

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA
I DEL MEDI NATURAL



MODULACIÓN DE LA ADAPTACIÓN A ESTRÉS POR EL METABOLISMO RESPIRATORIO Y EL ENVEJECIMIENTO

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORA: **Eva González Cantó**

TUTORA ACADÉMICA: **Amparo Pascual-Ahuir Giner**

COTUTOR: **Markus Proft**

CURSO ACADÉMICO: **2017/2018**

Valencia, Julio 2018



Autora: Eva González Cantó

Tutora académica: Prof. Dra. Amparo Pascual-Ahuir Giner

Cotutor: Dr. Markus Proft

Localidad y fecha: Valencia, Julio 2018

Título: Modulación de la adaptación a estrés por el metabolismo respiratorio y el envejecimiento.

Resumen:

Las células eucariotas se adaptan continuamente a estreses abióticos como por ejemplo el estrés osmótico o el estrés oxidativo. Ambos estreses están fisiológicamente relacionados, y en estudios anteriores se ha podido establecer que una eficiente adaptación al estrés hiperosmótico y salino requiere una activación del metabolismo respiratorio a través de la inducción de la función mitocondrial y peroxisomal. En el presente trabajo se estudiará cómo influye la función de los dos orgánulos y el proceso del envejecimiento en la dinámica adaptación a estrés. Para ello, se plantean tres abordajes experimentales usando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo celular.

1- Se determinará cómo influye la función mitocondrial y peroxisomal en la respuesta dosis dependiente de la expresión génica a estrés osmótico. Se emplearán cepas transformadas con reporteros de luciferasa desestabilizada específicos para dicho estrés. Se cuantificará en tiempo real la capacidad de dosis respuesta de cada cepa y se comparará de forma cuantitativa la sensibilidad y posibles defectos de señalización entre las cepas sin y con mutaciones mitocondriales o peroxisomales.

2- Peroxisomas y mitocondrias están conectados físicamente por proteínas de la membrana exterior de los dos orgánulos, como Pex11 y Mdm34 en levadura. Previos estudios han mostrado que el número de peroxisomas asociados a la red mitocondrial aumenta en situaciones de estrés salino. En el presente trabajo se cuantificará el grado de asociación entre los dos orgánulos por microscopía de fluorescencia. Se usarán cepas modificadas con fusiones de Pex11 y Mdm34 con los dominios N- y C-terminales de YFP en ensayos de BiFC in vivo (complementación bimolecular de fluorescencia). Se cuantificará así la interacción de mitocondrias y peroxisomas durante la inducción de la respiración y la adaptación a estrés.

3- Se estudiará cómo influye el envejecimiento de las células en su capacidad de activar la expresión génica en respuesta a estrés oxidativo. Una característica clave de las células envejecidas es la acumulación de daños oxidativos intracelulares y una menor capacidad de detoxificar ROS. Se estudiará en dos modelos diferentes del envejecimiento de levadura, el replicativo y el cronológico, cómo cambia la capacidad de defensa ante el estrés oxidativo durante el proceso del envejecimiento. Se emplearán cepas con reporteros luciferasa integrativos y específicos para el estrés oxidativo en estudios de la expresión génica en tiempo real y a lo largo de los diferentes regímenes de envejecimiento.

Palabras clave: Adaptación a estrés, peroxisoma, mitocondria, expresión génica, envejecimiento celular.

Title: Modulation of stress adaptation by the respiratory metabolism and during aging.

Abstract:

Eukaryotic cells continuously adapt to abiotic stresses such as osmotic or oxidative stress. Both stresses are physiologically related, and in previous studies it has been established that an efficient adaptation to hyperosmotic and saline stress requires an activation of respiratory metabolism through the induction of mitochondrial and peroxisomal function. In the present work we study how the function of the two organelles and the aging process influences the dynamic adaptation to stress. Three experimental approaches are proposed using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a cellular model.

1- It will be determined how mitochondrial and peroxisomal function influences the dose-dependent response of gene expression to osmotic stress. Strains transformed with destabilized luciferase reporters will be used. The dose response capacity of each strain will be quantified in real time and the sensitivity and possible signaling defects between the strains without and with mitochondrial or peroxisomal mutations will be quantitatively compared.

2- Peroxisomes and mitochondria are physically connected by proteins of the outer membrane of the two organelles, for example Pex11 and Mdm34 in yeast. Previous studies have shown that the number of peroxisomes associated with the mitochondrial network increases in situations of salt stress. In the present work, the degree of association between the two organelles will be quantified by fluorescence microscopy. Strains modified with Pex11 and Mdm34 fusions with the N- and C-terminal domains of YFP will be used in BiFC assays in vivo (bimolecular fluorescence complementation). The interaction of mitochondria and peroxisomes during the induction of respiration and adaptation to stress will be quantified.

3- It will be studied how the aging of cells influences their ability to activate gene expression in response to oxidative stress. A key feature of aging cells is the accumulation of intracellular oxidative damage and a decreased ability to detoxify ROS. We will study in two different models of yeast aging, the replicative and the chronological, how the defense capacity changes in response to oxidative stress during the aging process. Strains with integrative and specific luciferase reporters for oxidative stress will be used in studies of gene expression in real time and throughout the different aging regimes.

Key words: Adaptation to stress, peroxisome, mitochondria, gene expression, cellular aging.

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a Markus la posibilidad que me ofreció de realizar este trabajo de fin de grado en su grupo de investigación, y también a Payo por aceptar ser mi tutora. Agradezco infinitamente todas las facilidades y la ayuda que me han ofrecido siempre que lo he necesitado. Y, por supuesto, el apoyo y la confianza durante estos meses.

Quisiera agradecer también a mi familia, por el apoyo incondicional durante estos casi 22 años, por creer en mí siempre más que yo misma. A mis padres, por su esfuerzo, dedicación y educación, y por ser, junto a mi hermano y mi hermana, mi ejemplo a seguir.

También me gustaría agradecer a mis amigas de siempre, por toda una vida de amistad, por estar siempre y para todo.

Por último, gracias a esas personas a las que conocí hace casi 4 años en aquellas jornadas de acogida, y que, tras 4 años compartiendo momentos dentro y fuera de la universidad, hoy forman parte de mi vida para siempre.

Índices

ÍNDICE TEMÁTICO

1. Introducción	1
1.1.MECANISMOS DE ADAPTACIÓN A ESTRÉS OSMÓTICO EN LEVADURA	1
1.2.MECANISMOS DE ADAPTACIÓN A ESTRÉS OXIDATIVO EN LEVADURA	3
1.3.CONEXIÓN ENTRE EL METABOLISMO RESPIRATORIO (MITOCONDRIAS Y PEROXISOMAS) Y LA ADAPTACIÓN AL ESTRÉS OSMÓTICO	5
1.4.ENVEJECIMIENTO Y SU ESTUDIO EN LEVADURA	6
1.5.LUCIFERASA DESESTABILIZADA Y SU USO EN LA CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN LEVADURA	7
2. Objetivos	9
3. Materiales y métodos	10
3.1. CEPAS	10
3.1.1. Bacterias	10
3.1.2. Levaduras	10
3.2. MEDIOS DE CULTIVO	11
3.2.1. Bacterias	11
3.2.2. Levaduras	11
3.3. PLÁSMIDOS	11
3.4. TRANSFORMACIÓN DE LEVADURAS	13
3.5. EXTRACCIÓN DEL ADN CROMOSÓMICO	14

3.6. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A ESTRÉS OSMÓTICO CON EL SISTEMA LUCIFERASA	15
3.7. ENSAYO BiFC IN VIVO.....	16
3.8. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A ESTRÉS OXIDATIVO CON EL SISTEMA LUCIFERASA	17
4. Resultados y discusión	19
4.1. CARACTERIZACIÓN DE LA DINÁMICA TRANSCRIPCIONAL DE CEPAS MUTANTES MITOCONDRIALES Y PEROXISOMALES EN RESPUESTA A ESTRÉS OSMÓTICO	19
4.1.1. CTT1.....	19
4.1.2. SOD2.....	21
4.2. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN FÍSICA ENTRE PEROXISOMAS Y MITOCONDRIAS	24
4.3. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL ENVEJECIMIENTO CELULAR EN LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL AL ESTRÉS OXIDATIVO	27
4.3.1. Envejecimiento replicativo en la cepa UCC4925	27
4.3.2. Envejecimiento cronológico en la cepa UCC4925	30
4.3.3. Comparación del envejecimiento replicativo y el envejecimiento cronológico en la cepa UCC4925	33
5. Conclusiones.....	35
6. Bibliografía.....	36
7. Anexos	43
ANEXO I	43
ANEXO II	44
ANEXO III	48

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

ILUSTRACIÓN 1. ESQUEMA DE LA CASCADA DE SEÑALIZACIÓN QUE ACTIVA A LA QUINASA HOG1 EN RESPUESTA A ESTRÉS OSMÓTICO.	1
ILUSTRACIÓN 2. ESQUEMA DE LA ACTIVACIÓN Y LA FUNCIÓN DE YAP1 EN RESPUESTA AL ESTRÉS OXIDATIVO..	4
ILUSTRACIÓN 3. ESQUEMA DEL FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA LUCIFERASA A NIVEL MOLECULAR.	8
ILUSTRACIÓN 4. SISTEMA MEP.	17

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. CEPAS DE LEVADURA EMPLEADAS.	10
TABLA 2. PLÁSMIDOS EMPLEADOS.	12
TABLA 3. CEBADORES EMPLEADOS Y SUS SECUENCIAS.	43

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. CARACTERIZACIÓN DE LA DINÁMICA TRANSCRIPCIONAL DEL GEN REPORTERO CTT1 EN RESPUESTA A UN BAREMO DE CONCENTRACIONES DE NaCl.	20
FIGURA 2. INDUCCIÓN DEL GEN REPORTERO CTT1 EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NaCl.	20
FIGURA 3. CARACTERIZACIÓN DE LA DINÁMICA TRANSCRIPCIONAL DEL GEN REPORTERO SOD2 EN RESPUESTA A UN BAREMO DE CONCENTRACIONES DE NaCl.	21
FIGURA 4. INDUCCIÓN DEL GEN REPORTERO SOD2 EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NaCl.	22
FIGURA 5. PORCENTAJE DE CÉLULAS QUE PRESENTAN INTERACCIÓN ENTRE PEX11 Y MDM34 SEGÚN EL ENSAYO BiFC.	24
FIGURA 6. IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE LAS CÉLULAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO BiFC PARA PEX11-MDM34 Y PEX11-PEX11.	26
FIGURA 7. CARACTERIZACIÓN DE LA DINÁMICA TRANSCRIPCIONAL DEL GEN REPORTERO SOD2 EN RESPUESTA A UN BAREMO DE CONCENTRACIONES DE H ₂ O ₂ DURANTE EL ENVEJECIMIENTO REPLICATIVO DE LA CEPA UCC4925.	28

FIGURA 8. ACTIVIDAD MÁXIMA DE SOD2 FRENTE A CONCENTRACIÓN DE H ₂ O ₂ DURANTE EL ENVEJECIMIENTO REPLICATIVO DE LA CEPA UCC4925.	29
FIGURA 9. PORCENTAJE DE CÉLULAS DURANTE EL ENVEJECIMIENTO REPLICATIVO DE LA CEPA UCC4925.	30
FIGURA 10. CARACTERIZACIÓN DE LA DINÁMICA TRANSCRIPCIONAL DEL GEN REPORTERO SOD2 EN RESPUESTA A UN BAREMO DE CONCENTRACIONES DE H ₂ O ₂ DURANTE EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE LA CEPA UCC4925.....	30
FIGURA 11. ACTIVIDAD MÁXIMA DE SOD2 FRENTE A CONCENTRACIÓN DE H ₂ O ₂ DURANTE EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE LA CEPA UCC4925.	31
FIGURA 12. PORCENTAJE DE CÉLULAS VIVAS DURANTE EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE LA CEPA UCC4925.	32
FIGURA 13. CARACTERIZACIÓN DE LA DINÁMICA TRANSCRIPCIONAL DEL GEN REPORTERO SOD2 EN RESPUESTA A UN BAREMO DE CONCENTRACIONES DE H ₂ O ₂ DURANTE EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE LA CEPA UCC4925.	47
FIGURA 14. ACTIVIDAD MÁXIMA DE SOD2 FRENTE A CONCENTRACIÓN DE H ₂ O ₂ DURANTE EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DE LA CEPA UCC4925.	48

Abreviaturas

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero

ARNt: Ácido Ribonucleico de transferencia

ATP: Adenosina Trifosfato

BiFC: “Bimolecular Fluorescence Complementation”

CLS: Vida cronológica (“Chronological Life Span”)

dNTPs: Desoxirribonucleótidos Trifosfato

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético

ERMES: “Endoplasmic Reticulum Mitochondria Encounter Structure”

G418: Geneticina

GDP: Guanosina Difosfato

GFP: Proteína fluorescente verde (“Green Fluorescent Protein”)

GSH: Glutati3n

GTP: Guanosina Trifosfato

GTPasa: Guanosina trifosfatasa

H₂O₂: Per3xido de hidr3geno

HCl: 3cido clorh3drico

HOG: Ruta de respuesta a alta osmolaridad (“High Osmolarity Glycerol”)

KAN: Kanamicina

Kb: Kilobase

LB: Medio de cultivo “Luria Bertani”

MAPK: Prote3na quinasa activada por mit3genos (“Mitogen-Activated Protein Kinase”)

MEP: “Mother Enrichment Program”

MgCl₂: Cloruro de magnesio

NaCl: Cloruro de sodio

NAD: Nicotinamida Adenina Dinucleótido

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato en su forma reducida

NaOH: Hidróxido de sodio

O₂⁻: Superóxido

OD₆₀₀: Densidad óptica a 600 nm

OH[•]: Radical hidroxilo

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa ("Polymerase Chain Reaction")

PEG4000: Polietilenglicol 4000

RE: Retículo endoplásmico

RLS: Vida replicativa ("Replicative Life Span")

ROS: Especies reactivas de oxígeno ("Reactive Oxygen Species")

SD: Medio de cultivo "Synthetic Dextrose"

SDS: Dodecilsulfato sódico

Ser: Serina

SGal: Medio de cultivo "Synthetic Galactose"

SOD: Superóxido dismutasa

Thr: Treonina

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano

Tyr: Tirosina

U: Unidades

WT: "Wild Type"

YFP: Proteína fluorescente amarilla ("Yellow Fluorescent Protein")

YPD: Medio de cultivo "Yeast extract-Peptone-Dextrose"

1. Introducción

Introducción

1.1. MECANISMOS DE ADAPTACIÓN A ESTRÉS OSMÓTICO EN LEVADURA

Una propiedad fundamental de las células vivas es la capacidad de detectar y responder adecuadamente a las condiciones ambientales cambiantes y a otros estímulos diversos (Chen y Thorner, 2007). En ocasiones, en el ambiente en el que se encuentran estas células se puede producir un estrés osmótico, que conlleva la respuesta del sistema osmorregulador, el cual es bien conocido en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Hohmann et al., 2007).

La respuesta a estrés osmótico de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* consiste en un proceso de adaptación que tiene lugar principalmente a través de la vía de señalización HOG (High Osmolarity Glycerol).

El núcleo central de la vía de señalización HOG es la MAPK Hog1 (Brewster et al., 1993). Las cascadas de MAP quinasas, las cuales están compuestas por tres quinasas secuencialmente activadas, son unidades de señalización conservadas evolutivamente en diversos organismos eucariotas, incluidos hongos y levaduras (Chen et al., 2001).

La vía de señalización HOG está compuesta por dos ramas, que son funcionalmente redundantes, pero mecanísticamente diferentes. Una de ellas tiene como osmosensor Sln1 y la otra Sho1, por lo que las ramas reciben estos nombres (Saito y Posas, 2012). Sln1 activa la MAPKKK Ssk2/Ssk22 (Maeda et al., 1995) y Sho1 la MAPKKK Ste11 (Posas y Saito, 1997). Una señal procedente de cualquiera de las dos ramas converge en la activación de una MAPKK común, Pbs2, que activa la MAPK Hog1 (Brewster et al., 1993; Maeda et al., 1994) (Ilustración 1).

Tras la activación de Hog1, al producirse la fosforilación de los residuos Thr-174 y Tyr-176 (Brewster et al., 1993), una fracción de esta MAPK se transporta al núcleo donde se acumula y ejerce su función. Esto ocurre en respuesta a un estrés osmótico, y, a medida que se produce la adaptación a la elevada osmolaridad y se reestablece el equilibrio osmótico, la actividad de Hog1 disminuye y se exporta de nuevo al citoplasma (Ferrigno et al., 1998; Reiser et al., 1999).

La activación de Hog1 en respuesta a estrés osmótico conlleva un proceso de adaptación en el que se producen respuestas a corto y largo plazo.

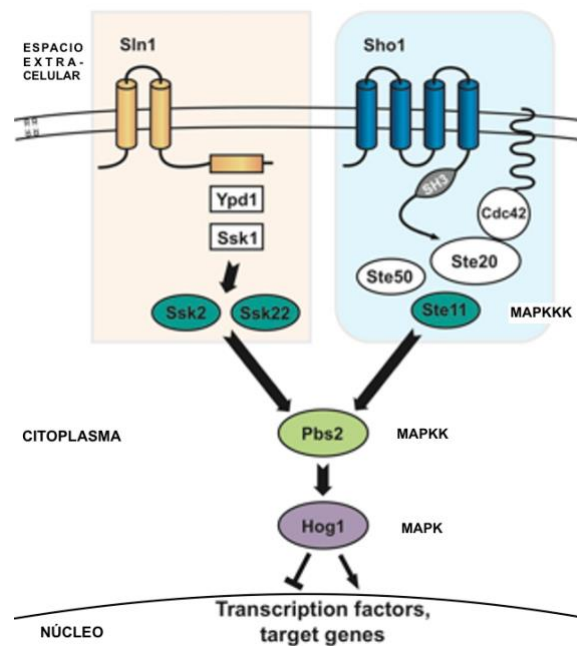


Ilustración 1. Esquema de la cascada de señalización que activa a la quinasa Hog1 en respuesta a estrés osmótico. El estrés osmótico en levadura induce una cascada de quinasas en la cual las MAPKKK Ssk2, Ssk22 y Ste11 convergen, fosforilan y activan a la MAPKK Pbs2. Pbs2 fosforilada activa a Hog1, que es una MAPK, la cual se transloca al núcleo para activar la expresión génica en respuesta a estrés osmótico (Modificado de UNIVERSITY OF LJUBLJANA).

Introducción

La adaptación a corto plazo se consigue mediante cambios en la acumulación de glicerol (Albertyn et al., 1994) y el restablecimiento del equilibrio iónico (Proft y Struhl, 2004). Un aumento en la osmolaridad provoca la pérdida de agua, la disminución del tamaño celular y la detención del crecimiento celular hasta que se consigue la adaptación. La principal estrategia para sobrevivir es producir y acumular osmolitos compatibles para mantener el equilibrio hídrico y reestablecer el volumen y la turgencia de las células (Blomberg y Adler, 1989; Hohmann et al., 2007; Westfall et al., 2008; de Nadal et al., 2011). Existen diversos osmolitos compatibles como trehalosa, aminoácidos e iones, pero el glicerol parece ser el más importante (Hohmann et al., 2007), siendo Hog1 el principal responsable de su acumulación en condiciones de elevada osmolaridad (Albertyn et al., 1994), a través de diversos mecanismos: regulación de la expresión génica, ajuste metabólico y control de la exportación e importación (Hohmann, 2002).

La adaptación a largo plazo implica la regulación transcripcional y traduccional del genoma. En respuesta al estrés osmótico, se induce la transcripción de un gran número de genes, muchos de ellos responsables de proteger a las células del estrés oxidativo, como *CTT1* y *SOD2*. La inducción de aproximadamente el 80% de los genes depende de Hog1 (Posas et al., 2000; Rep et al., 2000; O'Rourke y Herskowitz, 2004; Capaldi et al., 2008). Una de las funciones de esta MAPK es el control de la expresión génica en la etapa de inicio de la transcripción mediante la regulación de varios factores de transcripción, siendo cada uno de ellos responsable de controlar la expresión de un subconjunto de genes osmosensibles (Molin et al., 2009; Romero-Santacreu et al., 2009; Miller et al., 2011). El mecanismo mejor comprendido por el cual Hog1 modula el inicio de la transcripción es la fosforilación directa de los factores de transcripción. Sin embargo, existen otros mecanismos mediante los cuales Hog1 puede inducir la activación de la expresión génica. Uno de ellos es la asociación de Hog1 a la cromatina, que se produce a través de interacciones físicas con factores de transcripción (Saito y Posas, 2012). En este caso, la activación de la expresión génica es posible gracias al reclutamiento de la maquinaria transcripcional básica, la ARN Polimerasa II, que depende tanto de la presencia de Hog1 activada como de la presencia de factores de transcripción específicos (Alepez et al., 2003). Además de en la etapa de inicio de la transcripción, Hog1 afecta directamente en el proceso de elongación, pues además de asociarse a las regiones promotoras de los genes osmosensibles, se asocia también a las regiones codificantes de estos genes (Pascual-Ahuir et al., 2006; Pokholok et al., 2006; Proft et al., 2006) y es esencial para una mayor asociación de la ARN Polimerasa II a éstas (Proft et al., 2006). También en respuesta a estrés osmótico, Hog1 media el remodelamiento de la cromatina y controla la estabilidad de los ARNm (Saito y Posas, 2012).

