en humanos, el factor de elongación eEF1By – proteína homóloga de Tef4 –, se localiza en la mitocondria (Pisani et al., 2016). Además, diferentes proteomas mitocondriales realizados en levadura en los últimos años han identificado a Tef4, pero no a su isoforma Tef3, en este organelo (Flores-Mireles et al., 2023; Gonczarowska-Jorge et al., 2017; Reinders et al., 2006; Renvoisé et al., 2014; Schulte et al., 2023b; Sickmann et al., 2003).

Con el fin de comprobar su localización en mitocondria de forma experimental, se purificaron mitocondrias de una cepa con Tef4 etiquetada con 3xHA, con lo que se confirmó la localización de Tef4 en mitocondria, en una concentración menos abundante que en citosol (Figura 6).

A pesar de que los predictores utilizados no logran localizar a Tef4 en la mitocondria, un análisis bioinformático de los codones de inicio no canónicos (Monteuuis et al., 2019), los cuales dirigen a las proteínas hacia la mitocondria, sugirió un inicio de traducción distinto para Tef4. Este estaría localizado 18 nt río arriba del ORF, siendo el codón de inicio TTG en lugar de ATG) (Monteuuis et al., 2019). Aunque este cambio de ORF, no predice ninguna presecuencia, y los datos que se tienen hasta el momento son insuficientes para aseverar que esta isoforma se traduce de forma significativa, sería interesante mutar el codón de inicio no canónico, TTG, para poner a prueba esta hipótesis.

Después de confirmar la localización mitocondrial de Tef4, se incubaron las mitocondrias con proteinasa K con el propósito de conocer la localización submitocondrial. Los resultados indicaron que Tef4 se encuentra en la periferia de la membrana externa mitocondrial, ya que al incubar a las mitocondrias con PK se perdió a Tef4, como sucedió con un control de proteína que ve hacia el lado citosólico de la membrana externa mitocondrial (Tom20). Esta observación nos conduce a dos posibilidades: la primera es que Tef4 se asocie de forma indirecta a la mitocondria a través de un complejo, por ejemplo, siendo parte del complejo eEF1 (complejo de elongación eucarionte 1). Alternativamente, Tef4 se podría asociar directamente mediante un dominio transmembranal. Para explorar esta última hipótesis, se utilizaron dos predictores de dominios transmembranales (Tabla 12 y 13). Como control se utilizó la secuencia proteica de Tom20, proteína que posee un segmento transmembranal (Eaglesfield & Tokatlidis, 2021b); y Mdl1, proteína que posee 6 segmentos transmembranales (Eaglesfield & Tokatlidis, 2021b). El predictor DeepTMHMM (Hallgren et al., 2022), predijo de forma eficiente los cruces transmembranales de Mdl1, pero no de Tom20 (Tabla 12), mientras que el predictor Orient TM (Liakopoulos et al., 2001) predijo cruces transmembranales en ambas proteínas, pero no el número correcto. Sin embargo, ningún software predice algún segmento transmembranal en la secuencia de Tef4. Por lo que, aunque no es imposible, es poco probable que Tef4 posea un cruce transmembranal.

Tabla 12. Predicción de cruces transmembranales. Estos resultados se obtuvieron mediante el predictor DeepTMHMM (Hallgren et al., 2022)

Proteína	Cruces transmembranales predichos	Cruces transmembranales
Mdl1	6	6
Tom20	0	1
Tef4	0	N/D

Tabla 13. Predicción de cruces transmembranales. Estos resultados se obtuvieron mediante el predictor Orient TM (Liakopoulos et al., 2001)

Proteína	Cruces transmembranales predichos	Cruces transmembranales
Mdl1	5	6
Tom20	2	1
Tef4	0	N/D

El factor de elongación eEF1A se ha reportado que está asociado a la superficie de la membrana externa mitocondrial asociado a un macrocomplejo (Brandina et al., 2006b). Este macrocomplejo se compone de transportadores mitocondriales, enzimas glucolíticas y factores de traducción (Brandina et al., 2006b). Ya que eEF1A forma parte del complejo de elongación eEF1 al igual que Tef4, es posible que la asociación a mitocondria de Tef4 dependa de eEF1A (codificado por *TEF1* y *TEF2* en levadura) (Brandina et al., 2006b). Aún no se conoce la función de este macrocomplejo. Se especula que podría regular el transporte del piruvato a la mitocondria, o estar involucrado en la importación de tRNAs a la mitocondria (Baleva et al., 2017). Por lo que es necesario que se caractericen los factores y enzimas que lo conforman para poder elucidar su función. Así como también investigar la presencia de Tef4 en el macrocomplejo de la enolasa.

El dominio Glutación S-Transferasa no actúa en la vía de eliminación del peróxido de hidrógeno en la cepa de laboratorio D273-10b

Como se mencionó anteriormente, la proteína Tef4 presenta un dominio GST, que se cree que es catalíticamente activo (Jeppesen et al., 2003; Renou et al., 2022). Aunque no se ha comprobado experimentalmente, se ha reportado que la delección del gen *TEF4*, en la cepa de laboratorio BY4741, hace más sensible a la cepa al estrés oxidativo por peróxido de hidrógeno (Todorova et al., 2007). Aunado a que Tef4 se localiza en mitocondria y considerando que este organelo es una de las principales fuentes generadores de ROS, es posible que la función de Tef4 en mitocondria sea la de regular o percibir estrés oxidativo.

Con el fin de investigar el papel de Tef4 en la cepa D273-10b, se decidió replicar el experimento realizado por Todorova et al., en 2007. Sin embargo, no se encontró que la cepa $\Delta tef4$ fuera sensible a H_2O_2 , como sí lo es en el fondo genético BY4741. Por ello se realizó un alineamiento del DNA genómico de *TEF4* entre ambas cepas (Anexo 3) para conocer si el cambio en el fenotipo se debía a alguna mutación en el genoma, pero no se encontró ninguna diferencia entre las secuencias. Por lo que es posible que el fenotipo sea dado por diferencias genéticas y cómo éstas interactúan entre sí, propias de la cepa de laboratorio que se estudió. Existiendo ejemplos de proteínas que no conservan su función entre cepas de laboratorio de *S. cerevisiae* (García-Guerrero et al., 2018)

Que la mutante nula $\Delta tef4$ no sea sensible a peróxido nos indica que al menos en estas condiciones, el dominio GST no está ejerciendo función alguna en la vía de eliminación del peróxido de hidrógeno. O tal vez sí participa en esta vía, pero su función no es fundamental porque otras proteínas podrían ser más activas que Tef4, al menos en estas condiciones.

La proteína Tef4 no regula la morfología de la red mitocondrial

La regulación de la morfología mitocondrial que ejerce la subunidad γ en humanos (heEF1By) se da mediante la proteína vimentina. Siendo la vimentina una proteína de filamento intermedio estructural y parcialmente localizada en mitocondria, cuyo *knockdown* conlleva a la fragmentación y desorganización de la mitocondria (Corbi et al., 2010). El silenciamiento de heEF1By causa la incorrecta compartimentalización de la vimentina y por ende la fragmentación de la red mitocondrial. Esto se debe a que, en humanos, heEF1By se une a la región promotora del mRNA de la vimentina co-localizandola en mitocondria (Corbi et al., 2010).

Pisani en 2016 reportó que el ortólogo de la proteína Tef4 en humano, al expresarse en células HeLa, y después de silenciarse mediante un *small interfering RNA* (siRNA) específico para Tef4 de humano, mostró una afectación en la red mitocondrial. Por lo anterior, se decidió analizar si en las mutantes $\Delta tef4$ se veía algún efecto en la morfología de la red mitocondrial. Ni en un medio con glucosa, ni con galactosa, se observó fragmentación o alguna otra diferencia en la red mitocondrial en las cepas $\Delta tef3$, $\Delta tef3/4$ y $\Delta tef4$ (Figura 10 y 12).

Comparando las secuencias proteicas, el porcentaje de identidad entre heEF1By y Tef4 es 35.4 % (Tabla 14), –entre Tef3 y heEF1By es de 34.6 % – lo que indica una baja identidad entre secuencias. Sin embargo, a lo largo de todo el alineamiento, muchos aminoácidos están conservados (Figura 15). Los dominios de unión a RNA de heEF1By están a lo largo de toda la secuencia proteica, la cual consta de 437 aminoácidos (Pisani et al., 2016). Debido a lo anterior, no se puede concluir mediante la alineación de ambas secuencias si

Tef4 es capaz de unirse a RNA, ya que no son muy similares entre sí. Por otra parte, no hay un ortólogo de la vimentina en levadura que pudiera estar regulando la morfología mitocondrial. Lo anterior, aunado a que la delección de las dos isoformas de la subunidad y no muestra una afectación en la red mitocondrial, nos indica que la localización mitocondrial de Tef4 no está involucrada con la regulación de la morfología mitocondrial.

