

Trabajo Final de Grado en Biotecnología

Identificación y caracterización de reguladores del control de calidad mitocondrial en *Saccharomyces cerevisiae*



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

Autora: Irene Muñoz Blat
Tutora: Dra. Amparo Pascual-Ahuir.
Tutor Externo: Dr. Markus Proft

Curso 2017-2018

Valencia, julio de 2018



Datos del TFG:

Autora:	Irene Muñoz Blat
Tutora de la UPV:	Dra. Amparo Pascual-Ahuir
Tutor Externo:	Dr. Markus Proft
Titulación:	Grado en Biotecnología
Título del Trabajo:	“Identificación y caracterización de reguladores del control de calidad mitocondrial en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ”
Lugar de Realización:	Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) e Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV)
Localidad y fecha:	Valencia, julio de 2018

Palabras clave:

Cadena de transporte de electrones, mitocondria, mitofagia, levadura

Resumen:

La mitofagia es un tipo específico de autofagia que tiene un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial. Es además un proceso que asegura el mantenimiento de la calidad mitocondrial en situaciones de estrés, de hecho, un mal funcionamiento de los mecanismos moleculares implicados en la mitofagia está relacionado con distintas enfermedades en humanos. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un sistema modelo muy valorado en la biología molecular de procesos básicos, y una excelente herramienta para el estudio de los procesos mitofágicos. Recientemente se ha encontrado que la adaptación al estrés requiere una activación mitocondrial selectiva, por ejemplo, en el caso del transportador de piruvato Mpc se basa en la regulación coordinada de subunidades específicas del complejo. Además, se ha demostrado que la actividad respiratoria alta y/o la pérdida del potencial de membrana mitocondrial por el tratamiento con valinomicina, aumenta la tasa de degradación de complejos específicos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Nuestros resultados previos muestran que existen mecanismos de mitofagia selectiva en estas condiciones, y nuestra investigación actual se centra en descifrar los mecanismos moleculares de este proceso. Hasta ahora el estudio de la mitofagia en levaduras se ha centrado casi exclusivamente en la mitofagia inducida por ayuno de nutrientes, mientras que en las células de mamíferos está bien establecido que la mitofagia contrarresta el daño causado por la despolarización de las mitocondrias, y su defecto se asocia a la enfermedad de Parkinson. En este contexto se pretende identificar reguladores del control de calidad mitocondrial. Por un lado, se buscará los reguladores transcripcionales que estén implicados en la reposición de componentes mitocondriales, y además intentaremos identificar aquellas proteínas que participen de forma activa en la mitofagia selectiva.

Keywords

Electronic Transport Chain, mitochondria, mitophagy, yeast

Abstract

Mitophagy is a specific type of autophagy that has an essential role in the maintenance of mitochondrial homeostasis. It is also a process that ensures the maintenance of mitochondrial quality in situations of stress. In fact, a malfunction of the molecular mechanisms involved in mitophagy is related to different diseases in humans. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is a model highly valued in the molecular biology, and an excellent tool for the study of mitophagic processes. Recently it has been found that stress adaptation requires a selective mitochondrial activation, which in the case of the pyruvate transporter Mpc is based on the coordinated regulation of specific subunits of the complex. High respiratory activity and/or loss of mitochondrial membrane potential by valinomycin treatment, also increases the rate of degradation of specific sub-complexes of the mitochondrial electron transport chain. Our results show that there are mechanisms of selective mitophagy under these conditions, and our current research focuses on deciphering the molecular mechanisms of this process. Before our findings the study of mitophagy in yeast has been almost exclusively focused at starvation induced mitophagy, whereas in mammalian cells it has been well established that mitophagy counteracts the damage caused by the depolarization of mitochondria, and its failure is associated with Parkinson's disease. In this context, we intend to identify regulators of mitochondrial quality control we will look for transcriptional regulators that are involved in the renewal of mitochondrial components, moreover we will also try to identify those proteins that participate actively in selective mitophagy.

AGRADECIMIENTOS

Tras 4 años de carrera, esta etapa llega a su fin y este trabajo es el encargado de poner el broche final.

A lo largo de este tiempo se me ha brindado la oportunidad de adquirir conocimientos de la mano de grandes profesores que se han preocupado de darnos una formación adecuada para nuestra salida al mundo laboral. Por ello, en primer lugar, me gustaría agradecer a esos docentes que han sido capaces de motivarnos para lograr nuestros objetivos. En concreto a Payo, mi tutora, gracias por darme la oportunidad de aprender a desenvolverme en un laboratorio y mostrarme que en la ciencia pocas cosas son previsibles. Tampoco puedo olvidarme de Markus, gracias por ayudarme a desarrollar una parte importante de este trabajo y por preocuparte de que todo saliese lo mejor posible.

También me gustaría hacer una mención especial a mi familia, en concreto a mis padres por ayudarme cuando lo necesitaba, gracias a vosotros he logrado llegar hasta aquí, sois un pilar fundamental en mi vida, os quiero mucho. Tampoco puedo olvidar a mi hermano, que gracias a sus habilidades como editor fotográfico ha podido ayudarme con algunas de las imágenes de este trabajo.

Por supuesto, gracias a todos los amigos que me llevo, que sé que son los mejores. Me quedo con los momentos de risas, tampoco me olvido del estrés de los exámenes o los días interminables de clases por la mañana y prácticas por las tardes, porque sé que sin ellos nada hubiese sido igual.

Es ahora cuando las palabras de “disfruta de la etapa universitaria, que pasa volando” cobran sentido, me cuesta creer que ya hayan pasado 4 años desde que pisé por primera vez las aulas de la ETSIAMN y la verdad que no cambiaría nada.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico
ADNc: ADN complementario
ADNmt: ADN mitocondrial
AIM/LIR Motivo de interacción con la proteína Atg8
AMPK: Quinasa heterotrimérica
APS Persulfato amónico
ARN: Ácido ribonucleico
ARNm: ARN mensajero
ATG: Autofagia
ATP: Adenosin trifosfato
ATP5: Subunidad 5 de la F1F0 de ATP sintasa,
BNIP3: Miembro de la familia de proteínas apoptóticas Bcl-2
CAT: Catalasa
CoA: Coenzima A
COX6: Subunidad VI de citocromo -C oxidasa
CSK2: Quinasa caseína 2
DMSO: Dimetilsulfóxido
DsRed: Proteína roja fluorescente de
DTT: Ditiotritol
ECT: Cadena de transporte de electrones
EDTA Ácido etilendiaminetetracético
ELA: Esclerosis lateral amiotrófica
FUNDC1: Receptor mitocondrial de mitofagia
GABA: Ácido γ -aminobutírico
GFP: Proteína verde fluorescente
GPx Glutatión peroxidasa
GSK-3 β : Glucógeno sintasa quinasa 3
HEPES: ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazinaetanosulfónico
K-Ras: Interruptor de señalización celular
KDa: Kilodalton
LC3: Cadena ligera 3
LiTE: Acetato de Litio en 1x de tampón TE
LRR2: Leucine-rich repeat protein 2
m/v: masa/volumen
Mfn1: Mitofusina 1
Mfn2: Mitofusina 2
mL: mililitro
mM: milimolar
NAD: Nicotamida Adenina Dinucleótido
ND11: NADH deshidrogenasa
NET: Trampas extracelulares de neutrófilos
NF-kB: Factor nuclear kB
OD: Densidad óptica
Opa1: Proteína de tipo Dinamina

OXPHOS: Fosforilación oxidativa
p53: proteína supresora de tumores
PAGE Electroforesis en gel de poli(acrilamida)
PAS: Estructura preautofagósoma
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PDH: Piruvato deshidrogenasa
PEG Polietilenglicol
PINK1 Quinasa PTEN-inducida putativa 1
PMSF: Fluoruro de fenilmetanosulfonilo poli(acrilamida)
PVDF: Polivinilideno de difluorido
QCR2: Subunidad 2 del citocromo-C
RE: Retículo endoplasmático
ROS: Especies reactivas de oxígeno
Rpm: Revoluciones por minuto
RTPCR: PCR a tiempo Real
SC: Supercomplejos
SD: Medio sintético con glucosa
SDH2: Subunidad hierro-azufre de succinato deshidrogenasa
SDS: Dodecil sulfato sódico
SGal: Medio sintético con galactosa
SOD: Superóxido dismutasa
TAE: Tris-Acetato-EDTA
TAP: Proteína activadora de células T
TBS: Tampón salino de Tris
TCA: Ácido tricloroacético
TE: Tris-EDTA
TEMED: Tetrametiletilenodiamida
TIM: Translocasa mitocondrial interna
TOM: Translocasa mitocondrial externa
Tris: (Hidroximetil) Aminometano
Val: Valinomicina
VDAC: Canal de aniones dependiente de voltaje
WT: Cepa silvestre
YNB: Base nitrogenada de levadura
YPD: Medio rico: extracto de levadura Peptona-Dextrosa
YPGal: Medio rico: extracto de levadura Peptona-Galactosa
 μ L: microlitro
 μ M: micromolar
 μ g: microgramo

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. La mitocondria.....	1
1.1.1. Estructura.....	1
1.1.2. Funciones.....	2
1.1.3. Cadena Respiratoria mitocondrial.....	3
1.1.4. La mitocondria y el daño oxidativo.....	5
1.2. La mitofagia.....	5
1.2.1. Descripción del proceso de autofagia y sus tipos.....	5
1.2.2. La mitofagia en levaduras.....	6
1.2.3. La mitofagia en células de mamífero.....	8
1.3. La levadura como modelo de estudio de mitofagia.....	9
2. OBJETIVOS.....	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
3.1. Material biológico y medios de cultivo.....	12
3.2. Ensayos de sensibilidad.....	12
3.2.1. Crecimiento en medio líquido.....	12
3.2.2. Ensayos de crecimiento en medio sólido (Droptest).....	12
3.3. RTPCR.....	13
3.3.1. Preparación de las muestras.....	13
3.3.2. Purificación del ARN por el método del ácido fenólico.....	13
3.3.3. Limpieza del ARN con RNeasy MiniKit de QUIAGEN.....	13
3.3.4. Síntesis de cDNA (Superscript II; Invitrogen Cat. No 18080-051).....	14
3.3.5. Reacción de RTPCR.....	14
3.4. Microscopía de fluorescencia.....	14
3.5. Extracción de material genético.....	15
3.6. Transformación de levadura.....	15
3.7. Manipulación y análisis de proteína.....	16
3.7.1. Obtención de los extractos proteicos. Purificación del mitofagosoma.....	16
3.7.2. Preparación del gradiente continuo de sacarosa.....	17
3.7.3. Precipitación de proteínas con TCA.....	17
3.7.4. Electroforesis de proteínas.....	17
3.7.5. Transferencia de proteínas a membranas PVDF.....	18

3.7.6. Detección inmunológica de proteínas (Western Blot).....	18
3.8. Análisis Estadístico.....	19
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
4.1. Estudio de genes implicados en mitofagia por ausencia de nutrientes en condiciones de inducción del reciclaje selectivo.....	20
4.2. Estudio de la regulación transcripcional de los componentes de la cadena de transporte electrónico mediante el método de RTPCR (Real Time PCR).....	25
4.3. Microscopía de fluorescencia para el estudio de la mitofagia en diferentes cepas con la construcción Rosella.....	27
4.4. Estudio del papel de las proteasas mitocondriales en el reciclaje de la cadena de transporte de electrones mediante fraccionamiento en gradiente de sacarosa.....	31
5. CONCLUSIONES.....	34
6. BIBLIOGRAFÍA.....	35
7. ANEXOS.....	39
7.1. ANEXO 1, Tabla 1. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> empleadas	39
7.2. ANEXO 2, Tabla 2. Descripción de la función de los genes mutados empleados en los diferentes experimentos	40

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Representación de la cadena de transporte de electrones de la membrana mitocondrial interna.....	4
Figura 2. Esquema de la mitofagia en Levadura.....	7
Figura 3. Representación esquemática de los modelos de mitofagia de mamífero y levadura....	9

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 4. Esquema de la construcción Rosella para la detección de la mitofagia empleando microscopio de fluorescencia.....	15
Figura 5. Esquema del montaje de la transferencia proteica.....	18

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 6. Ensayo de crecimiento en medio sólido YPD (DropTest) de las cepas BY4741, Δ HOG1, Δ SCH9 y Δ YME1.....	21
Figura 7. Ensayo de crecimiento en medio sólido de la cepa BY4741 y los mutantes Δ YME1, Δ HOG1, Δ SCH9, Δ UTH, Δ AIM25, Δ PTC6.....	22
Figura 8. Ensayo de crecimiento en medio sólido de la cepa BY4741 y los mutantes Δ YIL165C, Δ APN2, Δ MDM10, Δ CYT2, Δ AIM25, Δ ACF2 y Δ PIK1.....	23
Figura 9. Ensayo de crecimiento en medio sólido de la cepa BY4741 y los mutantes de factores de transcripción Δ YAP1, Δ STB5, Δ RTG1, Δ RTG3, Δ MSN2, Δ MSN4, Δ MOT3 Y Δ HAP2.....	24
Figura 10. Gráficas de ARNm relativo de proteínas de complejos mitocondriales frente al tiempo de incubación con Valinomicina en medio YPGal.....	26
Figura 11. Gráficas de ARNm relativo de proteínas de complejos mitocondriales frente al tiempo de incubación con Valinomicina en medio YPD.....	27
Figura 12. Detección de mitofagia en células de levadura mediante el sistema Rosella empleando un microscopio de fluorescencia.....	28
Figura 13. Detección de mitofagia en células de levadura mediante el sistema Rosella empleando un microscopio de fluorescencia.....	29
Figura 14. Detección de mitofagia en células de levadura mediante el sistema Rosella empleando un microscopio de fluorescencia.....	30
Figura 15. Western Blot que muestra el perfil de fragmentación mediante gradiente de sacarosa de la proteína ATG8-TAP.....	32
Figura 16. Western Blot que muestra el perfil de fragmentación mediante gradiente de sacarosa de la proteína NDI1-TAP.....	32
Figura 17. Western Blot que muestra el perfil de fragmentación mediante gradiente de sacarosa de la proteína QCR2-TAP.....	33

ANEXOS

ANEXO 1. Tabla 1. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> empleadas.....	39
ANEXO 2. Tabla 2. Descripción de la función de los genes mutados empleados en los diferentes experimentos.....	40

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La mitocondria

Las mitocondrias son simbioses bacterianas antiguas con sus propios sistemas de síntesis de proteínas y ADN mitocondrial (ADNmt). Cada célula humana contiene cientos de mitocondrias y miles de moléculas de ADNmt. La forma de herencia del ADNmt es materna. Existe cierta variación en algunas regiones del ADN mitocondrial que fue aprovechada por el hombre para adaptarse en los diferentes entornos. Las mitocondrias se encargan de quemar las calorías ingeridas en la dieta con el oxígeno para aportar la energía necesaria al organismo en forma de moléculas de ATP. En estas reacciones se genera un subproducto tóxico para las células (si se acumula en grandes cantidades) que son las especies reactivas de oxígeno (ROS) que dañan a las mitocondrias y en consecuencia a la célula en general. (Wallace, D. C., 2005)

Se sabe que aparecieron por primera vez hace 2 billones de años cuando se produjo la endosimbiosis por parte del precursor de las eucariotas modernas y las α -proteobacterium, el proceso logró abastecer las necesidades energéticas de las nuevas células. (Lane & Martin, 2010).

Como ya se ha comentado antes, las mitocondrias tienen su propio material genético, el mtDNA es una molécula de DNA de doble cadena con 16569 pb e información de 37 genes. El genoma mitocondrial codifica 22 RARNs de transferencia y 2 ARNs ribosómicos. Si bien, la mayor parte de las proteínas mitocondriales están codificadas en el núcleo celular y se traducen en los ribosomas citosólicos y son activamente importadas y clasificadas en los compartimentos mitocondriales por maquinaria de translocación externa e interna dependiente del potencial electroquímico. (Friedman & Nunnari, 2014). Las proteínas encargadas del transporte de estas proteínas son las traslocasas especializadas, de la membrana externa (TOM) y de la membrana interna (TIM). (Sokol *et al.*, 2014). Por otra parte, los 13 genes restantes de los 37 mencionados codifican las subunidades peptídicas de los diferentes complejos de la cadena de transporte de electrones, del sistema de fosforilación oxidativa, las subunidades de los complejos I, II y IV. (Holt & Reyes, 2012) (Friedman & Nunnari, 2014).

1.1.1 Estructura

Las mitocondrias son estructuras membranosas debido al proceso de endosimbiosis que sufrieron en su formación. Están compuestas por una doble membrana que delimita dos espacios: un espacio intermembrana entre las 2 capas y una matriz mitocondrial.

- Membrana externa: La principal proteína de la que se compone es la porina (VDAC), una proteína formadora de canales. A través de estos canales pueden atravesar la membrana moléculas con tamaños inferiores a 5 KDa. Además, hay otras proteínas que realizan funciones distintas, como las que transforman sustancias lipídicas que serán metabolizadas en la matriz, algunas implicadas en la síntesis de lípidos, receptores de importación mitocondrial y enzimas implicados en la división y fusión.
- Espacio intermembrana: Está compuesto por enzimas que fosforilan nucleótidos con el ATP procedente de la matriz.
- Membrana interna: Está formada por numerosas crestas o pliegues que aumentan la superficie total de la membrana. En esta membrana se localizan las proteínas que

forman la cadena de transporte de electrones, cuyas funciones son realización de reacciones de oxidación de la cadena de transporte de electrones, producción de ATP en la matriz gracias al gradiente de protones generado que impulsa la ATP sintasa y proteínas transportadoras que permiten el paso de metabolitos hacia la matriz, por ello esta membrana ha de ser impermeable a iones y pequeñas moléculas cargadas.

- Matriz: Se encuentran diferentes tipos de enzimas entre los cuales están los presentes en la oxidación del piruvato, el ciclo del ácido cítrico y la oxidación de los ácidos grasos además es donde se encuentran algunas copias del genoma mitocondrial, ribosomas mitocondriales y enzimas para la expresión de genes mitocondriales. (Alberts *et al.*, 2008).

1.1.2 Funciones

La principal función y la más conocida de las mitocondrias es la obtención de energía para la supervivencia celular, generando el ATP necesario. Este proceso es conocido como fosforilación oxidativa (OXPHOS). Para ello, la mitocondria, realiza la oxidación del piruvato proveniente de los azúcares y de los ácidos grasos (mediante la β -oxidación). Estas moléculas son degradadas por los enzimas de la matriz mitocondrial hasta la obtención de acetil-CoA que entra en el ciclo del ácido cítrico generando diferentes intermediarios. Como producto de desecho se genera CO_2 , además se van generando también electrones de alta energía que son transportados por las moléculas de NADH y FADH_2 hasta la membrana interna mitocondrial donde se encuentran los complejos de la cadena de transporte electrónico. La energía transportada de estos electrones es aprovechada para generar el ATP. (Alberts *et al.*, 2008).

Pero, además de este papel de suministro de energía se ha demostrado que las mitocondrias desempeñan otras funciones celulares. Tienen un papel muy importante en la regulación del metabolismo celular, dado que se ha observado que diferentes cambios dinámicos en la morfología coinciden con una serie de eventos fisiológicos como las transiciones entre los diferentes estados respiratorios y la remodelación de las crestas mitocondriales durante la apoptosis. Las aberraciones en la morfología de las crestas dan como resultado alteraciones del metabolismo célula, así como la maquinaria de fusión y fisión mitocondrial (Manella *et al.*, 1994) Para dar una explicación a la forma en la afectan estas transiciones morfológicas en un rendimiento metabólico alterado, se propone que la maquinaria que regula la morfología mitocondrial se integre en las vías que regulan las modificaciones postraduccionales. Experimentos publicados hace 40 años, demuestran que la fosforilación del complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) inhibe la conversión del piruvato a Acetil-CoA. (Linn *et al.*, 1969) Actualmente, se sabe que la expresión de las quinasa PDH esta controlada a nivel trascricional (Holness & Sugden, 2003). Cuando los niveles de sustrato son bajos estas quinasa fosforilan PDH para inhibir su actividad. Se ha descubierto que la insulina puede activar una quinasa Akt que se encuentra en la matriz mitocondrial además de en el citosol (Cross *et al.*, 1995). Cuando esta quinasa Akt fosforila GSK-3 β (en su forma no fosforilada es una quinasa que fosforila la PDH inhibiendo su actividad) inhibe su actividad quinasa, permitiendo que la PDH se desfosfore y aumente el metabolismo (Hoshi *et al.*, 1996). Recientemente se han identificado quinasa como la PINK1 y LRRK2 que están afectadas en la enfermedad del Parkinson, además se sabe que PINK1 interactúa con un gen de dicha enfermedad (Parkin) (Clark *et al.*, 2006) que codifica la ubiquitina E3 que es una ligasa citosólica encontrada en la matriz mitocondrial. (Kuroda *et al.*, 2006) (McBride *et al.*, 2006).