Además, debido a que el estrés osmótico puede producirse en cualquier etapa del ciclo celular, todas las fases del ciclo celular están reguladas por mecanismos activados por estrés. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, Hog1 induce un retraso rápido y transitorio en varias etapas del ciclo celular para permitir el desarrollo completo de respuestas adaptativas antes de reanudar la progresión del ciclo celular (Clotet y Posas, 2007; Yaakov et al., 2009).

1.2. MECANISMOS DE ADAPTACIÓN A ESTRÉS OXIDATIVO EN LEVADURA

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* sufre de manera continua cambios en el entorno en el que se desarrolla. Además de la respuesta al estrés osmótico, es bien conocida su respuesta al estrés oxidativo, el cual tiene como responsables a las especies reactivas de oxígeno (ROS), a las que están expuestos todos los organismos durante el curso del metabolismo aerobio normal o después de la exposición a compuestos que generan estos radicales libres (Halliwell, 2006).

El oxígeno molecular no es reactivo y es inofensivo en su estado fundamental, pero puede sufrir una reducción parcial al recibir un electrón procedente de una cadena de transporte de electrones, dando lugar al anión superóxido (O_2^-). Éste, a su vez, produce el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), a través de una reacción catalizada por superóxido dismutasas (SOD). Tanto el superóxido como el peróxido de hidrógeno pueden dar lugar al radical hidroxilo ($OH\cdot$), que es altamente reactivo. Estas ROS pueden dañar una amplia variedad de componentes celulares y se dice que se produce un estrés oxidativo cuando los mecanismos antioxidantes y de supervivencia celular no son capaces de hacer frente a estas ROS o al daño causado por ellas (Morano et al., 2012).

La principal fuente de ROS en las células eucariotas es la respiración mitocondrial a través del proceso de fosforilación oxidativa (Murphy, 2009), debido al escape de electrones de la cadena de transporte, los cuales reducen el oxígeno produciendo ROS. También se considera una fuente importante el retículo endoplásmico (RE) al emplear como aceptor final de electrones al oxígeno durante el plegamiento oxidativo de proteínas (Tu y Weissman, 2004).

En la respuesta defensiva de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* frente a niveles elevados de ROS tiene un papel fundamental la reprogramación transcripcional de la expresión génica para llevar a cabo los cambios necesarios que permitan reestablecer el equilibrio redox. Las respuestas se basan en la expresión de genes que codifican mecanismos de defensa antioxidante y genes que codifican enzimas encargadas de la reparación y detoxificación del daño celular causado (Morano et al., 2012).

La principal respuesta al estrés oxidativo es protagonizada por el factor de transcripción Yap1 (Harshman et al., 1988), que se encuentra en el citoplasma en ausencia de una amenaza oxidativa (Kuge et al., 1997). Sin embargo, ante la presencia de compuestos oxidantes, se acumula en el núcleo, donde induce la expresión génica. Crm1 es el encargado de transportar a Yap1 al citoplasma, pero cuando las células sufren un estrés oxidativo, se impide la unión de Crm1 a Yap1 y, por tanto, la exportación de Yap1 del núcleo (Isoyama et al., 2001). El mecanismo que impide la unión es diferente en función del causante del estrés (Morano et al., 2012) (Ilustración 2).

Introducción

Yap1 controla la expresión de al menos 32 genes (Lee et al., 1999) y 15 de ellos requieren la presencia de Skn7, entre los que se encuentra *SOD2* (Morano et al., 2012). Además, también están implicados en la resistencia a estrés oxidativo Msn2 y Msn4, que son factores de transcripción que regulan genes como *CTT1* (Martinez-Pastor et al., 1996).

Una respuesta de las células de levadura es la regulación de sus sistemas tiol para mantener así el equilibrio redox. La maquinaria encargada de mantener este equilibrio son los sistemas GSH/glutaredoxina y tiorredoxina (Morano et al., 2012).

Otra respuesta celular al estrés oxidativo es la regulación traduccional de la expresión génica, pues un control traduccional de ARNm específicos es necesario para la supervivencia celular en condiciones de estrés (Preiss et al., 2003; Smirnova et al., 2005). En respuesta al estrés oxidativo, el nivel de inhibición traduccional depende de la dosis y está mediado principalmente por la quinasa Gcn2, que fosforila la subunidad α del factor de iniciación de la traducción 2 (eIF2) (Shenton et al., 2006). El factor eIF2 se encuentra unido a GDP, que es sustituido por GTP en una reacción catalizada por eIF2B. En su forma unida a GTP, eIF2 interacciona con el iniciador metionil-ARNt formando un complejo que es capaz de iniciar la traducción. Una forma de evitar el inicio de la traducción es mediante la fosforilación del factor eIF2 en un residuo conservado de serina (Ser51) (Pavitt et al., 1998; Harding et al., 2000), de forma que se convierte en un inhibidor del factor eIF2B, reduciéndose así la formación del complejo iniciador de la traducción y, por tanto, la traducción (Pavitt et al., 1998).

El estrés oxidativo en la mayoría de los casos conlleva una inhibición de la traducción de los ARNm. Sin embargo, se ha visto que dicho estrés puede afectar de diferentes formas, e incluso aumenta la traducción de antioxidantes y moléculas protectoras del estrés (Morano et al., 2012).

Las modificaciones postraduccionales también son características de la respuesta a estrés oxidativo. La clave de estos cambios parece ser la reprogramación del metabolismo de carbohidratos, que es esencial para mantener el equilibrio redox celular durante el estrés (Morano et al., 2012). Una respuesta conservada parece ser el flujo metabólico desde la glucólisis a la ruta de las pentosas fosfato, que es la fuente de poder reductor en forma de NADPH (Ralser et al., 2007). Esta ruta está conectada a la glucólisis mediante la oxidación de la glucosa-6-fosfato, por lo que cualquier fallo que afecte a la actividad glucolítica puede afectar al flujo hacia la ruta de las pentosas fosfato (Morano et al., 2012), y una actividad reducida de las enzimas glucolíticas confiere resistencia frente al estrés oxidativo (Ralser et al., 2006; Ralser et al., 2007), al aumentar el flujo hacia la ruta de las pentosas fosfato, aumentando así la producción de NADPH (Ralser et al., 2007). Esta actividad enzimática glucolítica está regulada por modificaciones traduccionales que ocurren como respuesta al estrés oxidativo, causando cambios rápidos y reversibles en dicha actividad (Biswas et al., 2006).

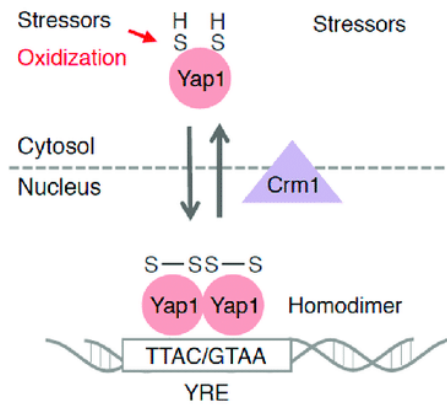


Ilustración 2. Esquema de la activación y la función de Yap1 en respuesta al estrés oxidativo. La respuesta del factor de transcripción Yap1 al estrés oxidativo es su acumulación y activación en el núcleo, donde participa en la transcripción de genes importantes en la respuesta a estrés (Fuse y Kobayashi, 2017).

Introducción

Además, *Saccharomyces cerevisiae*, también en respuesta al estrés oxidativo, media un retraso de la progresión del ciclo celular, lo cual les permite reparar cualquier daño sin que sea transmitido a sus células hijas (Shackelford et al., 2000), y también se ha visto que el estrés oxidativo puede desencadenar una muerte celular programada en levadura (Pereira et al., 2008; Perrone et al., 2008).

1.3. CONEXIÓN ENTRE EL METABOLISMO RESPIRATORIO (MITOCONDRIAS Y PEROXISOMAS) Y LA ADAPTACIÓN AL ESTRÉS OSMÓTICO

El estrés osmótico ha permitido conocer aspectos de la adaptación celular de *Saccharomyces cerevisiae* al estrés con gran detalle (Saito y Posas, 2012). Este estrés provoca la pérdida inmediata de agua y la acumulación de cationes potencialmente dañinos en el interior de la célula (Hohmann et al., 2007; Hohmann, 2015). La principal vía de señalización que responde ante el estrés osmótico es la vía de señalización HOG (High Osmolarity Glycerol), que tiene como núcleo central la MAPK Hog1 (Brewster y Gustin, 2014).

La vía de señalización HOG regula numerosas respuestas adaptativas ante el estrés osmótico. Hog1 es el encargado de coordinar un cambio en el programa de expresión génica global de la célula (Martinez-Montanes et al., 2010; de Nadal y Posas, 2015), de forma que se inducen los genes involucrados en la adaptación a estrés y se reprimen aquellos responsables del crecimiento y la proliferación celular. La MAPK Hog1 es la responsable del control de la biosíntesis y la acumulación de glicerol en respuesta al estrés osmótico (Albertyn et al., 1994) y también de la detención del ciclo celular (Saito y Posas, 2012) y la represión de la replicación para evitar la competición entre la ADN polimerasa y la ARN polimerasa (Duch et al., 2013).

Recientemente, se ha observado que el estrés osmótico induce respuestas adaptativas en las que se ven implicados mitocondrias y peroxisomas. Concretamente, se observa una alteración en el equilibrio metabólico entre la fermentación y la respiración, al producirse un cambio inmediato hacia la respiración. Esto se produce por la inducción de biomasa mitocondrial y componentes mitocondriales específicos (Pastor et al., 2009). Además, se produce la activación de la biogénesis peroxisomal y la oxidación de ácidos grasos por β -oxidación (Manzanares-Estreder et al., 2017).

Las posibles razones que explican la necesidad de que se produzca un cambio metabólico transitorio de la fermentación de los azúcares a la degradación oxidativa de las grasas almacenadas internamente son diversas. Una es que la presencia del estrés osmótico interfiere con la absorción de azúcares en los cultivos de levadura (Wei et al., 1982), por lo que puede producirse una inhibición de la actividad transportadora de las permeasas de azúcares, que explica la inducción de la expresión de diversos sistemas de captación de azúcares en la membrana plasmática (Posas et al., 2000; Rep et al., 2000). Además, la biosíntesis masiva de glicerol que se produce en respuesta a un estrés osmótico puede reducir adicionalmente la captación de azúcares debido a la formación de un subproducto tóxico, el metilglioxal. Éste se acumula en las levaduras e induce enzimas detoxificantes (Aguilera y Prieto, 2001; Rep et al., 2001; Maeta et al., 2005),

Introducción

pero aun así es capaz de inhibir también las permeasas de azúcares (Yoshida et al., 2012; Roy et al., 2016).

En definitiva, el estrés osmótico causa un estrés nutricional que se contrarresta con diferentes ajustes metabólicos. Todo esto sugiere que una correcta adaptación a dicho estrés depende de un cambio metabólico transitorio de la fermentación de azúcares hacia el catabolismo oxidativo de los ácidos grasos internos en los peroxisomas y las mitocondrias (Pascual-Ahuir et al., 2017).

1.4. ENVEJECIMIENTO Y SU ESTUDIO EN LEVADURA

El envejecimiento es un proceso multisistémico complicado que ha sido un auténtico enigma en investigación. Sin embargo, en las dos últimas décadas se han producido importantes descubrimientos. Sorprendentemente, gran parte del éxito de la investigación centrada en el envejecimiento ha empleado uno de los organismos modelos más simples: la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, en la cual el envejecimiento ha sido estudiado a través de dos ensayos principalmente: replicativo y cronológico (Longo et al., 2012).

Los estudios de vida replicativa, o “Replicative Life Span” (RLS), datan de hace más de 50 años (Mortimer y Johnston, 1959). Estos ensayos se basan en el hecho de que las células de levadura se dividen por brotación asimétrica dando lugar a células hijas de tamaño inferior al de las células de las que proceden. El objetivo de estos estudios es determinar el número de divisiones que sufre una célula de levadura. Para ello, las células hija que se van generando se eliminan una vez empiezan a dividirse, y esto permite observar cómo las células no presentan una división infinita, sino que sufren un número limitado de divisiones, entre 20 y 25, entran en un estado post-replicativo corto, y, a continuación, se produce la lisis celular (Longo et al., 2012).

Uno de los genes de envejecimiento más famosos en levadura es *SIR2*, que codifica una proteína deacetilasa dependiente de NAD de la familia de las Sirtuinas. Estas proteínas se relacionaron por primera vez con el envejecimiento en levaduras al demostrar que la sobreexpresión de *SIR2* tenía como consecuencia un alargamiento de la RLS (Kaeberlein et al., 1999).

Una reducción de la disponibilidad de nutrientes sin llegar a la desnutrición ha demostrado prolongar la vida en diversos organismos, desde las levaduras hasta los primates (Anderson y Weindruch, 2012; Katewa y Kapahi, 2010). Una consecuencia de la restricción nutricional es el aumento de la RLS a través de *SIR2*, aunque se han identificado otras proteínas de la familia de las Sirtuinas que también median el aumento de la vida replicativa (Longo et al., 2012). Otra consecuencia de la disminución de nutrientes disponibles es la reducción de la señalización a través de las rutas Ras-PKA y TOR/Sch9, que regulan el crecimiento, el metabolismo y la resistencia al estrés en respuesta a la disponibilidad de nutrientes, produciéndose un aumento de la RLS (Fabrizio et al., 2004; Kaeberlein et al., 2005). Además, mutaciones en las rutas Ras-PKA y TOR/Sch9 provocan un aumento de la RLS aún en presencia de nutrientes, y se relacionan con una resistencia al estrés oxidativo, lo que plantea la posibilidad de que el daño oxidativo sea un factor principal del envejecimiento replicativo de la levadura. Sin embargo, ha sido difícil vincular el daño oxidativo con el envejecimiento y se necesitan más estudios (Longo et al., 2012).

Introducción

Un mecanismo distinto a *SIR2* y a la restricción de nutrientes, que es la actividad mejorada del proteasoma, ha demostrado también aumentar la vida replicativa de las células (Kruegel et al., 2011).

La vida cronológica, o “Chronological Life Span” (CLS), es el periodo de tiempo que sobrevive una célula de levadura que no se divide. La CLS se mide normalmente haciendo crecer un cultivo de células en la fase post-diauxica, que es la etapa que se inicia unas 24 horas después de la inoculación, cuando las células agotan la glucosa extracelular, reducen drásticamente el crecimiento y cambian a un modo de metabolismo respiratorio mitocondrial dependiente del etanol generado durante la fermentación (Werner-Washburne et al., 1996). La fase estacionaria se inicia al final de la fase post-diauxica, entre los días 2 y 7, y está caracterizada por tasas metabólicas más bajas y por la regulación positiva de las vías de resistencia al estrés (Longo et al., 2012).

Los estudios de vida cronológica complementan los de vida replicativa, pues permiten el análisis de las células que no se dividen de organismos superiores (Fabrizio y Longo, 2007; Longo, 1997; Longo et al., 1996).

Las dos rutas principales implicadas son la ruta TOR/S6K (Fabrizio et al., 2001), que es activada por aminoácidos y otros nutrientes, y la ruta Ras/adenilato ciclasa (AC)/PKA (Longo et al., 1999; Fabrizio et al., 2003), que es activada principalmente por glucosa pero también por otros nutrientes. Estas vías detectan la disponibilidad de nutrientes y controlan su utilización. Ambas vías convergen en el regulón de resistencia al estrés que incluye Rim15 y los factores de transcripción Msn2/Msn4 y Gis1 (Pedruzzi et al., 2003; Wei et al., 2008). Estos factores también regulan el metabolismo y la acumulación y uso de fuentes de carbono intracelulares y extracelulares (Bonawitz et al., 2007; Wei et al., 2008).

La inhibición de la ruta TOR/S6K y la ruta Ras/adenilato ciclasa (AC)/PKA aumenta la CLS, lo cual requiere cambios a gran escala en la expresión génica y posiblemente en la reprogramación epigenética (Cheng et al., 2007; Ge et al., 2010). Esto sucede en una situación de crecimiento calórico restringido, en la cual se observa un aumento en la respiración y en la producción de ROS, pero también en la capacidad detoxificante, lo que apoya el estrés mitocondrial como una pieza central en el envejecimiento cronológico (Longo et al., 2012).

1.5. LUCIFERASA DESESTABILIZADA Y SU USO EN LA CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN LEVADURA

La modulación dinámica de la expresión génica es esencial para entender la respuesta de los sistemas biológicos a los estímulos externos. La levadura es un modelo excelente que permite describir el impacto de los cambios ambientales en la transcripción a nivel de todo el organismo y caracterizar los eventos moleculares que conducen a la activación de la expresión génica (Hahn y Young, 2011).

Introducción

Tradicionalmente, la transcripción se mide mediante la determinación directa o indirecta del nivel de ARNm de un gen de interés o mediante la detección de una actividad enzimática reportera cuya expresión está controlada por el promotor de interés. Sin embargo, estos métodos requieren la disrupción celular y normalmente también mucho tiempo de preparación (Rienzo et al, 2012). Otra opción es emplear reporteros fluorescentes como la proteína GFP (“Green Fluorescence Protein”), que permite estudiar la expresión génica visualizando la actividad transcripcional instantáneamente en la célula viva individual sin alterar su integridad (Cormack, 1998). Sin embargo, es necesaria la excitación empleando una fuente de luz externa que interfiere con la cuantificación de la expresión génica. Además, las respuestas transcripcionales son transitorias en muchos casos y están reguladas por la duración y la intensidad del estímulo (Yosef y Regev, 2011), por lo que se requieren versiones desestabilizadas de los reporteros fluorescentes, que en muchos casos son relativamente duraderas (Mateus y Avery, 2000).

En cuanto a la reacción bioluminiscente catalizada por la luciferasa, es un sistema reportero que ha sido adaptado a estudios de expresión génica en mamíferos, insectos, plantas y hongos filamentosos (Miraglia et al., 2011). El sustrato de la luciferasa de luciérnaga es la luciferina, cuya oxidación da lugar a oxiluciferina, mediante el empleo de ATP y la consecuente emisión de un fotón (Thorne et al, 2010), siendo la luz emitida una medida inmediata y muy sensible de la actividad enzimática sin necesidad de excitación externa (Rienzo et al., 2012) (Ilustración 3).

En levadura, se han creado versiones de luciferasa de vida corta de 20-30 minutos para monitorizar las respuestas transcripcionales en *Schizosaccharomyces pombe* (Deng et al., 2006) y para estudiar la regulación génica en *Saccharomyces cerevisiae* (Robertson et al., 2008; Robertson y Johnson, 2011).

El uso de luciferasa desestabilizada es útil para determinar parámetros cinéticos como la velocidad de síntesis, la duración de la actividad de expresión génica, la actividad máxima o la fase de latencia después de la estimulación, además de la forma en la que diferentes cambios ambientales modulan estos parámetros en la célula viva (Rienzo et al., 2012).

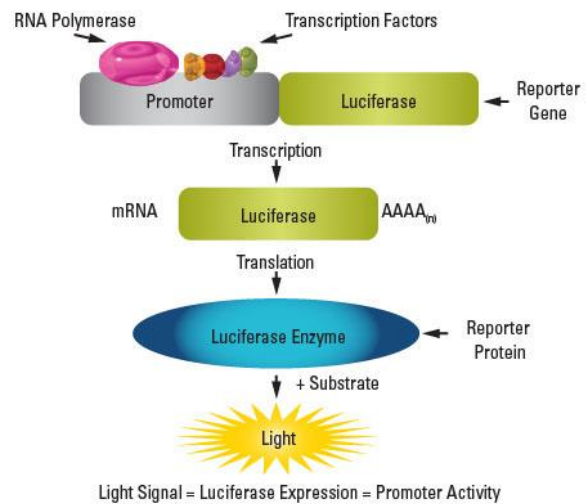


Ilustración 3. Esquema del funcionamiento del sistema luciferasa a nivel molecular. La ARN polimerasa y los factores de transcripción son reclutados y activan el promotor en presencia de estrés. El resultado de la transcripción es un ARNm que tras la traducción da lugar al enzima luciferasa. (Thermo Scientific, Luciferase Reporters).

2. Objetivos

Objetivos

Los objetivos del presente trabajo son los siguientes:

- Estudiar el nivel de implicación de mitocondrias y peroxisomas en la respuesta transcripcional a estrés osmótico.
- Comparar la interacción física entre peroxisomas y mitocondrias en condiciones de fermentación, estrés osmótico y respiración.
- Analizar la posible influencia del envejecimiento en la respuesta transcripcional a estrés oxidativo.

3. Materiales y métodos

Materiales y métodos

3.1. CEPAS

3.1.1. Bacterias

La cepa bacteriana empleada en este trabajo para el aislamiento y la propagación de plásmidos fue la cepa DH5 α de *Escherichia coli*, con genotipo: F' Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) deoRrecA1 endA1 hsdR17(rK⁻mK⁺)phoA supE44 λ ⁻¹ thi⁻¹.

3.1.2. Levaduras

Las cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en el presente trabajo se encuentran recogidas en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas de levadura empleadas.