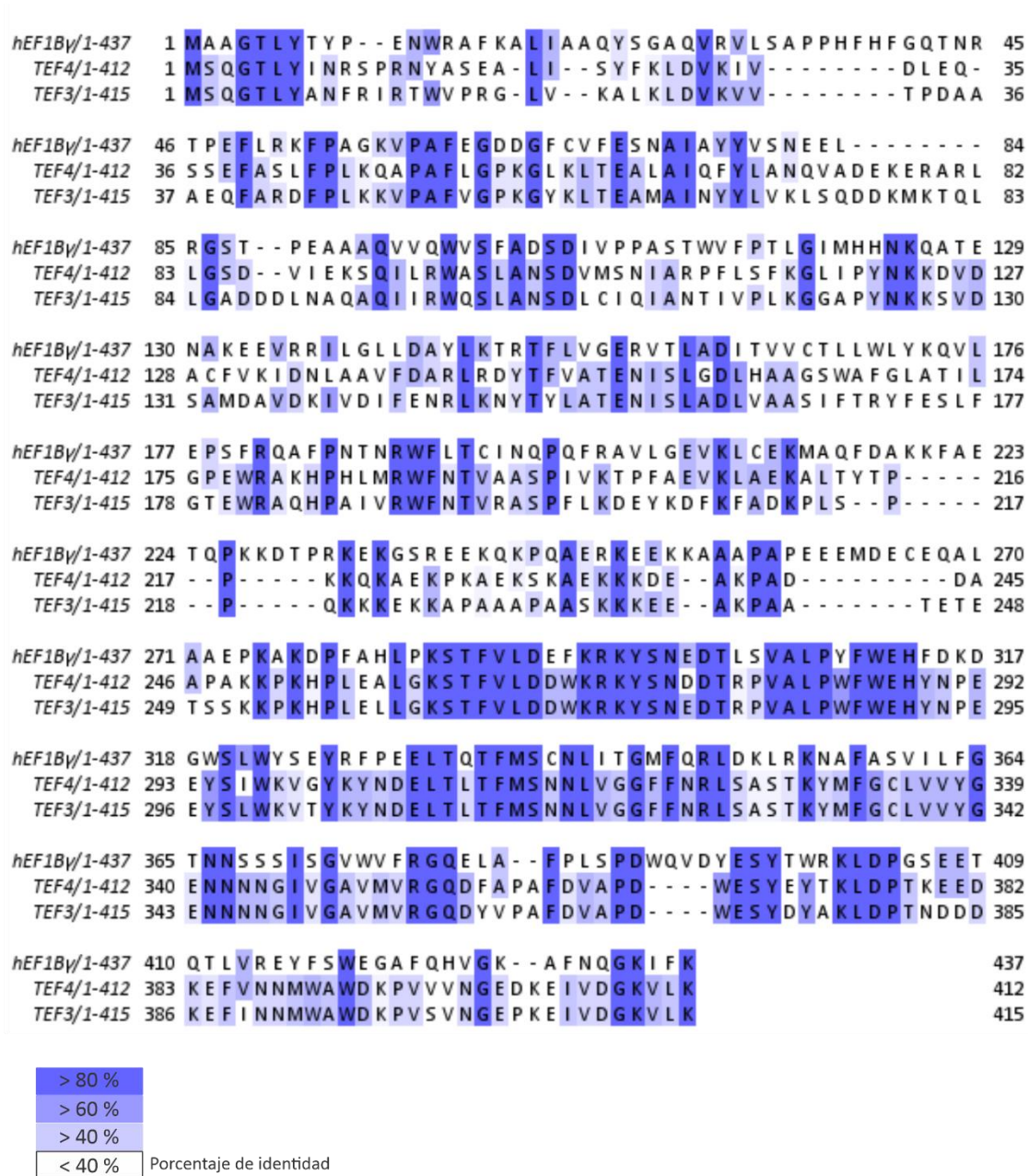


Figura 15 Alineamiento de las proteínas hEF1By de humano, Tef4 y Tef3. El color indica el porcentaje de identidad. El alineamiento fue hecho con el software Clustal W (Sievers et al., 2011) y Jalview

Tabla 14. Matriz porcentaje de identidad entre las proteínas heEF1G, Tef4 y Tef3. El alineamiento fue realizado con el software Clustal W (Sievers et al., 2011)

Proteína	heEF1By	Tef4	Tef3
heEF1By	100.0%	35%	35%
Tef4	35.4%	100%	65%
Tef3	34.6%	65%	100%

En este estudio, se confirmó que la proteína Tef4 se localiza en la mitocondria en la superficie de la membrana externa. Sin embargo, aún falta investigar cómo es que se da esta asociación, la cual pensamos que ocurre de forma indirecta a través del factor de elongación eucarionte 1 (eEF1), ya que el factor de traducción, Tef2 (eEF1A), también se ha reportado en la superficie de la membrana externa mitocondrial (Brandina et al., 2006b).

Además de la localización, es necesario elucidar la función de Tef4 en este organelo. Basándose en los análisis realizados a través de la base de datos de SGD (Anexo 5 y 6), se proponen tres posibles hipótesis sobre su función:

1. **Participación en la traducción mitocondrial:** El factor de traducción eEF1 se localiza en la superficie de mitocondria, así como los polisomas, lo que podría sugerir que su función en la mitocondria se deba a la colocalización de la traducción citosólica en este organelo.
2. **Participación en el macrocomplejo de enolasa:** Tef4, junto con Tef2 y Tef1, podría formar parte del macrocomplejo de la enolasa (Baleva et al., 2017; Brandina et al., 2006b). Y aunque la función de este complejo aún no se conozca, es posible que el esclarecimiento de este nos ayude a elucidar la función Tef4 en mitocondria.
3. **Participación en la vía de degradación mitofágica:** Esta hipótesis se basa en la observación de que la doble mutante $\Delta tef3/4$ presenta un defecto en el recambio de proteínas oxidadas en condiciones de estrés oxidativo, utilizando sulfato de cadmio como agente oxidante (Esposito & Kinzy, 2010b). Dado que el cadmio afecta la cadena de transporte de electrones, esto sugiere una conexión entre Tef4 y la respuesta a daños mitocondriales (Branca et al., 2020). Además, existen informes de que en la mutante $\Delta tef4$ hay una disminución de la autofagia en un medio deficiente de nitrógeno (Dengjel et al., 2012). La cepa $\Delta tef4$ también muestra sensibilidad a la rapamicina, un fármaco inductor de la mitofagia (Nicastro et al., 2021; Parsons et al., 2003; Xie et al., 2005). Además, Tef4 interactúa genéticamente con Atg21 (Costanzo et al., 2016), una proteína involucrada en la formación de

vesículas para la degradación en el citosol en la vía mitofágica. Aunado a lo anterior, Tef4 interactúa genética y físicamente con Rpn11, la cual a la par de Tef4, es una proteína que pertenece al complejo del proteasoma 26S (Costanzo et al., 2016; Guerrero et al., 2006b, 2008b; Kaake et al., 2010). Siendo que este complejo regula la cantidad de Atg32 –proteína de la membrana externa mitocondrial que inicia la mitofagia– al degradarla. (Camougrand et al., 2020). Estas observaciones respaldan la posibilidad de que Tef4 participe en la regulación de la vía mitofágica.

Conclusiones

- La proteína Tef4 se localiza en la superficie de la membrana externa mitocondrial cuando las células se crecen en un medio con galactosa.
- Utilizando la microscopía de epifluorescencia, no se observó ningún cambio en la morfología de la red mitocondrial en las mutantes nulas de los genes *TEF3* y *TEF4*.
- Las mutantes nulas de los genes *TEF3*, *TEF4* y *TEF3/4* crecen en medios respiratorios al igual que la cepa silvestre.
- Las mutantes nulas $\Delta tef3$, $\Delta tef3$ y $\Delta tef3/4$, no son sensibles a H_2O_2

Perspectivas

- Realizar una IP de la proteína Tef4 3xHA con mitocondrias puras con el fin de conocer a las proteínas que interactúan con Tef4 a través de espectrometría de masas. Para así conocer las interacciones que presenta la proteína al estar unida a la superficie mitocondrial
- Eliminar a la subunidad eEF1A (*TEF1* y *TEF2*) con el fin de conocer si la localización mitocondrial de Tef4 depende del complejo eEF1.
- Eliminar a la enolasa (*ENO1* y *ENO2*) con el fin de conocer si la localización mitocondrial de Tef4 depende el complejo de la enolasa.
- Verificar que Tef3 no se asocia a la superficie mitocondrial, como sí lo hace Tef4.
- Realizar ensayos de mitofagia con un medio deficiente en nitrógeno en mutantes carentes de Tef3 y Tef4.