Por otro lado, se ha visto que las mitocondrias están involucradas en el ciclo celular, es un orgánulo relevante en la señalización del mismo (McBride *et al.*, 2006). Por ejemplo, AMPK es una quinasa heterotrimérica que es sensible a la relación AMP:ATP (Hardie, 2005) Cuando AMPK se activa fosforila la serina 15 de p53 promueve la detención del ciclo celular durante el daño al ADN(Harris & Levine, 2005).

Otro ejemplo importante es el papel de las mitocondrias en la señalización celular, se sabe que la fragmentación mitocondrial y la remodelación de crestas son esenciales en la muerte celular (Bossy-Wetzel *et al.*, 2003). Se ha visto que gran cantidad de proteínas son trasladadas al interior mitocondrial previamente a la muerte celular como es el caso de las GTPasas y K-Ras. Además, las mitocondrias tienen un papel muy importante en el desarrollo, dependiendo del tejido y la función celular, la morfología mitocondrial es variable. La Mfn1 y la Mfn2 están relacionadas con la dinámica mitocondrial durante el desarrollo embrionario, con lo cual un déficit de alguna de estas proteínas puede producir un problema de implantación placentaria. (McBride *et al.*, 2006).

Por último, cabe destacar el papel de las mitocondrias en la función neuronal, las mitocondrias son altamente sensibles a la estimulación sináptica, está bien establecido que las mitocondrias juegan un papel importante en la amortiguación de los flujos de calcio durante la sinápsis neuronal. (McBride *et al.*, 2006).

Según las conclusiones de McBride *et al.*, 2006, se ha determinado que es necesario el estudio de la complejidad mitocondrial, así como su interconexión con la red celular para el tratamiento de ciertas enfermedades que se relacionan con la disfunción mitocondrial dado que están relacionadas con proteínas implicadas en la función mitocondrial. Por ejemplo, mutaciones en Mfn2 provocan la enfermedad Charcot-Marie Tooth tipo 2A, caracterizada por una pérdida de neuronas motoras periféricas (Kijima *et al.*, 2004), además las mutaciones en Opa1 (y recientemente también Mfn2) son responsables de la atrofia óptica autosómica dominante, causando ceguera progresiva (Alexander *et al.*, 2001), (Delettre *et al.*, 2001). La comprensión de vinculación con ciclo celular y la apoptosis hará más fácil el estudio de nuevos tratamientos contra el cáncer. Además, la identificación de quinzasas y fosfatasa involucradas en la enfermedad del Parkinson permitirá conocer nuevas condiciones neurodegenerativas. Por otra parte, debido a la implicación metabólica característica de la mitocondria, el hecho de comprender mejor su metabolismo permitirá controlar enfermedades como la diabetes, la obesidad y miopatías mitocondriales complejas. (McBride *et al.*, 2006).

1.1.3 Cadena Respiratoria mitocondrial

La cadena respiratoria mitocondrial (ETC) está compuesta por 5 complejos de proteínas: NADH-Ubiquinona oxidoreductasa como Complejo I, Succinato-ubiquinona oxidoreductasa como Complejo II, Ubiquinona-citocromo C Oxidoreductasa como complejo III, Citocromo-C oxidasa como Complejo IV y ATP Sintasa como Complejo V. (Vartak *et al.*, 2013). Como se ha explicado anteriormente, las mitocondrias son esenciales para abastecer los requisitos energéticos de la célula formando ATP a través la fosforilación oxidativa que tiene lugar en los complejos de la cadena de transporte de electrones. Los complejos respiratorios mitocondriales nombrados anteriormente son los responsables de la oxidación de NADH y FADH₂ generados en las distintas vías metabólicas, este proceso produce un gradiente de protones en el espacio intermembrana que es aprovechado por la ATP sintasa para sintetizar ATP. Los electrones procedentes de NADH entran en la ETC a través del Complejo I, mientras que los procedentes del FADH₂ entran en el complejo II, a continuación, los electrones son transferidos al Coenzima Q y seguidamente al complejo III, al citocromo C y al complejo IV que los pasa al oxígeno como último aceptor (Figura 1). (Acin-Perez & Enriquez, 2014)

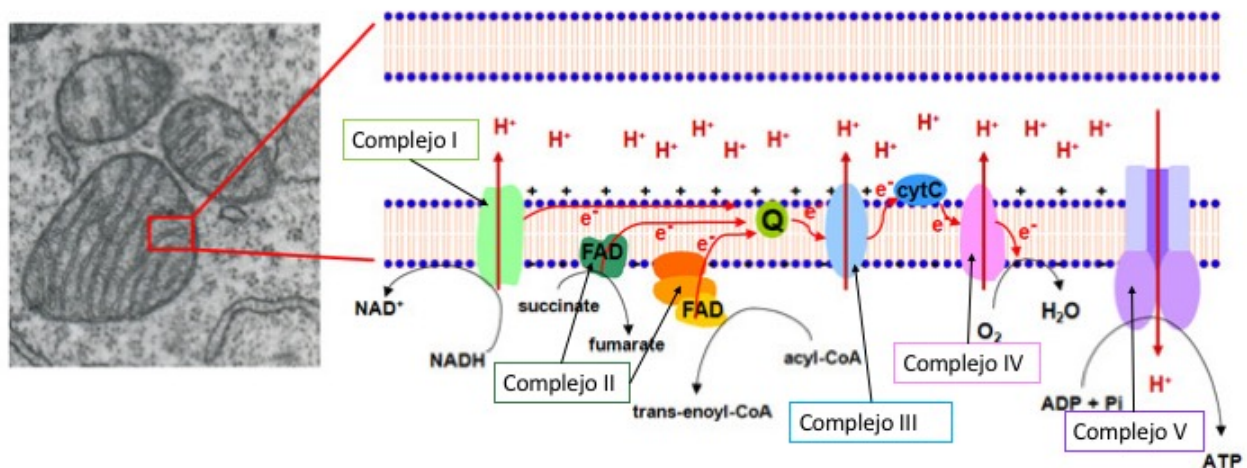


Figura 1. Representación de la cadena de transporte de electrones de la membrana mitocondrial interna. A la izquierda una fotografía con microscopio electrónico de mitocondrias humanas. A la derecha una representación de los complejos de la ETC. El complejo I está representado en verde claro (NADH-Ubiquinona oxidoreductasa), el complejo II está representado por las figuras de color verde oscuro (Succinato deshidrogenasa) y en amarillo anaranjado (Ubiquinona oxidoreductasa), en azul claro está representado el Complejo III (Ubiquinona-citocromo C oxidoreductasa), en rosa claro se representa el complejo IV (Citocromo-C oxidasa) y por último en morado aparece el Complejo V o ATP sintasa. Con flechas rojas está representado tanto el flujo de electrones como el de protones. Imagen modificada de NATURE EDUCATION ©, 2010.

La organización de la membrana interna de la mitocondria ha suscitado gran debate a lo largo de los años. Inicialmente se propuso que los diferentes complejos se hallaban empaquetados para garantizar la estabilidad y la alta eficiencia del transporte electrónico (modelo sólido) (Slater, 2003), posteriormente apareció el término del modelo fluido que proponía que los complejos eran entidades independientes incrustados en la membrana interna y el Coenzima Q y el citocromo C tenían libertad de movimiento por la membrana (Keilin & Hartree, 1947). Sin embargo, actualmente se han publicado resultados de experimentos en mitocondrias de levadura en los que se había logrado purificar complejos asociados formando estructuras más grandes más conocidas como supercomplejos respiratorios (SC) acuñando un nuevo término de modelo de plasticidad (Schagger, 2000). Si bien, es cierto que no puede afirmarse que ninguno de los tres modelos sea el adecuado, ya que todos ellos presentan incompatibilidades. El último modelo propuesto, el de plasticidad, se observó a través del aislamiento de estos supercomplejos y su identificación mediante electroforesis tras realizar un gradiente de sacarosa, pero también se comprobó que no todos los complejos están formando supercomplejos y pueden estar solos en la membrana conservando su funcionalidad (Acin-Perez & Enriquez, 2014).

Los principales supercomplejos descritos incluyen los complejos I-II-IV y las formas diméricas/oligoméricas de la ATP sintasa. Dado que el complejo I es diferente en levadura, hasta ahora se han descrito tres supercomplejos en *S. cerevisiae*: (1) el complejo mitocondrial deshidrogenasa (formado por las proteínas Ndi1, Nde1, Nde2), (2) el supercomplejo del citocromo bc_1 -COX (III-IV) que tiene 2 formas dominantes (III₂-IV₂ y III₂-IV) y (3) el complejo dímero/oligómero F_1F_0 ATP Sintasa. (Stuart, 2008) (Vartak *et al.*, 2013). Se ha postulado que la formación de estos supercomplejos confiere ciertas ventajas a la célula, como, por ejemplo, la mejor transferencia de electrones a través de la canalización del sustrato, prevención de la formación de ROS y ayuda en el ensamblaje y estabilización del complejo I (Barrientos & Ugalde,

2013). Sin embargo, no se han obtenido resultados concluyentes a cerca de las proteínas que colaboran en la formación de estos supercomplejos ni de su papel patológico en ciertas enfermedades (Vartak *et al.*, 2013).

1.1.4 La mitocondria y el daño oxidativo

Las mitocondrias son una importante fuente de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que son causantes de muchas patologías y contribuyen al daño mitocondrial, además también interviene en la señalización redox desde el orgánulo al resto de la célula. (Murphy, 2009). Estas ROS como el superóxido y el peróxido de hidrógeno, intervienen en otros procesos que no tiene por qué ser negativos, como en la inmunidad, pueden funcionar como moléculas efectoras antimicrobianas, también como moléculas reguladoras de actividad transcripcional del factor nuclear kB (NF-kB), producción de trampas extracelulares de neutrófilos (NET), además regulan la autofagia (Dan Dunn *et al.*, 2015).

Normalmente, entre el 1 y 5 % del oxígeno es convertido en ROS, además algunos estudios demuestran que la producción intracelular de ROS es debida a las mitocondrias. La producción de las ROS ocurre en 2 puntos localizados de la cadena de transporte de electrones que son el complejo I y el complejo III (Hollensworth *et al.*, 2000). Estos radicales pueden dañar diferentes moléculas dentro de la mitocondria, como proteínas, DNA o lípidos. El daño no reparado en el DNA mitocondrial conlleva la producción de complejos I y III defectuosos que aumentan la producción de la forma superóxida (Voets *et al.*, 2012; Castro *et al.*, 2012; Alexeyev, 2009). Este proceso crea un círculo vicioso de producción de ROS y daño al orgánulo que muchas veces lleva a la apoptosis. (Bhat *et al.*, 2015)

Muchas evidencias sugieren que el daño mitocondrial está involucrado en la patogénesis de muchas enfermedades neurodegenerativas. El sistema nervioso central depende mucho de la función mitocondrial debido a que tiene una gran demanda energética, ello produce una mayor producción de ROS provocando mutaciones en el ADN mitocondrial, produciendo fallo energético. Los trastornos neurodegenerativos más importantes relacionados con la edad mitocondrial son el Alzheimer, la enfermedad de Huntington, Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) y el Parkinson. (Bhat *et al.*, 2015)

Las células han desarrollado enzimas antioxidantes para poder lidiar contra el daño oxidativo. Algunos de ellos son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa. Además, hay otras moléculas antioxidantes como el ascorbato, el α -tocoferol y el glutatión. A pesar de tener estas armas, el sistema puede fallar, se pueden acumular las ROS y producir daños celulares. (Wei *et al.*, 2001).

1.2. La mitofagia

1.2.1 Descripción del proceso de autofagia y sus tipos

La autofagia es un proceso de catabolismo de componentes celulares como partes del citosol, los orgánulos y agregados de proteínas que son eliminados mediante la encapsulación de los mismos en una estructura de doble membrana conocida como autofagosoma (Nakatogawa *et al.*, 2009) La doble membrana, llamada también membrana de aislamiento, rodea la carga y los bordes se sellan para aislar la carga citoplasmática en el interior del autofagosoma. A continuación, se fusiona con un lisosoma permitiendo la degradación de la carga. La bicapa puede ser reutilizada o catabolizada para producir energía. (Youle & Narendra, 2011).

Se pueden identificar 3 tipos de autofagias: la macroautofagia, que ocurre mediante la generación de autofagosomas, la microautofagia que consiste en la degradación de ciertos componentes mediante una invaginación de la membrana lisosomal o vacuolar y la autofagia mediada por chaperonas que reconocen proteínas en mal estado y sólo se ha descrito en eucariotas superiores. (Youle & Narendra, 2011).

Existen 2 tipos de macroautofagia: La autofagia no selectiva debida a la privación de nutrientes con el fin de suministrar energía a la célula. La autofagia selectiva en condiciones nutritivas buenas y su principal función es la eliminación de orgánulos dañados y agregados de proteínas que podrían ser tóxicos. (Youle & Narendra, 2011).

Dentro de la autofagia selectiva, la mitofagia media la eliminación selectiva de mitocondrias dañadas, así como la eliminación de las mitocondrias de los eritrocitos en su proceso de maduración y también la eliminación de las mitocondrias de los espermatozoides después de la fertilización. (Ashrafi & Schwarz, 2013).

1.2.2. La mitofagia en Levaduras

En los últimos años, se ha avanzado en el conocimiento de los genes implicados en la mitofagia en levadura obteniéndose información a cerca de los mismos, cómo se regula la inducción y cómo se regula la maquinaria.

Para el seguimiento de la autofagia se emplearon métodos de monitorización basados en proteínas mitocondriales fusionadas con GFP (proteína verde fluorescente) que debido a su fluorescencia puede realizarse un seguimiento del proceso de mitofagia mediante el uso de microscopio de fluorescencia. (Kanki & Klionsky, 2008; Kissova *et al.*, 2004.) La mitofagia puede inducirse mediante el cultivo de las levaduras en medios con fuentes de carbono no fermentables, como el lactato y el glicerol. Empleando estas metodologías se identificó que los genes esenciales para la mitofagia son los Atg. En concreto la mitofagia requiere de la presencia de Atg11, Atg20 y Atg24. Atg11 juega un papel importante en la formación de la estructura preautofagosómica (PAS) como proteína adaptadora para introducir carga mitofagosómica en el PAS. Además de estas proteínas se han identificado otras como el complejo Atg17-Atg29-Atg31. (Kanki & Klionsky, 2008)

Se han establecido receptores específicos de mitofagia, uno de ellos es el Atg32, que es una proteína de membrana externa mitocondrial de 59 kDa con sus extremos N y C-terminal expuestos hacia el citoplasma y el espacio intermembrana respectivamente. Es una proteína específica de mitofagia, las células con mitofagia completamente bloqueada carecen de esta proteína. En su extremo N-terminal Atg32 se une a Atg8 y Atg 11. Atg8 es una proteína de tipo ubiquitina conjugada con fosfolípidos y necesaria para la formación de autofagosoma. Atg32 contiene un motivo de interacción con Atg8 LC3 (AIM/LIR) cuya secuencia consenso es (W/F/Y)XX(L/I/V) que se encuentra conservada tanto en mamíferos como levaduras. Atg32 se une a Atg8 al motivo AIM. Atg11 se une a la región (I/V)LS de Atg32. (Müller *et al.*, 2015)

A través de las interacciones con Atg8 y Atg11, Atg32 recluta mitocondrias al PAS en la superficie de la vacuola donde se va formando la maquinaria autofagosómica. (Liu *et al.*, 2014)

Sin embargo, estudios de nuestro grupo de investigación publicados recientemente demuestran que en la inducción de la mitofagia debida al daño mitocondrial juega un papel muy

importante la proteína adaptadora Atg11, pero no el receptor Atg32. Al tratar con valinomicina cepas de levadura se indujo la mitofagia y se comprobó en cuanto contribuían cada una de las 2 proteínas mencionadas, dando como resultado que la proteína Atg11 era absolutamente necesaria para la mitofagia y que Atg32 no estaba prácticamente inducida. Se realizó otro experimento de sobreexpresión de Atg11 para observar si existía mayor tasa de recambio de los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones. Mediante microscopía electrónica se estudió la degradación de las proteínas Ndi1 y Qcr2 tras el cambio de la fermentación a la respiración en ausencia y presencia de Atg11. Ambas subunidades mostraron mayor tasa de degradación ya en medio fermentativo y también con inducción completa de respiración.

Se comprobó en dicho trabajo que la mitofagia ocurre más rápido cuando se induce un daño específico mediante la valinomicina en comparación con la privación de nutrientes.

Por tanto, es un punto de partida el hecho de estudiar nuevas vías mitofágicas que pueda tener la levadura para evitar el daño mitocondrial. (Timón-Gómez *et al.*, 2018)

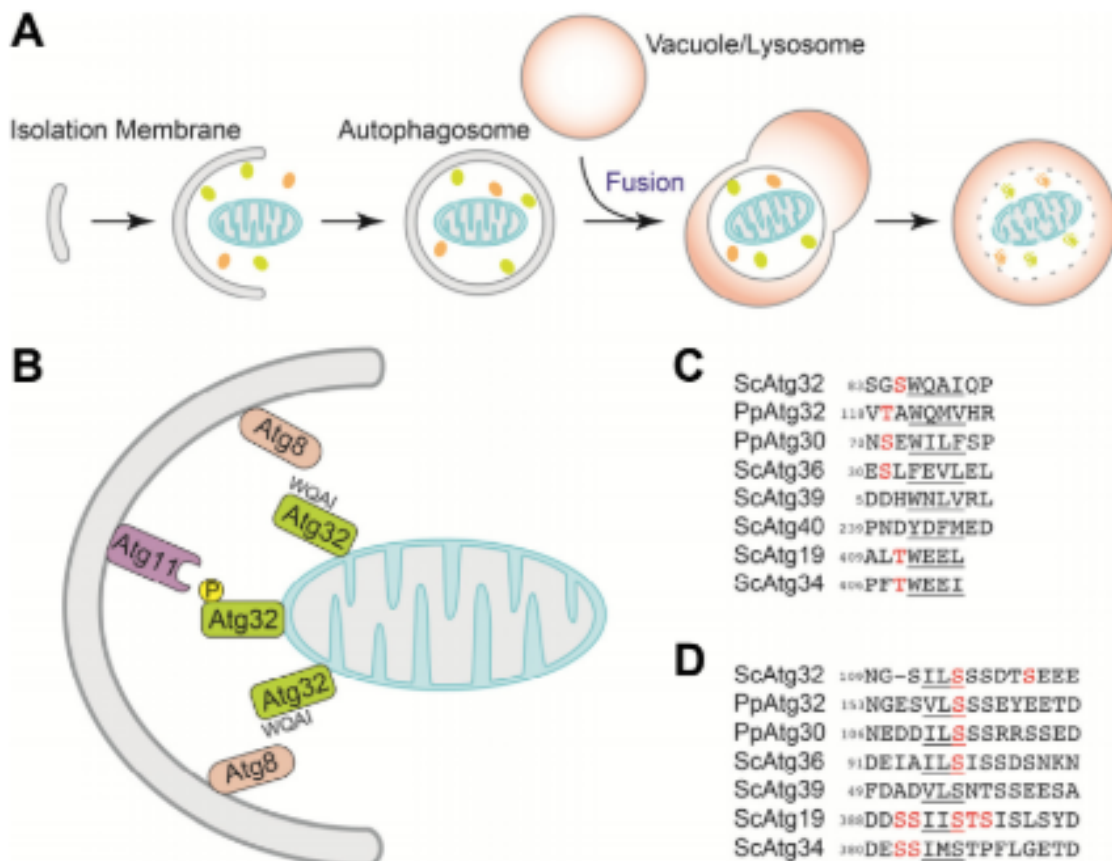


Figura 2. Esquema de la mitofagia en Levadura. (A) Representación esquemática de la autofagia, cuando se induce la autofagia, las membranas de aislamiento se nuclean en el sitio de ensamblaje de la estructura preautofagosómica (PAS). Crecen y engloban la carga mitocondrial en una vesícula de doble membrana llamada autofagosoma, a continuación, el autofagosoma se fusiona con una vacuola o lisosoma para la degradación. (B) Autofagia en levadura mediada por Atg32 actúa como un receptor de mitofagia que interacciona con la proteína adaptadora Atg11 y la proteína tipo ubiquitina Atg8 para señalar la mitocondria al PAS. La interacción de Atg11-Atg32 depende la fosforilación de la Serina 114 por CK2. (C,D) Representación de las secuencias de la interacción de Atg8 (C) y Atg11 (D), las letras en rojo son los residuos susceptibles de fosforilación. (Farre and Subramani, 2016).