Cepa	Genotipo	Procedencia
BY4741	MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0	Euroscarf
BY4741 Δ fzo1	BY4741 fzo1::KAN	Euroscarf
BY4741 Δ rpo41	BY4741 rpo41::KAN	Euroscarf
BY4741 Δ pex3	BY4741 pex3::KAN	Euroscarf
BY4741 Δ pex19	BY4741 pex19::KAN	Euroscarf
BY4741 V _N PEX11- MDM34V _C	BY4741 KANMX-VN173-PEX11 + MDM34-VC155-HIS3	Laboratorio de Uros Petrovic
BY4741 V _N PEX11- PEX11VC	BY4741 KANMX-VN173-PEX11 + PEX11-VC155-HIS3	Laboratorio de Uros Petrovic
UCC4925	MATa/MAT α his3 Δ 1/his3 Δ 1 leu2 Δ 0/leu2 Δ 0 ura3 Δ 0/ura3 Δ 0 lys2 Δ 0/+ trp1 Δ 63/+ ho Δ ::P _{SCW11} -cre-EBD78- NatMX/ho Δ ::P _{SCW11} -cre-EBD78-NatMX loxP-CDC20-Intron- loxP-HphMX/loxP-CDC20-Intron-loxP-HphMX loxP-UBC9- loxp-LEU2/loxP-UBC9-loxp-LEU2	Laboratorio de Daniel E. Gottschling

3.2. MEDIOS DE CULTIVO

3.2.1. Bacterias

- **Medio LB (“Luria Bertani”)**: Para su preparación, se disolvió en agua MiliQ un 1% de triptona, un 0,5% de extracto de levadura y un 1% de NaCl. La disolución se autoclavó a 121°C durante 20 minutos.

3.2.2. Levaduras

- **Medio SD (“Synthetic Dextrose”)**: Para su preparación, se disolvió en agua MiliQ un 2% de glucosa (dextrosa) y un 0,67% de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos y con sulfato de amonio. En caso de preparar SD sólido se añadió también un 2% de agar bacteriológico. La disolución se autoclavó a 121°C durante 20 minutos. A continuación, el medio se suplementó con los aminoácidos requeridos a partir de un stock 100X con uracilo (2,5 g/L), leucina (10 g/L) y metionina (10 g/L) y, por último, se ajustó el pH del medio con ácido succínico 0,5M a pH 5,5 o a pH 3.
- **Medio SGal (“Synthetic Galactose”)**: Para su preparación, se disolvió en agua MiliQ un 2% de galactosa y un 0,67% de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos y con sulfato de amonio. La disolución se autoclavó a 121°C durante 20 minutos. A continuación, el medio se suplementó con los aminoácidos requeridos a partir de un stock 100X con uracilo (2,5 g/L), leucina (10 g/L) y metionina (10 g/L) y, por último, se ajustó el pH del medio con ácido succínico 0,5M a pH 5,5.
- **Medio YPD (“Yeast extract-Peptone-Dextrose”)**: Para su preparación, se disolvió en agua MiliQ un 1% de extracto de levadura, un 2% de peptona y un 2% de glucosa (dextrosa). En caso de preparar YPD sólido se añadió también un 2% de agar bacteriológico. La disolución se autoclavó a 121°C durante 20 minutos y, por último, se ajustó el pH del medio con ácido succínico 0,5M a pH 5,5.

El medio YPD se preparó a pH 3 para realizar los ensayos de bioluminiscencia en el luminómetro de una forma ligeramente diferente. Por una parte, se disolvió en agua MiliQ un 1% de extracto de levadura y un 2% de peptona. Por otra parte, se disolvió en agua MiliQ un 2% de glucosa (dextrosa). Ambas disoluciones se autoclavaron a 121°C durante 20 minutos, se mezclaron en las proporciones adecuadas y se ajustó el pH con ácido succínico 0,5M a pH 3. De esta forma, el medio tomó un color menos pardo.

3.3. PLÁSMIDOS

En la Tabla 2 aparecen descritos todos los plásmidos empleados a lo largo del trabajo.

Tabla 2. Plásmidos empleados.

Plásmido	Descripción
pAG413-CTT1-luc CP+	Plásmido de levadura centromérico con gen de resistencia a ampicilina, gen <i>HIS3</i> y con el promotor del gen <i>CTT1</i> , nucleótidos -983/-10, fusionado con <i>luc CP+</i> , el gen de la luciferasa de luciérnaga desestabilizada (Dolz et al., 2013)
pAG413-SOD2-luc CP+	Plásmido de levadura centromérico con gen de resistencia a ampicilina, gen <i>HIS3</i> y con el promotor del gen <i>SOD2</i> , nucleótidos -977/-16, fusionado con <i>luc CP+</i> , el gen de la luciferasa de luciérnaga desestabilizada (Dolz et al., 2013)
pUG6-luc CP+-CYC1t-KAN	Plásmido de levadura con terminador de <i>CYC1</i> , gen de resistencia a kanamicina y gen de luciferasa de luciérnaga desestabilizada <i>luc CP+</i> (Saiz, 2014)

Los plásmidos empleados para la transformación de la cepa salvaje (BY4741), las cepas mutantes mitocondriales ($\Delta fzo1$ y $\Delta rpo41$) y las cepas mutantes peroxisomales ($\Delta pex3$ y $\Delta pex19$) fueron pAG413-CTT1-luc CP+ y pAG413-SOD2-luc CP+. Para la propagación de estos plásmidos se empleó la cepa DH5 α de *Escherichia coli* y, a partir de cultivos bacterianos de 3 mL en medio LB, se llevó a cabo la purificación del ADN plasmídico empleando el kit NucleoSpin® Plasmid (Machery-Nagel).

La pureza de los plásmidos purificados se comprobó mediante la digestión de estos, haciendo uso de las enzimas de restricción SmaI y SacI. La reacción se preparó con 2 μ L del ADN plasmídico, 2 μ L de tampón Tango (10X), 16 μ L de agua MiliQ y 0,2 μ L de la enzima SmaI (10 U/ μ L). A continuación, se incubó a 25°C durante 1 hora, se añadieron 0,5 μ L de la enzima SacI (10 U/ μ L) y se incubó a 37°C durante toda la noche. Por último, al día siguiente, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1% para comprobar la pureza de estos plásmidos.

Además, se comprobó la eficiencia de la purificación con la medida de la concentración de los plásmidos purificados empleando el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000c.

El plásmido empleado para la obtención de la construcción integrativa en la cepa UCC4925 fue pUG6-luc CP+-CYC1t-KAN. De nuevo, para la propagación del plásmido se empleó la cepa DH5 α de *Escherichia coli*, y se purificó el ADN plasmídico a partir de un cultivo bacteriano de 3 mL en medio LB, haciendo uso del kit NucleoSpin® Plasmid (Machery-Nagel). La eficiencia de la purificación se comprobó también en este caso con la medida de la concentración empleando el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000c.

Materiales y métodos

A continuación, para conseguir la construcción deseada y amplificar el cassette *sod2::SOD2p-luc CP+-KAN-SOD2*, se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando los cebadores SOD2-luc-fw y SOD2-luc-rev, cuyas secuencias se encuentran recogidas en el Anexo I. La reacción se realizó en un volumen de 100 μL , constituidos por 1 μL del plásmido (10 $\text{ng}/\mu\text{L}$), 1 μL de cada uno de los cebadores (100 $\text{pmol}/\mu\text{L}$), 10 μL de dNTPs (2 mM), 10 μL de tampón de la Taq polimerasa con MgCl_2 (10X), 2 μL de Taq polimerasa (0,5 $\text{U}/\mu\text{L}$) y 75 μL de agua MiliQ. Las condiciones de amplificación fueron: un paso de desnaturalización de 5 minutos a 95°C; 40 ciclos de amplificación (desnaturalización durante 30 segundos a 95°C, alineamiento durante 30 segundos a 53°C y extensión de la ADN polimerasa durante 3 minutos a 72°C); y un paso final de elongación a 72°C durante 7 minutos.

Con el objetivo de confirmar que la reacción de amplificación se había realizado de forma correcta, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1%. De esta forma, se confirmó que la construcción había sido exitosa al observar los fragmentos de 3,5 Kb.

Tras comprobar que se había logrado la construcción deseada, se purificó el producto obtenido en la PCR empleando el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Machery-Nagel).

3.4. TRANSFORMACIÓN DE LEVADURAS

Tanto para la transformación de la cepa salvaje (BY4741), las cepas mutantes mitocondriales ($\Delta fzo1$ y $\Delta rpo41$) y las cepas mutantes peroxisomales ($\Delta pex3$ y $\Delta pex19$), como para la transformación de la cepa de estudio del envejecimiento UCC4925, se empleó el método del acetato de litio (Gietz et al., 1995).

En primer lugar, se creció un cultivo líquido en agitación de la cepa correspondiente en 50 mL de medio YPD hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) de entre 0,7 y 1,2. A continuación, se centrifugaron las células en un tubo Falcon de 50 mL (3 mins, 3000 rpm) y se lavaron con agua estéril y con LiTE 1X estéril (0.1M acetato de litio, 10mM Tris/HCl pH 7.6, 1mM EDTA). Las células fueron resuspendidas en 500 μL de LiTE 1X estéril y se incubaron a 30°C durante 15 minutos para hacerlas competentes. Transcurridos los 15 minutos, a 60 μL de células competentes se añadieron 10 μL del ADN correspondiente, ya purificado, y 300 μL de LiTE/40% PEG4000 (9 volúmenes 45% PEG4000, 1 volumen 10X LiTE), y se mezcló con ayuda del vórtex. La mezcla se incubó a 30°C durante 30 minutos y a 42°C durante 20 minutos, para así permitir la entrada del ADN en las células competentes.

A partir de este punto, el proceso de transformación fue diferente para la cepa salvaje y las cepas mutantes y para la cepa de estudio del envejecimiento.

En la transformación de la cepa salvaje (BY4741), las cepas mutantes mitocondriales ($\Delta fzo1$ y $\Delta rpo41$) y las cepas mutantes peroxisomales ($\Delta pex3$ y $\Delta pex19$), la mezcla se centrifugó (20 segs, 5000 rpm) y se lavó con agua estéril. El sobrenadante se eliminó, las células se resuspendieron en el líquido remanente y se sembraron en placas con medio SD, que se incubaron a 30°C durante 1-2 días.

Materiales y métodos

En la transformación de la cepa UCC4925, la mezcla, a la que en el paso previo a las incubaciones también se le había añadido 5 μ L de ADN de esperma de salmón, se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1 mL de medio YPD. A continuación, se incubó a 30°C durante 2 horas con el objetivo de permitir la inserción de los fragmentos en el genoma de levadura mediante recombinación homóloga. Transcurridas las 2 horas, se centrifugó (1 min, 10000 rpm), se lavó con agua estéril y las células se resuspendieron en el líquido remanente. Por último, las células se sembraron en placas YPD, en las cuales se había añadido previamente geneticina (G418) (250X), y se incubaron a 30°C durante 1-2 días.

Transcurridos 1 o 2 días desde la siembra de las placas, aquellas colonias crecidas en éstas, se consideraron las colonias transformadas y fueron las empleadas en los ensayos de bioluminiscencia.

3.5. EXTRACCIÓN DEL ADN CROMOSÓMICO

Tras la transformación de la cepa UCC4925, en la cual se pretendía conseguir una construcción integrativa, se comprobó la correcta inserción del fragmento en el genoma. Con el objetivo descrito, se extrajo el ADN genómico de las colonias crecidas tras la transformación de la cepa UCC4925 siguiendo un protocolo de aislamiento rápido del ADN genómico.

En primer lugar, para cada colonia crecida, se creció un cultivo en 3 mL de medio YPD en agitación a 30°C durante toda la noche. Las células se centrifugaron (30 segs, 5000 rpm) y se lavó el pellet con 1 mL de agua estéril. A continuación, el pellet se resuspendió en 200 μ L de tampón de protoplastos PP (100mM Tris/HCl pH 7,5, 10mM EDTA, 10 μ l/ml β -mercaptoetanol, 0,2mg/ml zimoliasa) y se incubó a 37°C durante 1 hora. Transcurrida 1 hora, se añadieron 200 μ L de tampón de lisis (0,2M NaOH, 1% SDS), se mezcló por inversión y se incubó a 65°C durante 20 minutos. Tras 20 minutos, se añadieron 200 μ L de acetato potásico 5M a pH 5,5, se mezcló por inversión y se centrifugó 3 minutos a máxima velocidad (13.400 rpm). El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo eppendorf, se añadieron 600 μ L de isopropanol para precipitar el ADN cromosómico y se mezcló por inversión. De nuevo, se centrifugó a máxima velocidad (13.400 rpm) durante 1 minuto, y se lavó el pellet con etanol al 70%. Por último, para conseguir un secado óptimo del pellet, se incubó a 45°C durante 20 minutos, y después se resuspendió en 50 μ L de tampón TE (10mM Tris/HCl pH 7,5, 1mM EDTA).

A partir del ADN genómico que se extrajo mediante el protocolo anterior, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando los cebadores SOD2-Chk-luc y LucSeqRev, cuyas secuencias se encuentran recogidas en el Anexo I. La reacción de PCR se realizó en un volumen de 50 μ L, constituido por 1 μ L del ADN genómico, 1 μ L de cada uno de los cebadores (100 pmol/ μ L), 5 μ L de dNTPs (2 mM), 5 μ L de tampón de la Taq polimerasa con MgCl₂ (10X), 1 μ L de Taq polimerasa (0,5 U/ μ L) y 36 μ L de agua MiliQ. Las condiciones de amplificación fueron: un paso de desnaturalización de 5 minutos a 95°C; 40 ciclos de amplificación (desnaturalización durante 30 segundos a 95°C, alineamiento durante 30 segundos a 53°C y extensión de la ADN polimerasa durante 2 minutos a 72°C); y un paso final de elongación a 72°C durante 7 minutos.

Materiales y métodos

Por último, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1%. De esta forma, se confirmó que la inserción del fragmento en el genoma había sido exitosa al observar los fragmentos de 400 pb.

3.6. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A ESTRÉS OSMÓTICO CON EL SISTEMA LUCIFERASA

Con el objetivo de estudiar los cambios en la expresión génica en respuesta a estrés osmótico, más concretamente, estudiar la implicación de mitocondrias y peroxisomas en dicha respuesta, se emplearon cinco cepas distintas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Una de ellas fue BY4741, que es una cepa silvestre (WT). Las cuatro cepas restantes eran mutantes, dos de ellas mitocondriales, $\Delta fzo1$ y $\Delta rpo41$, y las otras dos peroxisomales, $\Delta pex3$ y $\Delta pex19$.

Respecto a las cepas mutantes mitocondriales, la cepa $\Delta fzo1$ es mutante para la mitofusina *fzo1*, que es una GTPasa implicada en la fusión mitocondrial, mientras que $\Delta rpo41$ carece de la ARN polimerasa mitocondrial. Por otra parte, en cuanto a las cepas mutantes peroxisomales, $\Delta pex3$ y $\Delta pex19$ carecen de proteínas necesarias para la correcta localización y estabilidad de las proteínas de membrana peroxisomales.

Como se ha descrito anteriormente, las cinco cepas fueron transformadas con dos plásmidos: pAG413-CTT1-luc CP⁺ y pAG413-SOD2-luc CP⁺. Estos son una construcción del gen de la luciferasa de luciérnaga desestabilizada fusionado con un promotor. En este caso, *CTT1* y *SOD2*, que son promotores inducibles por estrés, por lo que, tras la transformación, se llevaron a cabo ensayos de bioluminiscencia tratando las células con disoluciones de NaCl a distintas concentraciones para cuantificar así cambios en la expresión génica en respuesta al estrés salino gracias a los genes reporteros *CTT1* y *SOD2* presentes en las cinco cepas.

En primer lugar, se prepararon precultivos de las cinco cepas transformadas con los dos plásmidos en 3 mL de medio SD a pH 5,5, y se incubaron a 30°C en agitación durante 24 horas. A partir de estos, se prepararon los cultivos en 3,5 mL de medio SD a pH 3, y se incubaron de nuevo a 30°C en agitación. Estos cultivos se crecieron hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀) de 2-2,5 y, a continuación, se añadieron 50 µL del sustrato luciferina (10mM) por cada 1 mL de cultivo, es decir, 165 µL, pues 200 µL del cultivo se emplearon para la medida de la densidad óptica, por lo que el volumen final fue de 3,3 mL. A continuación, estos cultivos con el sustrato luciferina se incubaron a 30°C en agitación durante 1 hora.

Durante la incubación, se preparó el estrés salino. En primer lugar, se preparó un stock a una concentración 5M disolviendo NaCl en agua MiliQ. A partir de esta disolución, se prepararon 12 stocks a diferentes concentraciones: 0, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,8 y 1M, que fueron las concentraciones ensayadas con las células.

Materiales y métodos

Una vez transcurrido el tiempo de incubación de los cultivos con el sustrato luciferina, se preparó la placa de 96 pocillos añadiendo 30 μ L de estrés salino a cada pocillo, ensayando las doce concentraciones por duplicado, es decir, empleando dos pocillos para cada concentración. Por último, se cargaron 120 μ L de cultivo por pocillo, ocupando cada cepa dos filas, que es lo que ocupaban las doce concentraciones del estrés ensayadas por duplicado. A continuación, la placa se introdujo en el luminómetro GloMax®-Multi Detection System y se escogieron los parámetros: 99 lecturas de placa, 1 seg/pocillo y periodos de 3 minutos.

El análisis de los datos se llevó a cabo empleando el programa Microsoft Excel.

3.7. ENSAYO BiFC IN VIVO

Con el objetivo de estudiar la interacción física entre peroxisomas y mitocondrias, concretamente una interacción ya descrita entre Pex11 y Mdm34, se llevó a cabo un ensayo BiFC, que se basa en la complementación estructural entre dos fragmentos no fluorescentes N-terminal y C-terminal de una proteína fluorescente, que se fusionan a proteínas de interés, de forma que, si las dos proteínas interactúan, los fragmentos reconstituyen la proteína fluorescente intacta, lo cual se puede visualizar utilizando microscopía de fluorescencia (Kodama y Hu, 2012).

Pex11 es una proteína peroxisomal requerida para la β -oxidación de ácidos grasos de cadena media y para la proliferación de peroxisomas. Por otra parte, Mdm34 es un componente mitocondrial del complejo ERMES (“Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Encounter Structure”) que vincula el retículo endoplásmico a las mitocondrias. La interacción entre estas dos proteínas fue descrita por Mattiazi Ušaj et al. (2015). Este grupo construyó las cepas BY4741 V_N PEX11-MDM34 V_C y BY4741 V_N PEX11-PEX11 V_C empleando la proteína Venus, que es una versión mejorada de la proteína fluorescente amarilla, o “Yellow Fluorescent Protein” (YFP). En ambas cepas, el extremo N-terminal de la proteína Venus fue usado para el marcaje del extremo N-terminal de PEX11, y el extremo C-terminal de la proteína Venus fue usado para el marcaje del extremo C-terminal de MDM34 en la primera cepa y para marcar el extremo C-terminal de PEX11 en la segunda cepa, que sirvió como control positivo.

En el presente trabajo, empleando las cepas BY4741 V_N PEX11-MDM34 V_C y BY4741 V_N PEX11-PEX11 V_C , proporcionadas por el Laboratorio de Uros Petrovic, se llevó a cabo el ensayo BiFC para estudiar la interacción entre Pex11 y Mdm34 en tres condiciones diferentes: medio SD, medio SD con NaCl (0,8M) y medio SGal.

En primer lugar, se preparó, de ambas cepas, un precultivo en 3 mL de medio SD, que se incubó a 30°C en agitación durante unas 24 horas. A partir de cada precultivo, se prepararon los cultivos de 50 mL en medio SD, medio SD + NaCl (0,8M) y medio SGal, que se incubaron a 30°C en agitación durante unas 24 horas. Por último, 3 mL de cada cultivo se centrifugaron (1 min, 3000 rpm), se lavaron con 1 mL del medio correspondiente y se resuspendieron en 0,5 mL de dicho medio.

Materiales y métodos

Para la visualización de las células y de la interacción entre Pex11 y Mdm34, se colocaron 10 μ L sobre un portaobjetos, se colocó un cubreobjetos, y sobre éste se añadió una gotita de aceite de inmersión.

El microscopio utilizado para analizar las células de levadura fue el Microscopio Confocal Leica SP8 con el objetivo HCXPL APO CS2 aceite, con resolución (nm) (xy/z) 139.43/235,82, aumento/apertura 63x/1,40 y distancia libre de trabajo 0,140 mm. Para la visualización de la proteína Venus se aplicó una longitud de onda de excitación de 514 nm, y su longitud de emisión fue de 527 nm.

3.8. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A ESTRÉS OXIDATIVO CON EL SISTEMA LUCIFERASA

Con el objetivo de estudiar los cambios en la expresión génica en respuesta a estrés oxidativo, más concretamente, estudiar la influencia del envejecimiento, tanto replicativo como cronológico, en dicha respuesta, se empleó la cepa UCC4925, con la que se llevaron a cabo estudios de envejecimiento replicativo y de envejecimiento cronológico.