Referencias

- Achilonu, I., Elebo, N., Hlabano, B., Owen, G. R., Papathanasopoulos, M., & Dirr, H. W. (2018). An update on the biophysical character of the human eukaryotic elongation factor 1 beta: Perspectives from interaction with elongation factor 1 gamma. *Journal of Molecular Recognition*, *31*(7). <https://doi.org/10.1002/JMR.2708>
- Achilonu, I., Siganunu, T. P., & Dirr, H. W. (2014). Purification and characterisation of recombinant human eukaryotic elongation factor 1 gamma. *Protein Expression and Purification*, *99*, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2014.04.003>
- Aretz, I., Jakubke, C., & Osman, C. (2020). Power to the daughters – mitochondrial and mtDNA transmission during cell division. *Biological Chemistry*, *401*(5), 533–546. <https://doi.org/10.1515/hsz-2019-0337>
- Baleva, M. V., Meyer, M., Entelis, N., Tarassov, I., Kamenski, P., & Masquida, B. (2017). Factors beyond enolase 2 and mitochondrial lysyl-tRNA synthetase precursor are required for tRNA import into yeast mitochondria. *Biochemistry (Moscow)*, *82*(11), 1324–1335. <https://doi.org/10.1134/S0006297917110104>
- Bchini, R., Girardet, J., Sormani, R., Gelhaye, E., & Morel-Rouhier, M. (2021). Oxidized glutathione promotes association between eukaryotic translation elongation factor 1By and Ure2p glutathione transferase from *Phanerochaete chrysosporium*. *The FEBS Journal*, *288*(9), 2956–2969. <https://doi.org/10.1111/febs.15614>
- Board, P. G., Coggan, M., Wilcet, M. C. J., & Parkert, M. W. (1995). Evidence for an essential serine residue in the active site of the Theta class glutathione transferases. *Biochem. J*, *311*, 247–250.
- Boldogh, I. R., & Pon, L. A. (2007). Purification and Subfractionation of Mitochondria from the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Cell Biology*, *80*, 45–64. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(06\)80002-6](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(06)80002-6)
- Branca, J. J. V., Fiorillo, C., Carrino, D., Paternostro, F., Taddei, N., Gulisano, M., Pacini, A., & Becatti, M. (2020). Cadmium-induced oxidative stress: Focus on the central nervous system. *Antioxidants*, *9*(6), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX9060492>
- Brandina, I., Graham, J., Lemaitre-Guillier, C., Entelis, N., Krasheninnikov, I., Sweetlove, L., Tarassov, I., & Martin, R. P. (2006a). Enolase takes part in a macromolecular complex

associated to mitochondria in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1757(9–10), 1217–1228. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.07.001>

Brandina, I., Graham, J., Lemaitre-Guillier, C., Entelis, N., Krasheninnikov, I., Sweetlove, L., Tarassov, I., & Martin, R. P. (2006b). Enolase takes part in a macromolecular complex associated to mitochondria in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1757(9–10), 1217–1228. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.07.001>

Busch, J. D., Fielden, L. F., Pfanner, N., & Wiedemann, N. (2023). Mitochondrial protein transport: Versatility of translocases and mechanisms. *Molecular Cell*, 83(6), 890–910. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2023.02.020>

Camougrand, N., Vigié, P., Gonzalez, C., Manon, S., & Bhatia-Kiššová, I. (2020). The yeast mitophagy receptor Atg32 is ubiquitinated and degraded by the proteasome. *PLOS ONE*, 15(12), e0241576. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0241576>

Corbi, N., Batassa, E. M., Pisani, C., Onori, A., Di Certo, M. G., Strimpakos, G., Fanciulli, M., Mattei, E., & Passananti, C. (2010). The eEF1 γ Subunit Contacts RNA Polymerase II and Binds Vimentin Promoter Region. *PLoS ONE*, 5(12), e14481-91. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014481>

Costanzo, M., VanderSluis, B., Koch, E. N., Baryshnikova, A., Pons, C., Tan, G., Wang, W., Usaj, M., Hanchard, J., Lee, S. D., Pelechano, V., Styles, E. B., Billmann, M., Van Leeuwen, J., Van Dyk, N., Lin, Z. Y., Kuzmin, E., Nelson, J., Piotrowski, J. S., ... Boone, C. (2016). A global genetic interaction network maps a wiring diagram of cellular function. *Science*, 353(6306). https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAF1420/SUPPL_FILE/COSTANZO-SM.PDF

Couvillion, M. T., Soto, I. C., Shipkovenska, G., & Churchman, L. S. (2016). Synchronized mitochondrial and cytosolic translation programs. *Nature*, 533(7604), 499–503. <https://doi.org/10.1038/nature18015>

den Brave, F., Gupta, A., & Becker, T. (2021). Protein Quality Control at the Mitochondrial Surface. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 795685. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.795685/BIBTEX>

Dengjel, J., Høyer-Hansen, M., Nielsen, M. O., Eisenberg, T., Harder, L. M., Schandorff, S., Farkas, T., Kirkegaard, T., Becker, A. C., Schroeder, S., Vanselow, K., Lundberg, E., Nielsen, M. M., Kristensen, A. R., Akimov, V., Bunkenborg, J., Madeo, F., Jäättelä, M., & Andersen, J. S. (2012). Identification of autophagosome-associated proteins and

- regulators by quantitative proteomic analysis and genetic screens. *Molecular and Cellular Proteomics*, 11(3), M111.014035. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.014035>
- Dennerlein, S., Wang, C., & Rehling, P. (2017). Plasticity of Mitochondrial Translation. *Trends in Cell Biology*, 27(10), 712–721. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.05.004>
- Dever, T. E., Kinzy, T. G., & Pavitt, G. D. (2016). Mechanism and Regulation of Protein Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 203(1), 65–107. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.186221>
- Díaz-Granados, V. H., & Pérez-Martínez, X. (2022). *Estudio de la función del factor de traducción citosólico eIF5A sobre la mitocondria de Saccharomyces cerevisiae*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Eaglesfield, R., & Tokatlidis, K. (2021a). Targeting and Insertion of Membrane Proteins in Mitochondria. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.803205>
- Eaglesfield, R., & Tokatlidis, K. (2021b). Targeting and Insertion of Membrane Proteins in Mitochondria. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 803205. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.803205/BIBTEX>
- Eliyahu, E., Pnueli, L., Melamed, D., Scherrer, T., Gerber, A. P., Pines, O., Rapaport, D., & Arava, Y. (2010). Tom20 Mediates Localization of mRNAs to Mitochondria in a Translation-Dependent Manner. *Molecular and Cellular Biology*, 30(1), 284–294. <https://doi.org/10.1128/mcb.00651-09>
- Ellenrieder, L., Rampelt, H., & Becker, T. (2017). Connection of Protein Transport and Organelle Contact Sites in Mitochondria. *Journal of Molecular Biology*, 429(14), 2148–2160. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.05.023>
- Esposito, A. M., & Kinzy, T. G. (2010a). The eukaryotic translation elongation factor 1By has a non-guanine nucleotide exchange factor role in protein metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 285(49), 37995–38004. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.160887>
- Esposito, A. M., & Kinzy, T. G. (2010b). The Eukaryotic Translation Elongation Factor 1By Has a Non-guanine Nucleotide Exchange Factor Role in Protein Metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 285(49), 37995–38004. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.160887>