1.2.3 La mitofagia en células de mamífero

Igual que ocurre en levadura, en mamífero existen receptores análogos a Atg 32 localizados en la membrana externa mitocondrial y contiene la secuencia clásica del tetrapéptido que está conservada: W/F/YXXL/I que media la interacción con LC3 para la autofagia selectiva. Existen 2 tipos de mitofagia identificadas en células de mamífero. Un tipo incluye a la familia NIX/BNIP3L y BNIP3, el otro receptor mitocondrial es FUNDC1. (Liu *et al.*, 2014)

La familia de los receptores NIX/BNIP3L y BNIP3 están localizados en la mitocondria y Retículo Endoplasmático (RE) y están involucrados en la regulación de muerte por apoptosis o necrosis programada afectando a la respiración mitocondrial y a la producción de ROS (Sowter *et al.* 2001). La familia NIX/BNIP3L contiene un dominio LIR que es equivalente al AIM de levaduras, éste interacciona con LC3 y esto define a NIX/BNIP3L como receptor de mitofagia (Novak *et al.*, 2010). BNIP3 también contiene el dominio LIR y realiza las funciones mitofágicas (Hanna *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2013) Se ha visto que mutaciones en el dominio LIR interfieren en la interacción con LC3/GABARAP. Se ha visto que NIX/BNIP3L funciona en la degradación mitofágica de reticulocitos, un proceso necesario para la maduración de los glóbulos rojos, aunque esta eliminación mitocondrial de reticulocitos también es independiente de NIX y algunas proteínas Atg. (Sandoval *et al.*, 2008)

NIX/BNIP3L y BNIP3 también están involucradas en la mitofagia inducida por hipoxia, están regulados transcripcionalmente por HIF o FOXO3 (Sowter *et al.* 2001; Chinnadurai *et al.*, 2008). Por otra parte, se ha visto que la fosforilación de BNIP3 en la serina 17 y 24 facilita la unión a LC3-B y GATE-16 facilitando la mitofagia, además se ha visto que NIX/BNIP3L interacciona con Rheb que es una GTPasa de la familia de las Ras en células con gran actividad de fosforilación oxidativa. (Zhu *et al.*, 2013)

Por otro lado, el otro receptor mitocondrial es el FUNDC1, formado por 3 dominios transmembrana y localizado en el exterior de la membrana mitocondrial. La región N-terminal se localiza hacia el citosol y contiene el dominio LIR, (Y(18)xxL), las regiones conservadas de Y18 y L21 son esenciales para la interacción con LC3, con lo cual mutaciones en estos residuos pueden abolir la mitofagia. Aunque FUNDC1 participa en la mitofagia inducida por hipoxia, el nivel ARNm de FUNDC1 disminuye en condiciones hipóxicas, reduciendo también sus niveles proteicos debido a la mitofagia. La actividad de FUNDC1 en la mitofagia esta mediada por una fosforilación reversible a nivel postraduccional, la mitofagia se activa con la defosforilación de ciertos residuos (Liu *et al.*, 2012). En condiciones normales la tirosina 18 de FUNDC1 es fosforilada por una quinasa Src y la serina 13 por CK2. Estas quinastas se encuentran generalmente activas inhibiendo la mitofagia. Se necesita la inactivación de las 2 quinastas para que comience la mitofagia. Además, se ha descubierto que la fosfatasa PGMA5 es la responsable de la defosforilación de la serina 13 de FUNDC1, esta proteína desfosforilada tiene gran afinidad por LC3 produciendo la incorporación selectiva del autofagosoma. (Chen *et al.*, 2014)

Por otra parte, cabe destacar la importancia de la mitofagia en ciertas enfermedades, como es el caso de Parkinson. Se ha identificado otra vía de señalización para este proceso en la que están involucradas la quinasa PINK1 y la ubiquitina ligasa E3 (Parkin). Alteraciones en esta vía de señalización han sido relacionadas con la enfermedad nombrada. PINK 1 es un sensor de daño mitocondrial que en condiciones fisiológicas es eliminado en el interior mitocondrial manteniendo unos niveles muy bajos, pero cuando se induce daño mitocondrial PINK1 comienza a acumularse y esta es la señal para que se reclute a Parkin. Se piensa que el reclutamiento de

Parkin implica la ubiquitinación debido a su actividad de ubiquitina ligasa para la eliminación de los residuos mitocondriales (Youle & Narendra, 2011). (Figura 3)

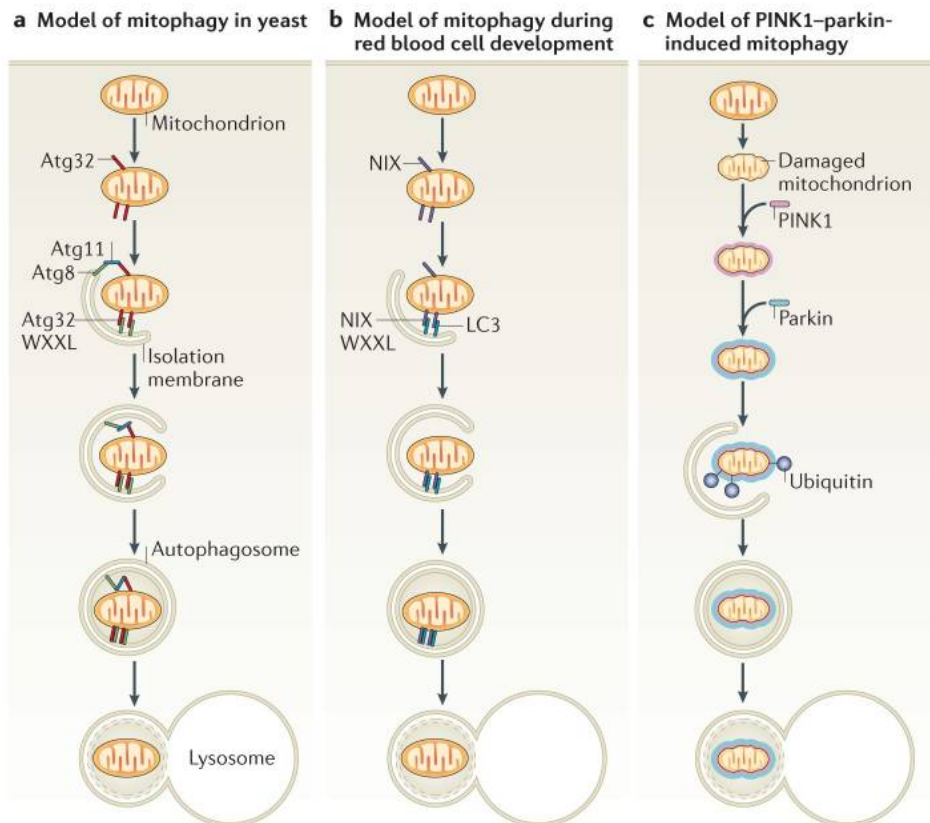


Figura 3. Representación esquemática de los modelos de mitofagia de mamífero y levadura. (a) Modelo de mitofagia en Levadura, es necesaria la presencia del receptor Atg32 que puede unirse o bien a Atg8 por su dominio WXXL o bien puede unirse a Atg 11 (proteína adaptadora) y esta a Atg8. Cuando se produce la unión la doble membrana comienza a sellarse formando el autofagosoma que luego se fusionan con el lisosoma. (b) Modelo de mitofagia durante el desarrollo de los glóbulos rojos. Durante la diferenciación de los glóbulos rojos, pierden las mitocondrias mediante mitofagia. Las mitocondrias expresan la proteína NIX/BNIP3L aumentando su concentración durante el desarrollo, a través del motivo WXXL se une a LC3 (homólogo de Atg8 en levadura) presente en las membranas de aislamiento, se piensa que media el secuestro de las mitocondrias en autofagosomas. (c) Modelo PINK1-Parkin de la inducción de mitofagia. Cuando las mitocondrias se dañan comienza la acumulación de la quinasa PINK1, señal que produce el reclutamiento de la ubiquitina ligasa E3 (Parkin) que ubiquitina las proteínas mitocondriales haciendo que las mitocondrias queden envueltas en membranas de aislamiento para luego fusionarse con lisosomas. (Imagen recuperada de Youle & Narendra, 2011).

1.3 La levadura como modelo de estudio de mitofagia

La levadura proporciona ciertas ventajas específicas para el estudio de enfermedades mitocondriales debido a la capacidad de sobrevivir en diferentes fuentes de carbono fermentables en ausencia de función mitocondrial. Es por ello por lo que, mutaciones patogénicas que inducen disfunción mitocondrial pueden mantenerse en levadura mientras disponga de carbono fermentable. Por otro lado, el fenotipo de crecimiento es un método simple para evaluar la función mitocondrial dado que cuando se cultivan levaduras con mitocondrias dañadas en presencia de fuentes de carbono no fermentables como el glicerol, etanol o lactato, no crecerán. (Baile & Claypool, 2013).

Otra ventaja importante de estudiar la función mitocondrial en levadura frente a células de mamífero es que las primeras tienen un genoma mitocondrial homoplásmico a diferencia del de las de mamífero que suele ser heteroplásmico, es decir, que proviene de diferentes poblaciones mitocondriales. Esta característica de las células de mamífero hace que sea necesario un número mínimo de ADNmt mutante para que se observe el efecto de la enfermedad, lo que se conoce como efecto umbral y suele atribuirse a la aparición progresiva y variada de enfermedades mitocondriales. Esto hace que sea difícil generar mutantes en las células de mamífero, aunque es cierto que este efecto umbral no puede estudiarse en el modelo de levadura. (Baile & Claypool, 2013).

La levadura puede ser modelo para el estudio de enfermedades relacionadas con el envejecimiento, se ha podido establecer una compleja red donde se relacionan muchas funciones mitocondriales con el envejecimiento, observándose resultados alentadores que pueden aplicarse en modelos más complejos (Barros *et al.*, 2010).

En conclusión, la levadura se muestra como un modelo bueno para el estudio de mecanismos moleculares teniendo en cuenta que se trata de un organismo unicelular, es por ello que, para poder escalar los resultados obtenidos se necesita el uso de organismos más complejos como seres humanos o modelos animales. Aún así, *S. cerevisiae* se ha propuesto como un buen modelo para el estudio de la patogenicidad mitocondrial.

2. OBJETIVOS

En estudios anteriores se ha investigado el proceso de reciclaje mitocondrial en condiciones de ayuno de nutrientes y en estudios recientes se han observado indicios de un reciclaje más selectivo inducido por el uso de antibióticos como la valinomicina (Timón-Gómez *et al.*, 2018). El objetivo principal del trabajo es la búsqueda de nuevos reguladores implicados en el proceso de la mitofagia en *Saccharomyces cerevisiae*. Para ello, se han desarrollado una serie de objetivos experimentales a partir de los cuales se pretende cubrir el objetivo principal:

1. Identificación de nuevos reguladores en la mitofagia empleando como método de selección la resistencia a la valinomicina.
2. Estudio de regulación transcripcional de componentes de la cadena de transporte de electrones en presencia de valinomicina.
3. Estudio de rutas de señalización implicadas en el reciclaje mitocondrial
4. Estudio del papel de las proteasas mitocondriales en el reciclaje de la cadena de transporte de electrones.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material Biológico y medios de cultivo

Para la realización de los diferentes ensayos se utilizaron las cepas enumeradas en la Tabla 1 que se encuentra en el ANEXO 1 al final del documento.

Para el cultivo de las diferentes cepas se emplearon diferentes medios de cultivo dependiendo de las condiciones necesarias en cada uno de los ensayos. Los medios utilizados fueron YPD e YPGal como medios ricos y SD y SGal como medios mínimos. Las cepas fueron crecidas a 28 °C y en agitación a 180 rpm. La composición de los medios ricos (YPD e YPGal) es de, en el caso de YPD glucosa (2% m/v), peptona bacteriológica (2%, m/v) y extracto de levadura (1%, m/v). En el caso del YPGal, la glucosa se sustituye por la misma cantidad de galactosa (2%, m/v), manteniendo el resto de componentes en las mismas concentraciones. La composición de los medios mínimos (SD y SGal) es de glucosa (2%, m/v), *yeast nitrogen base* (YNB) (0,7%, m/v) y ácido succínico (50mM) ajustado a un pH de 5,5 con Tris. En el caso del SGal se sustituye la glucosa por la misma cantidad de galactosa (2%, m/v) manteniendo las proporciones del resto de componentes. Estos medios mínimos son empleados para la selección de cepas por auxotrofías, es decir, es necesarios suplementar los medios con los aminoácidos necesarios. En este caso con histidina (100 µg /mL), metionina (100 µg /mL) y leucina (100 µg /mL).

Si se necesitaba obtener un medio sólido se añadió un 2%, m/v de agar bacteriológico. Los medios YPGal y SGal se empleaban cuando se necesitaban otras fuentes de carbono para otras condiciones.

3.2. Ensayos de sensibilidad

3.2.1. Crecimiento en medio líquido

A modo de precultivo, se crecieron en medio YPD los mutantes recuperados de la colección para obtener un cultivo de levaduras saturado para poder realizar los posteriores experimentos en medio sólido (Una $OD_{660} = 2$). Para realizar el ensayo de sensibilidad en medio sólido, se crecieron en una placa de 96 pocillos los diferentes mutantes a estudiar en medio YPD realizando diluciones celulares seriadas de cada uno de 1/10, 1/100 y 1/1000.

3.2.2. Ensayos de crecimiento en medio sólido (Droptest)

Este experimento se llevó a cabo para comparar el crecimiento de los diferentes mutantes (BY4741 (WT), Δ HOG1, Δ SCH9, Δ YME1, Δ UTH1, Δ AIM25, Δ PTC6, Δ YIL165(C), Δ APN2, Δ MDM10, Δ CYT2, Δ ACF2, Δ PIK1, Δ YAP 1, Δ STB5, Δ RTG3, Δ MNS2, Δ MNS4, Δ MOT3, Δ HAP2) bajo las mismas condiciones en presencia de concentraciones crecientes del antibiótico Valinomicina (Sigma, stock a 1mM en DMSO). Como se ha comprobado en estudios previos (Timón-Gómez *et al.*, 2018) la Valinomicina produce un daño mitocondrial a la célula induciendo el proceso de mitofagia. Se realizaron precultivos llevados a saturación en medio líquido YPD y se realizaron diluciones seriadas (1:10, 1:100, 1:1000) en una placa de 96 pocillos para cada uno de los mutantes. Con un replicador manual (Sigma) se depositó una gota de cada pocillo en una placa con YPD sólido. Las placas se incubaron 24h realizando réplicas cada hora durante las 5 primeras horas. Un primer experimento se realizó con los mutantes Δ HOG1, Δ SCH9, Δ YME1 y el WT BY4741 para comprobar la concentración de Valinomicina a la cual se observaban diferencias en

el crecimiento. Se hicieron diluciones con Valinomicina 40 μM y 100 μM , empleándose la concentración del 100 mM para los posteriores ensayos con el resto de mutantes.

3.3. RTPCR

3.3.1. Preparación de las muestras

Para la realización de la Real Time PCR se prepararon cultivos llevados a saturación de YPD e YPGal (100 mL de cada uno), este último medio fuerza a la levadura a respirar, es por ello por lo que, se necesita inocular más cantidad de células debido a que el crecimiento es más lento, ya que el hecho de respirar supone un estrés para las levaduras debido a los daños que les ocasiona. Se extrajeron muestras de 10 mL cada una a tiempos 0, 30 minutos, 1 hora, 1,5 horas, 2 horas y 5 horas, siendo el tiempo 0 el que no contiene valinomicina. Tras la extracción de los primeros 10 mL se inoculó valinomicina 4 μM y se incubó de nuevo en agitación a 28 °C. En cada extracción se centrifugaron 10 mL de muestra a 3000 rpm durante 3 minutos y se realizan lavados con H₂O, por último, se congeló el pellet a -20 °C pudiéndose continuar con el protocolo.

3.3.2. Purificación del ARN por el método del ácido fenólico.

Se resuspendió el pellet en 400 μL tampón TES (10mM Tris/HCL pH = 7.5, 10mM EDTA, 0,5% SDS) y se añadió la misma cantidad de ácido fenólico (equilibrado con fenol a pH = 4). Se incubó a 65 °C durante 45 minutos, a continuación, se depositaron las muestras en hielo durante 5 minutos. Seguidamente, se centrifugó durante 1 minuto a 10000 rpm y se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo Eppendorf y se extrajo con la misma cantidad de fenol empleado anteriormente. Se transfirió de nuevo la fase acuosa a un nuevo tubo al que se le añade acetato sódico 3M (40 μL) a pH 5 y un volumen de etanol de 2.5. Se centrifugó de nuevo a 14000 rpm durante 10 minutos, se lavó el pellet con etanol al 70% y a continuación se dejó secar sin desecar demasiado la muestra ya que de lo contrario podría no resuspenderse bien. A continuación, se añadieron 100 μL de H₂O Milli Q. Por último, se midió la concentración de ARN en un NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) y se almacenó la muestra a -20 °C.

3.3.3. Limpieza del ARN con RNeasy MiniKit de QUIAGEN

Se mezclaron en un Eppendorf estéril los siguientes reactivos: 50 μg del ARN extraído con ácido fenólico, 10 μL de tampón de reacción DNasa I 10x con MgCl₂, 2 μL de DNasa I (libre de RNasa 1 u/ μL), 1 μL de Inhibidor de Ribonucleasa (40 u/ μL) y H₂O MiliQ estéril hasta un volumen de 100 μL . Se mezcló bien y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Se añadió a continuación el tampón RLT del kit y se mezcló bien, seguidamente se añadieron 250 μL de etanol (96-100%) y se mezcló bien con la pipeta sin centrifugar.

Se transfirieron las muestras a las columnas spin RNeasy Mini colocándolas bajo un tubo colector de 2mL y se centrifugó 15 segundos a 10000 rpm. Se eliminó el contenido del tubo colector y se reutilizó. Se añadieron 500 μL de tampón RPE (RNeasy MiniKit) a la columna y se repitió la centrifugación durante 15 segundos. Se descartó el líquido del tubo colector y se reutilizó. Se añadieron de nuevo otros 500 μL del tampón RPE a la columna y se repitió la centrifugación durante 2 minutos. Se descartó el tubo colector junto con el líquido. Se colocó un nuevo tubo colector en la columna y se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto. Se colocó la columna en un nuevo tubo colector de 1,5 mL y se añadieron a la columna 30 μL de agua libre de RNasa (RNeasy MiniKit). Se centrifugó durante 1 minuto a > 10000 rpm para eluir el ARN. A continuación, se cuantificó el ARN en un NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) y se conservaron las muestras a -20 °C.