La cepa UCC4925 presenta un sistema que permite la división de las células madre e impide la de las células hija. Este sistema logra este objetivo al interrumpir genes esenciales para la progresión del ciclo celular mediante la acción de una recombinasa, que se induce por estradiol en células recién nacidas. La eliminación de estos genes por recombinación da lugar a células hija que se detienen permanentemente en la fase M. Este sistema forma parte del método conocido como “Mother Enrichment Program” (MEP), que tiene como fin restringir la capacidad replicativa de las células hija, permitiendo que las células madre logren una vida replicativa normal. (Ilustración 4). De esta forma, es posible llevar a cabo los estudios de vida replicativa, o “Replicative Life Span” (RLS), que tienen como objetivo determinar el número de divisiones que experimenta una célula antes de entrar en senescencia (Lindstrom y Gottschling, 2009).

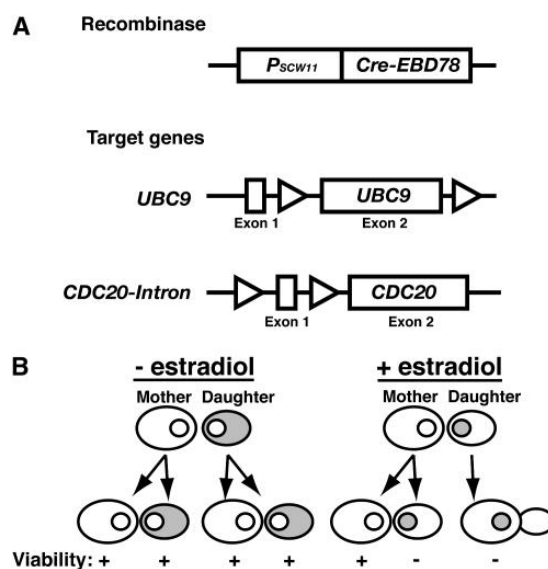


Ilustración 4. Sistema MEP. (A) Componentes del sistema MEP. Cre-EBD78 es una nueva versión de una proteína de fusión entre la recombinasa Cre del bacteriófago P1 y el dominio de unión a estrógenos del receptor de estrógenos murino, que depende del estradiol para su actividad. PSCW11-cre-EBD78 se expresa en células recién nacidas, utilizando un promotor específico derivado de SCW11. Los genes diana se construyen mediante la introducción de sitios loxP (triángulos). Para *UBC9*, la recombinación entre los sitios loxP elimina el exón 2. Para *CDC20*, la recombinación entre sitios loxP elimina el exón 1. En ambos casos, se generan proteínas incapaces de desarrollar su función. **(B)** Localización esperada de Cre-EBD78 (sombreado) en respuesta al estradiol. La expresión de PSCW11-cre-EBD78 está restringida a la fase G1 de las células hija. En ausencia de estradiol, la proteína de fusión se secuestra en el citoplasma. Tras la unión del ligando, la proteína de fusión se transloca al núcleo (círculo pequeño), donde puede actuar sobre los sitios diana loxP (Lindstrom y Gottschling, 2009).

Materiales y métodos

Como se ha descrito anteriormente, la cepa UCC4925 fue transformada logrando una construcción integrativa del gen de la luciferasa de luciérnaga desestabilizada fusionado con *SOD2*, que es un promotor inducible por estrés, por lo que, tras la transformación, se llevaron a cabo ensayos de bioluminiscencia tratando las células con disoluciones de H_2O_2 a distintas concentraciones para cuantificar así cambios en la expresión génica en respuesta al estrés oxidativo a medida que las células experimentaban el envejecimiento.

En primer lugar, se preparó un precultivo de la cepa UCC4925 transformada en 3 mL de medio YPD, y se incubó a 30°C en agitación durante 24 horas. A partir de este precultivo, se prepararon dos cultivos en matraces con 100 mL de medio YPD a pH 3, que se incubaron de nuevo a 30°C en agitación. Uno de estos cultivos se empleó para el ensayo del envejecimiento cronológico, y el otro para el estudio del envejecimiento replicativo, al cual se añadieron, a las 24 horas del inicio del cultivo, 10 μ L de estradiol (10 mM) para conseguir una concentración 1 μ M.

En el caso del envejecimiento replicativo, se realizaron ensayos a cuatro tiempos tras la adición del estradiol, que se consideró el momento de inicio del cultivo: 0, 24, 48 y 72 horas. En el caso del envejecimiento cronológico, se realizaron ensayos a once tiempos tras el inicio del cultivo: día 5, 6, 7, 8, 9, 13, 16, 22, 26, 29 y 33. En ambos casos, los matraces se mantuvieron a 30°C en agitación durante todo el experimento, y, para cada ensayo, se realizó una medida de la densidad óptica a 600 nm (OD_{600}), preparando, a partir de los cultivos originales, nuevos cultivos en 4 mL de medio YPD a pH 3 ajustando la densidad óptica a 2,5.

A los cultivos preparados a partir de los originales, se añadieron 50 μ L del sustrato luciferina (10mM) por cada 1 mL de cultivo, es decir, 200 μ L, y se incubaron a 30°C en agitación durante 1 hora. Durante la incubación, se preparó el estrés oxidativo. Partiendo de un stock de H_2O_2 a una concentración 7,9M, se realizó una dilución 100 mM en agua MiliQ y, a partir de ésta, una nueva dilución 7,5 mM, a partir de la cual se prepararon 12 stocks a diferentes concentraciones: 0, 0,025, 0,05, 0,075, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,75, 1 y 1,5 mM, que fueron las concentraciones ensayadas con las células.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación de los cultivos con el sustrato luciferina, se preparó la placa de 96 pocillos añadiendo 30 μ L del estrés oxidativo a cada pocillo, ensayando las doce concentraciones por duplicado, es decir, empleando dos pocillos para cada concentración. Por último, se cargaron 120 μ L de cultivo por pocillo, ocupando dos filas, que es lo que ocupaban las doce concentraciones del estrés ensayadas por duplicado. A continuación, la placa se introdujo en el luminómetro GloMax®-Multi Detection System y se escogieron los parámetros: 99 lecturas de placa, 1 seg/pocillo y periodos de 3 minutos.

El análisis de los datos se llevó a cabo empleando el programa Microsoft Excel.

En cada ensayo, además de medir la densidad óptica a 600 nm (OD_{600}), la cual muestra el número de células en el cultivo, se midió el número de células vivas presentes. Para ello, a partir del cultivo, se realizaron diluciones 1:1.000, 1:10.000 y 1:100.000, y se sembraron en placas YPD, que se incubaron a 30°C durante 2-3 días, tras los cuales se realizó un recuento de las colonias crecidas, que se correspondían con las células viables en el cultivo en el momento del ensayo.

4. Resultados y discusión

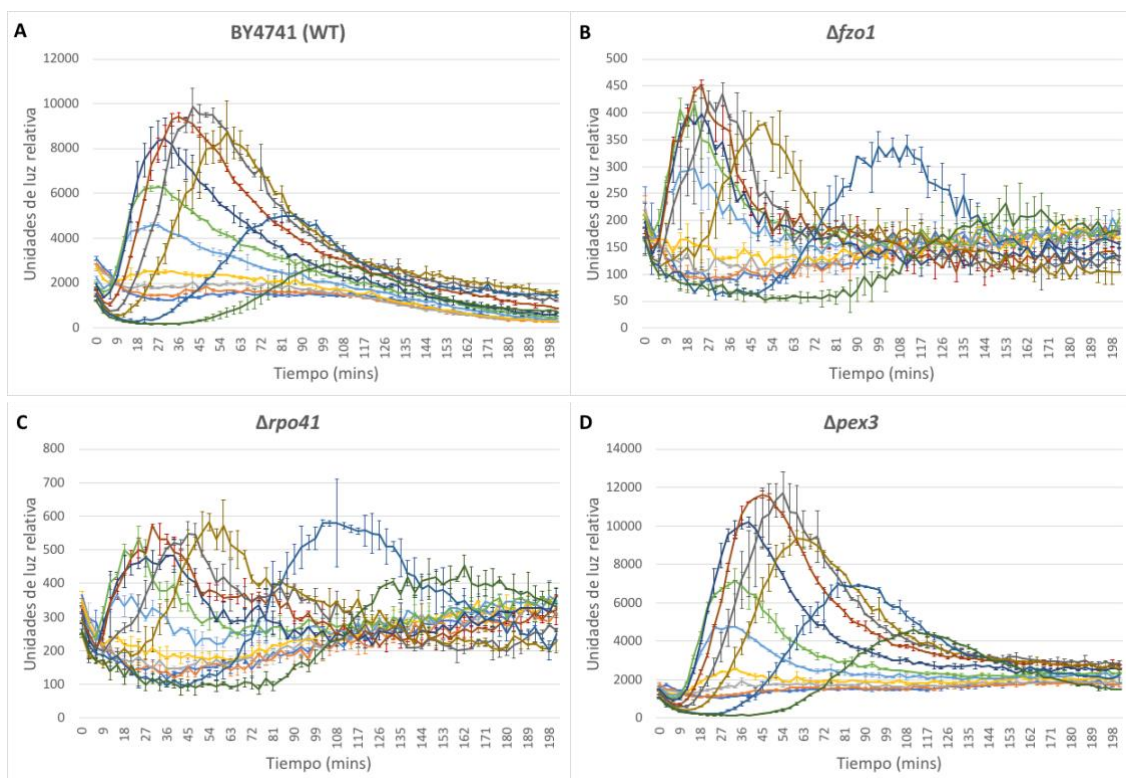
Resultados y discusión

4.1. CARACTERIZACIÓN DE LA DINÁMICA TRANSCRIPCIONAL DE CEPAS MUTANTES MITOCONDRIALES Y PEROXISOMALES EN RESPUESTA A ESTRÉS OSMÓTICO

El estrés osmótico desencadena una respuesta adaptativa en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que incluye una respuesta transcripcional, produciéndose cambios en la expresión génica. El estudio de estos cambios in vivo y a tiempo real es posible utilizando el sistema luciferasa.

En este experimento, se emplearon dos construcciones plasmídicas del gen de la luciferasa de luciérnaga desestabilizada fusionado con dos promotores inducibles por estrés: *CTT1* y *SOD2*. Con estas construcciones, se lograron transformar cinco cepas distintas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*: la cepa silvestre BY4741, las cepas mutantes mitocondriales $\Delta fzo1$ y $\Delta rpo41$, y las cepas mutantes peroxisomales $\Delta pex3$ y $\Delta pex19$. Y, mediante ensayos de bioluminiscencia, en los que las células fueron tratadas con NaCl en un rango de concentraciones de 0 a 1M, se pudo caracterizar la respuesta transcripcional de estas cinco cepas al estrés salino gracias a los genes reporteros *CTT1* y *SOD2*.

4.1.1. *CTT1*



Resultados y discusión

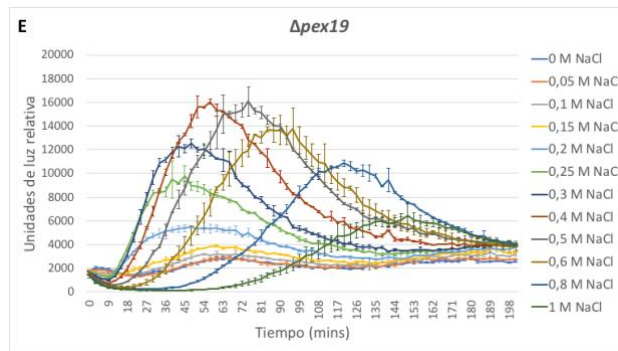


Figura 1. Caracterización de la dinámica transcripcional del gen reportero *CTT1* en respuesta a un baremo de concentraciones de NaCl. Curvas dosis-respuesta obtenidas al inducir el promotor *CTT1* con un baremo de concentraciones de NaCl de 0 a 1M en la cepa silvestre (A), las cepas mutantes mitocondriales: $\Delta fzo1$ (B) y $\Delta rpo41$ (C), y las cepas mutantes peroxisomales: $\Delta pex3$ (D) y $\Delta pex19$ (E) durante 200 minutos.

Para la obtención de la Figura 1 a partir de los datos crudos obtenidos en el ensayo de bioluminiscencia de cada una de las cepas con el gen reportero *CTT1*, se calculó el promedio de los valores de los duplicados, se dividió entre la OD_{600} del cultivo, y los valores obtenidos se normalizaron respecto al tiempo 0. Por último, los valores resultantes se representaron frente al tiempo, frente a los minutos en los que se realizaron las medidas, obteniendo así la Figura 1.

En la Figura 1, se observa que la respuesta transcripcional máxima en las cinco cepas ocurre frente a concentraciones de NaCl de entre 0,4 y 0,6M. Otro fenómeno visible en las cinco cepas es el retraso en la aparición de las curvas dosis-respuesta a medida que aumenta la concentración de NaCl, probablemente debido a que las células han de realizar un esfuerzo mayor para activar la maquinaria transcripcional cuando son sometidas a condiciones extremas de estrés.

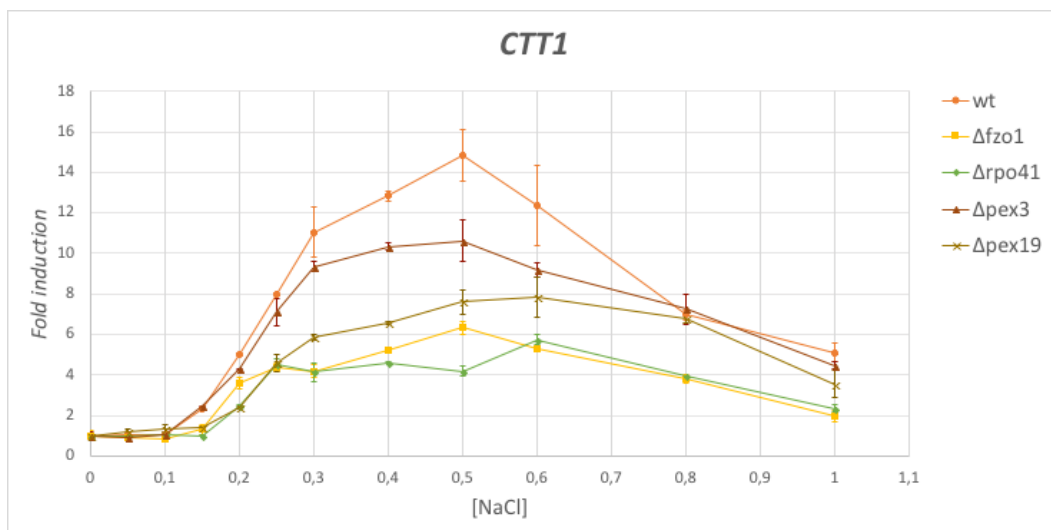


Figura 2. Inducción del gen reportero *CTT1* en función de la concentración de NaCl. Representación del *fold induction* frente a las doce concentraciones de NaCl ensayadas para las cinco cepas con el gen reportero *CTT1*.

Resultados y discusión

Para obtener la Figura 2, se calculó el *fold induction* para cada concentración de NaCl ensayada, partiendo de los datos ya tratados para la construcción de la Figura 1. Para ello, se dividió la actividad máxima del gen reportero *CTT1* en respuesta a cada concentración de NaCl entre la actividad de dicho gen en respuesta a una concentración 0M de NaCl en ese mismo tiempo, en esa misma lectura del luminómetro. Esto se calculó para cada cepa con el gen reportero *CTT1* y se representó frente a las doce concentraciones de NaCl ensayadas.

Como se puede observar en la Figura 2, la respuesta transcripcional de la cepa silvestre BY4741 es superior a la del resto de cepas. Una respuesta menor presenta $\Delta pex3$ y $\Delta pex19$, que son cepas mutantes peroxisomales, y $\Delta fzo1$ y $\Delta rpo41$, que son cepas mutantes mitocondriales.

4.1.2. SOD2

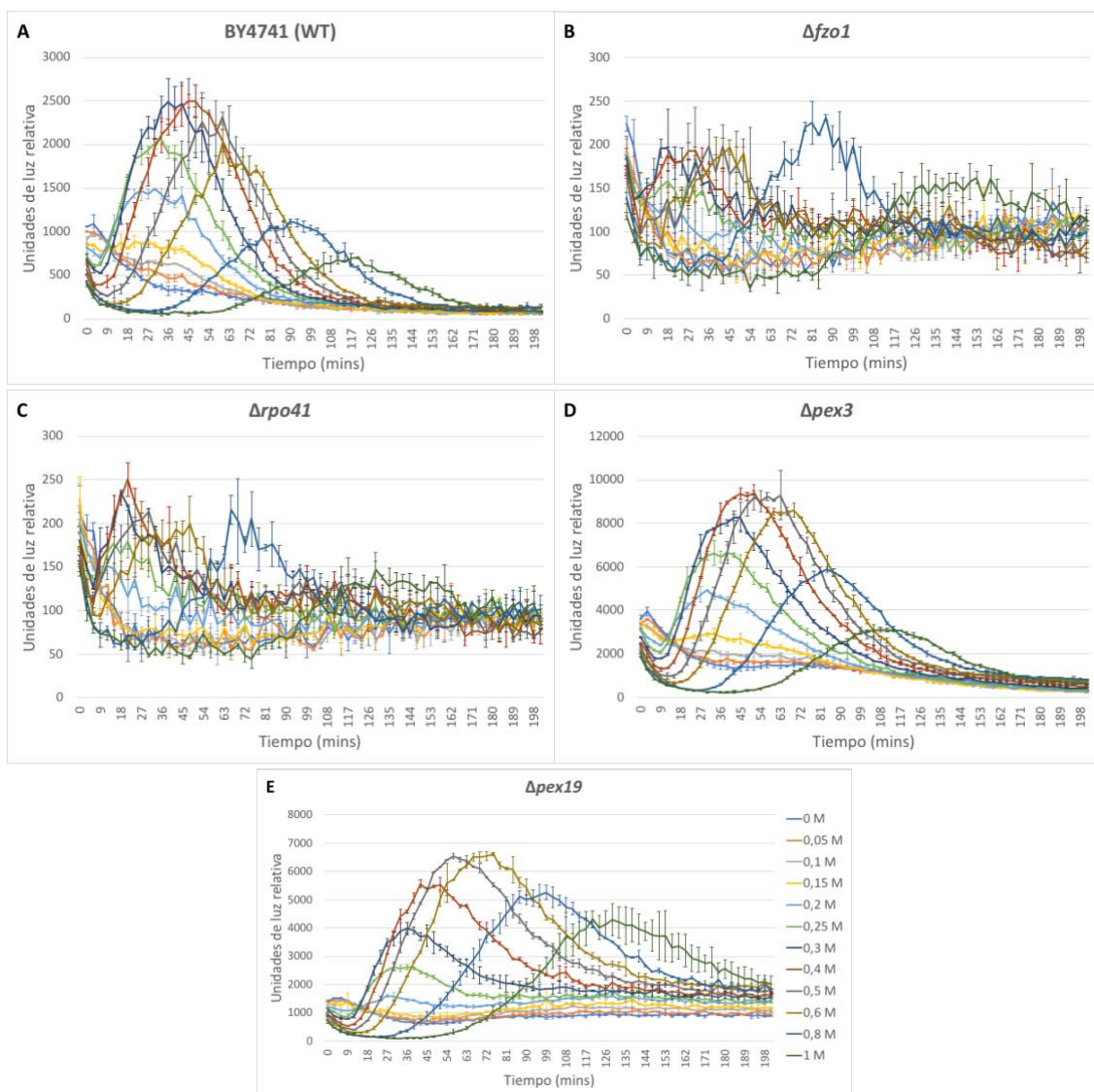


Figura 3. Caracterización de la dinámica transcripcional del gen reportero *SOD2* en respuesta a un baremo de concentraciones de NaCl. Curvas dosis-respuesta obtenidas al inducir el promotor *SOD2* con un baremo de concentraciones de NaCl de 0 a 1M en la cepa silvestre (A), las cepas mutantes mitocondriales: $\Delta fzo1$ (B) y $\Delta rpo41$ (C), y las cepas mutantes peroxisomales: $\Delta pex3$ (D) y $\Delta pex19$ (E) durante 200 minutos.

Resultados y discusión

Para la obtención de la Figura 3 a partir de los datos crudos obtenidos en el ensayo de bioluminiscencia de cada una de las cepas con el gen reportero *SOD2*, se calculó el promedio de los valores de los duplicados, se dividió entre la OD₆₀₀ del cultivo, y los valores obtenidos se normalizaron respecto al tiempo 0. Por último, los valores resultantes se representaron frente al tiempo, frente a los minutos en los que se realizaron las medidas, obteniendo así la Figura 3.

En la Figura 3, se observa que la respuesta transcripcional máxima en las cinco cepas ocurre frente a concentraciones de NaCl de entre 0,4 y 0,8M. En este caso, al igual que con el gen reportero *CTT1*, al analizar la transcripción del gen reportero *SOD2* en respuesta a estrés salino en las cinco cepas, se observa el retraso en la aparición de las curvas dosis-respuesta a medida que aumenta la concentración de NaCl.