- Flores-Mireles, D., Camacho-Villasana, Y., Lutikurti, M., García-Guerrero, A. E., Lozano-Rosas, G., Chagoya, V., Gutiérrez-Cirlos, E. B., Brandt, U., Cabrera-Orefice, A., & Pérez-Martínez, X. (2023). The cytochrome *b* carboxyl terminal region is necessary for mitochondrial complex III assembly. *Life Science Alliance*, *6*(7), e202201858. <https://doi.org/10.26508/lsa.202201858>
- Fox, T. D. (2012). Mitochondrial Protein Synthesis, Import, and Assembly. *Genetics*, *192*(4), 1203–1234. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.141267>
- García-Guerrero, A. E., Camacho-Villasana, Y., Zamudio-Ochoa, A., Winge, D. R., & Pérez-Martínez, X. (2018). Cbp3 and Cbp6 are dispensable for synthesis regulation of cytochrome *b* in yeast mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, *293*(15), 5585–5599. <https://doi.org/10.1074/JBC.RA117.000547/ATTACHMENT/4DD193CA-608F-4DBC-8E7D-E544A1B2245A/MMC1.PDF>
- García-Guerrero, A. E., Zamudio-Ochoa, A., Camacho-Villasana, Y., García-Villegas, R., Pérez-Martínez, X., & Reyes-Prieto, A. (2016). Evolution of translation in mitochondria. In *Evolution of the Protein Synthesis Machinery and Its Regulation* (pp. 109–142). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39468-8_6
- García-Rodríguez, L. J., Gay, A. C., & Pon, L. A. (2007). Puf3p, a Pumilio family RNA binding protein, localizes to mitochondria and regulates mitochondrial biogenesis and motility in budding yeast. *Journal of Cell Biology*, *176*(2), 197–207. <https://doi.org/10.1083/jcb.200606054>
- García-Villegas, R., Camacho-Villasana, Y., Shingú-Vázquez, M. Á., Cabrera-Orefice, A., Uribe-Carvajal, S., Fox, T. D., & Pérez-Martínez, X. (2017). The Cox1 C-terminal domain is a central regulator of cytochrome *c* oxidase biogenesis in yeast mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, *292*(26), 10912–10925. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.773077>
- Gavin, A. C., Aloy, P., Grandi, P., Krause, R., Boesche, M., Marzioch, M., Rau, C., Jensen, L. J., Bastuck, S., Dümpelfeld, B., Edelmann, A., Heurtier, M. A., Hoffman, V., Hoefert, C., Klein, K., Hudak, M., Michon, A. M., Schelder, M., Schirle, M., ... Superti-Furga, G. (2006). Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature*, *440*(7084), 631–636. <https://doi.org/10.1038/nature04532>
- Gavin, A. C., Bösch, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J. M., Michon, A. M., Cruciat, C. M., Remor, M., Höfert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., ... Superti-Furga, G. (2002a).

- Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 2002 415:6868, 415(6868), 141–147. <https://doi.org/10.1038/415141a>
- Gavin, A. C., Bösch, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J. M., Michon, A. M., Cruciat, C. M., Remor, M., Höfert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., ... Superti-Furga, G. (2002b). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 2002 415:6868, 415(6868), 141–147. <https://doi.org/10.1038/415141a>
- Gerber, A. P., Herschlag, D., & Brown, P. O. (2004). Extensive association of functionally and cytologically related mRNAs with Puf family RNA-binding proteins in yeast. *PLoS Biology*, 2(3), 0342–0354. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020079>
- Goldstein, A. L., & McCusker, J. H. (1999). Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 15(14), 1541–1553. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199910\)15:14<1541::AID-YEA476>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199910)15:14<1541::AID-YEA476>3.0.CO;2-K)
- Gonczarowska-Jorge, H., Zahedi, R. P., & Sickmann, A. (2017). The proteome of baker's yeast mitochondria. *Mitochondrion*, 33, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2016.08.007>
- Goujon, M., McWilliam, H., Li, W., Valentin, F., Squizzato, S., Paern, J., & Lopez, R. (2010). A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research*, 38(Web Server), W695–W699. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq313>
- Grant, C. M. (2011). Regulation of Translation by Hydrogen Peroxide. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(1), 191–203. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3699>
- Grant, C. M., MacIver, F. H., & Dawes, I. W. (1997). Mitochondrial function is required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 410(2–3), 219–222. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00592-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00592-9)
- Grousl, T., Ivanov, P., Malcova, I., Pompach, P., & Frydlova, I. (2013). Heat Shock-Induced Accumulation of Translation Elongation and Termination Factors Precedes Assembly of Stress Granules in *S. cerevisiae*. *PLoS ONE*, 8(2), 57083. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057083>

- Guerrero, C., Milenković, T., Pržulj, N., Kaiser, P., & Huang, L. (2008a). Characterization of the proteasome interaction network using a QTAX-based tag-team strategy and protein interaction network analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(36), 13333–13338. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801870105>
- Guerrero, C., Milenković, T., Pržulj, N., Kaiser, P., & Huang, L. (2008b). Characterization of the proteasome interaction network using a QTAX-based tag-team strategy and protein interaction network analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(36), 13333–13338. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801870105>
- Guerrero, C., Tagwerker, C., Kaiser, P., & Huang, L. (2006a). An Integrated Mass Spectrometry-based Proteomic Approach. *Molecular & Cellular Proteomics*, *5*(2), 366–378. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500303-MCP200>
- Guerrero, C., Tagwerker, C., Kaiser, P., & Huang, L. (2006b). An integrated mass spectrometry-based proteomic approach: Quantitative analysis of tandem affinity-purified in vivo cross-linked protein complexes (QTAX) to decipher the 26 S proteasome-interacting network. *Molecular and Cellular Proteomics*, *5*(2), 366–378. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500303-MCP200>
- Hallgren, J., Tsigos, K. D., Damgaard Pedersen, M., Juan, J., Armenteros, A., Marcatili, P., Nielsen, H., Krogh, A., & Winther, O. (2022). DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks. *BioRxiv*, 2022.04.08.487609. <https://doi.org/10.1101/2022.04.08.487609>
- Hofmann, L., Saunier, R., Cossard, R., Esposito, M., Rinaldi, T., & Delahodde, A. (2009). A nonproteolytic proteasome activity controls organelle fission in yeast. *Journal of Cell Science*, *122*(20), 3673–3683. <https://doi.org/10.1242/jcs.050229>
- Hoppins, S., Collins, S. R., Cassidy-Stone, A., Hummel, E., DeVay, R. M., Lackner, L. L., Westermann, B., Schuldiner, M., Weissman, J. S., & Nunnari, J. (2011). A mitochondrial-focused genetic interaction map reveals a scaffold-like complex required for inner membrane organization in mitochondria. *Journal of Cell Biology*, *195*(2), 323–340. <https://doi.org/10.1083/JCB.201107053/VIDEO-3>
- Innokentev, A., & Kanki, T. (2021). Mitophagy in Yeast: Molecular Mechanism and Regulation. *Cells*, *10*(12), 3569. <https://doi.org/10.3390/cells10123569>
- Jeppesen, M. G., Ortiz, P., Shepard, W., Kinzy, T. G., Nyborg, J., & Andersen, G. R. (2003). The Crystal Structure of the Glutathione S-Transferase-like Domain of Elongation

- Factor 1B γ from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(47), 47190–47198. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306630200>
- Ježek, J., Cooper, K., & Strich, R. (2018). Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Dynamics: The Yin and Yang of Mitochondrial Dysfunction and Cancer Progression. *Antioxidants*, 7(1), 13. <https://doi.org/10.3390/antiox7010013>
- Kaake, R. M., Milenković, T., Pržulj, N., Kaiser, P., & Huang, L. (2010). Characterization of cell cycle specific protein interaction networks of the yeast 26S proteasome complex by the QTAX strategy. *Journal of Proteome Research*, 9(4), 2016–2029. <https://doi.org/10.1021/pr1000175>
- Khalimonchuk, O., Bird, A., & Winge, D. R. (2007). Evidence for a Pro-oxidant Intermediate in the Assembly of Cytochrome Oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 282(24), 17442–17449. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702379200>
- Kim, B., & Song, Y. S. (2016). Mitochondrial dynamics altered by oxidative stress in cancer. *Free Radical Research*, 50(10), 1065–1070. <https://doi.org/10.1080/10715762.2016.1210141>
- Kim, S., & Coulombe, P. A. (2010). Emerging role for the cytoskeleton as an organizer and regulator of translation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(1), 75–81. <https://doi.org/10.1038/nrm2818>
- Kim, S. H., Choi, J. H., Marsal-García, L., Amiri, M., Yanagiya, A., & Sonenberg, N. (2023). The mRNA translation initiation factor eIF4G1 controls mitochondrial oxidative phosphorylation, axonal morphogenesis, and memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 120(25), e2300008120. https://doi.org/10.1073/PNAS.2300008120/SUPPL_FILE/PNAS.2300008120.SD01.XLSX
- Kim, S., Kellner, J., Lee, C. H., & Coulombe, P. A. (2007). Interaction between the keratin cytoskeleton and eEF1B γ affects protein synthesis in epithelial cells. *Nature Structural and Molecular Biology*, 14(10), 982–983. <https://doi.org/10.1038/nsmb1301>
- Kobayashi, S., Kidou, S., & Ejiri, S. (2001). Detection and Characterization of Glutathione S-Transferase Activity in Rice EF-1 $\beta\beta'\gamma$ and EF-1 γ Expressed in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 288(3), 509–514. <https://doi.org/10.1006/BBRC.2001.5799>