3.3.4. Síntesis de ADNc (Superscript II; Invitrogen Cat. No 18080-051)

Se añadió en un tubo de microcentrífuga la siguiente mezcla preparando duplicados para los controles sin transcriptasa reversa: 5µg de la muestra de RNA tratada con DNasa (5 µL), 50µM del primer oligo (dT)20 (1µL), 10 µM del mix dNTP (1µL) y H₂O MiliQ hasta un volumen final de 10 µL. Se incubó a 65 °C durante 5 minutos, después se depositaron en hielo durante 1 minuto. Se preparó el mix de síntesis de ADNc en el orden indicado: Tampón RT 10x (2µL/reacción), 25 mM MgCl₂ (4µL/reacción), 0,1 M DTT (2µL/reacción), RNaseOut 40U/µL (1µL/reacción), SuperScriptII RT 200U/µL (1µL/reacción) (se añadió H₂O en el caso de las reacciones control que no llevan transcriptasa reversa). A continuación, se añadieron 10 µL del mix de síntesis de ADNc a cada muestra mezclando bien y centrifugando. Se incubó durante 50 minutos a 50 °C. Se terminó la reacción colocando las muestras a 85 °C durante 5 minutos y almacenándolas directamente en hielo. Se centrifugó brevemente y se añadió 1 µL de RNasaH y se incubó durante 20 minutos a 37 °C. Por último, se añadieron 90 µL de H₂O MiliQ y se conservaron las muestras a - 20 °C. Se usaron 2 µL para la RTPCR.

3.3.5. Reacción de RTPCR

Para la reacción se necesitó preparar un EVA Green Master Mix (para 100 reacciones es necesario: 500 µL de EvaGreen qPCR Basic HS Mix (Biotium) 2x, 20µL ADN Taq Polimerasa TrueStart 5 U/µL (Fermentas), 6µL ROX (0.1 mM). Cada reacción contiene 2 µL de ADN, 3µL de primer (A+B) (3.3 µM) + 5µL del EVA Green Master Mix. Las reacciones se hicieron por triplicado, por ello se multiplicó por 3 estas últimas medidas, obteniendo un volumen final por muestra de 31 µL. Se añadieron 10 µL de cada reacción a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de Applied Biosystems. Los primers empleados fueron los que amplifican los genes ACT1, NDI1, SDH2, QCR2, COX6 y ATP5. Una vez colocadas las muestras se cubrió con un plástico la placa y se centrifugó, a continuación, se inició la reacción en una máquina de Real Time PCR de Applied Biosystems 7000 con un programa de 1 ciclo de 2 minutos a 95 °C y 40 ciclos cada uno de los cuales se compone de 5 segundos a 95 °C, 5 segundos a 53 °C y 30 segundos a 72 °C.

3.4. Microscopía de fluorescencia.

Para observar la morfología de las células y el proceso de mitofagia se empleó un microscopio de fluorescencia Leica 5000 haciendo uso del objetivo de 100x con aceite de inmersión. Para poder observar las cepas debían de estar transformadas con el plásmido pVT100-ROSELLA [URA3] que tiene los fluoróforos DsRed y pHluorin.

Las levaduras se crecieron en medio mínimo SD suplementado con aminoácidos, además se empleó también medio SGal para forzar a las células aumentar la tasa de respiración forzando el aumento de la cantidad mitocondrial. Se añadió el antibiótico valinomicina para forzar la mitofagia y poder comparar las condiciones frente a condiciones normales sin valinomicina.

A continuación, en la Figura 4 se muestra un esquema de la conformación de la construcción Rosella.

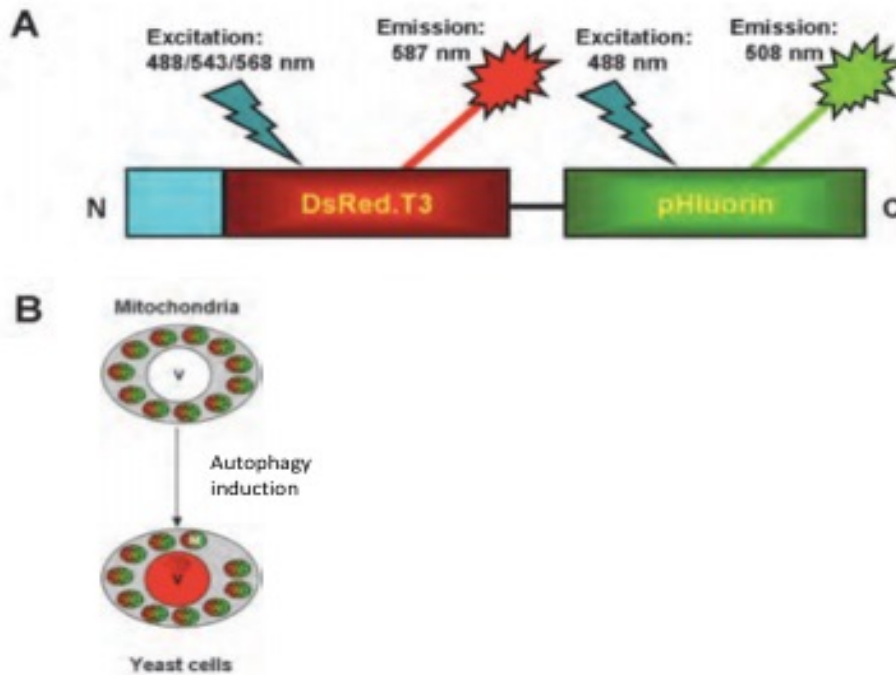


Figura 4. Esquema de la construcción Rosella para la detección de la mitofagia empleando microscopio de fluorescencia. (A) Representación esquemática del sistema Rosella en el cual se muestra en azul el péptido de localización mitocondrial, en rojo y verde aparecen los 2 fluoróforos que contiene el plásmido: DsRed.T3 (resistente a los cambios de pH) en rojo, con una longitud de onda de excitación de 488,543 o 568 nm y una longitud de onda de emisión de 587 nm, pHluorin (sensible a cambios de pH) representado en verde, con una longitud de onda de excitación de 488 nm y de emisión de 508 nm. Cuando la mitocondria es introducida en el interior de la vacuola el pHluorin deja de emitir en color verde debido a que es sensible al pH, por ello solo se observa fluorescencia roja. **(B)** Representación de las 2 situaciones observables, las mitocondrias antes de la mitofagia muestran fluorescencia roja y verde, pero al entrar en la vacuola para su degradación sólo mostrarán fluorescencia roja. Figura modificada de Mijaljica *et al.*, 2011.

3.5. Extracción de material genético

El plásmido empleado para la introducción del sistema Rosella es el pVT100U-mtRosella que presenta resistencia a ampicilina y tiene el gen URA3, de interés para la selección de cepas por auxotrofías. (Rosado *et al.*, 2008)

Para proceder a la extracción del ADN del plásmido de bacterias se cultivaron las mismas en un cultivo de 3 mL y se aplicó el protocolo de purificación del kit comercial de NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel). Seguidamente se cuantificó la cantidad de ADN empleando el NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific).

3.6. Transformación de levadura

Se emplearon 2 protocolos de transformación de levaduras.

El primero de ellos fue el método basado en Acetato de Litio (Gietz *et al.* 1995):

Se crecieron células en medio de cultivo YPD hasta un OD₆₆₀ de 0.7-1.2, a continuación, se centrifugó a 3000 rpm durante 3 minutos y se realizó un lavado del pellet con H₂O estéril en las mismas condiciones. Seguidamente se hizo un lavado con tampón LiTE 1x (Acetato de Litio en 1x de tampón TE (10 mM Tris/HCl pH 7.6, 1mM EDTA). Se resuspendieron las células de nuevo en tampón LiTE 1x y se incubó durante 15 minutos a 30 °C para hacerlas competentes. Seguidamente se añadieron de 1 a 5 µL del ADN plasmídico a 60 µL de células competentes y 300 µL de LiTE/PEG4000 (40%, v/v). Se incubó la mezcla durante 30 minutos a 30 °C y seguidamente a 42 °C durante 20 minutos exactos, para permitir la entrada del ADN en la célula. Se realizó un spin para agrupar las células y a continuación se realizó un lavado con agua estéril descartando el sobrenadante. Por último, se sembraron las células en el medio selectivo incubándolas a 30°C durante 1 o 2 días.

El segundo fue un protocolo publicado en *Nature* (Gietz & Schiestl, 2007) mejorado para alcanzar una alta tasa de transformación de levadura. Tras realizar el cultivo celular se recogieron las células por centrifugación a 3000 g durante 5 minutos resuspendiendo el precipitado en 25 mL de agua estéril, se repitió el lavado para después resuspender las células en 1 mL de agua estéril. Por otra parte, se ha de desnaturalizar el carrier de ADN en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos, colocándolo seguidamente en un baño de agua con hielo. Se transfirió la suspensión celular a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, se centrifugó durante 30 segundos a 13000 g y se descartó el sobrenadante. A continuación, se resuspendieron las células en 1 mL de agua estéril, de este volumen, se pipetearon 100 µL en tubos de 1,5 mL para cada transformación. Se centrifugó a 13000 g durante 30 segundos y se eliminó el sobrenadante. Para cada reacción de transformación con un solo plásmido se realizó una mezcla con los siguientes componentes: 240 µL PEG 3350 (50% (m/v) esterilizado por filtración, 36 µL de Acetato de Litio 1M, 50 µL Carrier de ADN monocatenario (2 mg/mL), 34 µL de plásmido diluido en agua estéril. Se añadieron los 360 µL totales de la muestra a los 100 µL de cada muestra de transformación incluyendo un tubo de transformación sin plásmido como control. Se colocaron los tubos en un baño de agua a 42 °C durante 40 minutos. A continuación, se centrifugaron los tubos a 13000 g durante 30 segundos eliminando el sobrenadante con una pipeta. Para las transformaciones que utilizaron plásmidos con selección de genes prototróficos se pipeteó 1 mL de agua estéril en el tubo de transformación rompiendo el sedimento celular. Para los plásmidos que emplearon genes de antibióticos se pipeteó 1 mL de YPD en el tubo de transformación incubándose durante 2-3 horas a 30 °C para asegurar la expresión del ADN plasmídico. En los 2 casos se pipeteó un volumen de 200 µL de suspensión celular en casa uno de los medios (medio SD con los aminoácidos para las auxotrofías y medio YPD con el antibiótico para los resistentes al antibiótico) y se extendió sobre la placa con una varilla de vidrio. Se incubaron las placas a 30 °C durante 3-4 días y se contaron las colonias transformantes.

3.7. Manipulación y análisis de proteínas

3.7.1. Obtención de los extractos proteicos. Purificación del mitofagosoma.

Se crecieron las células en YPD hasta un OD₆₆₀ de 1.5 aproximadamente y se recogieron mediante centrifugación. A continuación, se realizaron 2 lavados con agua y se resuspendieron las células en tampón pre-spheroplasting (100mM Tris/HCl pH 8.5, 40 mM β-mercaptetanol) y se incubaron 10 minutos a 30 °C. Posteriormente, las células se centrifugaron a 2000g durante 2 minutos y el pellet se resuspendió en 10 mL de tampón spheroplasting (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1.4 M de Sorbitol) conteniendo 1 mg/mL de Zymoliasa 100T (Se ha de añadir en fresco). En este punto, las células se convirtieron en esferoplastos durante la incubación a 30 °C 30-60 minutos. Seguidamente se recogieron los esferoplastos por centrifugación a 1000 g a 4°C durante 5 minutos y se lavaron 2 veces con 10 mL de Sorbitol 1.4 M. Seguidamente, se

resuspendieron las células lisadas en 1.2 mL de tampón hipoosmótico (50mM de HEPES-KOH a pH 7.6, 200mM de Sorbitol y 1mM EDTA), conteniendo inhibidores de proteasa (Sigma) y 2 mM de PMSF. Las células se rompieron mecánicamente, los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 300 g durante 1 minuto a 4 °C y el lisado clarificado se centrifugó a 15000 g durante 15 minutos a 4 °C. Las muestras se resuspendieron en tampón hiposmótico y se añadieron a los gradientes de sacarosa (30-60%). Por último, se realizó una ultracentrifugación a 134000 g durante 60 minutos en la ultracentrífuga SW40 Ti Rotor (Beckman Coulter).

Tras la ultracentrifugación del gradiente continuo, se recogió de cada tubo todo el volumen de 200 µL en 200 µL desde la parte superior del tubo. Separando cada volumen en un Eppendorf perfectamente identificado con la muestra y fracción recogida.

3.7.2. Preparación del gradiente continuo de sacarosa

Se preparó un gradiente en continuo de sacarosa de concentraciones entre el 60 y 30 % en peso. Se prepararon las distintas concentraciones (60%, 50%, 40% y 30%) de sacarosa y se fueron añadiendo en tubos de mayor concentración a menor la misma cantidad de cada una de ellas. A continuación, se llevaron a un congelador a -80 °C. El gradiente continuo se generará durante la descongelación.

3.7.3. Precipitación de proteínas con TCA

Siguiendo el protocolo original de precipitación proteica con TCA de Luis Sánchez, se añadió a cada uno de los tubos Eppendorf con las fracciones separadas 1 volumen de TCA (Ácido tricloroacético) por cada 4 volúmenes de muestra proteica y se incubó a 4 °C durante 10 minutos. Se realizó un spin en la microcentrífuga a 14000 rpm durante 5 minutos, eliminando el sobrenadante y manteniendo el pellet de aspecto blanquecino. Seguidamente se lavó el pellet con 200 µL de acetona fría y se realizó de nuevo un spin en las mismas condiciones que el anterior. Se eliminó el sobrenadante y se repitió el lavado con acetona y se dejó secar el tubo en un termobloque a 95 °C entre 5 y 10 minutos. Por último, para realizar posteriormente la electroforesis se añadió tampón Laemmli al 2X y se colocó la muestra en un termobloque a 96 °C durante 10 minutos antes de cargarla en el gel de poliacrilamida.

3.7.4. Electroforesis de proteínas

Para la Electroforesis de las proteínas precipitadas en el paso anterior se emplearon geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) al 10%. Los geles se formaron con 2 fases: El gel de separación es el que está en la parte de abajo y en él las proteínas corren en función de su peso molecular, por otra parte se preparó el gel de empaquetamiento se localiza en la parte de arriba, es el que contiene los pocillos y su función es agrupar a todas las proteínas en una misma línea para que entren todas a la vez en el gel de separación. La composición del gel de separación es de 1,2 mL de acrilamida al 40%, 1,8 mL de H₂O, 3 mL tampón de separación 2x (Tris/HCL (0,75 M) pH 8.8, SDS (0,2% m/v)), 5 µL de TEMED y 50 µL de APS (10%, m/v). El gel de empaquetamiento se compone de 0,3 mL de acrilamida al 40%, 1,2 mL de H₂O, 1,5 mL de tampón de empaquetamiento 2x (Tris/HCL (0,25M) pH 6.8, SDS (0,2 %, m/v), 5 µL de TEMED, 50 µL APS (10%, m/v). Las condiciones para la electroforesis fueron, en primer lugar 30 minutos con una diferencia de potencial de 70 V y a continuación 100 V durante 2 horas, para ello se cubrió la cubeta con tampón de electroforesis SDS-PAGE 1x (glicina (0,19M), SDS (0,1%, m/v) a pH 8,3 ajustado con Tris). Se inyectaron las muestras de proteína precipitada con TCA resuspendida con tampón Laemmli 2x y se añadió en un pocillo el marcador de pesos moleculares (*PageRuler™ Prestained Protein Ladder*, Fermentas).

3.7.5. Transferencia de proteínas a membranas PVDF.

Tras la electroforesis es importante transferir las proteínas del gel a una membrana para realizar posteriormente la detección con anticuerpos. Se utilizaron las membranas *Immunoblot*[®] *PVDF* 0,45 μm (Amersham™ Hybond™, GE Healthcare) y el sistema *Mini-Trans Blot* (BioRad) para transferir las proteínas a la membrana con un potencial de 30 V durante toda la noche. Para realizar la transferencia el sistema se compone de unas carcassas de plástico sobre las que se colocan 2 esponjas, 4 papeles de filtro, la membrana PVDF y el gel, para esclarecer el montaje ver la figura 5.

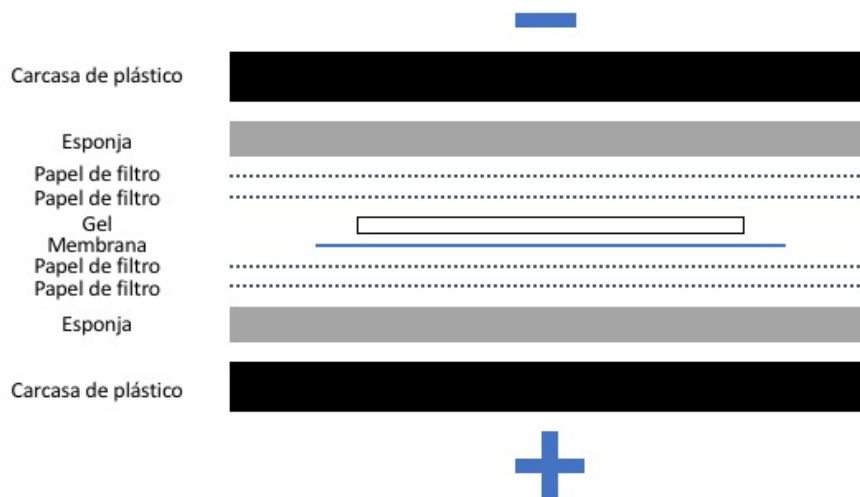


Figura 5. Esquema del montaje de la transferencia proteica. En la imagen se representan cada una de las partes del “sándwich” que se ha de formar para una correcta transferencia de proteínas.

Para la transferencia se utilizó el tampón de transferencia SDS-PAGE y metanol (20% v/v), para romper la unión SDS-proteína y así favorecer la unión de la proteína a la membrana.

3.7.6. Detección inmunológica de proteínas (Western Blot)

Para la detección inmunológica de proteínas se realizó la técnica del doble anticuerpo, primero se incubó la membrana con un anticuerpo que reconoce la proteína en cuestión y a continuación se incubó con un segundo anticuerpo que reconoce al primero y al añadir un sustrato genera una reacción colorimétrica que es detectable. En primer lugar, se utilizó una solución de bloqueo a base de leche en polvo (TBS 1x (NaCl (1,5 M), Tris/HCl (0,2 M) a pH 7.6), leche desnatada en polvo (2% m/v)) que actuó durante 30 minutos. Seguidamente se añadió el anticuerpo diluido (1:5000 en solución de bloqueo) α -PAP (Sigma) que actuó durante 60 minutos. Para continuar, se realizaron lavados de la membrana, 2 lavados de leche el polvo con TBS de 10 minutos en agitación cada uno de ellos y otros 2 con TBS 1x también en las mismas condiciones. Por último, se añadió el segundo anticuerpo α -HRP-rabbit (Sigma) con una dilución 1:10000 en TBS 1x, se incubó durante 1 hora y se realizaron 3 lavados con TBS 1x durante 10 minutos en agitación cada uno.

Para la detección inmunológica se empleó el sistema *ECL Prime Western Blotting Detection* (GE Healthcare - Amersham Bioscience), la señal de la reacción quimioluminiscente producida al añadir los sustratos (Luminol y Peróxido) a la membrana se observó con la cámara LAS-3000

(Fujufilm). Por último, el procesamiento de las imágenes y la cuantificación de la intensidad de la señal se realizaron con el programa Fiji (ImageJ) y las figuras se montaron con la ayuda de Adobe® Photoshop®.

3.8. Análisis Estadístico

Para el procesamiento de los datos de la RTPCR se obtuvo la media de las réplicas y se realizaron duplicados de cada una de las muestras obteniendo la media y la desviación típica representada en las barras de error de las gráficas. Para realizar los cálculos se empleó el programa de Microsoft Office® Excel®.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Estudio de genes implicados en mitofagia por ausencia de nutrientes en condiciones de inducción del reciclaje selectivo.

Como ya sabía de antemano y por resultados de estudios previos de nuestro grupo de investigación, los genes Atg son los que se han relacionado con el proceso de mitofagia inducida por daño mitocondrial (Timón-Gómez *et al.*, 2018), sin embargo no se conocen todos los genes o rutas implicadas en este proceso, es por ello que se han seleccionado de la bibliografía una serie de genes que están implicados en el proceso de la mitofagia o pueden estarlo (ver Tabla 2 localizada en el ANEXO 2), así como algunos factores de transcripción que podrían regular rutas interesantes en dicho proceso.