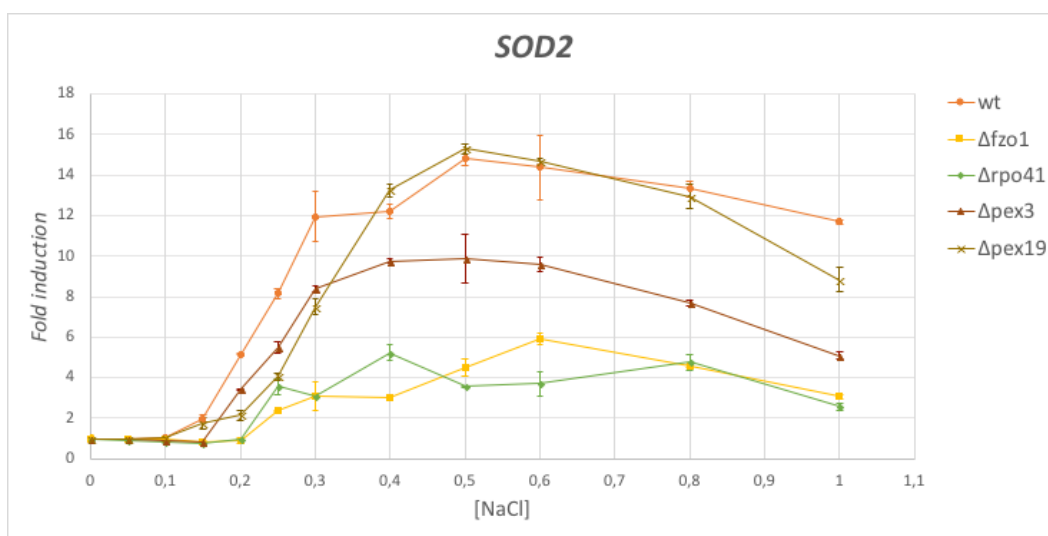


Figura 4. Inducción del gen reportero *SOD2* en función de la concentración de NaCl. Representación del *fold induction* frente a las doce concentraciones de NaCl ensayadas para las cinco cepas con el gen reportero *SOD2*.

Para obtener la Figura 4, se calculó el *fold induction* para cada concentración de NaCl ensayada, partiendo de los datos ya tratados para la construcción de la Figura 3. Para ello, se dividió la actividad máxima del gen reportero *SOD2* en respuesta a cada concentración de NaCl entre la actividad de dicho gen en respuesta a una concentración 0M de NaCl en ese mismo tiempo, en esa misma lectura del luminómetro. Esto se calculó para cada cepa con el gen reportero *SOD2* y se representó frente a las doce concentraciones de NaCl ensayadas.

De nuevo, en la Figura 4, como ocurre con el gen reportero *CTT1*, la respuesta transcripcional de la cepa silvestre BY4741 es superior a la del resto de cepas. Sin embargo, en este caso, la cepa mutante peroxisomal *Δpex19* presenta un comportamiento similar a la cepa silvestre e incluso el *fold induction* es superior para cuatro concentraciones de NaCl. Una respuesta menor presenta *Δpex3*, que es la otra cepa mutante peroxisomal, y *Δfzo1* y *Δrpo41*, que son las cepas mutantes mitocondriales.

Resultados y discusión

Analizando conjuntamente los resultados obtenidos con los dos genes reporteros, *CTT1* y *SOD2*, y tomando la cepa silvestre BY4741 como la cepa control, y, por tanto, su respuesta frente al estrés salino como la respuesta normal, se observa que las cuatro cepas mutantes estudiadas presentan una respuesta disminuida frente al estrés salino. Esta observación parece confirmar la implicación de mitocondrias y peroxisomas en la respuesta a dicho estrés, pues con anterioridad se ha podido comprobar que el estrés salino induce un cambio inmediato de fermentación a respiración mediante la inducción de biomasa mitocondrial y componentes mitocondriales específicos (Pastor et al., 2009), además de activar la biogénesis peroxisomal y la oxidación de ácidos grasos mediante la β -oxidación (Manzanares-Estreder et al., 2017). Estos dos eventos desencadenados por el estrés salino sugieren que es necesario un cambio metabólico hacia el catabolismo oxidativo de los ácidos grasos internos en los peroxisomas y las mitocondrias para lograr una adaptación exitosa al estrés (Pascual-Ahuir et al., 2017), por lo que defectos en estos orgánulos, como los que presentan las cepas mutantes estudiadas, parecen impedir una respuesta adecuada al estrés salino.

Sin embargo, como se puede observar en la Figura 2 y en la Figura 4, tanto el gen reportero *CTT1* como el *SOD2* presentan una inducción mayor en las cepas mutantes peroxisomales que en las cepas mutantes mitocondriales. Esto parece indicar que, aunque han demostrado ser necesarios ambos orgánulos en la respuesta al estrés salino, no son igual de importantes en dicha respuesta, pues las cepas con mitocondrias funcionales y con peroxisomas no funcionales presentan una respuesta más similar a la de la cepa silvestre que aquellas cepas sin actividad mitocondrial, pero con actividad peroxisomal. Esto sugiere que los peroxisomas no son la única fuente de Acetil-CoA que emplean las mitocondrias para llevar a cabo la respiración celular, por lo que, si las mitocondrias son funcionales, aunque los peroxisomas no lo sean, se puede producir el cambio de fermentación a respiración necesario para conseguir la adaptación al estrés salino, lo cual no puede suceder si las mitocondrias no son funcionales.

4.2. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN FÍSICA ENTRE PEROXISOMAS Y MITOCONDRIAS

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la β -oxidación de los ácidos grasos únicamente tiene lugar en los peroxisomas. Cuando las células crecen en un medio con glucosa, hay un número muy pequeño de peroxisomas por célula con una actividad baja de β -oxidación de ácidos grasos (Marchesini y Poirier, 2003). Sin embargo, se ha observado que cuando la fuente de carbono es menos eficiente o no es fermentable, de forma que se inicia la respiración celular, se produce un aumento en el número de peroxisomas por célula (Sibirny, 2016). Además, también se ha podido ver que el estrés salino induce un cambio inmediato de fermentación a respiración a través de la activación de la biogénesis peroxisomal y la oxidación de ácidos grasos mediante la β -oxidación (Manzanares-Estreder et al., 2017).

En este experimento, se estudió la interacción física entre peroxisomas y mitocondrias en células crecidas en tres diferentes condiciones: medio SD, medio SD con NaCl (0,8M) y medio SGal, es decir, en condiciones de fermentación, estrés salino y respiración, respectivamente. Como se ha descrito anteriormente, en estas tres situaciones el número de peroxisomas es distinto, pero no se conoce si la interacción entre peroxisomas y mitocondrias también lo es, por lo que el objetivo de este experimento fue determinar si dicha interacción, en las tres condiciones establecidas, era distinta.

Para el estudio de la interacción entre peroxisomas y mitocondrias, se llevó a cabo un ensayo BiFC que se centró en una interacción ya descrita: Pex11-Mdm34, empleando las cepas BY4741 V_N PEX11-MDM34 V_C y BY4741 V_N PEX11-PEX11 V_C , proporcionadas por el Laboratorio de Uros Petrovic. En este ensayo se pudo identificar el grado de interacción entre Pex11 y Mdm34 mediante la visualización de puntos intracelulares fluorescentes por la reconstitución in vivo de la proteína Venus.

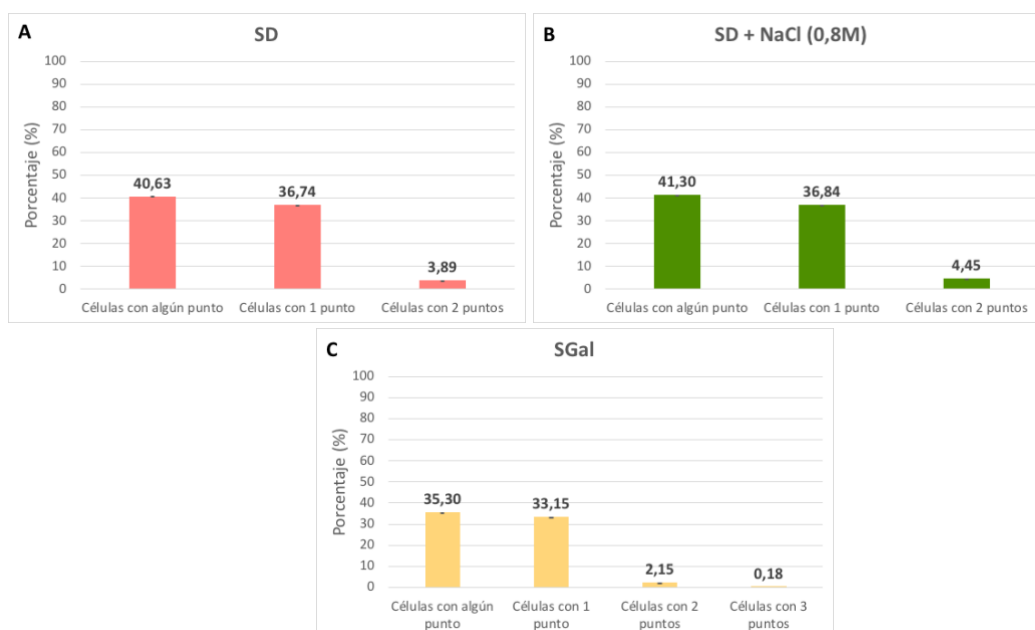


Figura 5. Porcentaje de células que presentan interacción entre Pex11 y Mdm34 según el ensayo BiFC. Las células fueron crecidas en medio SD (A), medio SD con NaCl (0,8M) (B) y medio SGal (C).

Resultados y discusión

Para la construcción de la Figura 5, se tomaron imágenes durante el ensayo BiFC y, a partir de ellas, se realizó un recuento del número de: células totales, células con algún punto, células con 1 punto, células con 2 puntos y células con 3 puntos, para así calcular los porcentajes que aparecen representados en la Figura 5.

Como se puede observar en la Figura 5A, en el caso de las células crecidas en medio SD, de un total de 411 células, en el 40'63% se observó interacción entre Pex11 y Mdm34, en el 36'74% solo se observaba un punto y en el 3'89% restante, dos. Por otra parte, tal y como se muestra en la Figura 5B, en el cultivo en medio SD con NaCl, de un total de 247 células, se observó interacción en el 41'3%, en el 36'84% un punto y dos puntos en el 4'45% restante. Por último, como recoge la Figura 5C, se pudo observar interacción en el 35'3% de las células crecidas en medio SGal de un total de 558 células, de las cuales un 33'15% presentaba un punto, un 2'15% dos puntos y un 0'18%, porcentaje correspondiente a una única célula, presentaba 3 puntos.

Estos resultados muestran que no existen apenas diferencias en la interacción entre Pex11 y Mdm34 en las tres condiciones ensayadas. Por un lado, los resultados obtenidos para las células crecidas en SD con NaCl son prácticamente iguales a los obtenidos para las células crecidas en SD. De la misma forma, tampoco se observan diferencias grandes entre los resultados obtenidos para las células crecidas en SGal y para las crecidas en SD y en SD con NaCl, pero sí se observa un descenso de los porcentajes en las células crecidas en SGal. Sin embargo, esto puede deberse a que en las células crecidas en medio SGal, los puntos correspondientes a la interacción entre Pex11 y Mdm34 eran menos intensos que los que aparecían en el resto de las condiciones, por lo que en muchos casos se confundían con el fondo y no se podían confirmar como positivos. Por esta razón, es posible que la cuantificación no fuera óptima, de forma que los porcentajes son inferiores a los reales.

Esto no permite concluir que las tres condiciones estudiadas no influyen en la interacción entre peroxisomas y mitocondrias, pues en este caso solo se analizó la interacción entre Pex11 y Mdm34, pero puede que la interacción se produzca a través de otras proteínas. Además, puede que la interacción aumente en otro momento diferente al analizado, ya que el ensayo se realizó 24 horas después de iniciar el cultivo, momento en el que es posible que ya se hubiera producido el aumento de la interacción entre peroxisomas y mitocondrias y también puede suceder que no se hubiera producido todavía. Sin embargo, sí se puede confirmar, de acuerdo con los resultados obtenidos en este ensayo BiFC, que la interacción entre Pex11 y Mdm34 no cambia cuando las células son cultivadas en medio SD, SD con NaCl (0,8M) y SGal, es decir, no cambia en condiciones de fermentación, estrés osmótico y respiración.

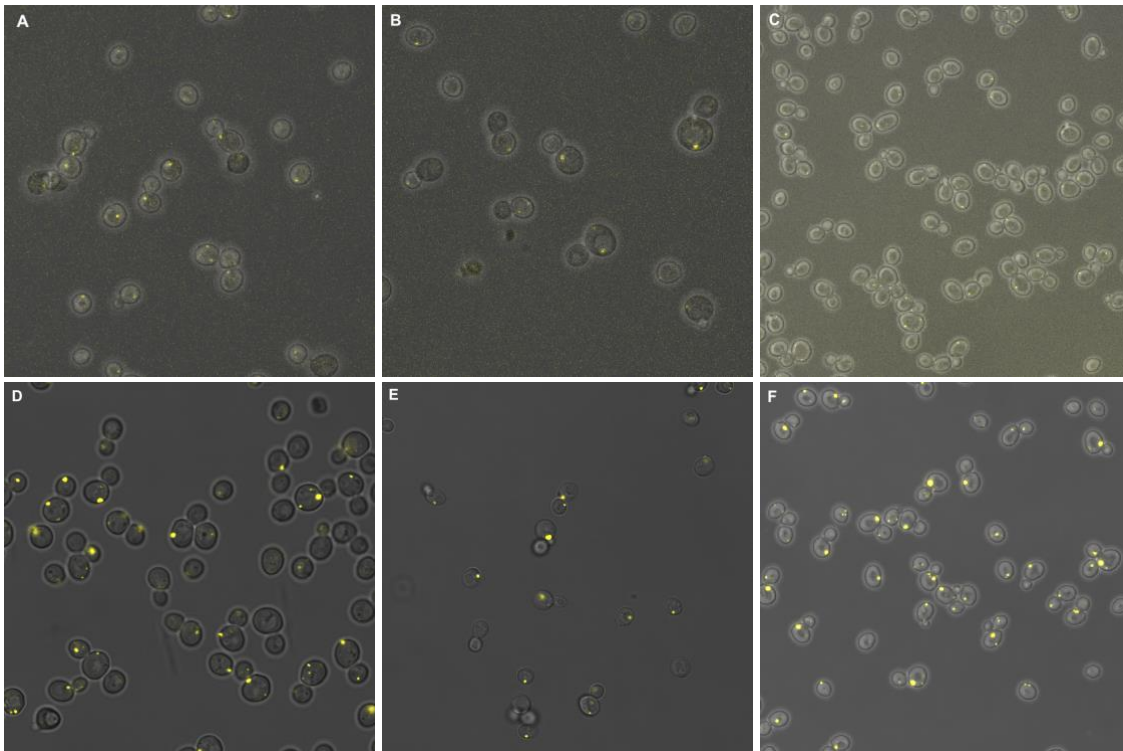


Figura 6. Imágenes representativas de las células utilizadas en el estudio BiFC para Pex11-Mdm34 y Pex11-Pex11. Estudio de la interacción Pex11-Mdm34 en células crecidas en medio SD (A), medio SD con NaCl (0,8M) (B) y medio SGal (C). Estudio de la interacción Pex11-Pex11, control positivo, en células crecidas en medio SD (D), medio SD con NaCl (0,8M) (E) y medio SGal (F).

Como se puede observar en la Figura 6, tras 24 horas desde el inicio del cultivo, que es el momento en el que se realizó el ensayo BiFC, las células presentaban un crecimiento inferior en medio SD con NaCl (Figura 6B), y en el caso de las crecidas en el medio SGal (Figura 6C), el crecimiento era superior. Además, también se observa diferencia en la intensidad de los puntos correspondientes a la interacción entre Pex11 y Mdm34, siendo menos intensos los que aparecen en la Figura 6C que los de la Figura 6A y 6B. Esto parece indicar que la interacción es más débil entre Pex11 y Mdm34 cuando las células crecen en medio SGal, al menos en el momento en el que se realizó el ensayo, a las 24 horas tras el inicio del cultivo.

También en la Figura 6, se pueden observar diferencias entre el control positivo de cada condición con el correspondiente ensayo, pues en los controles positivos aparecen puntos correspondientes a la interacción entre Pex11 y Pex11, por lo que son más abundantes e intensos.

4.3. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL ENVEJECIMIENTO CELULAR EN LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL AL ESTRÉS OXIDATIVO

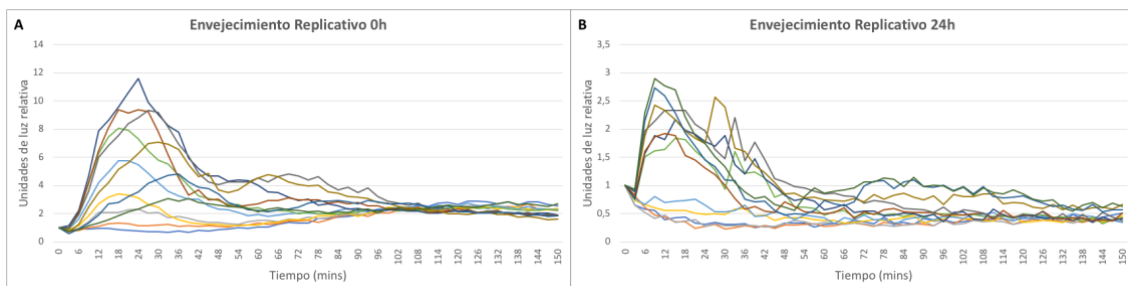
El envejecimiento es un proceso complejo cuyo estudio se ha basado en uno de los organismos modelo más simples: la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Principalmente se ha utilizado para el estudio de dos tipos de envejecimiento: el replicativo y el cronológico (Steinkraus et al., 2008). El envejecimiento replicativo describe el potencial de división de las células (Mortimer y Johnston, 1959), mientras que el envejecimiento cronológico hace referencia a la capacidad de las células en fase estacionaria de mantener la viabilidad en el tiempo (Longo et al., 1996).

El objetivo de este experimento fue analizar cómo influye el envejecimiento en la capacidad de activar la expresión génica en respuesta a estrés oxidativo por parte de las células de levadura, pues se ha podido observar en las células envejecidas la acumulación de daños oxidativos intracelulares y una menor capacidad de detoxificar ROS.

En este experimento, se empleó una cepa con el sistema característico del método MEP, la cepa UCC4925, en la que se consiguió una construcción integrativa del gen de la luciferasa de luciérnaga desestabilizada fusionado con *SOD2*, que es un promotor inducible por estrés, de forma que fue posible analizar los cambios en la expresión génica durante el envejecimiento a nivel cromosómico, in vivo y a tiempo real mediante ensayos de bioluminiscencia en los que las células fueron tratadas con H_2O_2 en un rango de concentraciones de 0 a 1,5mM.

La cepa UCC4925 se empleó para estudiar los cambios en la respuesta transcripcional de las células de levadura al estrés oxidativo a medida que experimentaban tanto el envejecimiento replicativo, conforme sufrían divisiones, como el envejecimiento cronológico, a medida que pasaba el tiempo y se agotaban los nutrientes disponibles en el medio. De esta forma, fue posible comparar la influencia de ambos envejecimientos en la respuesta transcripcional de las células al estrés oxidativo.

4.3.1. Envejecimiento replicativo en la cepa UCC4925



Resultados y discusión

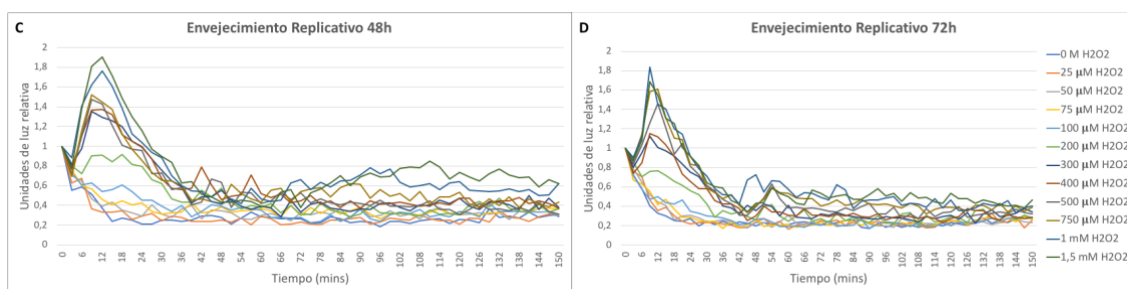


Figura 7. Caracterización de la dinámica transcripcional del gen reportero *SOD2* en respuesta a un baremo de concentraciones de H_2O_2 durante el envejecimiento replicativo de la cepa UCC4925. Curvas dosis-respuesta obtenidas al inducir el promotor *SOD2* con un baremo de concentraciones de H_2O_2 de 0 a 1,5mM en la cepa UCC4925 a las 0h (A), 24h (B), 48h (C) y 72h (D) durante 150 minutos.

Para la obtención de la Figura 7, a partir de los datos crudos obtenidos en cada uno de los ensayos de bioluminiscencia realizados durante el estudio del envejecimiento replicativo en la cepa UCC4925, se calculó el promedio de los valores de los duplicados, se dividió entre la OD_{600} del cultivo en el momento del ensayo, y los valores obtenidos se normalizaron respecto al tiempo 0. Por último, los valores resultantes se representaron frente al tiempo, frente a los minutos en los que se realizaron las medidas, obteniendo así la Figura 7.