- Kummer, E., & Ban, N. (2021). Mechanisms and regulation of protein synthesis in mitochondria. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 22(5), 307–325. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00332-2>
- Kundu, D., & Pasrija, R. (2020). The ERMES (Endoplasmic Reticulum and Mitochondria Encounter Structures) mediated functions in fungi. *Mitochondrion*, 52, 89–99. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.02.010>
- Kurihara, Y., Kanki, T., Aoki, Y., Hirota, Y., Saigusa, T., Uchiumi, T., & Kang, D. (2012). Mitophagy plays an essential role in reducing mitochondrial production of reactive oxygen species and mutation of mitochondrial DNA by maintaining mitochondrial quantity and quality in yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(5), 3265–3272. <https://doi.org/10.1074/JBC.M111.280156>
- Labbé, K., Murley, A., & Nunnari, J. (2014). Determinants and Functions of Mitochondrial Behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30(1), 357–391. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155756>
- Lapointe, C. P., Wilinski, D., Saunders, H. A. J., & Wickens, M. (2015). Protein-RNA networks revealed through covalent RNA marks. *Nature Methods*, 12(12), 1163–1170. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3651>
- Lee, C. Der, & Tu, B. P. (2015). Glucose-Regulated Phosphorylation of the PUF Protein Puf3 Regulates the Translational Fate of Its Bound mRNAs and Association with RNA Granules. *Cell Reports*, 11(10), 1638–1650. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.05.014>
- Liakopoulos, T. D., Pasquier, C., & Hamodrakas, S. J. (2001). A novel tool for the prediction of transmembrane protein topology based on a statistical analysis of the SwissProt database: the OrientTM algorithm. *Protein Engineering*, 14(6). <http://biophysics.biol.uoa.gr/DB-NTMR/>
- Liu, L., Li, Y., Chen, G., & Chen, Q. (2023). Crosstalk between mitochondrial biogenesis and mitophagy to maintain mitochondrial homeostasis. *Journal of Biomedical Science* 2023 30:1, 30(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/S12929-023-00975-7>
- Monteuuis, G., Miścicka, A., Świrski, M., Zenad, L., Niemitalo, O., Wrobel, L., Alam, J., Chacinska, A., Kastaniotis, A. J., & Kufel, J. (2019). Non-canonical translation initiation in yeast generates a cryptic pool of mitochondrial proteins. *Nucleic Acids Research*, 47(11), 5777–5791. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz301>

- Nicastro, R., Raucci, S., Michel, A. H., Stumpe, M., Osuna, G. M. G., Jaquenoud, M., Kornmann, B., & de Virgilio, C. (2021). Indole-3-acetic acid is a physiological inhibitor of TORC1 in yeast. *PLOS Genetics*, *17*(3), e1009414. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1009414>
- Olarewaju, O., Ortiz, P. A., Chowdhury, W. Q., Chatterjee, I., & Kinzy, T. G. (2004). The translation elongation factor eEF1B plays a role in the oxidative stress response pathway. *RNA Biology*, *1*(2), 89–94. <https://doi.org/10.4161/rna.1.2.1033>
- Ott, M., Amunts, A., & Brown, A. (2016). Organization and Regulation of Mitochondrial Protein Synthesis. *Annual Review of Biochemistry*, *85*(1), 77–101. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014334>
- Parsons, A. B., Brost, R. L., Ding, H., Li, Z., Zhang, C., Sheikh, B., Brown, G. W., Kane, P. M., Hughes, T. R., & Boone, C. (2003). Integration of chemical-genetic and genetic interaction data links bioactive compounds to cellular target pathways. *Nature Biotechnology* *2003 22:1*, *22*(1), 62–69. <https://doi.org/10.1038/nbt919>
- Perez-Martinez, X., Broadley, S. A., & Fox, T. D. (2003). Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. *EMBO Journal*, *22*(21), 5951–5961. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg566>
- Pisani, C., Onori, A., Gabanella, F., Delle Monache, F., Borreca, A., Ammassari-Teule, M., Fanciulli, M., Di Certo, M. G., Passananti, C., & Corbi, N. (2016). eEF1B binds the Che-1 and TP53 gene promoters and their transcripts. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, *35*(1), 146–159. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0424-x>
- Priesnitz, C., & Becker, T. (2018). *Pathways to balance mitochondrial translation and protein import*. <https://doi.org/10.1101/gad.316547>
- Qiu, J., Wenz, L. S., Zerbes, R. M., Oeljeklaus, S., Bohnert, M., Stroud, D. A., Wirth, C., Ellenrieder, L., Thornton, N., Kutik, S., Wiese, S., Schulze-Specking, A., Zufall, N., Chacinska, A., Guiard, B., Hunte, C., Warscheid, B., Van Der Laan, M., Pfanner, N., ... Becker, T. (2013). Coupling of mitochondrial import and export translocases by receptor-mediated supercomplex formation. *Cell*, *154*(3), 596–608. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.033>
- Ramakrishnan, V. (2002). Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell*, *108*(4), 557–572. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00619-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00619-0)

- Redza-Dutordoir, M., & Averill-Bates, D. A. (2021). Interactions between reactive oxygen species and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1868(8), 119041. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2021.119041>
- Reinders, J., Zahedi, R. P., Pfanner, N., Meisinger, C., & Sickmann, A. (2006). Toward the complete yeast mitochondrial proteome: Multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics. *Journal of Proteome Research*, 5(7), 1543–1554. <https://doi.org/10.1021/pr050477f>
- Renou, J., Sormani, R., Gelhaye, E., Didierjean, C., & Morel-Rouhier, M. (2022). Genomic and functional insights into the diversification of the elongation factor eEF1By in fungi. *Fungal Biology Reviews*. <https://doi.org/10.1016/J.FBR.2022.07.001>
- Renvoisé, M., Bonhomme, L., Davanture, M., Valot, B., Zivy, M., & Lemaire, C. (2014). Quantitative variations of the mitochondrial proteome and phosphoproteome during fermentative and respiratory growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Proteomics*, 106, 140–150. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.04.022>
- Rossjohn, J., McKinstry, W. J., Oakley, A. J., Verger, D., Flanagan, J., Chelvanayagam, G., Tan, K.-L., Board, P. G., & Parker, M. W. (1998). Human theta class glutathione transferase: the crystal structure reveals a sulfate-binding pocket within a buried active site. *Structure*, 6(3), 309–322. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(98\)00034-3](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(98)00034-3)
- Rowe, W., Kershaw, C. J., Castelli, L. M., Costello, J. L., Ashe, M. P., Grant, C. M., Sims, P. F. G., Pavitt, G. D., & Hubbard, S. J. (2014). Puf3p induces translational repression of genes linked to oxidative stress. *Nucleic Acids Research*, 42(2), 1026–1041. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt948>
- Sanders, J., Brandsma, M., Janssen, G. M. C., Dijk, J., & Möller, W. (1996). Immunofluorescence studies of human fibroblasts demonstrate the presence of the complex of elongation factor-1 $\beta\gamma\delta$ in the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science*, 109(5), 1113–1117.
- Sasikumar, A. N., Perez, W. B., & Kinzy, T. G. (2012). The many roles of the eukaryotic elongation factor 1 complex. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 3(4), 543–555. <https://doi.org/10.1002/wrna.1118>
- Savojardo, C., Bruciaferri, N., Tartari, G., Martelli, P. L., & Casadio, R. (2019). DeepMito: accurate prediction of protein sub-mitochondrial localization using convolutional neural networks. *Bioinformatics*, 36(1), 56–64. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz512>

- Schatton, D., & Rugarli, E. I. (2018). A concert of RNA-binding proteins coordinates mitochondrial function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 53(6), 652–666. <https://doi.org/10.1080/10409238.2018.1553927>
- Schneider, B. L., Seufert, W., Steiner, B., Yang, Q. H., & Futcher, A. B. (1995). Use of polymerase chain reaction epitope tagging for protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 11(13), 1265–1274. <https://doi.org/10.1002/yea.320111306>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Schulte, U., den Brave, F., Haupt, A., Gupta, A., Song, J., Müller, C. S., Engelke, J., Mishra, S., Mårtensson, C., Ellenrieder, L., Priesnitz, C., Straub, S. P., Doan, K. N., Kulawiak, B., Bildl, W., Rampelt, H., Wiedemann, N., Pfanner, N., Fakler, B., & Becker, T. (2023a). Mitochondrial complexome reveals quality-control pathways of protein import. *Nature*, 614(7946), 153–159. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05641-w>
- Schulte, U., den Brave, F., Haupt, A., Gupta, A., Song, J., Müller, C. S., Engelke, J., Mishra, S., Mårtensson, C., Ellenrieder, L., Priesnitz, C., Straub, S. P., Doan, K. N., Kulawiak, B., Bildl, W., Rampelt, H., Wiedemann, N., Pfanner, N., Fakler, B., & Becker, T. (2023b). Mitochondrial complexome reveals quality-control pathways of protein import. *Nature*, 614(7946), 153–159. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05641-w>
- Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H. E., Schönfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., Rehling, P., Pfanner, N., & Meisinger, C. (2003). The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(23), 13207–13212. <https://doi.org/10.1073/pnas.2135385100>
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., & Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7(1), 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
- Silverman, R. B. (2002). *The organic chemistry of enzyme-catalyzed reactions*. Academic Press. <http://www.sciencedirect.com:5070/book/9780080513362/organic-chemistry-of-enzyme-catalyzed-reactions>
- Todorova, T., Vuilleumier, S., & Kujumdzieva, A. (2007). Role of Glutathione S-Transferases and Glutathione in Arsenic and Peroxide Resistance in *Saccharomyces Cerevisiae*: A