Para acelerar el proceso de mitofagia se generaron condiciones que favorecen el mismo, para ello se inoculó valinomicina que es un antibiótico obtenido a partir de algunas cepas de *Streptomyces* que produce una pérdida de potencial de membrana de la mitocondria. Es un ionóforo neutro de elevada afinidad por el ión potasio (K^+), permite su transporte a través de las membranas lipídicas. La membrana mitocondrial interna es impermeable al K^+ , pero la valinomicina actúa permitiendo su entrada en dicha matriz desestabilizando el gradiente generado y afectando por tanto al proceso de fosforilación oxidativa. En definitiva, la valinomicina produce un daño específico en la mitocondria que puede ser estudiado (Safulina *et al.*, 2006).

La valinomicina será el antibiótico empleado a lo largo de los diferentes experimentos que se analizarán en los diferentes apartados.

El experimento se llevó a cabo mediante ensayos de crecimiento de cepas mutantes de dichos genes en medio sólido YPD (DropTest). Como se observa en la tabla 2 (ANEXO 2) se seleccionaron genes que realizan diversas funciones. En un primer ensayo se pretendió establecer la concentración de Valinomicina necesaria para notar cambios en el crecimiento de la levadura. Se cultivaron en una placa de 96 pocillos 4 cepas a 28 °C, BY4741 como la cepa control Wild Type (WT), Δ HOG1, Δ SCH9 y Δ YME1. Se realizaron 3 diluciones seriadas de cada cepa habiendo partido de una concentración inicial de levadura de una $OD_{660}=1,5-2$. A continuación se añadió valinomicina a distintas concentraciones (0 μ M, 40 μ M y 100 μ M). A tiempo 0 no se añadió Valinomicina y se realizó un primer goteo y se añadió valinomicina, transcurridas las 2 horas se realizó un segundo goteo para observar cómo afectaba la concentración de Valinomicina a cada una de las cepas mutantes. (Figura 6)

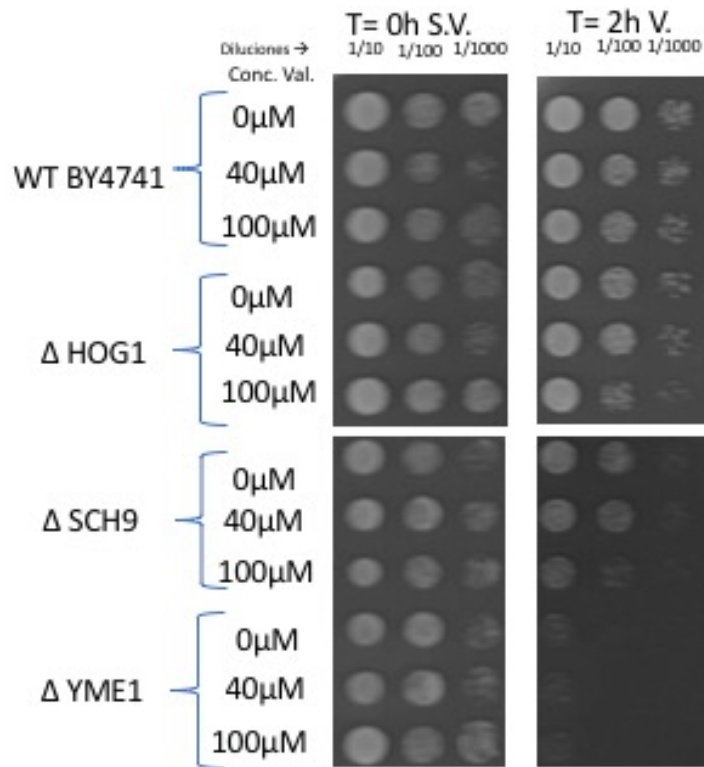


Figura 6. Ensayo de crecimiento en medio sólido YPD (DropTest) de las cepas BY4741, Δ HOG1, Δ SCH9 y Δ YME1. Se muestran las diferentes cepas mutantes crecidas en YPD en presencia de diferentes concentraciones de Valinomicina a 2 tiempos distintos. Donde Val. Es la abreviatura de Valinomicina. S.V es sin Valinomicina y V. Valinomicina.

Como se puede observar en la figura 6, la concentración de valinomicina más efectiva a la cual podían observarse cambios era a 100 μ M dado que en la mayoría de las cepas el crecimiento celular disminuye con esta concentración de valinomicina. Por otra parte, al comparar las 3 cepas mutantes se observó que el mutante Δ YME1 mostraba una reducción de crecimiento importante, dado que a las 2 horas no había prácticamente crecimiento en ninguna de las concentraciones de valinomicina (incluso en la de 0 μ M que pudo haber sido por contaminación con la fila superior). Se pueden lanzar la hipótesis de que el gen YME1 es necesario para la supervivencia celular cuando se induce daño mitocondrial. Como se ha nombrado en la tabla 2 (ANEXO 2), es la subunidad catalítica de un complejo de proteasas i-AAA, localizado en la membrana interna mitocondrial y responsable de la degradación de productos génicos mal plegados según los estudios de Rainey *et al.*, 2006. Al verse afectadas estas funciones de reparación la célula puede acabar entrando en apoptosis al acumular productos génicos en mal estado.

Por otra parte, también se puede observar como en el caso de la cepa Δ SCH9 también hay alteraciones en el crecimiento al tratar con valinomicina. SCH9 juega un papel importante en la respuesta celular a estrés osmótico como bien ha demostrado nuestro grupo de investigación en estudios previos (Pascual-Ahuir & Proft, 2007), es por lo que, al estar implicado en rutas de respuesta a estrés y estar mutado puede afectar negativamente a la viabilidad celular cuando se somete a la célula diferentes concentraciones de Valinomicina.

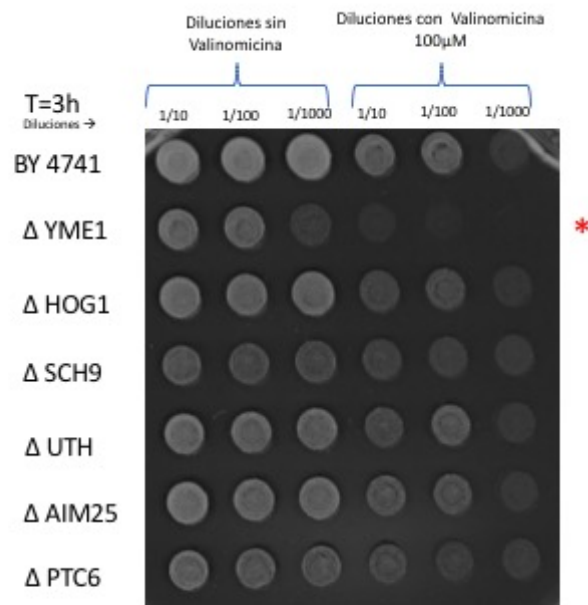


Figura 7. Ensayo de crecimiento en medio sólido de la cepa BY4741 y los mutantes Δ YME1, Δ HOG1, Δ SCH9, Δ UTH, Δ AIM25, Δ PTC6. Se muestra el crecimiento de las diferentes cepas crecidas en medio YPD tras 3 horas de incubación con valinomicina 100 μ M frente a un control sin valinomicina.

Siguiendo en la línea de los estudios de viabilidad celular en medio sólido, se siguieron estudiando diferentes mutantes de genes, esta vez se estableció una concentración de valinomicina de 100 μ M para continuar con el resto de estudios, manteniendo el mismo procedimiento, con las mismas diluciones celulares. En la figura 7 se muestra un estudio de los mismos genes estudiados en la figura 6 y se añadieron 3 mutantes más para comparar el crecimiento y afianzar el resultado anterior, además en este caso se eligió el crecimiento a las 3 horas de ser incubado con valinomicina porque fue la imagen donde mejor se observaron los cambios en el crecimiento. Como se indica en la figura 2 mediante un asterisco rojo, la cepa Δ YME1 tiene grandes dificultades para crecer por los motivos expuestos anteriormente y también puede observarse como Δ HOG1 parece tener también dificultades de crecimiento, respecto al resto de mutantes no pueden sacarse conclusiones tan obvias, aunque aparentemente el mutante Δ PTC6 tiene ciertas dificultades para crecer en presencia de valinomicina. Como se indica en la tabla 2 (ANEXO 2) PTC6 es una fosfatasa mitocondrial de tipo 2C implicada en la mitofagia, según el estudio realizado por Tal R, *et al.*, 2007, la fosfatasa mitocondrial PTC6 también llamada Aup1p se localiza en el espacio intermembrana y se ha visto que es necesaria para la supervivencia celular en fase estacionaria, se piensa que puede estar implicada en un mecanismo de transducción de señales que marca a las mitocondrias para el secuestro en autofagosomas.

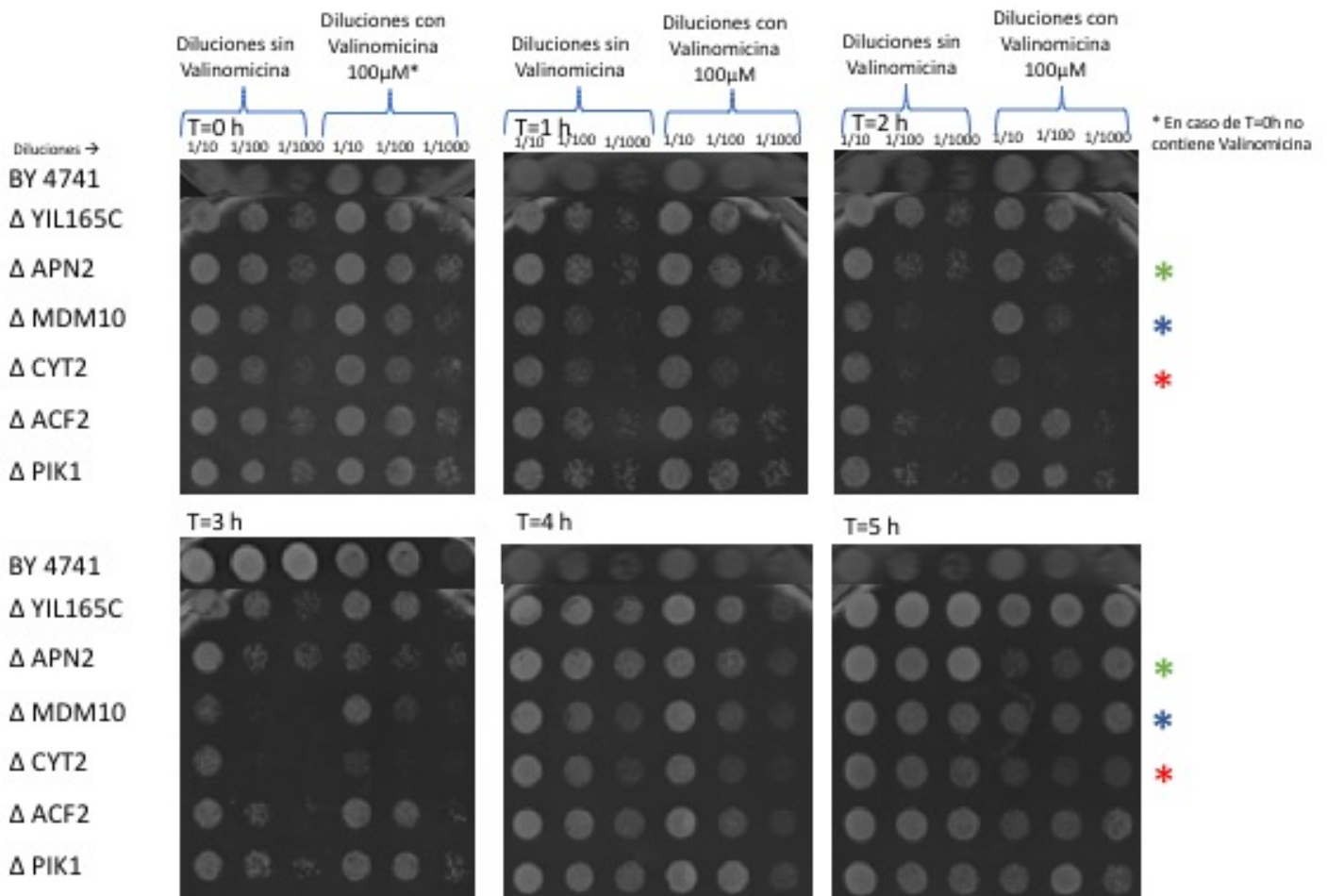


Figura 8. Ensayo de crecimiento en medio sólido de la cepa BY4741 y los mutantes Δ YIL165C, Δ APN2, Δ MDM10, Δ CYT2, Δ AIM25, Δ ACF2 y Δ PIK1. Se muestra el crecimiento de las diferentes cepas crecidas en medio YPD tras 5 horas de incubación con Valinomicina 100 μ M frente a controles sin valinomicina.

Se continuaron estudiando algunos mutantes de genes implicados en el proceso de mitofagia realizando el mismo proceso que el indicado anteriormente, es decir, fueron crecidos en YPD y añadido valinomicina a concentración de 100 μ M tomándose muestras cada hora mediante la técnica de goteo en placa durante 5 horas. En la figura 8 se puede observar el crecimiento de estos mutantes en estas condiciones. De los estudiados, cabe destacar a 3 de ellos marcados con asteriscos de colores. Δ APN2 muestra sensibilidad a la valinomicina, se trata de una endonucleasa abásica de clase II implicada en la reparación del daño del ADN, parece lógico pensar que al inducir un daño en la célula, con este gen mutado puede provocar que no pueda ejercer la función de reparación del ADN y así favorecer la entrada de la célula en apoptosis. Por otra parte, el mutante Δ MDM10 también parece estar afectado, aunque en menor medida, por los daños causado. MDM10 es una proteína de la membrana externa mitocondrial que se ha demostrado que juega un papel importante en la morfología mitocondrial, dado que el mutante de este gen, según estudios realizados, genera unas proteínas grandes con incapacidad de división (Sogo & Yaffe, 1994) y por tanto pudiendo afectar a la viabilidad celular. El último mutante que ve alterado su crecimiento en la figura 8 es Δ CYT2 que es el citocromo C1 hemoliasa implicado en la formación de apoformas mitocondriales, e implicado en la maduración del citocromo C1, puede ser que la mitofagia afecte al citocromo y sea necesario su recambio, aunque es una hipótesis porque no hay nada estudiado al respecto.

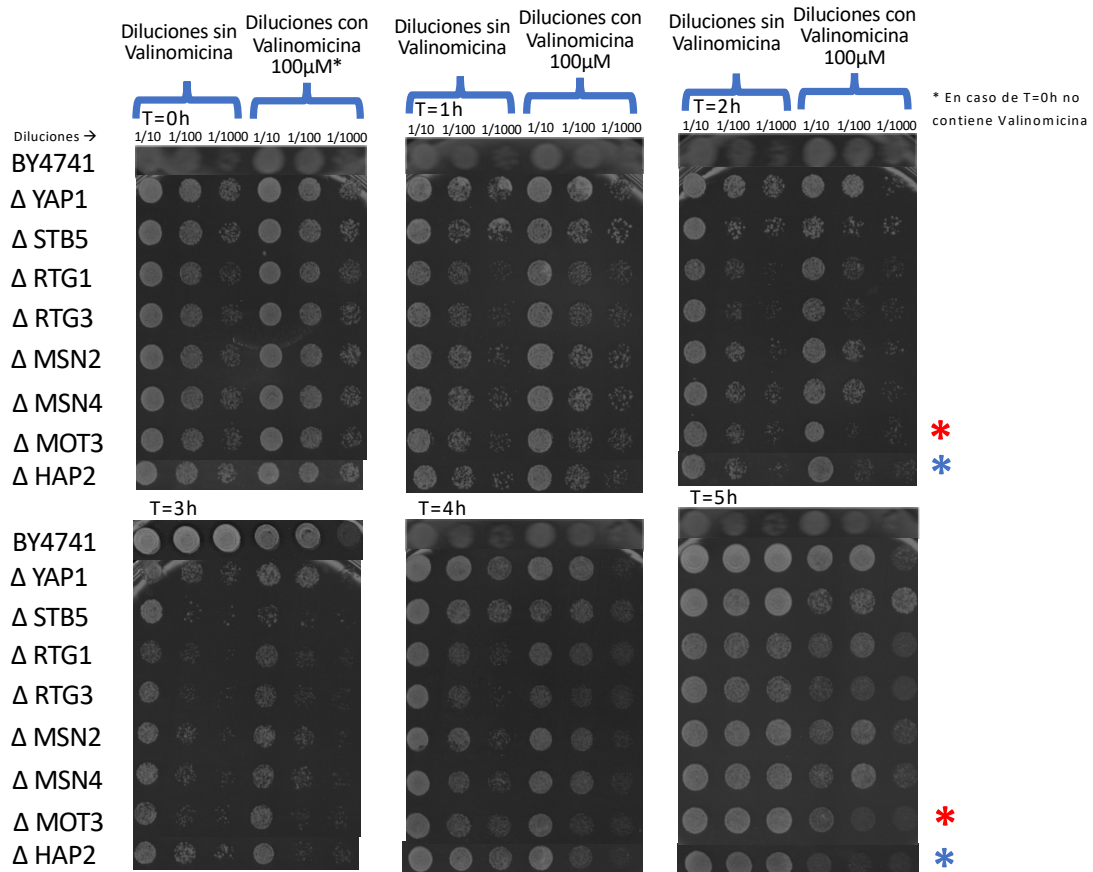


Figura 9. Ensayo de crecimiento en medio sólido de la cepa BY4741 y los mutantes de factores de transcripción Δ YAP1, Δ STB5, Δ RTG1, Δ RTG3, Δ MSN2, Δ MSN4, Δ MOT3 Y Δ HAP2. Se muestra el crecimiento de las diferentes cepas crecidas en medio YPD tras 5 horas de incubación con valinomicina 100 μ M frente a controles sin valinomicina.

Por último, se realizó un último ensayo en el cual se buscaron mutantes de factores de transcripción que pudiesen estar implicados en el proceso de mitofagia. Para ello, se siguió la misma metodología que la anteriormente comentada. Como se puede observar en la figura 9 se estudiaron los mutantes de cada uno de los factores de transcripción indicados en comparación con el WT, en presencia de valinomicina 100 μ M y tomándose muestras cada hora durante 5 horas. Destacados con asteriscos están los 2 mutantes a los cuales afectó más la valinomicina, indicando que podrían ser de gran interés en rutas implicadas en mitofagia. El primero de ellos es el mutante de MOT3, que según la bibliografía es un importante regulador de la levadura en situaciones de estrés osmótico. Se ha visto que este gen tiene función de activador y represor en la respuesta transcripcional a la hiperosmolaridad ya que coopera con activadores generales de respuesta a estrés que son MSN2 y MSN4 (estudiados también en la figura 9, pero no muestran demasiada sensibilidad a la valinomicina), por otro lado, también tiene un papel de regulador negativo de ciertos genes frente al estrés salino que actúan a nivel de la membrana celular y de transporte celular. (Martínez-Montañés *et al.*, 2013) Este resultado podría abrir nuevas vías de estudio de este factor de transcripción en la mitofagia. El mutante Δ HAP2 también presenta inhibición de crecimiento al tratar con valinomicina. HAP2 es un activador transcripcional y regulador de la expresión génica respiratoria. Este factor se requiere para las funciones respiratorias, se mantiene en niveles bajos y se activa con fuentes de carbono no fermentables (Pinkham & Guarente, 1985), por tanto, es esperable que al estar mutado la célula tenga dificultades para crecer en presencia de valinomicina dado que esta droga afecta a la función respiratoria.

Llegados a este punto, se deduce que hay una serie de genes que parecen estar implicados en la función mitocondrial, sin embargo, no se pueden obtener resultados concluyentes sobre los mismos, sería necesario estudiarlos en mayor profundidad y realizar más ensayos para corroborarlo.

4.2. Estudio de la regulación transcripcional de los componentes de la cadena de transporte electrónico mediante el método de RTPCR (Real Time PCR).