Como se puede observar en la Figura 7, en las células de la cepa UCC4925 se produce una pérdida de sensibilidad. Como muestra la Figura 7A, a las 0h del inicio del cultivo, la respuesta máxima se registra ante concentraciones del estrés oxidativo, H_2O_2 , de $300\mu M$. Sin embargo, en la Figura 7B y 7C se puede ver cómo la respuesta máxima se produce frente a concentraciones de 1,5mM y en la Figura 7D de 1mM, es decir, a las 24, 48 y 72h la respuesta se produce a concentraciones mayores del estrés. Esto parece indicar que, a medida que las células envejecen, es decir, que sufren el envejecimiento replicativo como consecuencia de las sucesivas divisiones que experimentan, pierden la capacidad de responder frente al estrés oxidativo, pues necesitan una mayor dosis de H_2O_2 para reaccionar.

Por otra parte, se puede comprobar cómo la respuesta celular es más dinámica a las 0h del inicio del cultivo que a las 24, 48 y 72h, pues como se muestra en la Figura 7A, los niveles transcripcionales máximos aumentan de forma progresiva a medida que aumenta la concentración de H_2O_2 hasta alcanzar la respuesta máxima, y después decrecen también de forma progresiva. Por el contrario, en la Figura 7B, 7C y 7D, a una concentración de $300\mu M$ aproximadamente se alcanza la saturación y para concentraciones superiores no se observan cambios notables en los niveles de transcripción.

Otra característica fácilmente observable en la Figura 7 es la disminución de la emisión de luz con el transcurso de las horas. De nuevo, esto parece indicar que, a medida que las células envejecen con el paso de las horas, decrece la respuesta transcripcional de éstas al estrés a pesar de ser sometidas a las mismas condiciones y a iguales concentraciones del estrés oxidativo.

Resultados y discusión

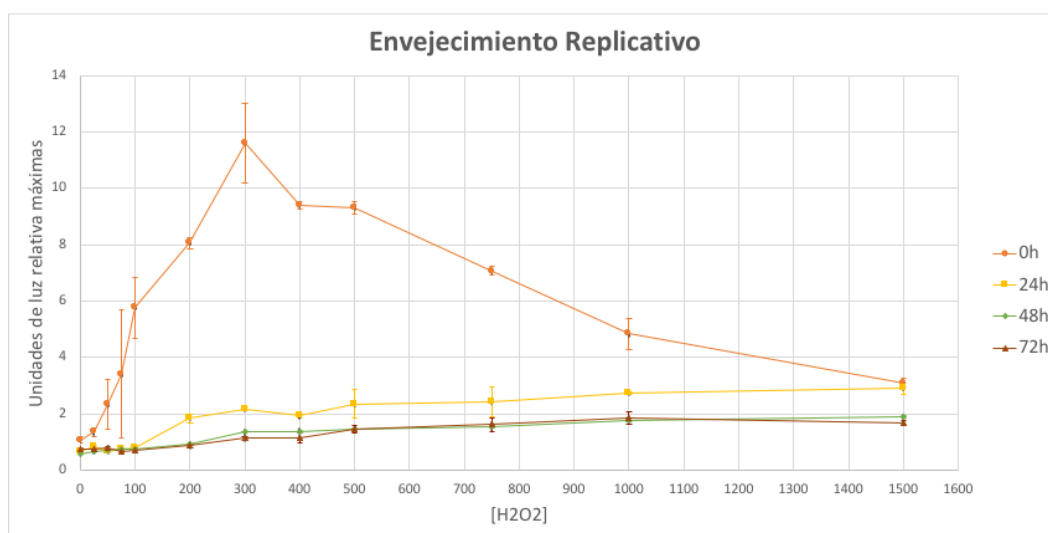


Figura 8. Actividad máxima de *SOD2* frente a concentración de H_2O_2 durante el envejecimiento replicativo de la cepa UCC4925. Representación de las unidades de luz relativa máximas frente a las doce concentraciones de H_2O_2 ensayadas a cuatro diferentes horas en la cepa UCC4925 con el gen reportero *SOD2* durante el envejecimiento replicativo.

En la Figura 8 se muestra, para los cuatro ensayos realizados, la actividad máxima del gen reportero *SOD2* en respuesta a las doce concentraciones de H_2O_2 ensayadas. Los valores de actividad máxima se obtuvieron a partir de los datos ya tratados para la obtención de la Figura 7, y se representaron frente a las doce concentraciones de H_2O_2 ensayadas.

En la Figura 8 se observa una respuesta transcripcional máxima de las células de la cepa UCC4925 frente al estrés oxidativo a las 0h, es decir, en el momento en el que se añade el estradiol al cultivo tras 24 horas de crecimiento. La posible razón que lo explica es el hecho de que las células son todavía jóvenes y capaces de reaccionar de forma normal al estrés. Sin embargo, tras el transcurso de únicamente 24h, al día siguiente, las células de la cepa estudiada experimentan una reducción de la respuesta máxima de hasta cuatro veces. Esto, como se ha comentado anteriormente, parece indicar que el envejecimiento replicativo que tiene lugar en las células con el paso de las horas influye en la capacidad de responder frente al estrés. En cuanto a la respuesta registrada a las 48 y a las 72h, también se detecta un cambio significativo, aunque no tan brusco, respecto a la que se produce a las 24h.

Además, se confirman en la Figura 8 las observaciones de la Figura 7, pues se vuelve a identificar la pérdida de sensibilidad: mientras que a las 0h se produce la respuesta máxima a una concentración de H_2O_2 de $300\mu M$, para el resto de los ensayos realizados la respuesta aumenta poco a poco hasta alcanzar su máximo a concentraciones máximas del estrés oxidativo.

Resultados y discusión

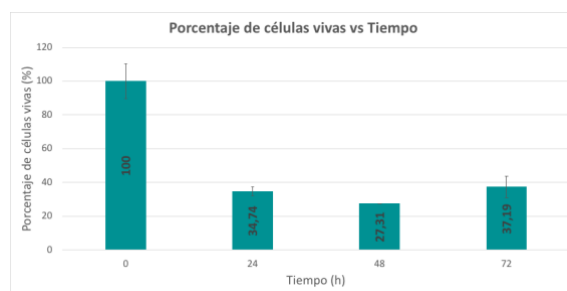


Figura 9. Porcentaje de células vivas durante el envejecimiento replicativo de la cepa UCC4925 con el gen reportero *SOD2*. Representación del porcentaje de células vivas frente al tiempo transcurrido desde el inicio del cultivo en horas.

La Figura 9 se obtuvo tras dividir el número de células vivas, obtenido tras calcular el promedio de las colonias contadas en una placa sembrada con una dilución 1:10.000 del cultivo y otra con una dilución 1:100.000, entre la OD_{600} , que muestra el número total de células en el cultivo. Esto se calculó para los cuatro ensayos realizados y se consideró que el valor obtenido en el primer ensayo se correspondía con un 100% de células vivas, y se calcularon el resto de los porcentajes.

Como se puede observar en la Figura 9, el número de células vivas sufre un descenso enorme desde las 0 hasta las 24h tras el inicio del cultivo, reduciéndose en más de un 65%. Esto parece explicar por qué la respuesta celular frente al estrés oxidativo experimenta también un cambio tan brusco entre estos dos tiempos, reduciéndose unas cuatro veces. Sin embargo, al igual que la respuesta no experimenta un cambio tan brusco entre las 24 y las 48 y las 72h, tampoco se observa una variación tan grande en el número de células vivas.

4.3.2. Envejecimiento cronológico en la cepa UCC4925

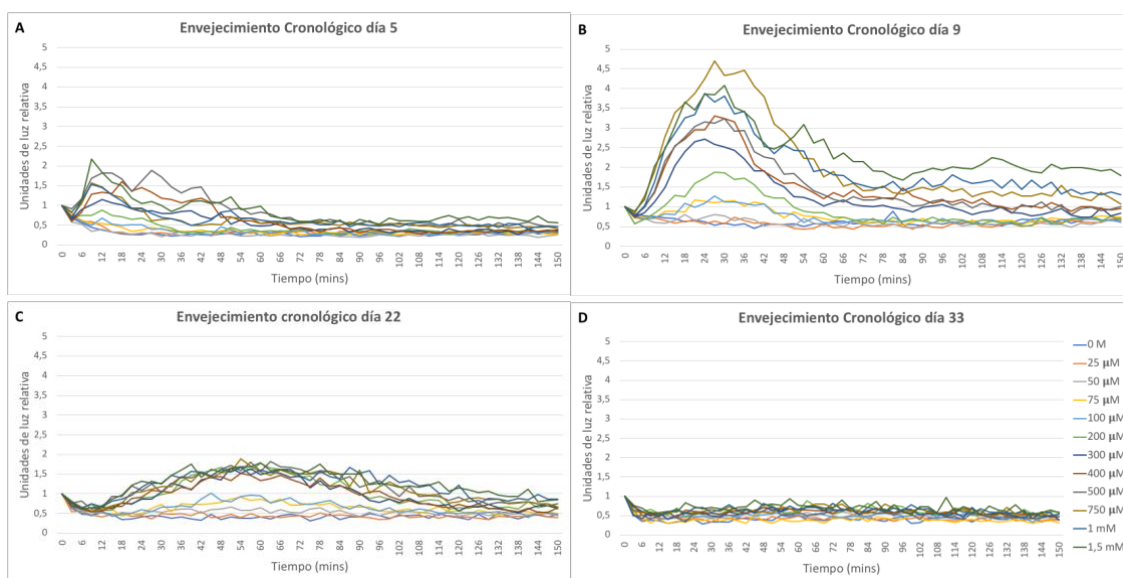


Figura 10. Caracterización de la dinámica transcripcional del gen reportero *SOD2* en respuesta a un baremo de concentraciones de H_2O_2 durante el envejecimiento cronológico de la cepa UCC4925. Curvas dosis-respuesta obtenidas al inducir el promotor *SOD2* con un baremo de concentraciones de H_2O_2 de 0 a 1,5mM en la cepa UCC4925 el día 5 (A), 9 (B), 22 (C) y 33 (D) durante 150 minutos.

Resultados y discusión

Para la obtención de la Figura 10, a partir de los datos crudos obtenidos en cuatro de los once ensayos de bioluminiscencia realizados durante el estudio del envejecimiento cronológico en la cepa UCC4925, se calculó el promedio de los valores de los duplicados, se dividió entre la OD_{600} del cultivo en el momento del ensayo, y los valores obtenidos se normalizaron respecto al tiempo 0. Por último, los valores resultantes se representaron frente al tiempo, frente a los minutos en los que se realizaron las medidas, obteniendo así la Figura 10.

En la Figura 10 aparecen representados los resultados obtenidos en los ensayos de bioluminiscencia realizados en el día 5, 9, 22 y 33 tras el inicio del cultivo, pues estos resultan suficientes para caracterizar la respuesta de la cepa UCC4925 al estrés oxidativo cuando experimenta el envejecimiento cronológico. Los resultados obtenidos en los once ensayos llevados a cabo están recogidos en el Anexo II.

Como se puede observar en la Figura 10, la respuesta transcripcional de las células de la cepa UCC4925 al estrés oxidativo en el día 5 es pequeña (Figura 10A), pero pasa a ser más del doble en el día 9 (Figura 10B) y disminuye hasta desaparecer en el día 33 (Figura 10D).

Un fenómeno fácilmente detectable en la Figura 10 es el retraso en la aparición de las curvas dosis-respuesta a medida que pasan los días. Esto significa que, conforme pasan los días y las células envejecen, éstas necesitan más tiempo para responder al estrés oxidativo. Además de ser tardía, con el paso del tiempo, la respuesta celular es menos intensa y, como se puede observar en la Figura 10C, se alarga en el tiempo. Una posible explicación es que la activación y desactivación de la maquinaria transcripcional resulta cada vez más complicada para las células como consecuencia del envejecimiento cronológico que experimentan con el paso de los días, por lo que se retrasa tanto el inicio de la transcripción como el final, lo cual se refleja en la emisión de luz.

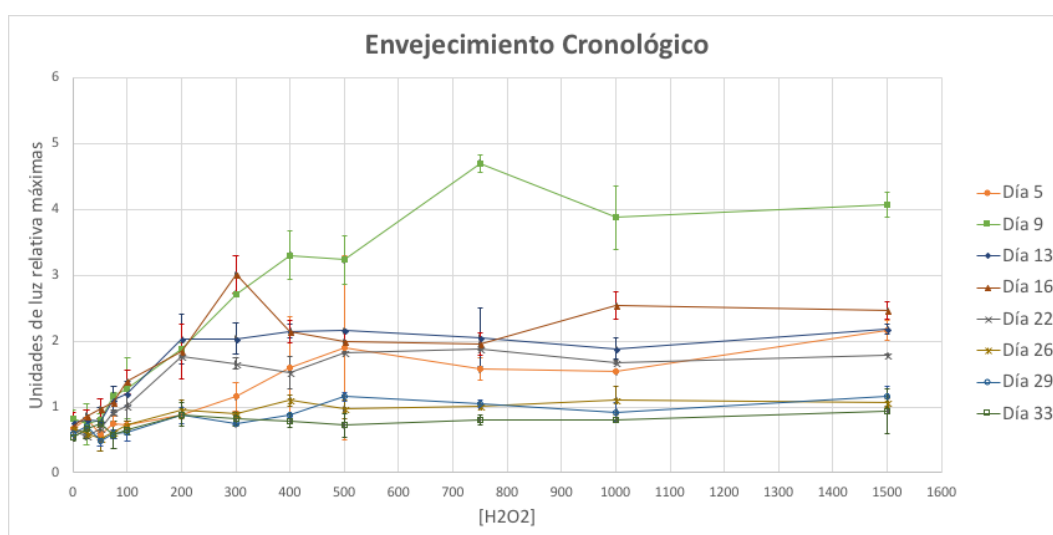


Figura 11. Actividad máxima de SOD2 frente a concentración de H_2O_2 durante el envejecimiento cronológico de la cepa UCC4925. Representación de las unidades de luz relativa máximas frente a las doce concentraciones de H_2O_2 ensayadas ocho diferentes días en la cepa UCC4925 con el gen reportero SOD2 durante el envejecimiento cronológico.

Resultados y discusión

En la Figura 11 se muestra, para ocho de los once ensayos realizados, la actividad máxima del gen reportero *SOD2* en respuesta a las doce concentraciones de H_2O_2 ensayadas. Los valores de actividad máxima se obtuvieron a partir de los datos ya tratados para la obtención de la Figura 10, y se representaron frente a las doce concentraciones de H_2O_2 ensayadas.

En la Figura 11 se representa la respuesta transcripcional máxima de las células de la cepa UCC4925 a las diferentes concentraciones de H_2O_2 en ocho de los ensayos realizados en el día 5, 9, 13, 16, 22, 26, 29 y 33. Los resultados obtenidos en los once ensayos llevados a cabo están recogidos en el Anexo III.

Como se puede observar en la Figura 11, la respuesta transcripcional máxima aumenta desde el día 5 hasta el 9, día en el que se registra la respuesta máxima y a partir del cual se detecta un descenso en dicha respuesta hasta el día 33, de manera que la respuesta en el día 26, 29 y 33 es casi nula.

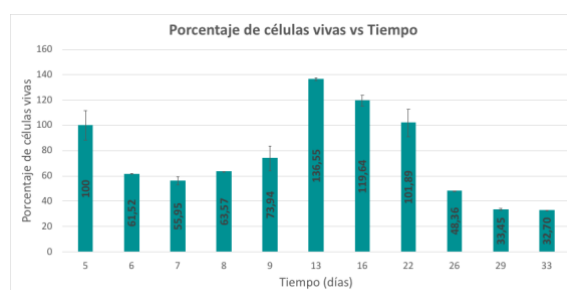


Figura 12. Porcentaje de células vivas durante el envejecimiento cronológico de la cepa UCC4925 con el gen reportero *SOD2*. Representación del porcentaje de células vivas frente al tiempo transcurrido desde el inicio del cultivo en días.

La Figura 12 se obtuvo tras dividir el número de células vivas, obtenido tras calcular el promedio de las colonias contadas en una placa sembrada con una dilución 1:10.000 del cultivo y otra con una dilución 1:100.000, entre la OD_{600} , que muestra el número de células total en el cultivo. Esto se calculó para los once ensayos realizados y se consideró que el valor obtenido en el primer ensayo se correspondía con un 100% de células vivas, y se calcularon el resto de los porcentajes.

La Figura 12 muestra el porcentaje de células viables en los once ensayos de bioluminiscencia llevados a cabo. En ella se puede observar cómo la tasa de células vivas disminuye del día 5 al día 9. Sin embargo, en el día 13, en el que se realiza el siguiente ensayo de bioluminiscencia, en lugar de seguir reduciéndose la tasa, ésta pasa a ser casi el doble que la del día 9. En los ensayos siguientes, tanto en el día 16 como en el día 22, se mantiene un número de células viables similar al del día 13, y, a partir del día 22, disminuye la tasa hasta el día 33.

Resultados y discusión

A partir de los datos recogidos en la Figura 12 se pueden obtener dos conclusiones. La primera es que el retraso en la respuesta transcripcional que se produce a partir del día 13, como se muestra en la Figura 10, no está relacionado con un descenso en el número de células. La segunda es que la disminución drástica de la respuesta máxima del día 9 al día 13 que se puede observar en la Figura 11 tampoco se debe a una disminución en la tasa de células viables. Es decir, tanto el retraso como la disminución de la respuesta transcripcional por parte de las células se produce a partir del día 13 tras el inicio del cultivo, y ese mismo día tiene lugar el aumento del número de células viables en el cultivo. Esto parece indicar que ambos cambios se producen sin que influya el número de células vivas presentes, pues probablemente dichos cambios se deben a que las células pierden la capacidad de responder de forma eficiente al estrés oxidativo, seguramente como consecuencia del envejecimiento cronológico experimentado. Sin embargo, en el día 26, 29 y 33 si que hay un descenso importante en el número de células vivas en el cultivo, por lo que la escasa respuesta transcripcional que las células presentan en dichos ensayos si puede deberse, al menos en parte, a la muerte celular.

4.3.3. Comparación del envejecimiento replicativo y el envejecimiento cronológico en la cepa UCC4925

Los resultados mostrados en los apartados 3.1. y 3.2., demuestran que la respuesta transcripcional de las células de la cepa UCC4925 frente al estrés oxidativo es diferente en función del envejecimiento inducido.

En primer lugar, se puede comprobar que la duración de la vida de las células es diferente para los dos tipos de envejecimiento. Por una parte, en el experimento del envejecimiento replicativo, a partir de las 72h, es decir, 3 días, en el cultivo ya no hay presencia de células vivas. Sin embargo, en el del envejecimiento cronológico, hay presencia de células vivas hasta el día 33, es decir, el envejecimiento cronológico permite que las células vivan hasta diez veces más.

Otra diferencia observable es el tipo de respuesta. En los ensayos realizados para el estudio del envejecimiento replicativo se puede ver cómo se produce la respuesta máxima en el momento en el que se inicia el cultivo, a las 0h, a bajas concentraciones de H₂O₂. Sin embargo, en los análisis del envejecimiento cronológico, dicha respuesta aumenta de forma progresiva hasta alcanzar el máximo a concentraciones elevadas del estrés oxidativo. En este caso, la respuesta máxima se produce en el día 9, cuando las células se encuentran en la fase estacionaria, que se alcanza de forma general alrededor del día 7 tras el inicio del cultivo. En la fase estacionaria ya se ha producido el cambio de fermentación a respiración debido al agotamiento de la glucosa del medio y se activan las vías de resistencia a estrés. Por esta razón, por el desarrollo de la resistencia al estrés oxidativo, las células que se encuentran en la fase estacionaria en el día 9, protagonizan la máxima respuesta a concentraciones elevadas del estrés oxidativo.

Resultados y discusión

Respecto al número de células viables en el cultivo, también se observan diferencias entre ambos tipos de envejecimiento. En el caso del envejecimiento replicativo, se observa una disminución inicial de las 0 a las 24h, una fase de meseta y de nuevo un descenso a partir de las 72h hasta no haber presencia de células vivas. Sin embargo, en el envejecimiento cronológico se observa una disminución inicial del día 5 al 6, una fase de meseta y un aumento radical entre el día 9 y el 13, que se mantiene hasta el día 22, cuando vuelve a producirse un descenso hasta que la tasa de células vivas es de 0 tras el día 33.

Sin embargo, aunque se identifican diferencias, en ambos tipos de envejecimiento se observa una pérdida de la capacidad de respuesta transcripcional al estrés oxidativo por parte de las células de la cepa UCC4925 a medida que envejecen.

5. Conclusiones

Conclusiones

Tras exponer y discutir los resultados obtenidos durante este proceso experimental, las conclusiones que se pueden extraer son las siguientes:

- Las mitocondrias juegan un papel fundamental en la respuesta transcripcional de *Saccharomyces cerevisiae* al estrés osmótico. Sin embargo, los peroxisomas, aún teniendo un papel en dicha respuesta, no resultan imprescindibles para el desarrollo de la misma.
- La interacción física entre peroxisomas y mitocondrias a través de Pex11 y Mdm34 no cambia al crecer las células en condiciones de fermentación, estrés osmótico y respiración.
- El envejecimiento, tanto replicativo como cronológico, en las células de levadura provoca una pérdida de la capacidad de respuesta transcripcional frente al estrés oxidativo.