Reverse Genetic Analysis Approach. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 21(3), 348–352. <https://doi.org/10.1080/13102818.2007.10817472>

- Toss Kinzy, T., Ripmaster, T. L., & Woolford, J. L. (1994). Multiple genes encode the translation elongation factor EF-1 γ in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 22(13), 2703–2707. <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L24222454%5Chttp://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=03051048&id=doi:&atitle=Multiple+genes+encode+the+translation+elongation+factor+EF-1+in+Saccharomyces+cerevisiae&stitle>
- Trosiuk, T. V., Shalak, V. F., Szczepanowski, R. H., Negrutskii, B. S., & El'skaya, A. V. (2016). A non-catalytic N-terminal domain negatively influences the nucleotide exchange activity of translation elongation factor 1B α . *FEBS Journal*, 283(3), 484–497. <https://doi.org/10.1111/febs.13599>
- Ulery, T. L., Heon Jang, S., & Jaehning, J. A. (1994). Glucose Repression of Yeast Mitochondrial Transcription: Kinetics of Derepression and Role of Nuclear Genes. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, 14(2), 1160–1170.
- Wang, Z., Sun, X., Wee, J., Guo, X., & Gu, Z. (2019). Novel insights into global translational regulation through Pumilio family RNA-binding protein Puf3p revealed by ribosomal profiling. *Current Genetics*, 65(1), 201–212. <https://doi.org/10.1007/s00294-018-0862-4>
- Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(12), 872–884. <https://doi.org/10.1038/nrm3013>
- Westermann, B., & Neupert, W. (2000). Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: Convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 16(15), 1421–1427. [https://doi.org/10.1002/1097-0061\(200011\)16:15<1421::AID-YEA624>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1097-0061(200011)16:15<1421::AID-YEA624>3.0.CO;2-U)
- Xie, M. W., Jin, F., Hwang, H., Hwang, S., Anand, V., Duncan, M. C., & Huang, J. (2005). Insights into TOR function and rapamycin response: Chemical genomic profiling by using a high-density cell array method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(20), 7215–7220. https://doi.org/10.1073/PNAS.0500297102/SUPPL_FILE/00297TABLE2.XLS

Anexos

Anexo 1. Inmunodetección de la proteína Tef4

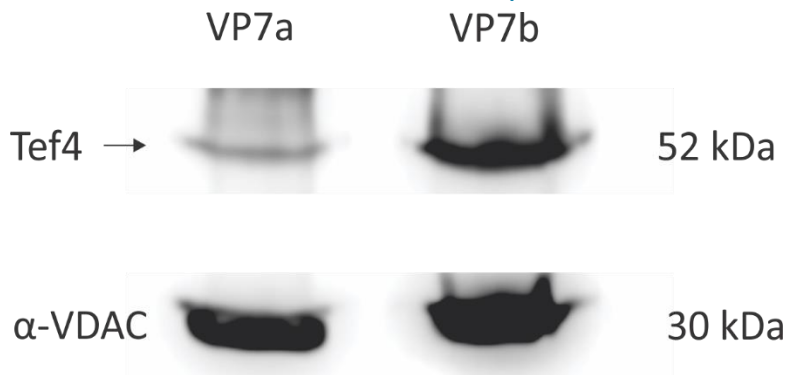
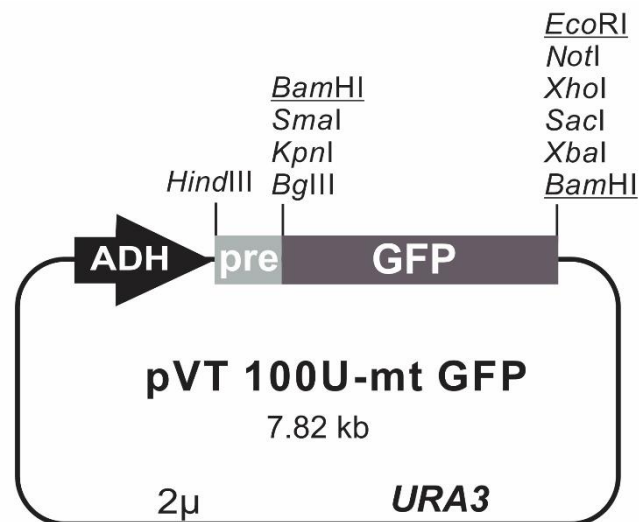


Figura 16. Western Blot de la cepa con la proteína Tef4 etiquetada con 3xHA. Se obtuvieron dos clones: VP7a y VP7b. Ambas se mandaron a secuenciar y no se encontró ninguna mutación. Para detectar a la proteína Tef4, se utilizó un anticuerpo contra HA peroxidasa, y α -VDAC como control de carga.

Anexo 2. Plásmido Pvt100U-mtGFP



Anexo 1. Representación del plásmido pVT100U-mtGFP. El plásmido incluye al marcador auxótrofo URA3. El promotor constitutivo del alcohol deshidrogenasa (ADH) se indica con una flecha negra. La presecuencia mitocondrial está indicada como "pre". Además, se indican los sitios de corte de las enzimas de restricción. (Westermann et al., 2000)

Anexo 3. Alineamiento del DNA genómico del gen *TEF4* de las cepas D273-10b y BY4741 con Clustal Omega (Goujon et al., 2010)