Se realizó un ensayo para determinar si los complejos de la cadena de transporte de electrones sufrían alguna regulación transcripcional al inducir daño mitocondrial por valinomicina. Para ello, se cultivaron en medio YPD e YPGal (para forzar la respiración de las levaduras) células de la cepa BY4741, en presencia de valinomicina 4 μ M realizando extracciones a diferentes tiempos (0h, 0,5h, 1h, 1,5h, 2h y 5h), se realizó la extracción del ARN a cada uno de esos tiempos siguiendo el método del ácido fenólico y se purificó con un kit comercial de QUIAGEN, seguidamente se pasó el ARN a ADNc mediante un protocolo de Invitrogen y una vez obtenido se procedió a realizar la RTPCR. Se emplearon *primers* para amplificar subunidades de cada uno de los complejos de la cadena transportadora de electrones y así poder ver el nivel de transcripción de los ARN de los genes estudiados. Los datos fueron tratados realizando duplicados de las reacciones de PCR de cada medio y cada *primer*, además se normalizaron con los niveles de expresión de actina para obtener niveles a ARNm relativo.

A continuación, en la Figura 10 se muestran los datos de expresión obtenidos de la RTPCR en medio YPGal, y en la Figura 11 se muestran los datos en medio YPD.

Como se puede observar en la figura 10, cada gráfico representa una subunidad de cada uno de los complejos, en el caso del complejo I (ND11) se observa una ligera tendencia de aumento de los niveles de ARNm relativo, sin embargo, en el complejo II (SDH2) parece haber una clara inducción de la transcripción dado que se aprecia que a la media hora se duplica la cantidad de transcritos de esta subunidad. El complejo III también parece que aumenta los niveles de ARNm pero más notablemente a las 2 horas de la incubación con valinomicina, en el complejo IV (COX6) también aumentan y en el V no demasiado.

El medio YPGal fuerza a la célula a respirar, con lo cual la maquinaria mitocondrial está funcionando con mayor intensidad.

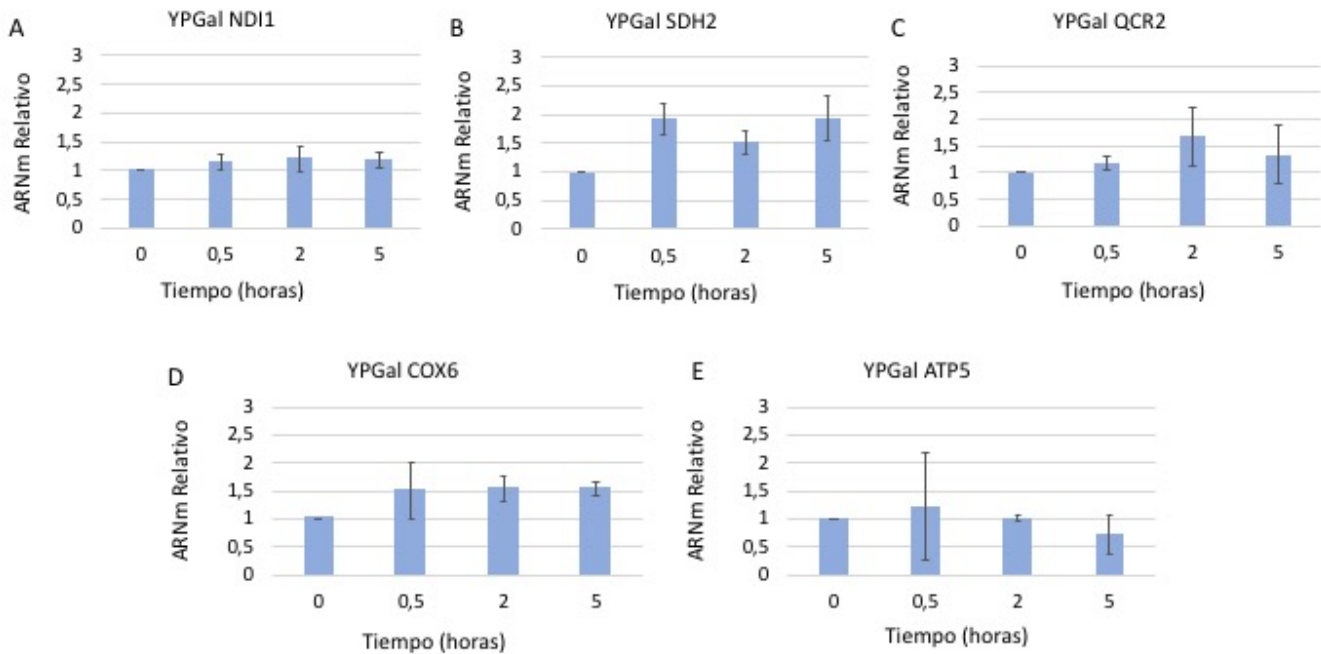


Figura 10. Gráficas de ARNm relativo de proteínas de complejos mitocondriales frente al tiempo de incubación con Valinomicina en medio YPGal. (A) Nivel de ARNm de NDI1 (NADH ubiquinona oxidoreductasa) proteína del complejo I. (B) Nivel de ARNm de SDH2 (Subunidad hierro-azufre de succinato deshidrogenasa), proteína del complejo II. (C) Nivel de ARNm de QCR2 (Subunidad 2 de ubiquinol citocromo-C reductasa), proteína del complejo III. (D) Nivel de ARNm de COX6 (Subunidad VI de citocromo -C oxidasa), proteína del complejo IV. (E) Nivel de ARNm de ATP5 (Subunidad 5 de la F_1F_0 de ATP sintasa, proteína del complejo V.

La representación de la figura 11 muestra los niveles de ARNm relativo en medio YPD en presencia de valinomicina a varios tiempos.

Se observa en dicha figura 11 cómo los niveles de ARNm relativo no aumentan tan claramente como lo hace en la figura 10 la cual representa el medio YPGal, de hecho, parece que en el complejo I (figura 11.A) incluso se reducen los transcritos para el NDI1. Sí es cierto que el complejo II (figura 11.B) parece haber una tendencia positiva al igual que se observa en el medio con YPGal, aunque cabe destacar la gran barra de error de las 5 horas que hace desconfiar bastante de ese dato. En el complejo III (figura 11.C) se aprecia un ligero aumento de los niveles de ARNm relativo a la media hora de tratar con valinomicina, sin embargo, al resto de horas decrecen bastante, algo similar ocurre con el resto de complejos. Es por ello que, no se pueden sacar resultados concluyentes de este medio, además las barras de error son más levadas que en el medio YPGal.

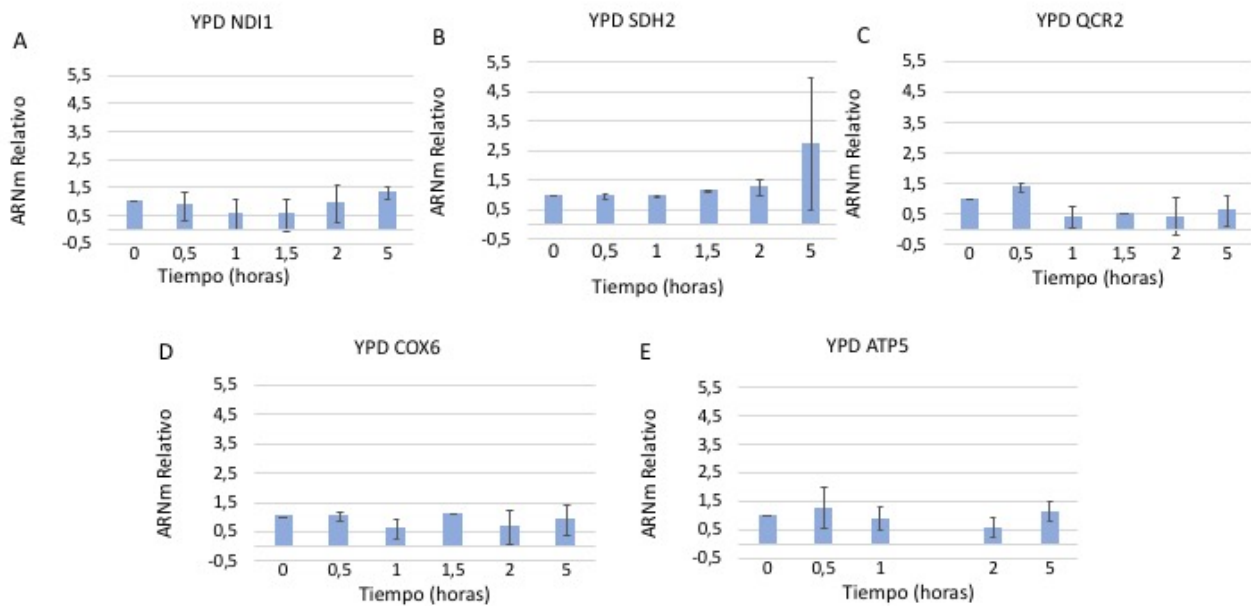


Figura 11. Gráficas de ARNm relativo de proteínas de complejos mitocondriales frente al tiempo de incubación con Valinomicina en medio YPD. (A) Nivel de ARNm de NDI1 (NADH ubiquinona oxidoreductasa) proteína del complejo I. (B) Nivel de ARNm de SDH2 (Subunidad hierro-azufre de succinato deshidrogenasa), proteína del complejo II. (C) Nivel de ARNm de QCR2 (Subunidad 2 de ubiquinol citocromo-C reductasa), proteína del complejo III. (D) Nivel de ARNm de COX6 (Subunidad VI de citocromo -C oxidasa), proteína del complejo IV. (E) Nivel de ARNm de ATP5 (Subunidad 5 de la F_1F_0 de ATP sintasa), proteína del complejo V.

Al comparar los niveles de transcritos de los dos medios, se observa que hay en general una mayor transcripción en medio YPGal (aunque no a unos niveles demasiado elevados), esto puede ser debido a que el medio YPGal fuerza a la célula a respirar, y por tanto a realizar mayor actividad mitocondrial mientras que el YPD permite a la levadura realizar la fermentación además de la respiración. En el primer caso, al solo poder respirar es de esperar que haya mayor actividad mitocondrial y por tanto mayor número de transcritos de los complejos mitocondriales. De los 5 complejos analizados, se observa que el complejo 2 parece mostrar mayores niveles de transcripción, sobretodo en medio YPGal, aunque como se ha dicho no a unos niveles demasiado elevados respecto del resto.

4.3. Microscopía de fluorescencia para el estudio de la mitofagia en diferentes cepas con la construcción Rosella.

Se ha indicado anteriormente que el proceso de mitofagia parece ser un proceso más selectivo que otros procesos de autofagia, dado que se produce cuando existe un daño específico en la mitocondria.

Con el fin de poder observar dicho proceso en el interior celular se propuso utilizar el sistema Rosella desarrollado por Mijaljica y colaboradores. Se emplea un reportero fluorescente (Rosella) que funciona como un biosensor dual formado por una proteína roja fluorescente que es resistente al pH de la vacuola (DsRed.T3) y otra que es sensible al pH (pHlourin), para que el reportero se localice en la mitocondria se fusiona con un péptido de localización mitocondrial (mt) (Mijaljica *et al.*, 2011). La forma en la que se observa la fluorescencia es, si no existe mitofagia, la mitocondria expresará tanto fluorescencia verde como roja, dado que el pH se mantiene, al no estar la mitocondria en el interior de la vacuola. Sin embargo, cuando la

mitocondria entra en el interior de la vacuola se observará solo fluorescencia roja en zonas cercanas a la mitocondria, pero diferenciadas que serán las vacuolas, y en estas zonas no se observará fluorescencia verde dado que esta proteína es sensible al pH.

Para observar este proceso de mitofagia se generaron condiciones que favorecen el mismo, para ello se inoculó valinomicina.

Se cultivaron las cepas en 2 medios, SD y SGal (para forzar la respiración) y estudiar si existía alguna diferencia entre los medios, se añadió valinomicina dejando controles a los que no se añadió antibiótico. Las cepas estudiadas fueron, el WT BY4741 y los mutantes Δ HOG1 y Δ YME1.

En la Figura 12 se comparan los 2 medios utilizados con la cepa WT, que son el SD y el SGal. En los 2 medios en presencia de Valinomicina se observan, al superponer las 2 imágenes (fluorescencia roja y verde) se observan pequeños puntos rojos alrededor de la red mitocondrial señalados con flechas que parecen indicar la presencia de las vacuolas reclutadas durante el proceso de mitofagia. Puesto que en los 2 medios se observa este proceso no se puede decir que uno sea mejor que otro para el estudio de la mitofagia, por ello, se empleó el medio SD dado que las células crecen mejor y más rápido que en SGal.

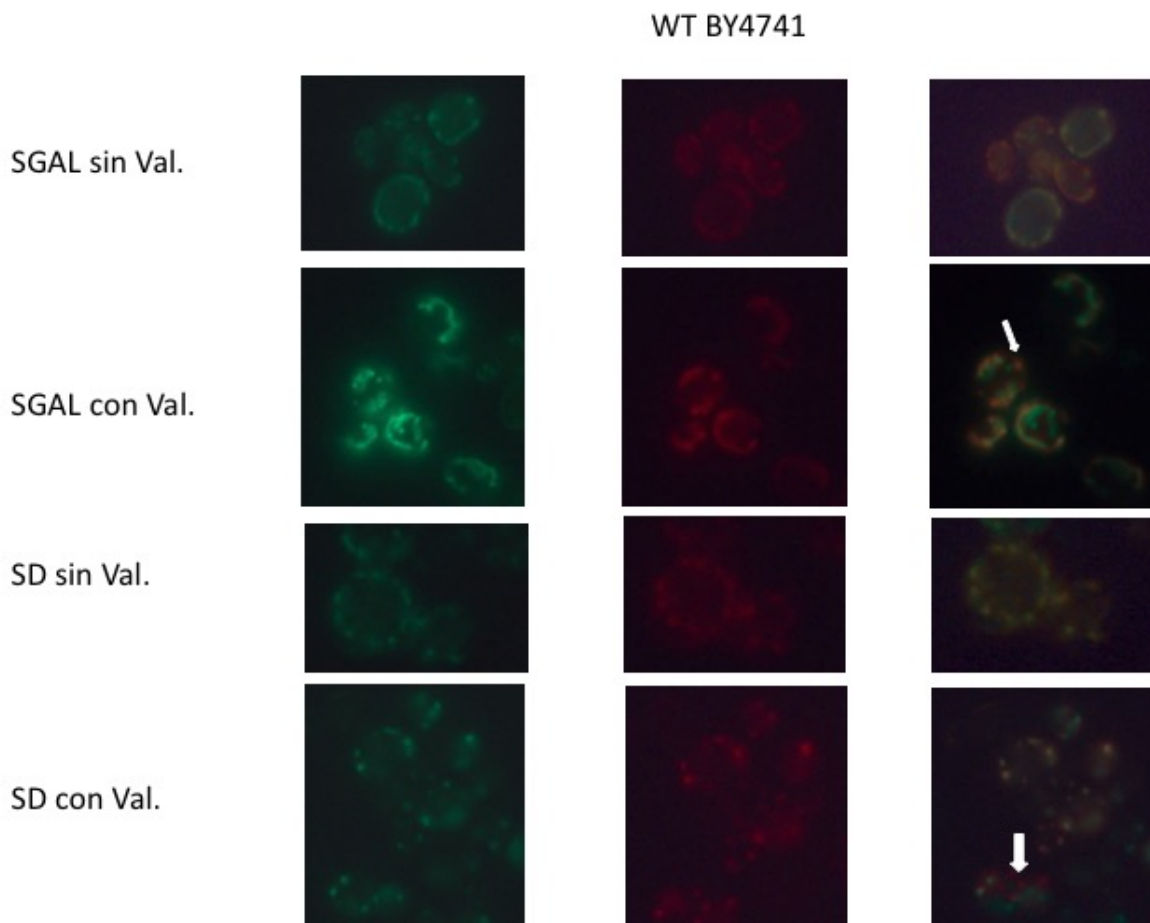


Figura 12. Detección de mitofagia en células de levadura mediante el sistema Rosella empleando un microscopio de fluorescencia. La tercera columna muestra la superposición de las 2 columnas anteriores. Las células de levadura BY4741 transformadas con el plásmido pVT100U-mtRosella fueron crecidas en 2 medios distintos (SD y SGal) en presencia y ausencia de Valinomicina (1mM) durante 2 horas. Parece observarse mitofagia en los 2 medios (indicado mediante las flechas blancas). Donde Val. Se refiere a Valinomicina.

Siguiendo con el medio SD, se continuó comparando algunos mutantes como el Δ HOG1 y Δ YME1 que se muestran en la figura 13. Sin embargo, de esta figura cabe destacar que debido a la baja calidad de la imagen del mutante Δ HOG1 con Valinomicina, no pueden sacarse resultados concluyentes. Sí es cierto que en el caso del mutante Δ YME1 sí parece haber presencia de mitofagia dado que hay fluorescencia roja en regiones donde no hay fluorescencia verde, lo que podría indicar la presencia de mitofagosomas como se indican en la flecha blanca.

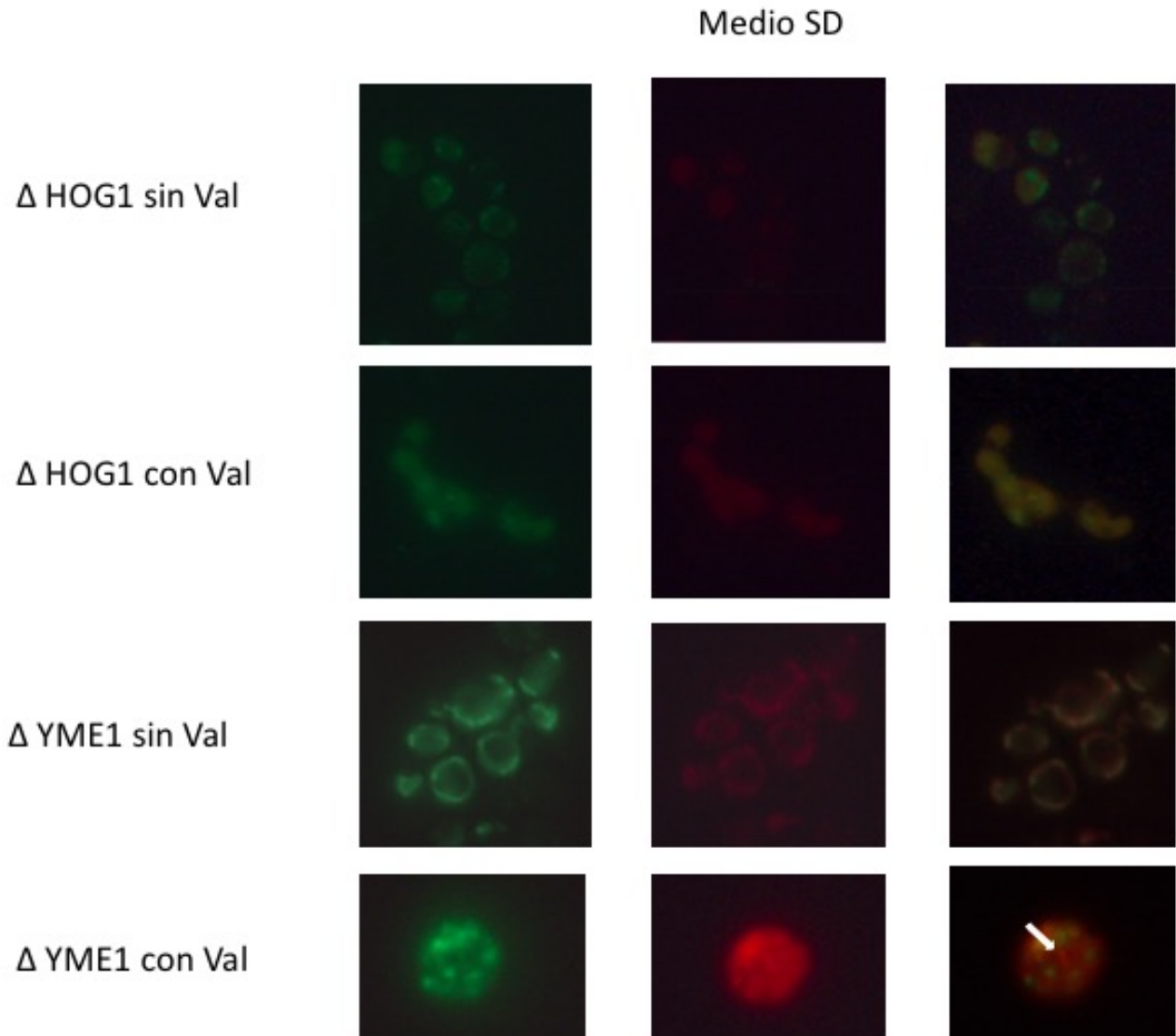


Figura 13. Detección de mitofagia en células de levadura mediante el sistema Rosella empleando un microscopio de fluorescencia. La tercera columna muestra la superposición de las 2 columnas anteriores. Las células de levadura transformadas con el plásmido pVT100U-mtRosella Δ HOG1 y Δ YME1 fueron crecidas en medio SD en presencia y ausencia de Valinomicina (1mM) durante 2 horas. Se indica la presencia de mitofagia con flechas blancas.