6. Bibliografía

Bibliografía

- AGUILERA, J.; PRIETO, J.A. (2001). The *Saccharomyces cerevisiae* aldose reductase is implied in the metabolism of methylglyoxal in response to stress conditions. *Curr. Genet.*, 39(5-6): 273-283.
- ALBERTYN, J.; HOHMANN, S.; THEVELEIN, J.M.; PRIOR, B.A. (1994). GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol. Cell. Biol.*, 14(6): 4135-4144.
- ALEPUZ, P.M.; DE NADAL, E.; ZAPATER, M.; AMMERER, G.; POSAS, F. (2003). Osmostress-induced transcription by Hot1 depends on a Hog1-mediated recruitment of the RNA Pol II. *EMBO J.*, 22(10): 2433-2442.
- ANDERSON, R.M.; WEINDRUCH, R. (2012). The caloric restriction paradigm: Implications for healthy human aging. *American journal of human biology*, 24(2): 101-106.
- BISWAS, S.; CHIDA, A.S.; RAHMAN, I. (2006). Redox modifications of protein-thiols: emerging roles in cell signaling. *Biochem. Pharmacol.*, 71(5): 551-564.
- BLOMBERG, A.; ADLER, L. (1989). Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 171(2): 1087-1092.
- BONAWITZ, N.D.; CHATENAY-LAPOINTE, M.; PAN, Y.; SHADEL, G.S. (2007). Reduced TOR signaling extends chronological life span via increased respiration and upregulation of mitochondrial gene expression. *Cell metabolism*, 5(4): 265-277.
- BREWSTER, J.L.; DE VALOIR, T.; DWYER, N.D.; WINTER, E.; GUSTIN, M.C. (1993). An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science*, 259(5102): 1760-1763.
- BREWSTER, J.L.; GUSTIN, M.C. (2014). Hog 1: 20 years of discovery and impact. *Sci. Signal.*, 7(343): re7.
- CAPALDI, A.P.; KAPLAN, T.; LIU, Y.; HABIB, N.; REGEV, A.; FRIEDMAN, N.; O'SHEA, E. (2008). Structure and function of a transcriptional network activated by the MAPK Hog1. *Nat. Genet.*, 40(11): 1300-1306.
- CHEN, R.E.; THORNER, J. (2007). Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1773(8): 1311-1340.
- CHEN, Z.; GIBSON, T.B.; ROBINSON, F.; SILVESTRO, L.; PEARSON, G.; XU, B.; WRIGHT, A.; VANDERBILT, C.; COBB, M.H. (2001). MAP kinases. *Chem. Rev.*, 101(8): 2449-2476.
- CHENG, C.; FABRIZIO, P.; GE, H.; LONGO, V.D.; LI, L.M. (2007). Inference of transcription modification in long-live yeast strains from their expression profiles. *BMC Genomics*, 8(1): 219.
- CLOTET, J.; POSAS, F. (2007). Control of cell cycle in response to osmotic stress: lessons from yeast. *Methods Enzymol.*, 428: 63-76.
- CORMACK, B. (1998). Green fluorescent protein as a reporter of transcription and protein localization in fungi. *Curr. Opin. Microbiol.*, 1(4): 406-410.
- DE NADAL, E.; AMMERER, G.; POSAS, F. (2011). Controlling gene expression in response to stress. *Nat. Rev. Genet.*, 12(12): 833-845.

Bibliografía

- DE NADAL, E.; POSAS, F. (2015). Osmostress-induced gene expression— a model to understand how stress-activated protein kinases (SAPKs) regulate transcription. *FEBS J.*, 282(17): 3275-3285.
- DENG, L.; SUGIURA, R.; TAKEUCHI, M.; SUZUKI, M.; EBINA, H.; TAKAMI, T.; KOIKE, A.; IBA, S.; KUNO, T. (2006). Real-time monitoring of calcineurin activity in living cells: evidence for two distinct Ca²⁺-dependent pathways in fission yeast. *Mol. Biol. Cell*, 17(11): 4790-4800.
- DOLZ-EDO, L.; RIENZO, A.; POVEDA-HUERTES, D.; PASCUAL-AHUIR, A.; PROFT, M. (2013). Deciphering Dynamic Dose Responses of Natural Promoters and Single cis Elements upon Osmotic and Oxidative Stress in Yeast. *Molecular And Cellular Biology*, 33(11): 2228-2240.
- DUCH, A.; DE NADAL, E.; POSAS, F. (2013). Dealing with transcriptional outbursts during S phase to protect genomic integrity. *J. Mol. Biol.*, 425(23): 4745-4755.
- FABRIZIO, P.; LIOU, L.L.; MOY, V.N.; DIASPRO, A.; VALENTINE, J.S.; GRALLA, E.B.; LONGO, V.D. (2003). SOD2 functions downstream of Sch9 to extend longevity in yeast. *Genetics*, 163(1): 35-46.
- FABRIZIO, P.; LONGO, V.D. (2007). The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol. Biol.*, 371: 89-95.
- FABRIZIO, P.; PLETCHER, S.D.; MINOIS, N.; VAUPEL, J.W.; LONGO, V.D. (2004). Chronological aging-independent replicative life span regulation by Msn2/Msn4 and Sod2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, 557(1-3): 136-142.
- FABRIZIO, P.; POZZA, F.; PLETCHER, S.D.; GENDRON, C.M.; LONGO, V.D. (2001). Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science*, 292(5515): 288-290.
- FERRIGNO, P.; POSAS, F.; KOEPP, D.; SAITO, H.; SILVER, P.A. (1998). Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin β homologs NMD5 and XPO1. *EMBO J.*, 17(19): 5606-5614.
- FUSE, Y.; KOBAYASHI, M. (2017). Conservation of the Keap1-Nrf2 System: An Evolutionary Journey through Stressful Space and Time. *Molecules*, 22(3): 436.
- GE, H.; WEI, M.; FABRIZIO, P.; HU, J.; CHENG, C.; LONGO, V.D.; LI, L.M. (2010). Comparative analyses of time-course gene expression profiles of the long-lived sch9Delta mutant. *Nucleic Acids Res.*, 38(1): 143-158.
- GIETZ, R.D.; SCHIESTL, R.H.; WILLEMS, A.R.; WOODS, R.A. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, 11(4): 355-360.
- HAHN, S.; YOUNG, E.T. (2011). Transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: transcription factor regulation and function, mechanisms of initiation, and roles of activators and coactivators. *Genetics*, 189(3): 705-736.
- HALLIWELL, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.*, 141(2): 312-322.
- HARDING, H.P.; NOVOA, I.; ZHANG, Y.; ZENG, H.; WEK, R.; SCHAPIRA, M.; RON, D. (2000). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell*, 6(5): 1099-1108.

Bibliografía

- HARSHMAN, K.D.; MOYE-ROWLEY, W.S.; PARKER, C.S. (1988). Transcriptional activation by the SV40 AP-1 recognition element in yeast is mediated by a factor similar to AP-1 that is distinct from GCN4. *Cell*, 53(2): 321-330.
- HOHMANN, S. (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66(2): 300-372.
- HOHMANN, S. (2015). An integrated view on a eukaryotic osmoregulation system. *Curr. Genet.*, 61(3): 373-382.
- HOHMANN, S.; KRANTZ, M.; NORDLANDER, B. (2007). Yeast osmoregulation. *Methods Enzymol.*, 428: 29-45.
- ISOYAMA, T.; MURAYAMA, A.; NOMOTO, A.; KUGE, S. (2001). Nuclear import of yeast AP-1-like transcription factor Yap1p is mediated by transport receptor Pse1p and this import step is not affected by oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, 276(24): 21863-21869.
- KAEBERLEIN, M.; MCVEY, M.; GUARENTE, L. (1999). The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes & development*, 13(19): 2570-2580.
- KAEBERLEIN, M.; POWERS, R.W. 3RD; STEFFEN, K.K.; WESTMAN, E.A.; HU, D.; DANG, N.; KERR, E.O.; KIRKLAND, K.T.; FIELDS, S.; KENNEDY, B.K. (2005). Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science*, 310(5751): 1193-1196.
- KATEWA, S.D.; KAPAHI, P. (2010). Dietary restriction and aging, 2009. *Aging Cell*, 9(2): 105-112.
- KODAMA, Y.; HU, C.D. (2012). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): A 5-year update and future perspectives. *Biotechniques*, 53(5): 285-298.
- KRUEGEL, U.; ROBISON, B.; DANGE, T.; KAHLERT, G.; DELANEY, J.R.; KOTIREDDY, S.; TSUCHIYA, M.; TSUCHIYAMA, S.; MURAKAMI, C.J.; SCHLEIT, J.; SUTPHIN, G.; CARR, D.; TAR, K.; DITTMAR, G.; KAEBERLEIN, M.; KENNEDY, B.K.; SCHMIDT, M. (2011). Elevated Proteasome Capacity Extends Replicative Lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS genetics*, 7(9): e1002253.
- KUGE, S.; JONES, N.; NOMOTO, A. (1997). Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *EMBO J.*, 16(7): 1710-1720.
- LEE, J.; GODON, C.; LAGNIEL, G.; SPECTOR, D.; GARIN, J.; LABARRE, J.; TOLEDANO, M.D. (1999). Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J. Biol. Chem.*, 274(23): 16040-16046.
- LINDSTROM, D.L.; GOTTSCHLING, D.E. (2009). The Mother Enrichment Program: A Genetic System for Facile Replicative Life Span Analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 183(2): 413-422.
- LONGO, V.D. (1997). The Pro-senescence Role of Ras2 in the Chronological Life Span of Yeast. Los Angeles: University of California Los Angeles, p. 112-153.
- LONGO, V.D.; GRALLA, E.B.; VALENTINE, J.S. (1996). Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. *J. Biol. Chem.*, 271(21): 12275-12280.

Bibliografía

- LONGO, V.D.; LIOU, L.L.; VALENTINE, J.S.; GRALLA, E.B. (1999). Mitochondrial superoxide decreases yeast survival in stationary phase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 365(1): 131-142.
- LONGO, V.D.; SHADEL, G.S.; KAEBERLEIN, M.; KENNEDY, B. (2012). Replicative and Chronological Aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Metabolism*, 16(1): 18-31.
- MAEDA, T.; TAKEKAWA, M.; SAITO, H. (1995). Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science*, 269(5223): 554-558.
- MAEDA, T.; WURGLER-MURPHY, S.M.; SAITO, H. (1994). A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature*, 369(6477): 242-245.
- MAETA, K.; IZAWA, S.; INOUE, Y. (2005). Methylglyoxal, a metabolite derived from glycolysis, functions as a signal initiator of the high osmolarity glycerol-mitogen-activated protein kinase cascade and calcineurin/Crz1-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 280(1): 253-260.
- MANZANARES-ESTREDA, S.; ESPI-BARDISA, J.; ALARCON, B.; PASCUAL-AHUIR, A.; PROFT, M. (2017). Multilayered control of peroxisomal activity upon salt stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.*, 104(5): 851-868.
- MARCHESINI, S.; POIRIER, Y. (2003). Futile Cycling of Intermediates of Fatty Acid Biosynthesis toward Peroxisomal β -Oxidation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal Of Biological Chemistry*, 278(35): 32596-32601.
- MARTINEZ-MONTANES, F.; PASCUAL-AHUIR, A.; PROFT, M. (2010). Toward a genomic view of the gene expression program regulated by osmostress in yeast. *OMICS*, 14(6): 619-627.
- MARTINEZ-PASTOR, M.T.; MARCHLER, G.; SCHULLER, C.; MARCHLER-BAUER, A.; RUIS, H.; ESTRUCH, F. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress-response element. *EMBO J.*, 15(9): 2227-2235.
- MATEUS, C.; AVERY, S.V. (2000). Destabilized green fluorescent protein for monitoring dynamic changes in yeast gene expression with flow cytometry. *Yeast*, 16(14): 1313-1323.
- MATTIAZZI UŠAJ, M.; BRLOŽNIK, M.; KAFERLE, P.; ŽITNIK, M.; WOLINSKI, H.; LEITNER, F.; KOHLWEIN, S.D.; ZUPAN, B.; PETROVIC, U. (2015). Genome-Wide Localization Study of Yeast Pex11 Identifies Peroxisome–Mitochondria Interactions through the ERMES Complex. *Journal Of Molecular Biology*, 427(11): 2072-2087.
- MILLER, C.; SCHWALB, B.; MAIER, K.; SCHULZ, D.; DÜMCKE, S.; ZACHER, B.; MAYER, A.; SYDOW, J.; MARCINOWSKI, L.; DÖLKEN, L.; MARTIN, D.E.; TRESCH, A.; CRAMER, P. (2011). Dynamic transcriptome analysis measures rates of mRNA synthesis and decay in yeast. *Mol. Syst. Biol.*, 7(1): 458.
- MIRAGLIA, L.; KING, F.; DAMOISEAUX, R. (2011). Seeing the light: luminescent reporter gene assays. *Comb. Chem. High Throughput Screen*, 14(8): 648-657.
- MOLIN, C.; JAUHAINEN, A.; WARRINGER, J.; NERMAN, O.; SUNNERHAGEN, P. (2009). mRNA stability changes precede changes in steady-state mRNA amounts during hyperosmotic stress. *RNA*, 15(4): 600-614.

Bibliografía

- MORANO, K.A.; GRANT, C.M.; MOYE-ROWLEY, W.S. (2011). The Response to Heat Shock and Oxidative Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190(4): 1157-1195.
- MORTIMER, R.K.; JOHNSTON, J.R. (1959). Life span of individual yeast cells. *Nature*, 183(4677): 1751-1752.
- MURPHY, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.*, 417(1): 1-13.
- O'ROURKE, S.M.; HERSKOWITZ, I. (2004). Unique and redundant roles for HOG MAPK pathway components as revealed by whole-genome expression analysis. *Mol. Biol. Cell*, 15(2): 532-542.
- PASCUAL-AHUIR, A.; MANZANARES-ESTREDEZ, S.; TIMÓN-GÓMEZ, A.; PROFT, M. (2017). Ask yeast how to burn your fats: lessons learned from the metabolic adaptation to salt stress. *Current Genetics*, 64(1): 63-69.
- PASCUAL-AHUIR, A.; STRUHL, K.; PROFT, M. (2006). Genome-wide location analysis of the stress-activated MAP kinase Hog1 in yeast. *Methods*, 40(3): 272-278.
- PASTOR, M.M.; PROFT, M.; PASCUAL-AHUIR, A. (2009). Mitochondrial function is an inducible determinant of osmotic stress adaptation in yeast. *J. Biol. Chem.*, 284(44): 30307-30317.
- PAVITT, G.D.; RAMAIAH, K.V.; KIMBALL, S.R.; HINNEBUSCH, A.G. (1998). eIF2 independently binds two distinct eIF2B subcomplexes that catalyze and regulate guanine-nucleotide exchange. *Genes Dev.*, 12(4): 514-526.
- PEDRUZZI, I.; DUBOULOZ, F.; CAMERONI, E.; WANKE, V.; ROOSEN, J.; WINDERICKX, J.; DE VIRGILIO, C. (2003). TOR and PKA signaling pathways converge on the protein kinase Rim15 to control entry into G0. *Mol. Cell.*, 12(6): 1607-1613.
- PEREIRA, C.; SILVA, R.D.; SARAIVA, L.; JOHANSSON, B.; SOUSA, M.J.; CORTE-REAL, M. (2008). Mitochondria-dependent apoptosis in yeast. *Biochim. Biophys. Acta*, 1783(7): 1286-1302.
- PERRONE, G.G.; TAN, S.X.; DAWES, I.W. (2008). Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1783(1): 1354-1368.
- POKHOLOK, D.K.; ZEITLINGER, J.; HANNETT, N.M.; REYNOLDS, D.B.; YOUNG, R.A. (2006). Activated signal transduction kinases frequently occupy target genes. *Science*, 313(5786): 533-536.
- POSAS, F.; CHAMBERS, J.R.; HEYMAN, J.A.; HOEFFLER, J.P.; DE NADAL, E.; ARIÑO, J. (2000). The transcriptional response of yeast to saline stress. *J. Biol. Chem.*, 275(23): 17249-17255.
- POSAS, F.; SAITO, H. (1997). Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: Scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science*, 276(5319): 1702-1705.
- PREISS, T.; BARON-BENHAMOU, J.; ANSORGE, W.; HENTZE, M.W. (2003). Homodirectional changes in transcriptome composition and mRNA translation induced by rapamycin and heat shock. *Nat. Struct. Biol.*, 10(12): 1039-1047.
- PROFT, M.; MAS, G.; DE NADAL, E.; VENDRELL, A.; NORIEGA, N.; STRUHL, K.; POSAS, F. (2006). The stress-activated Hog1 kinase is a selective transcriptional elongation factor for genes responding to osmotic stress. *Mol. Cell*, 23(2): 241-250.

Bibliografía

- PROFT, M.; STRUHL, K. (2004). MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction. *Cell*, 118(3): 351-361.
- RALSER, M.; HEEREN, G.; BREITENBACH, M.; LEHRACH, H.; KROBITSCH, S. (2006). Triose phosphate isomerase deficiency is caused by altered dimerization—not catalytic inactivity—of the mutant enzymes. *PLoS ONE*, 1(1): e30.
- RALSER, M.; WALMELINK, M.M.; KOWALD, A.; GERISCH, B.; HEEREN, G.; STRUYS, E.A.; KLIPP, E.; JAKOBS, C.; BREITENBACH, M.; LEHRACH, H.; KROBITSCH, S. (2007). Dynamic re-routing of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress. *J. Biol.*, 6(4): 10.
- REISER, V.; RUIS, H.; AMMERER, G. (1999). Kinase activity-dependent nuclear export opposes stress-induced nuclear accumulation and retention of Hog1 mitogen-activated protein kinase in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*, 10(4): 1147-1161.
- REP, M.; KRANTZ, M.; THEVELEIN, J.M.; HOHMANN, S. (2000). The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock: Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J. Biol. Chem.*, 275(12): 8290-8300.
- REP, M.; PROFT, M.; REMIZE, F.; TAMAS, M.; SERRANO, R.; THEVELEIN, J.M.; HOHMANN, S. (2001). The *Saccharomyces cerevisiae* Sko1p transcription factor mediates HOG pathway-dependent osmotic regulation of a set of genes encoding enzymes implicated in protection from oxidative damage. *Mol. Microbiol.*, 40(5): 1067-1083.
- RIENZO, A.; PASCUAL-AHUIR, A.; PROFT, M. (2012). The use of a real-time luciferase assay to quantify gene expression dynamics in the living yeast cell. *Yeast*, 29(6): 219-231.
- ROBERTSON, J.B.; JOHNSON, C.H. (2011). Luminescence as a continuous real-time reporter of promoter activity in yeast undergoing respiratory oscillations or cell division rhythms. *Methods Mol. Biol.*, 734: 63-79.
- ROBERTSON, J.B.; STOWERS, C.C.; BOCZKO, E.; JOHNSON, C.H. (2008). Real-time luminescence monitoring of cell-cycle and respiratory oscillations in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105(46): 17988-17993.
- ROMERO-SANTACREU, L.; MORENO, J.; PÉREZ-ORTÍN, J.E.; ALEPUZ, P. (2009). Specific and global regulation of mRNA stability during osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*, 15(6): 1110-1120.
- ROY, A.; HASHMI, S.; LI, Z.; DEMENT, A.D.; CHO, K.H.; KIM, J.H. (2016). The glucose metabolite methylglyoxal inhibits expression of the glucose transporter genes by inactivating the cell surface glucose sensors Rgt2 and Snf3 in yeast. *Mol. Biol. Cell*, 27(5): 862-871.
- SAITO, H.; POSAS, F. (2012). Response to Hyperosmotic Stress. *Genetics*, 192(2): 289-318.
- SAIZ, S. (2014). Desarrollo y aplicación de un sistema integrativo de luciferasa para la cuantificación de la expresión génica in vivo. Trabajo Fin de Grado en Biotecnología. Universitat Politècnica de València.
- SHACKELFORD, R.E.; KAUFMANN, W.K.; PAULES, R.S. (2000). Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic. Biol. Med.*, 28(9): 1387-1404.