<i>TEF4</i> -D273-10b	1	ATGTCCCAAGGTA	CTTTATACATTAATAGATCTCCAAGAAACTACGCTTCTGAAGCTTTGATTTCTTACTTTAACTAGATGTCAAGATCGTTG	94
<i>TEF4</i> -BY4741	1	ATGTCCCAAGGTA	CTTTATACATTAATAGATCTCCAAGAAACTACGCTTCTGAAGCTTTGATTTCTTACTTTAACTAGATGTCAAGATCGTTG	94
<i>TEF4</i> -D273-10b	95	ATCTAGAA	CAATCTAGCGAGTTTGCTTCTTTGTTCCCATGAAGCAAGCCCCTGCATTTTGGGTCCAAAGGGCTTAAAGCTAACTGAAGCTTT	188
<i>TEF4</i> -BY4741	95	ATCTAGAA	CAATCTAGCGAGTTTGCTTCTTTGTTCCCATGAAGCAAGCCCCTGCATTTTGGGTCCAAAGGGCTTAAAGCTAACTGAAGCTTT	188
<i>TEF4</i> -D273-10b	189	GGCTAT	CCAATTTTATTGTATGTTCCATATTTTATTTTAACTTCCACATACATTGTTTTGCGCGTTTCCCCTTTCGTTTATTTGGCACGTCAT	282
<i>TEF4</i> -BY4741	189	GGCTAT	CCAATTTTATTGTATGTTCCATATTTTATTTTAACTTCCACATACATTGTTTTGCGCGTTTCCCCTTTCGTTTATTTGGCACGTCAT	282
<i>TEF4</i> -D273-10b	283	TTTTCTTCGAAA	CATAATGATGAAAAAAATTTTATCAAAACAGTTATCCCTGCTCGAATGGGTAATAAGGTAACCTCTCATATGTTGATATT	376
<i>TEF4</i> -BY4741	283	TTTTCTTCGAAA	CATAATGATGAAAAAAATTTTATCAAAACAGTTATCCCTGCTCGAATGGGTAATAAGGTAACCTCTCATATGTTGATATT	376
<i>TEF4</i> -D273-10b	377	TGATTTCTGATA	TGTTCTTAAAGAAAAAGAAAGTCAAAATAACAAAAAGGAAGTACAAAGCGTGTCTTAATCCAGGAAAAATATAAAGGA	470
<i>TEF4</i> -BY4741	377	TGATTTCTGATA	TGTTCTTAAAGAAAAAGAAAGTCAAAATAACAAAAAGGAAGTACAAAGCGTGTCTTAATCCAGGAAAAATATAAAGGA	470
<i>TEF4</i> -D273-10b	471	TGTTTTACTAA	CATTTCTTCAATTAATGGTGTATAAACCATCGAGATGATGTATATTTAGTGGCTAATCAAGTTGCCGATGAAAAAGAAAGAG	564
<i>TEF4</i> -BY4741	471	TGTTTTACTAA	CATTTCTTCAATTAATGGTGTATAAACCATCGAGATGATGTATATTTAGTGGCTAATCAAGTTGCCGATGAAAAAGAAAGAG	564
<i>TEF4</i> -D273-10b	565	CTCGCTTATTAG	GGTCCGACGTTATCGAAAAGTCTCAAACTCTTAGATGGGCATCTCTAGCTAATCCGATGTCATGAGCAACATTGCTCGTCC	658
<i>TEF4</i> -BY4741	565	CTCGCTTATTAG	GGTCCGACGTTATCGAAAAGTCTCAAACTCTTAGATGGGCATCTCTAGCTAATCCGATGTCATGAGCAACATTGCTCGTCC	658
<i>TEF4</i> -D273-10b	659	ATTCCTTCTTT	CAAAGGTTTGATTCATACAAAGAAAGACGTTGATGCTTGTITTTGTTAAAAACGACAACTAGCTGCTGTCTTCGATGCT	752
<i>TEF4</i> -BY4741	659	ATTCCTTCTTT	CAAAGGTTTGATTCATACAAAGAAAGACGTTGATGCTTGTITTTGTTAAAAACGACAACTAGCTGCTGTCTTCGATGCT	752
<i>TEF4</i> -D273-10b	753	AGATTGAGAGA	CTACACCTTTGTTGCTACCGAAAAATTTCTCTAGGTGACCTTCATGCCGCTGGTTCTTGGGCTTTTGGTTGGCCATATT	846
<i>TEF4</i> -BY4741	753	AGATTGAGAGA	CTACACCTTTGTTGCTACCGAAAAATTTCTCTAGGTGACCTTCATGCCGCTGGTTCTTGGGCTTTTGGTTGGCCATATT	846
<i>TEF4</i> -D273-10b	847	TGGGCCCTGA	TGGAGAGCTAAGCATCCTCATTTGATGAGATGGTCAAACCTGTTGCTGCTTCTCCAATCGTGAAGACTCCATTTGCTGAAGT	940
<i>TEF4</i> -BY4741	847	TGGGCCCTGA	TGGAGAGCTAAGCATCCTCATTTGATGAGATGGTCAAACCTGTTGCTGCTTCTCCAATCGTGAAGACTCCATTTGCTGAAGT	940
<i>TEF4</i> -D273-10b	941	CAAAATGGCT	GAAAAGGCTCTAACCTACACTCCAACAAAGAAAGCAAAAGGCTGAAAAGCCAAAGCCGAAAAGTCAAAGGCTGAAAAGAAAG	1034
<i>TEF4</i> -BY4741	941	CAAAATGGCT	GAAAAGGCTCTAACCTACACTCCAACAAAGAAAGCAAAAGGCTGAAAAGCCAAAGCCGAAAAGTCAAAGGCTGAAAAGAAAG	1034
<i>TEF4</i> -D273-10b	1035	GACGAAGCTA	AGCCAGCAGATGATGCTGCTCCAGCTAAAAGCCAAAGCACCCATTGGAAGCTTTAGGAAAGTCCAATTTGTCTTGGATGACT	1128
<i>TEF4</i> -BY4741	1035	GACGAAGCTA	AGCCAGCAGATGATGCTGCTCCAGCTAAAAGCCAAAGCACCCATTGGAAGCTTTAGGAAAGTCCAATTTGTCTTGGATGACT	1128
<i>TEF4</i> -D273-10b	1129	GGAAAGAGAA	AGTACTCCAAACGACGACACACGACCAAGTTGCTTTGCCATGGTTCTGGGAAACACTAACCCCTGAAGAATACTCCATCTGGAAGGT	1222
<i>TEF4</i> -BY4741	1129	GGAAAGAGAA	AGTACTCCAAACGACGACACACGACCAAGTTGCTTTGCCATGGTTCTGGGAAACACTAACCCCTGAAGAATACTCCATCTGGAAGGT	1222
<i>TEF4</i> -D273-10b	1223	TGGTTACAA	ATACAAACGACGAACTTACCTTGACTTTTATGTCCTCAACAACTGGTCCGTTGGTTTTTCAAACAGATTGTCGCTTCTACTAAGTA	1316
<i>TEF4</i> -BY4741	1223	TGGTTACAA	ATACAAACGACGAACTTACCTTGACTTTTATGTCCTCAACAACTGGTCCGTTGGTTTTTCAAACAGATTGTCGCTTCTACTAAGTA	1316
<i>TEF4</i> -D273-10b	1317	ATGTTCCGTT	GTTTGGTTGCTATGTTGAAAAACAATAATGGTATTGTTGGTCCGTTATGGTCAGAGGCCAAGATTTGCTCCAGCCTTTG	1410
<i>TEF4</i> -BY4741	1317	ATGTTCCGTT	GTTTGGTTGCTATGTTGAAAAACAATAATGGTATTGTTGGTCCGTTATGGTCAGAGGCCAAGATTTGCTCCAGCCTTTG	1410
<i>TEF4</i> -D273-10b	1411	ATGTCGCT	CCAGACTGGGAATCTTACGAATACACCAAGTTGGAACCAACCAAGGAAGAAACAAGAAATTTGTCAAACAATGTGGGCTTGGGA	1504
<i>TEF4</i> -BY4741	1411	ATGTCGCT	CCAGACTGGGAATCTTACGAATACACCAAGTTGGAACCAACCAAGGAAGAAACAAGAAATTTGTCAAACAATGTGGGCTTGGGA	1504
<i>TEF4</i> -D273-10b	1505	AAAGCTGTT	GTTGCTCAATGGCGAAGATAAGCAAAATTTGTCAGCTAAGGTTTGAATAA	1565

Figura 17. Alineamiento del DNA genómico del gen *TEF4* de las cepas de laboratorio D273-10b y BY4741. No hay un cambio de bases entre los genes de estas dos cepas en el gen. El color morado corresponde a una identidad del 100 % entre los nucleótidos. (Goujon et al., 2010)(Goujon et al., 2010)

Anexo 4. Resultados de los predictores transmembranales DeepTMHMM y DAS

Como proteínas control se utilizaron a las proteínas Mdl1, la cual es una proteína mitocondrial que contiene 6 cruces transmembranales y Tom20, proteína mitocondrial que contiene 1 segmento transmembranal. Se utilizaron los predictores DeepTMHMM y DAS. Aquí se dejan los datos en bruto que arrojaron los predictores

DeepTMHMM - Predictions

>TEF3 | GLOB

MSQGTLYANFRIRTWVPRGLVKALKLDVKVVTDPAAAEEQFARDFPLKKVPAFVGPVKGYKLTEAMAI
NYYLVKLSQDDKMKTQLLGADDDLNAQAQIIRWQSLANSDLCIQIANTIVPLKGGAPYNKKSVD
MDAVDKIVDIFENRLKNYTYLATENISLADLVAASIFTRYFESLFGTEWRAQHPAIVRWFTVRASPF
LKDEYKDFKFADKPLSPQKKKEKKAPAAAPAASKKKEEAKPAATETETSSKKPKHPLELLGKSTFVLD
DWKRKYSNEDTRPVALPWFWEHYNPEEYSLWKVTKYKYNDELTLTFMSNNLVGGFFNRLSASTKY
MFGCLVYGENNNNGIVGAVMVRGQDYVPAFDVAPDWESYDYAKLDPTNDDDKEFINNMWA
WDKPVSVNGEPKEIVDGKVLK

>TOM20 | GLOB

MSQSNPILRGLAITTAIAALSATGYAIYFDYQRRNSPQFRKVLQRRAKEQAKMEEQAKTHAKEVKL
QKVTEFLSMELAKDPIPSDPSEREATFTTNVENGERLSMQQGKELEAASKFYKALTVYPQPADLLGI
YQRSIPEAIYEYIILMIAILPPANVASFVKGVVGSKAESDAVAEANDIDD

|||||
|||||

...

...

##gff-version 3

MDL1 Length: 695

MDL1 Number of predicted TMRs: 6

MDL1 inside 1 101

MDL1 TMhelix	102	121
MDL1 outside	122	155
MDL1 TMhelix	156	179
MDL1 inside	180	229
MDL1 TMhelix	230	250
MDL1 outside	251	254
MDL1 TMhelix	255	274
MDL1 inside	275	333
MDL1 TMhelix	334	355
MDL1 outside	356	374
MDL1 TMhelix	375	394
MDL1 inside	395	695

TEF4 Length: 412

TEF4 Number of predicted TMRs: 0

TEF4	inside	1	412
------	--------	---	-----

TEF3 Length: 415

TEF3 Number of predicted TMRs: 0

TEF3	inside	1	415
------	--------	---	-----

TOM20 Length: 183

TOM20 Number of predicted TMRs: 0

TOM20	inside	1	183
-------	--------	---	-----

...