Por último, en una última figura 14 se comparó el WT BY4741 con el mutante Δ YME1 para comparar la mitofagia de ambas cepas, aunque la calidad de la foto de BY4741 no permita apreciar bien la mitofagia sí hay presencia de pequeños puntos rojos al superponer las 2 imágenes lo que hace suponer que existe mitofagia. Sin embargo, en el mutante Δ YME1 parece haber mayor presencia de mitofagia por los puntos rojos que rodean la red mitocondrial indicado con flechas blancas.

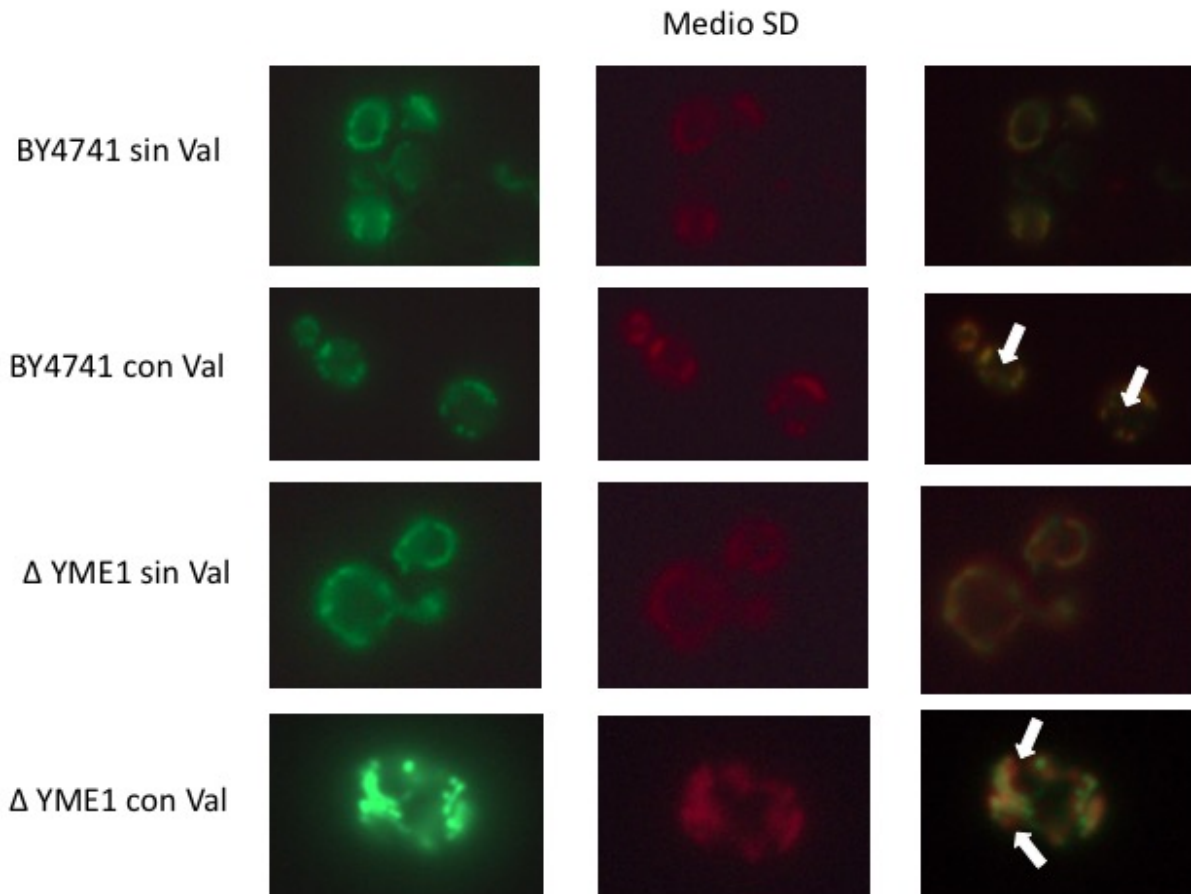


Figura 14. Detección de mitofagia en células de levadura mediante el sistema Rosella empleando un microscopio de fluorescencia. Las células de levadura transformadas con el plásmido pVT100U-mtRosella BY4741y Δ YME1 fueron crecidas en medio SD en presencia y ausencia de Valinomicina (1mM) durante 2 horas. Se indica la presencia de mitofagia con flechas blancas.

Como ya se ha apuntado en el primer punto de resultados, YME1 es la subunidad catalítica de un complejo de proteasas i-AAA, localizado en la membrana interna mitocondrial y responsable de la degradación de productos génicos mal plegados según los estudios de Rainey *et al.*, 2006. Es necesaria para la supervivencia celular cuando existe daño mitocondrial. Esto podría indicar que la ausencia de esta proteasa aceleraría el proceso de degradación mitocondrial por mitofagia al no poder realizar sus funciones de reparación celular, aunque esto es solo una mera hipótesis planteada frente a las observaciones (no cuantificadas) de los experimentos de microscopía.

4.4. Estudio del perfil fraccionamiento en gradiente de sacarosa de las proteínas de la ECT NDI1 y QCR2 y del receptor de mitofagia ATG8.

Con el fin de cubrir este objetivo se propuso el estudio de 4 cepas a las que se les añadió un epítipo TAP para la posterior inmunodetección, transformadas o bien con un fragmento de PCR que contenía el gen YME1 o bien con un plásmido con la constricción Rosella que ya se ha empleado posteriormente. Las cepas utilizadas fueron NDI1-TAP y QCR2-TAP transformadas con el fragmento amplificado por PCR de YME1 y por otra parte ATG8-TAP y ATG11-TAP transformadas con el plásmido pVT100-ROSELLA que ya ha sido empleado en el experimento anterior. Donde TAP funciona como un epítipo de 25 KDa que será empleado para la posterior inmunodetección. El objetivo estudiar los perfiles de fraccionamiento de los complejos mitocondriales I y II (utilizando las cepas NDI1-TAP y QCR2-TAP) y compararlos con el perfil de fraccionamiento del ATG8 que como se ha indicado con anterioridad se trata de un receptor necesario para la mitofagia. Para ello, en primer lugar, se crecieron las cepas en medio YPGal, posteriormente recuperando el contenido celular. A continuación, se siguió el protocolo de purificación del mitofagosoma descrito en materiales y métodos donde se lisan las células obteniendo el contenido proteico. Seguidamente se preparó el gradiente de sacarosa con unas concentraciones de entre el 30% y 60% se congeló a -80°C y durante la descongelación se generó un gradiente continuo.

El siguiente paso fue añadir los extractos proteicos al gradiente continuo de sacarosa y centrifugar con una ultracentrífuga. Se continuó extrayendo de cada tubo de gradiente alícuotas de 200 µL en 200 µL desde la parte superior hasta la inferior, con precaución de no mezclar las fases y se distribuyeron en tubos Eppendorf para a continuación precipitar las proteínas de cada uno de los tubos con TCA siguiendo el protocolo indicado en materiales y métodos.

Una vez obtenidas las muestras proteicas se realizó una electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y a continuación se realizó la transferencia a membranas PVDF para realizar la posterior inmunodetección siguiendo los protocolos indicados anteriormente.

A continuación, las figuras 15, 16 y 17 muestran los resultados del Western Blot de los geles de ATG8-TAP, NDI1-TAP y QCR2-TAP.

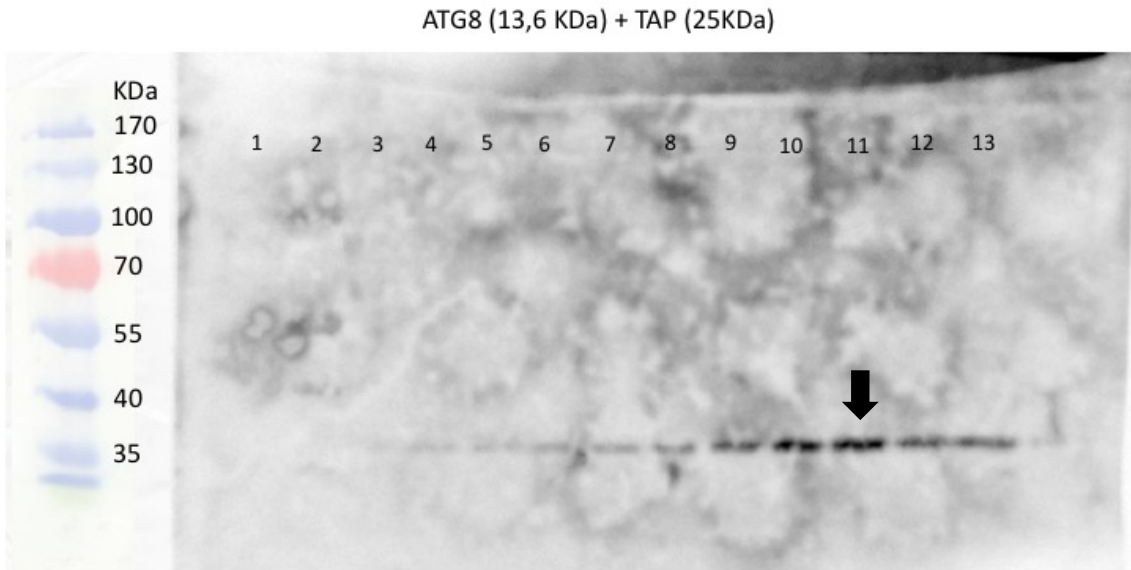


Figura 15. Western Blot que muestra el perfil de fragmentación mediante gradiente de sacarosa de la proteína ATG8-TAP. A la izquierda se encuentra el marcador de pesos moleculares en KDa, en la parte superior se indica el peso molecular del ATG8 y el peso molecular de TAP. Los números del 1 al 13 indican las fracciones recogidas tras el gradiente de sacarosa de menor densidad a mayor densidad. La banda que se observa corresponde a la suma del ATG8 + TAP (38,6 KDa). Señalada con una flecha la banda de mayor intensidad.

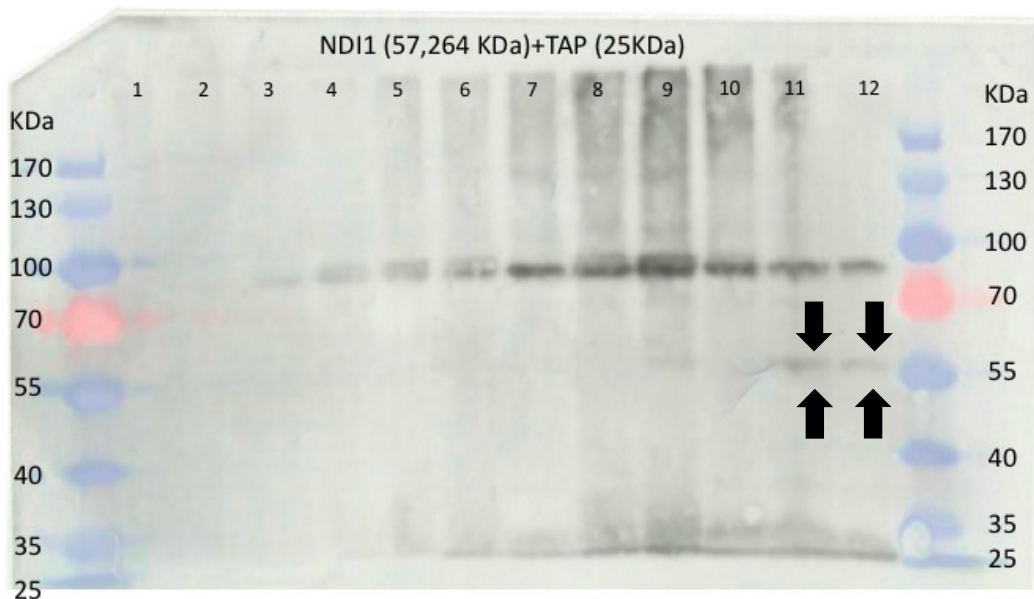


Figura 16. Western Blot que muestra el perfil de fragmentación mediante gradiente de sacarosa de la proteína NDI1-TAP. A ambos lados se encuentra el marcador de pesos moleculares en KDa, en la parte superior se indica el peso molecular del NDI1 y el peso molecular de TAP. Los números del 1 al 12 indican las fracciones recogidas tras el gradiente de sacarosa de menor densidad a mayor densidad. La banda que se observa corresponde a la suma del NDI1 + TAP (82,264 KDa). Señalados con flechas los productos de degradación de NDI1.

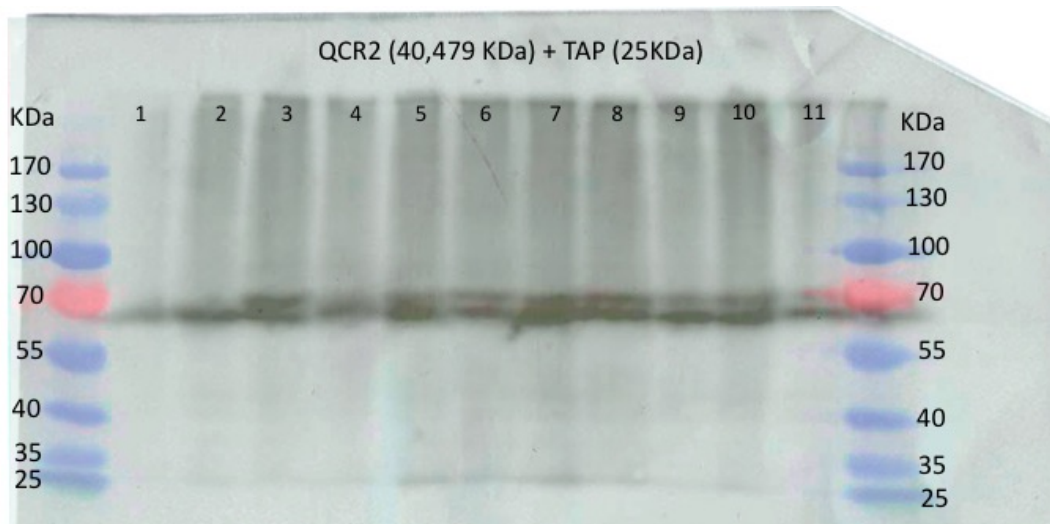


Figura 17. Western Blot que muestra el perfil de fragmentación mediante gradiente de sacarosa de la proteína QCR2-TAP. A ambos lados se encuentra el marcador de pesos moleculares en KDa, en la parte superior se indica el peso molecular de QCR2 y el peso molecular de TAP. Los números del 1 al 11 indican las fracciones recogidas tras el gradiente de sacarosa de menor densidad a mayor densidad. La banda que se observa corresponde a la suma del QCR2 + TAP (65,479 KDa).

Tras comparar las 3 figuras, y los patrones que muestran, se observa que el perfil de NDI1 recuerda al de ATG8 sin llegar a ser completamente iguales dado que las bandas de mayor intensidad en ambos casos se sitúan en las fracciones 8, 9, 10 y 11. Sin embargo, en el caso de QCR2, el patrón es completamente distinto. Cabe destacar, que en NDI1 (figura 16), en la fracción 11 se observa un producto de degradación, señalado con flechas, que es precisamente la fracción donde la banda de ATG8 (figura 15) aparece con mayor intensidad, lo que hace pensar que posiblemente en esa fracción se encuentre el mitofagosoma.

Se eligieron estas dos proteínas, NDI1 y QCR2, porque representan a los complejos I y III respectivamente y se ha visto en estudios previos (Timón-Gómez *et al.*, 2018) que estos 2 complejos sufren mitofagia simultáneamente. Se decidió realizar la comparación con ATG8, porque se ha visto también en dichos estudios que es un receptor que juega un papel importante en la generación del mitofagosoma y por tanto cabría esperar cierta similitud en los perfiles de los geles.

Estos resultados muestran un ensayo preliminar que podría abrir nuevas puertas para el estudio de la mitofagia, pudiendo ampliar los ensayos empleando otras proteínas localizadas en las mitocondrias como por ejemplo el transportador de piruvato que tiene localización mitocondrial, como también estudiar otras fuentes de carbono o en presencia de Valinomicina para favorecer el aumento de mitofagia.

5. CONCLUSIONES

Para finalizar la redacción de este trabajo, se proponen a continuación unas conclusiones generales extraídas de cada uno de los ensayos realizados para proporcionar una visión general de los resultados obtenidos:

1. En primer lugar, tras el estudio de los diferentes mutantes en presencia de valinomicina se encontraron ciertos genes que podrían ser necesarios en el reciclaje mitocondrial selectivo inducido por este antibiótico. Se han observado indicios en el caso de Δ YME1, Δ APN2, Δ MDM10, Δ CYT2, Δ MOT3 Y Δ HAP2.
2. El estudio de regulación transcripcional parece indicar que en medio YPGal existe un aumento moderado de los niveles de ARNm relativo de todos los complejos mitocondriales frente al medio YPD. Además, el complejo II presenta unos niveles transcripcionales ligeramente superiores al del resto de complejos.
3. En cuanto a la microscopía de fluorescencia para la observación de mitofagia selectiva, a nivel cualitativo las imágenes muestran, en el caso del mutante Δ YME1, la presencia de lo que podrían ser vesículas mitofágicas. Sería conveniente poder estudiar a nivel cuantitativo este proceso para valorar la implicación de esta proteasa en el proceso de la mitofagia.
4. Por último, los estudios de patrón de fraccionamiento indican diferentes perfiles para los complejos mitocondriales I y III siendo el patrón del complejo I similar al de ATG8. Esta metodología podría emplearse en el futuro para el estudio de más proteínas mitocondriales.

Por todo ello, este trabajo es de gran utilidad como punto de partida para el estudio de nuevos reguladores implicados en el proceso de mitofagia inducida por daño mitocondrial y aporta una visión general de lo complejo que es este proceso del que aún se desconocen muchas de las rutas implicadas en el mismo.