Bibliografía

- SHENTON, D.; SMIRNOVA, J.B.; SELLEY, J.N.; CARROLL, K.; HUBBARD, S.J.; PAVITT, G.D.; ASHE, M.P.; GRANT, C.M. (2006). Global translational responses to oxidative stress impact upon multiple levels of protein synthesis. *J. Biol. Chem.*, 281(39): 29011-29021.
- SIBIRNY, A.A. (2016). Yeast peroxisomes: structure, functions and biotechnological opportunities. *FEMS Yeast Research*, 16(4): fow038.
- SMIRNOVA, J.B.; SELLEY, J.N.; SANCHEZ-CABO, F.; CARROLL, K.; EDDY, A.A.; MCCARTHY, J.E.; HUBBARD, S.J.; PAVITT, G.D.; GRANT, C.M.; ASHE, M.P. (2005). Global Gene Expression Profiling Reveals Widespread yet Distinctive Translational Responses to Different Eukaryotic Translation Initiation Factor 2B-Targeting Stress Pathways. *Mol. Cell. Biol.*, 25(21): 9340-9349.
- STEINKRAUS, K.A.; KAEBERLEIN, M.; KENNEDY, B.K. (2008). Replicative Aging in Yeast: The Means to the End. *Annual Review Of Cell And Developmental Biology*, 24(1): 29-54.
- THERMOFISHER SCIENTIFIC. Visto el 18 de Junio de 2018. <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/luciferase-reporters.html>
- THORNE, N.; INGLESE, J.; AULD, D. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. *Chemistry & Biology*, 17(6): 646-657.
- TU, B.P.; WEISSMAN, J.S. (2004). Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J. Cell Biol.*, 164(3): 341-346.
- UNIVERSITY OF LJUBLJANA. Ljubljana, Slovenia. Visto el 20 de Mayo de 2018. http://ibk.mf.uni-lj.si/groups/plemenitaslab/AP_lab/L1-research-AP.html
- WEI, C.J.; TANNER, R.D.; MALANEY, G.W. (1982). Effect of sodium chloride on bakers' yeast growing in gelatin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43(4): 757-763.
- WEI, M.; FABRIZIO, P.; HU, J.; GE, H.; CHENG, C.; LI, L.; LONGO, V.D. (2008). Life span extension by calorie restriction depends on Rim15 and transcription factors downstream of Ras/PKA, Tor, and Sch9. *PLoS Genet.*, 4(1): e13.
- WERNER-WASHBURNE, M.; BRAUN, E.L.; CRAWFORD, M.E.; PECK, V.M. (1996). Stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.*, 19(6): 1159-1166.
- WESTFALL, P.J.; PATTERSON, J.C.; CHEN, R.E.; THORNER, J. (2008). Stress resistance and signal fidelity independent of nuclear MAPK function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105(34): 12212-12217.
- YAAKOV, G.; DUCH, A.; GARCÍA-RUBIO, M.; CLOTET, J.; JIMENEZ, J.; AGUILERA, A.; POSAS, F. (2009). The stress-activated protein kinase Hog1 mediates S phase delay in response to osmostress. *Mol. Biol. Cell*, 20(15): 3572-3582.
- YOSEF, N.; REGEV, A. (2011). Impulse control: temporal dynamics in gene transcription. *Cell*, 144(6): 886-896.
- YOSHIDA, A.; WEI, D.; NOMURA, W.; IZAWA, S.; INOUE, Y. (2012). Reduction of glucose uptake through inhibition of hexose transporters and enhancement of their endocytosis by methylglyoxal in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 287(1): 701-711.

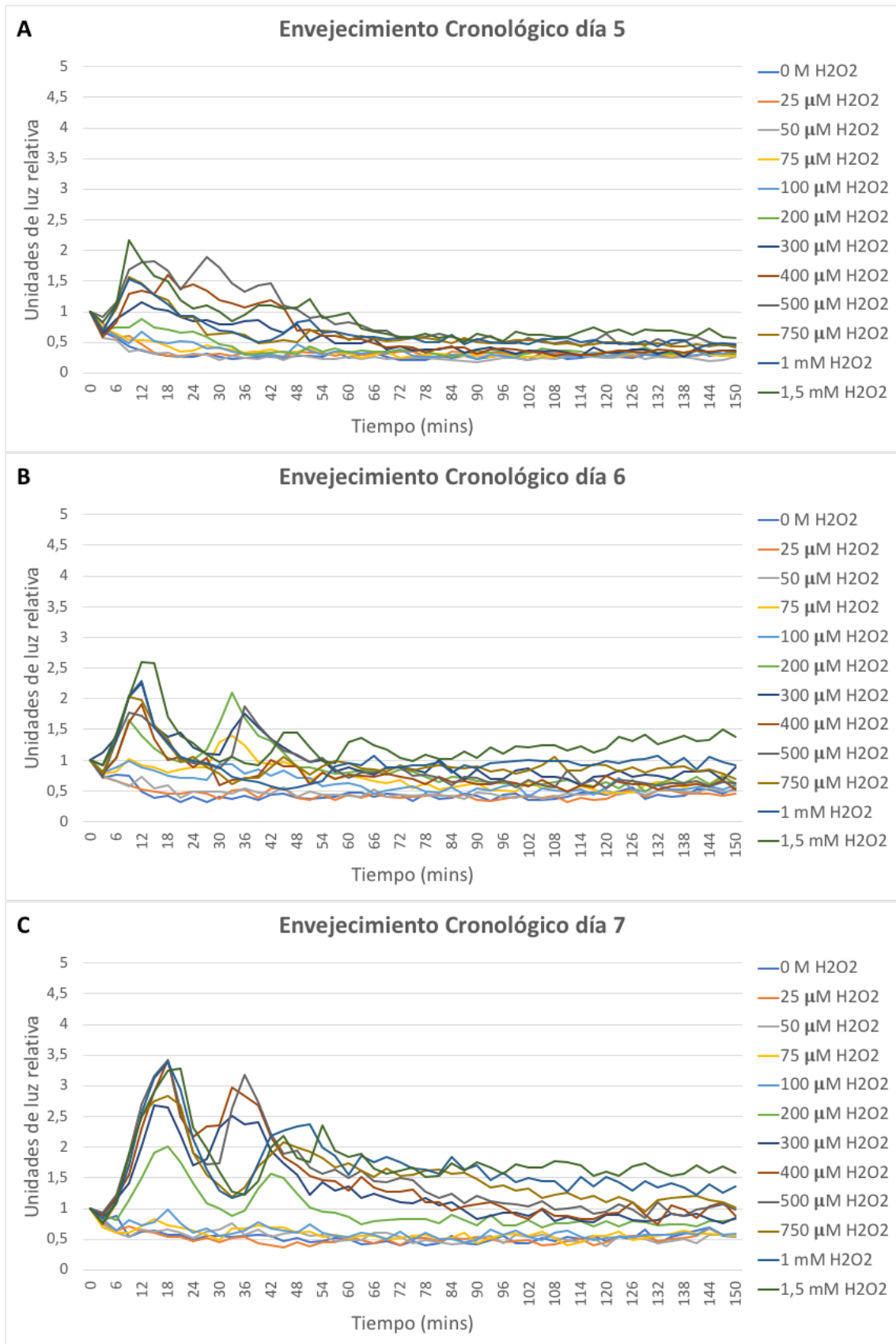
7. Anexos

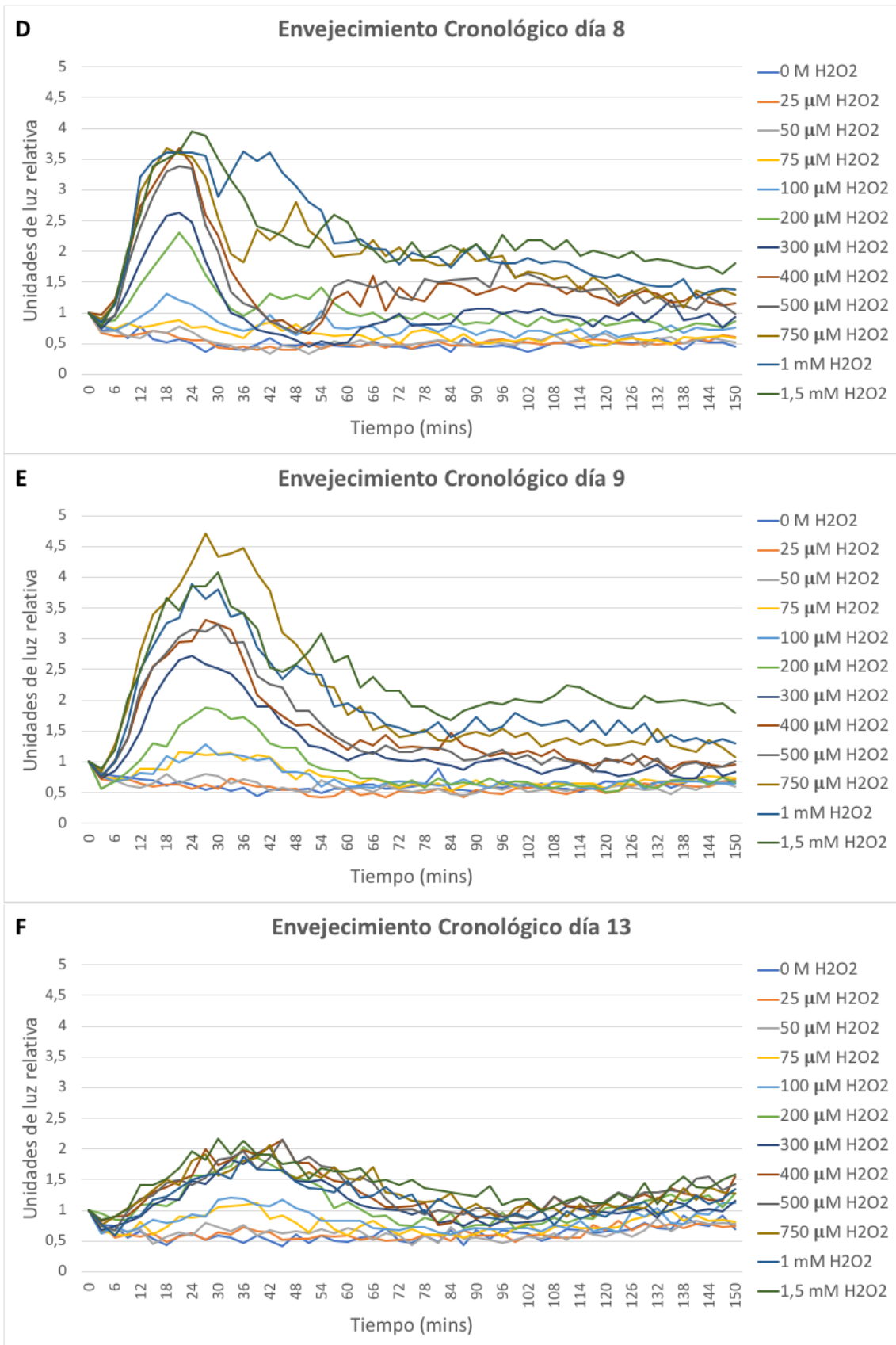
ANEXO I

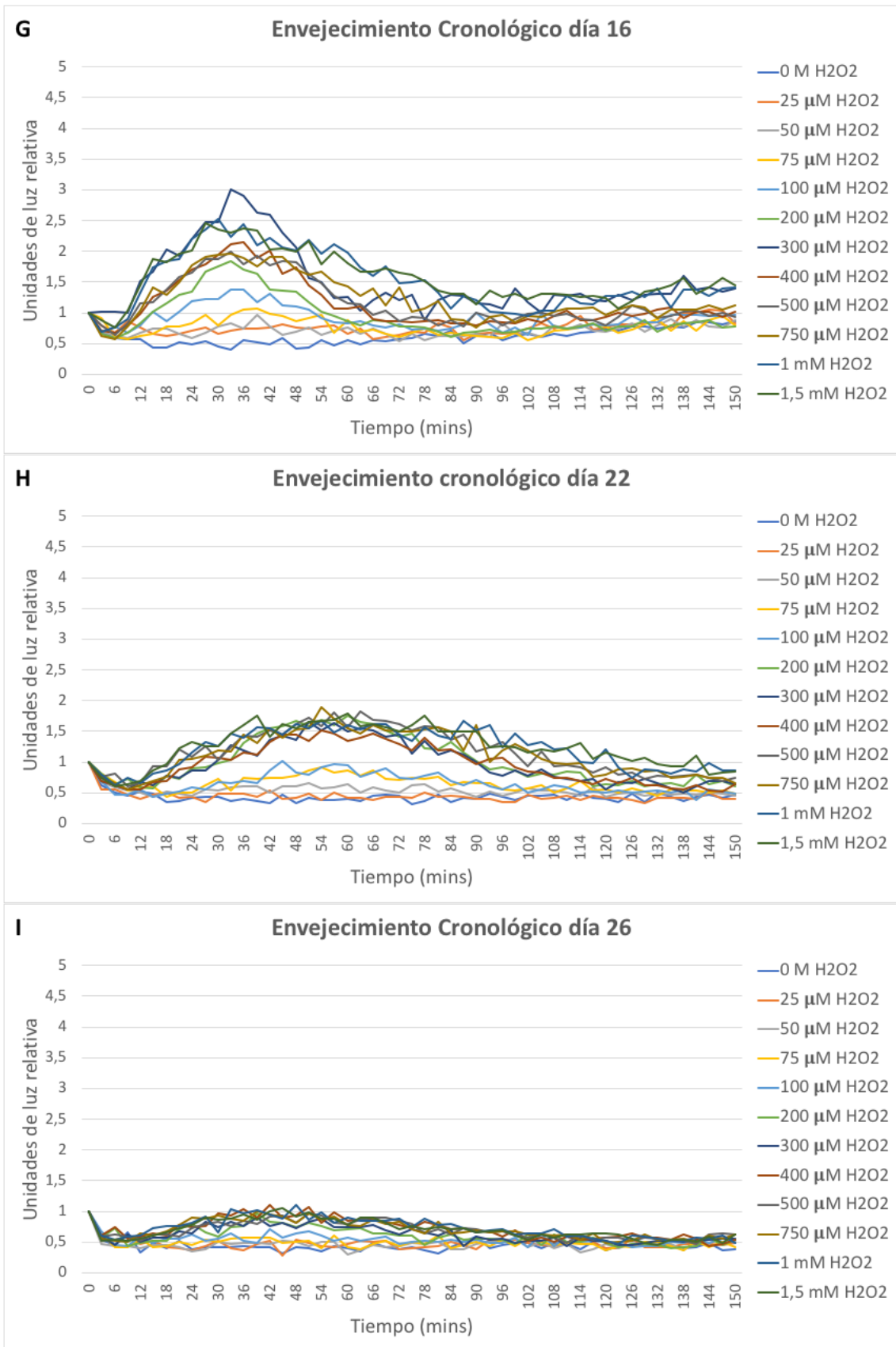
Tabla 1. Cebadores empleados y sus secuencias.

Cebador	Secuencia
SOD2-luc-fw	5' TTCTCTGTCTCATGCCAATAAGATCAATCAGCTCAGCTTCACAACCATGGCCGA TGCTAAGAAC 3'
SOD2-luc-rev	5' TTATGGAGATATAATTACGAATAATTATGAATAAATAGTGCTGCCGCATAGGCCA CTAGTGGATCTG 3'
SOD2-Chk-luc	5' CGCGACCTTAAACCTGGACC 3'
LucSeqRev	5' GGTGATGTCCACCTCAATG 3'

ANEXO II







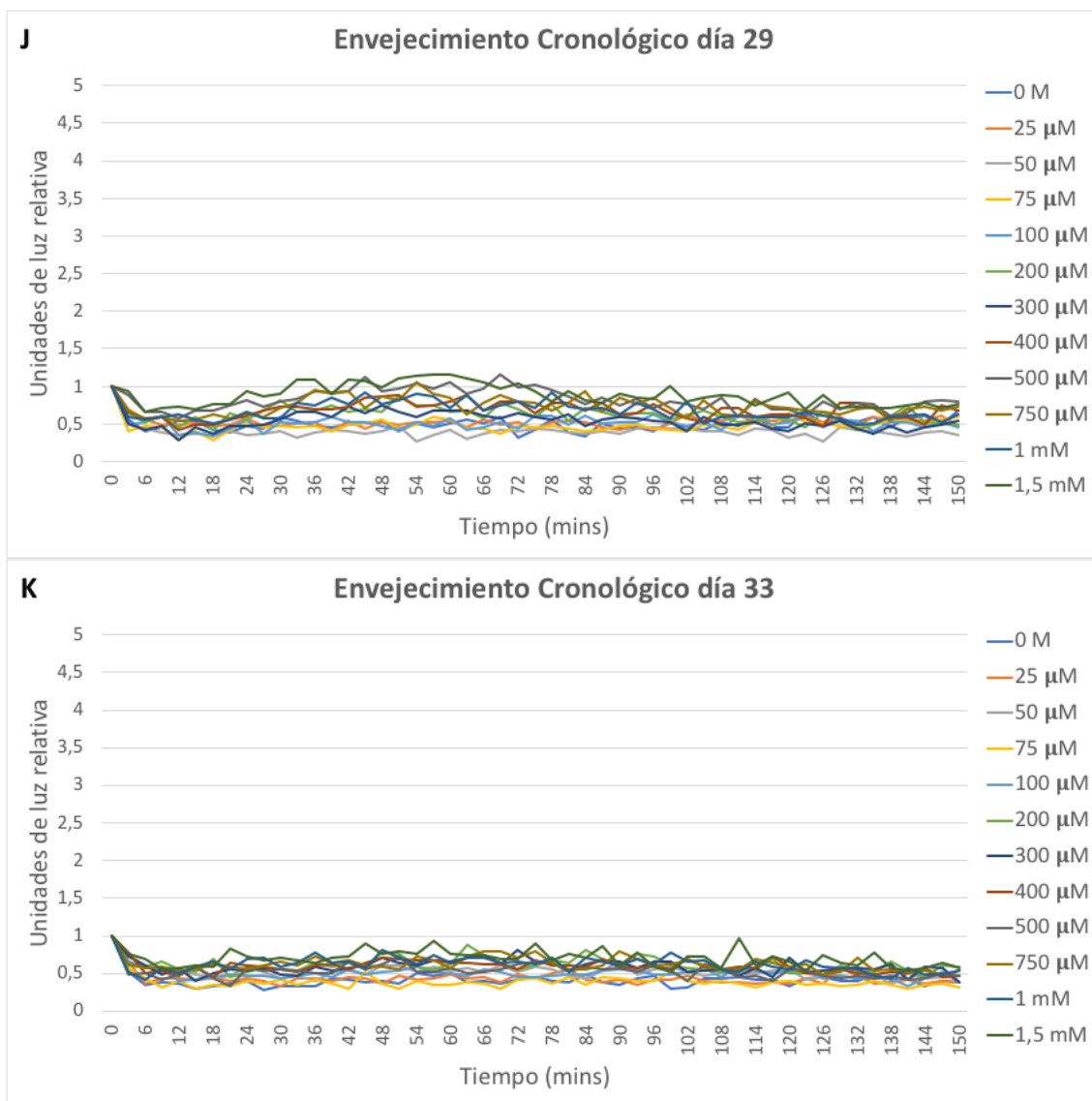


Figura 1. Caracterización de la dinámica transcripcional del gen reportero *SOD2* en respuesta a un baremo de concentraciones de H_2O_2 durante el envejecimiento cronológico de la cepa UCC4925. Curvas dosis-respuesta obtenidas al inducir el promotor *SOD2* con un baremo de concentraciones de H_2O_2 de 0 a 1,5mM en la cepa UCC4925 el día 5 (A), 6 (B), 7 (C), 8 (D), 9 (E), 13 (F), 16 (G), 22 (H), 26 (I), 29 (J) y 33 (K) durante 150 minutos.

ANEXO III

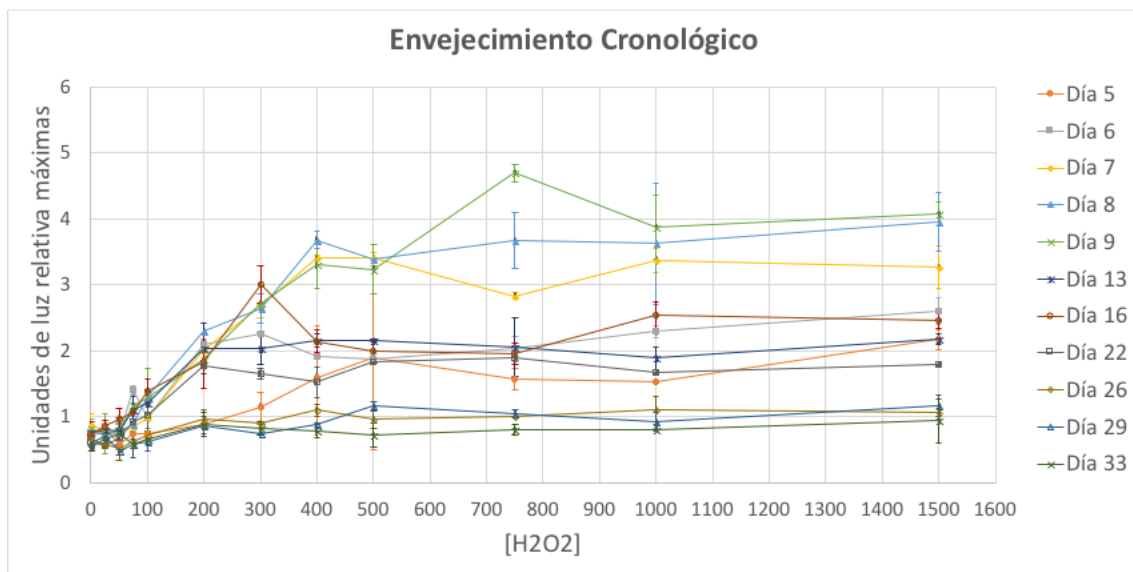


Figura 2. Actividad máxima de *SOD2* frente a concentración de H₂O₂ durante el envejecimiento cronológico de la cepa UCC4925. Representación de las unidades de luz relativa máximas frente a las doce concentraciones de H₂O₂ ensayadas once diferentes días en la cepa UCC4925 con el gen reportero *SOD2* durante el envejecimiento cronológico.