Job summary

...

Protein types:

TM: 1

GLOB: 3

Region types:

TMhelix: 6

signal: 0

inside: 7

outside: 3

TMBeta: 0

...

Anexo 5. Interacciones genéticas de proteínas mitocondriales con Tef4.

Tabla 15. Lista de las interacciones genéticas de proteínas mitocondriales con Tef4. OMM = membrana externa mitocondrial; IMS = espacio intermembranal mitocondrial; IMM= membrana interna mitocondrial; MOS= superficie de la membrana externa mitocondrial

Gen	¿Se ha confirmado su localización mitocondrial?	Localización mitocondrial	Descripción
ACK1	No	-	Vía metabólica de la integridad de la pared celular. Detectada en mitocondrias purificadas

AIM36	No	-	Función desconocida. La mutante nula muestra un fenotipo respiratorio reducido y pérdida del genoma mitocondrial
AIM41	No	-	Proteína de función desconocida. La mutante nula presenta pérdida de genoma mitocondrial.
BMS1	No	-	GTPasa requerida para la síntesis de subunidades ribosomales.
CDC48	No	-	ATPasa con actividad de desplegamiento de proteínas.
CRD1	No	-	Cardiolipín sintetasa. La cardiolipina es un fosfolípido de la membrana interna mitocondrial que es requerido para el correcto funcionamiento del potencial de membrana; correcto funcionamiento de la morfología de la red mitocondrial
CYR1	Sí	-	Adenilato ciclasa; requerida para la producción de cAMP.
DFR1	No	-	Dihidrofolato reductasa, involucrada en la biosíntesis de tetrahidrofolato. Se requiere para el metabolismo respiratorio
DIC1	Sí	IMM	Acarreador de dicarboxilato mitocondrial. Es una proteína de membrana integral que catalisa un intercambio de dicarboxilato-fosfato a través de la membrana interna mitocondrial.

ERG6	No	OMM	Involucrado en la vía de biosíntesis del ergosterol. Se encuentra en partículas lipídicas, en membrana plasmática del retículo endoplásmico y en la membrana externa mitocondrial
FMP52	No	OMM	Proteína de función desconocida. Se localiza en la membrana externa mitocondrial.
GLN4	Sí	M	Glutamina tRNA sintetasa. Si se reprime se da un fenotipo anormal de la red mitocondrial.
GYP1	No	-	Proteína activadora de GTPasa (GAP) para la vía Rab
HXK1	Sí	MOS	Proteína citosólica que cataliza la fosforilación de glucosa. Se ha encontrado asociada en la superficie mitocondrial.
IDH2	Sí	M	Isocitrato deshidrogenasa. Participa en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos.
IRA2	Sí	-	Regula negativamente a RAS convirtiendo el GTP a GDP. Es parálogo de <i>IRA1</i>
IRC20	No	-	Ubiquitin ligase E3. Implicada en la recombinación homóloga.
LIP2	No	-	Lipoil ligase. Involucrada en la modificación de enzimas mitocondriales.
MRPL19	Sí	M	Proteína ribosomal de la subunidad grande
NEM1	No	-	Se requiere para un fenotipo normal de la envoltura mitocondrial
NEW1	No	-	Proteína de unión a mRNA y factor de terminación traduccional
OST4	No	-	Subunidad del complejo oligosacaryltransferasa del lumen del retículo endoplásmico. La mutante nula reduce el crecimiento de la levadura en medios respiratorios.
PMA1	No	-	Regulador del pH plasmático y el potencial de membrana plasmático. Gen esencial.
PRE6	Sí	MOS	Subunidad del 20S proteasoma. En condiciones de estrés oxidativo se relocaliza del citosol a la superficie de la mitocondria.

PRP31	No	-	Factor de splicing. Componente del complejo U4/U6-U5 snRNP
PSD1	Sí	IMM	Fosfatidilserina descarboxilasa de la membrana interna mitocondrial. Convierte la fosfatidilserina a fosfatidiletanolamina; regula la fusión mitocondrial.
QCR10	Sí	IMM	Subunidad del complejo ubiquinol-citocromo c oxidorreductasa.
RAD27	Sí	M?	Exonucleasa 5' a 3'. Requerido para procesar los fragmentos de Okazaki.
RPN11	Sí	MOS	Proteína involucrada en la vía de degradación de proteínas. Su mutante nula muestra un fenotipo fragmentado de la red mitocondria
RPO21	No	-	Subunidad B220 de la RNA polimerasa II.
RPO41	Sí	M	RNA polimerasa mitochondrial. Sintetiza cebadores de RNA para la replicación del DNA mitocondrial.
RSM19	Sí	M	Proteína mitocondrial de la subunidad pequeña del ribosoma.
RSM24	Sí	M	Proteína mitocondrial de la subunidad pequeña del ribosoma.
RSM27	Sí	M	Proteína mitocondrial de la subunidad pequeña del ribosoma
RSP5	No	-	Ubiquitin ligase E3 de la familia NEDD4. Regula la respuesta al choque térmico, la transcripción, la endocitosis y la estabilidad de los ribosomas
SAP185	No	-	Subunidad del complejo de fosfatasa SIT4-SAP185 que media la progresión del ciclo celular mitótico G1/S; involucrada en la modificación de la uridina oscilante del tRNA
SDH9	Sí	IMM	Participa en la oxidación del succinato y la transferencia de electrones a la ubiquinona.
TEF2	Sí	MOS	Gen no esencial que codifica para la proteína eEF1A. Se ha confirmado su localización mitocondrial
YPT1	No		GTPasa de la familia Rab. Involucrada en la vía secretora del retículo endoplásmico al aparato de Golgi.

MRX18	Sí	IMS	Supuesta glucósido hidrolasa del espacio intermembranal mitocondrial.
MRX20	Sí	IMS	Aparene Proteína de transporte mitocondrial ; la mutante nula es viable, exhibe niveles reducidos de quitina y resistencia normal al blanco de calcoflúor

Anexo 6. Interacciones físicas de proteínas mitocondriales con Tef4.

Tabla 16. Lista de las interacciones físicas de proteínas mitocondriales con Tef4. OMM = membrana externa mitocondrial; IMS = espacio intermembranal mitocondrial; IMM= membrana interna mitocondrial; MOS= superficie de la membrana externa mitocondrial

Gen	¿Se ha confirmado su localización mitocondrial?	Localización mitocondrial	Descripción
PUF3	Sí	MOS	Proteína periférica mitochondrial. Se une al complejo Arp2/3 durante el movimiento anterógrado de la mitocondria. También promueve la biogénesis mitocondrial.
FUS3	No	-	Proteína involucrada en el apareamiento.
GUS1	Sí	M	Glutamil-tRNA sintetasa.
HSC82	No	-	Chaperona citoplasmática de la familia Hsp90.
ILV1	No	-	Treonin desaminasa. Cataliza el primer paso en la biosíntesis de isoleucina
LAM1	No	-	Presunta proteína esterol transferasa.
NEW1	No	-	Proteína de unión a mRNA y factor de terminación traduccional
PFK1	Sí	MOS	Subunidad de la 6-fosfofructocinasa. Involucrada en la vía de la glucólisis.
RAD59	Sí	M	Proteína involucrada en la reparación de la doble cadena de DNA.

RPN11	Sí	MOS	Proteína involucrada en la vía de degradación de proteínas. Su mutante nula muestra un fenotipo fragmentado de la red mitocondria
RPS18A	No	-	Componente proteico de la subunidad pequeña del ribosoma.
SAM50	Sí	OMM	Componente del complejo SAM. El complejo se une a los precursores beta-barril y facilita la inserción y el plegamiento de los mismos.
SIR3	No	-	Proteína silenciadora. Interactúa con Sir2p, Sir4p y las colas de las histonas H3/H4 para silenciar a la cromatina.
SPT7	No	-	Subunidad del complejo regulador transcripcional SAGA.
TEF1	Sí	MOS	Gen no esencial que codifica para la proteína eEF1A.
TEF2	Sí	MOS	Gen no esencial que codifica para la proteína eEF1A.
TMA19	Sí	MOS	Proteína que se asocia a ribosomas. Se relocaliza de citosol a mitocondria en condiciones de estrés oxidativo.
UTP10	No	-	Proteína nucleolar. Componente de la subunidad pequeña del ribosoma.