En el futuro podrían desarrollarse nuevos experimentos estudiando los genes que parecen tener una función importante en la mitofagia para aportar robustez a estos ensayos, así como realizar réplicas de los mismo para aumentar la N y dar mayor valor estadístico.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ACIN-PEREZ, R., & ENRIQUEZ, J. (2014). The function of the respiratory supercomplexes: The plasticity model. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1837(4), 444-450.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; & WALTER, P. (2008). *Molecular biology of the cell*, 5th edition. Editorial EDICIONES OMEGA.
- ALEXANDER, C.; VOTRUBA, M.; PESCH, U.; THISELTON, D. MAYER, S., & MOORE, A. ET AL. (2001). OPA1, encoding a dynamin-related GTPase is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *American Journal Of Ophthalmology*, 131(2), 289.
- and assembly. *Protein and Cell*, 4(8), 582–590.
- ALEXEYEV, M. (2009). Is there more to aging than mitochondrial DNA and reactive oxygen species?. *FEBS Journal*, 276(20), 5768-5787.
- ASHRAFI, G., & SCHWARZ, T. L. (2013). The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death and Differentiation*, 20(1), 31–42.
- BAILE, M. G.; & CLAYPOOL, S. M. (2013). The power of yeast to model diseases of the powerhouse of the cell. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 18(7), 241–78.
- BARRIENTOS, A.; & UGALDE, C. (2013). I Function, Therefore I Am: Overcoming Skepticism about Mitochondrial Supercomplexes. *Cell Metabolism*, 18(2), 147–149.
- BARROS, M. H.; DA CUNHA, F. M.; OLIVEIRA, G. A.; TAHARA, E. B.; & KOWALTOWSKI, A. J. (2010). Yeast as a model to study mitochondrial mechanisms in ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*, 131(7–8), 494–502.
- BHAT, A.; DAR, K.; ANEES, S.; ZARGAR, M.; MASOOD, A.; SOFI, M. & GANIE, S. (2015). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 74, 101-110.
- BOSSY-WETZEL, E.; BARSOUM, M. J.; GODZIK, A.; SCHWARZENBACHER, R. & LIPTON, S. A. (2003). Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. *Current opinion in cell biology*, 15(6), 706-716.
- CASTRO, M.; SUAREZ, E.; KRAISELBURD, E.; ISIDRO, A.; PAZ, J.; FERDER, L. & AYALA-TORRES, S. (2012). Aging increases mitochondrial DNA damage and oxidative stress in liver of rhesus monkeys. *Experimental Gerontology*, 47(1), 29-37.
- CHEN, G.; HAN, Z.; FENG, D.; CHEN, Y.; CHEN, L.; WU, H.; ... & DUAN, L. (2014). A regulatory signaling loop comprising the PGAM5 phosphatase and CK2 controls receptor-mediated mitophagy. *Molecular cell*, 54(3), 362-377
- CHINNADURAI, G.; VIJAYALINGAM, S. & GIBSON, S. B. (2009). BNIP3 subfamily BH3-only proteins: mitochondrial stress sensors in normal and pathological functions. *Oncogene*, 27(S1), S114.
- CLARK, I. E.; DODSON, M. W.; JIANG, C.; CAO, J. H.; HUH, J. R.; SEOL, J. H., ... & GUO, M. (2006). Drosophila pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature*, 441(7097), 1162.
- CROSS, D. A.; ALESSI, D. R.; COHEN, P.; ANDJELKOVICH, M. & HEMMINGS, B. A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, 378(6559), 785.
- DAN DUNN, J.; ALVAREZ, L. A.; ZHANG, X. & SOLDATI, T. (2015). Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox Biology*, 6, 472–485.
- DELETTRE, C.; LENAERS, G.; GRIFFOIN, J.; GIGAREL, N.; LORENZO, C. & BELENGUER, P. ET AL. (2001). Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *American Journal Of Ophthalmology*, 131(2), 288-289.
- FARRE, J.C. A& SUBRAMANI, S. (2016). Mechanistic insights into selective autophagy pathways: lessons from yeast. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 17(9) 537-552.

- FRIEDMAN, J. R.; & NUNNARI, J. (2014). Mitochondrial form and function. *Nature*, 505(7483), 335–343.
- GHAEMMAGHAMI, S.; HUH, W.-K.; BOWER, K.; HOWSON, R. W.; BELLE, A.; DEPHOURE, N. ET AL. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*, 425(6959), 737–741.
- GIETZ, R. D. & SCHIESTL, R. H. (2007). High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nature Protocols*, 2(1), 31–34.
- 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.
- HANNA, R. A.; QUINSAY, M. N.; OROGO, A. M.; GIANG, K.; RIKKA, S. & GUSTAFSSON, A. B. (2012). Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) interacts with Bnip3 to selectively remove endoplasmic reticulum and mitochondria via autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M111.
- HARDIE, D. G. (2005). New roles for the LKB1→ AMPK pathway. *Current opinion in cell biology*, 17(2), 167–173.
- HARRIS, S. L., & LEVINE, A. J. (2005). The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*, 24(17), 2899.
- HOLLENSWORTH, S.; SHEN, C.; SIM, J.; SPITZ, D.; WILSON, G. & LEDOUX, S. (2000). Glial cell type-specific responses to menadione-induced oxidative stress. *Free Radical Biology And Medicine*, 28(8), 1161–1174.
- HOLNESS, M. J., & SUGDEN, M. C. (2003). Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity by reversible phosphorylation.
- HOLT, I. J.; & REYES, A. (2012). Human Mitochondrial DNA Replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(12), a012971–a012971.
- HOSHI, M.; TAKASHIMA, A.; NOGUCHI, K.; MURAYAMA, M.; SATO, M.; KONDO, S.; ... & IMAHORI, K. (1996). Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(7), 2719–2723.
- KANKI, T. & KLIONSKY, D.J. (2008). Mitophagy in yeast occurs through a selective mechanism. *Journal Of Biological Chemistry* 283, 32386–32393.
- KEILIN, D., & HARTREE, E. (1947). Activity of the cytochrome system in heart muscle preparations. *Biochemical Journal*, 41(4), 500–502.
- KIJIMA, K.; NUMAKURA, C.; IZUMINO, H.; UMETSU, K.; NEZU, A. & SHIIKI, T. ET AL. (2004). Mitochondrial GTPase mitofusin 2 mutation in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Human Genetics*, 116(1-2), 23–27.
- KISSOVA, I.; DEFFIEU, M.; MANON, S. & CAMOUGRAND, N. (2004). Uth1p is involved in the autophagic degradation of mitochondria. *Journal Of Biological Chemistry*, 279, 39068–39074.
- KURODA, Y.; MITSUI, T.; KUNISHIGE, M.; SHONO, M.; AKAIKE, M.; AZUMA, H. & MATSUMOTO, T. (2006). Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells. *Human molecular genetics*, 15(6), 883–895.
- LANE, N. & MARTIN, W. (2010). The energetics of genome complexity. *Nature*, 467(7318), 929–934.
- LINN, T. C.; PETTIT, F. H. & REED, L. J. (1969). α -Keto acid dehydrogenase complexes, X. Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex from beef kidney mitochondria by phosphorylation and dephosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 62(1), 234–241.
- LIU, L.; FENG, D.; CHEN, G.; CHEN, M.; ZHENG, Q.; SONG, P.; ... & HUANG, L. (2012). Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nature cell biology*, 14(2), 177.
- LIU, L.; SAKAKIBARA, K.; CHEN, Q. & OKAMOTO, K. (2014). Receptor-mediated mitophagy in yeast and mammalian systems. *Cell Research*, 24(7), 787–795.

- MARTÍNEZ-MONTAÑÉS, F.; RIENZO, A.; POVEDA-HUERTES, D.; PASCUAL-AHUIR, A.; & PROFT, M. (2013). Activator and Repressor Functions of the Mot3 Transcription Factor in the Osmostress Response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 12(5), 636–647.
- MANNELLA, C. A.; MARKO, M.; PENCZEK, P.; BARNARD, D. & FRANK, J. (1994). The internal compartmentation of rat-liver mitochondria: Tomographic study using the high-voltage transmission electron microscope. *Microscopy research and technique*, 27(4), 278-283.
- MCBRIDE, H. M.; NEUSPIEL, M. & WASIAK, S. (2006). Mitochondria: More Than Just a Powerhouse. *Current Biology*, 16(14), 551–560.
- MÜLLER, M.; LU, K. & REICHERT, A. (2015). Mitophagy and mitochondrial dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1853(10), 2766-2774.
- MURPHY, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(Pt 1), 1–13.
- NATURE EDUCATION ©, 2010 <https://www.nature.com/scitable/content/the-electron-transport-system-ets-in-the-14897153>
- NAKATOGAWA, H.; SUZUKI, K.; KAMADA, Y. & OHSUMI, Y.(2009) Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nature Reviews. Molecular and Cell Biology*.10:458–467.
- NOVAK, I.; KIRKIN, V.; MCEWAN, D. G.; ZHANG, J.; WILD, P.; ROZENKNOP, A.; ... & REICHERT, A. S. (2010). Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO reports*, 11(1), 45-51.
- PASCUAL-AHUIR, A. & PROFT, M. (2007). The Sch9 kinase is a chromatin-associated transcriptional activator of osmotic stress-responsive genes. *The EMBO Journal*, 26(13), 3098–3108.
- PINKHAM, J. L. & GUARENTE, L. (1985). Cloning and molecular analysis of the HAP2 locus: a global regulator of respiratory genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 5(12), 3410–3416.
- RAINEY, R. N.; GLAVIN, J. D.; CHEN, H.-W.; FRENCH, S. W.; TEITELL, M. A. & KOEHLER, C. M. (2006). A New Function in Translocation for the Mitochondrial i-AAA Protease Yme1: Import of Polynucleotide Phosphorylase into the Intermembrane Space. *Molecular and Cellular Biology*, 26(22), 8488–8497.
- ROSADO, C. J.; MIJALJICA, D.; HATZINISIRIOU, I.; PRESCOTT, M.; & DEVENISH, R. J. (2008). Rosella: A fluorescent pH-biosensor for reporting vacuolar turnover of cytosol and organelles in yeast. *Autophagy*, 4(2), 205-213.
- SAFIULINA, D.; VEKSLER, V.; ZHARKOVSKY, A.; & KAASIK, A. (2006). Loss of mitochondrial membrane potential is associated with increase in mitochondrial volume: Physiological role in neurons. *Journal of Cellular Physiology*, 206(2), 347–353.
- SACCHAROMYCES GENOME DATABASE (SGD) (<http://www.yeastgenome.org/>)
- SCHAGGER, H. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *The EMBO Journal*, 19(8), 1777-1783.
- SANDOVAL, H.; THIAGARAJAN, P.; DASGUPTA, S. K.; SCHUMACHER, A.; PRCHAL, J. T.; CHEN, M. & WANG, J. (2008). Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. *Nature*, 454(7201), 232.
- SLATER, E. (2003). Keilin, Cytochrome, and the Respiratory Chain. *Journal Of Biological Chemistry*, 278(19), 16455-16461
- SOGO, LF. & YAFFE, MP. (1994) Regulation of mitochondrial morphology and inheritance by Mdm10p, a protein of the mitochondrial outer membrane. *Journal Of Cell Biology*, 126(6):1361-73
- SOKOL, A. M.; SZTOLSZTENER, M. E.; WASILEWSKI, M.; HEINZ, E. & CHACINSKA, A. (2014). Mitochondrial protein translocases for survival and wellbeing. *FEBS Letters*, 588(15), 2484–2495.

- SOWTER, H. M.; RATCLIFFE, P. J.; WATSON, P.; GREENBERG, A. H. & HARRIS, A. L. (2001). HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer research*, 61(18), 6669-6673.
- STUART, R. A. (2008). Supercomplex organization of the oxidative phosphorylation enzymes in yeast mitochondria. *Journal Of Bioenergetics And Biomembranes*, 40(5), 411-417.
- TAL, R.; WINTER, G.; ECKER, N.; KLIONSKY, D. & ABELIOVICH, H. (2006). Aup1p, a Yeast Mitochondrial Protein Phosphatase Homolog, Is Required for Efficient Stationary Phase Mitophagy and Cell Survival. *Journal Of Biological Chemistry*, 282(8), 5617-5624.
- TIMÓN-GÓMEZ, A.; SANFELIU-REDONDO, D.; PASCUAL-AHUIR, A. & PROFT, M. (2018). Regulation of the Stress-Activated Degradation of Mitochondrial Respiratory Complexes in Yeast. *Frontiers in Microbiology*, 9, 106.
- VARTAK, R.; PORRAS, C. A. M. & BAI, Y. (2013). Respiratory supercomplexes: structure, function and assembly. *Protein & Cell*, 4(8), 582-590.
- VOETS, A.; HUIGSLOOT, M.; LINDSEY, P.; LEENDERS, A.; KOOPMAN, W. & WILLEMS, P. ET AL. (2012). Transcriptional changes in OXPHOS complex I deficiency are related to antioxidant pathways and could explain the disturbed calcium homeostasis. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis Of Disease*, 1822(7), 1161-1168. doi: 10.1016/j.bbadis.2011.10.009
- WALLACE, D. C. (2005). A Mitochondrial Paradigm of Metabolic and Degenerative Diseases, Aging, and Cancer: A Dawn for Evolutionary Medicine. *Annual Review of Genetics*, 39, 359.
- WEI, Y.; LU, C.; WEI, C.; MA, Y. & LEE, H. (2001). Oxidative Stress in Human Aging and yeast mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 40(5), 411-417.
- YOULE, R. J. & NARENDRA, D. P. (2011). Mechanisms of mitophagy. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 12(1), 9-14.
- ZHU, Y.; MASSEN, S.; TEREZIO, M.; LANG, V.; CHEN-LINDNER, S.; EILS, R., ... & BRADY, N. R. (2013). Modulation of serines 17 and 24 in the LC3-interacting region of Bnip3 determines pro-survival mitophagy versus apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 288(2), 1099-1113.

7. ANEXOS

En este punto se encuentra el material complementario nombrado en el texto anteriormente.

7.1. ANEXO 1, Tabla 1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* empleadas.

Tabla 1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* empleadas. En esta tabla se describen los mutantes de levadura utilizados para el estudio, su genotipo y su procedencia.

Cepa	Genotipo	Procedencia
BY47471	MAT α ; his3 Δ 1; Leu2 Δ 0; Met15 Δ 0; Ura3	Euroscarf
Mutantes de delección		
Δ HOG1	BY4741 <i>HOG1</i> ::KANMX4	Euroscarf
Δ SCH9	BY4741 <i>SCH9</i> ::KANMX4	Euroscarf
Δ YME1	BY4741 <i>YME1</i> ::KANMX4	Euroscarf
Δ UTH1	BY4741 <i>UTH1</i> ::KANMX4	Euroscarf
Δ AIM25	BY4741 <i>AIM25</i> ::KANMX4	Euroscarf
Δ PTC6	BY4741 <i>PTC6</i> ::KANMX4	Euroscarf
Δ YIL165(C)	BY4741 <i>YIL165</i> ::KANMX4	Euroscarf
Δ APN2	BY4741 <i>APN2</i> ::KANMX4	Euroscarf
Δ MDM10	BY4741 <i>MDM10</i> ::KANMX4	Euroscarf
Δ CYT2	BY4741 <i>CYT2</i> ::KANMX4	Euroscarf
Δ ACF2	BY4741 <i>ACF2</i> ::KANMX4	Euroscarf
Δ PIK1	BY4741 <i>PIK1</i> ::KANMX4	Euroscarf
Δ YAP 1	BY4741 <i>YAP1</i> ::KANMX4	Euroscarf
Δ STB5	BY4741 <i>STB5</i> ::KANMX4	Euroscarf
Δ RTG3	BY4741 <i>RTG3</i> ::KANMX4	Euroscarf
Δ MSN2	BY4741 <i>MSN2</i> ::KANMX4	Euroscarf
Δ MSN4	BY4741 <i>MSN4</i> ::KANMX4	Euroscarf
Δ MOT3	BY4741 <i>MOT3</i> ::KANMX4	Euroscarf
Δ HAP2	BY4741 <i>HAP2</i> ::KANMX4	Euroscarf
Cepas con el epítipo TAP		
ATG8-TAP	BY4741 <i>ATG8-TAP</i> ::His3MX	<i>Ghaemmaghami et al., 2003</i>
ATG11-TAP	BY4741 <i>ATG11-TAP</i> ::His3MX	<i>Ghaemmaghami et al., 2003</i>
NDI1-TAP	BY4741 <i>NDI1-TAP</i> ::His3MX	<i>Ghaemmaghami et al., 2003</i>
QCR2-TAP	BY4741 <i>QCR2-TAP</i> ::His3MX	<i>Ghaemmaghami et al., 2003</i>

7.2. ANEXO 2, Tabla 2. Descripción de la función de los genes mutados empleados en los diferentes experimentos.

Tabla 2. Descripción de la función de los genes mutados empleados en los diferentes experimentos. Información recuperada de SGD (<http://www.yeastgenome.org/>)

Nomenclatura estándar	Nomenclatura Sistemática	Descripción de la función del gen mutado
BY4741		Cepa de laboratorio derivada de SC288C
HOG1	YLR113W	<i>(High Osmolarity Glycerol response)</i> . Proteína quinasa activada por mitógeno implicada en la osmorregulación.
SCH9	YHR205W	Proteína quinasa de la familia AGC; implicada en la transactivación de genes que responden a estrés osmótico.
YME1	YPR024W	<i>(Yeast Mitochondrial Scape)</i> Subunidad catalítica del complejo de proteasa i-AAA; complejo se encuentra en la membrana interna mitocondrial; responsable de la degradación de productos genéticos mitocondriales desplegados o mal plegados.
UTH1	YKR042W	Proteína de la membrana interna mitocondrial, su papel en la mitofagia es controvertido.
AIM25	YJR100C	<i>(Altered Inheritance of Mitochondria)</i> Proteína mitocondrial de función desconocida; involucrado en el mantenimiento de la integridad de la red mitocondrial; regulador negativo del flujo de mitofagia.
PTC6	YCR079W	Fosfatasa mitocondrial del tipo 2C (PP2C), involucrada en mitofagia.
YIL165(C)	YIL165C	Proteína putativa de función desconocida. El mutante muestra defectos de mitofagia.
APN2	YBL019W	<i>(APurinic/aprimidinic eNdonuclease)</i> Endonucleasa abásica (AP) de clase II implicada en la reparación del daño del ADN.
MDM10	YAL010C	<i>(Mitochondrial Distribution and Morphology)</i> Componente del complejo ERMES que actúa como un enlace molecular entre las mitocondrias y el RE, necesario para el intercambio eficaz de fosfolípidos entre los orgánulos y la mitofagia.
CYT2	YKL087C	Citocromo C1 hemoliasa involucrado en la maduración del citocromo C1 que se encuentra en la mitocondria.
ACF2	YLR144C	<i>(Assembly Complementing Factor)</i> Beta-1,3-endonucleasa intracelular. Se asocia con un papel en el ensamblaje del citoesqueleto de actina cortical. La abundancia de esta proteína aumenta en respuesta al estrés de replicación de DNA

PIK1	YNL267W	Fosfatidil Inositol 4-quinasa; puede controlar la autofagia y mitofagia no selectiva a través del tráfico de Atg9p
YAP 1	YML007W	(<i>Yeast AP-1</i>) Factor de transcripción básico de cremallera de leucina (bZIP); requerido para la tolerancia al estrés oxidativo; activado por H ₂ O ₂
STB5	YHR178W	(<i>Sin Three Binding protein</i>) Factor de transcripción; involucrado en la regulación de la resistencia a múltiples fármacos y la respuesta al estrés oxidativo
RTG1	YOL067C	(<i>ReTroGrade regulation</i>) Factor de transcripción (bHLH) involucrado en la comunicación interorganular; contribuye a la comunicación entre las mitocondrias, los peroxisomas y el núcleo, Objetivo de Hog1p
RTG3	YBL103C	(<i>ReTroGrade regulation</i>) Factor de transcripción bHLH/Zip para vías retrógradas (RTG) y TOR; forma un complejo con otra proteína bHLH/Zip, Rtg1p, para activar las vías; objetivo de Hog1p
MSN2	YMR037C	(<i>Multicopy suppressor of SNF1 mutation</i>) Activador transcripcional sensible al estrés.
MSN4	YKL062W	(<i>Multicopy suppressor of SNF1 mutation</i>) Activador transcripcional sensible al estrés.
MOT3	YMR070W	(<i>Modifier of Transcription</i>) Represor transcripcional, activador; papel en el ajuste celular al estrés osmótico
HAP2	YGL237C	(<i>Heme Activator Protein</i>) Subunidad del complejo de unión a CCAAT Hap2p/3p/4p/5p; el complejo es un activador transcripcional y regulador global de la expresión génica respiratoria.
ATG8	YBL078C	(<i>AuTophagy related</i>) Componente de autofagosoma; proteína única tipo ubiquitina cuyo objetivo de conjugación es la fosfatidiletanolamina lipídica (PE); Atg8p-PE está anclado a las membranas, está involucrado en la expansión de fagóforo y puede mediar la fusión de la membrana durante la formación del autofagosoma.
ATG11	YPR049C	(<i>AuTophagy related</i>) Proteína adaptadora para la pexofagia y la vía de selección de Cvt; carga la carga unida al receptor al sitio de ensamblaje de fagóforo (PAS) para el empaquetamiento en vesículas.
NDI1	YML120C	NADH ubiquinona oxidorreductasa; transfiere electrones de NADH a ubiquinona en la cadena respiratoria, pero no bombea protones.

QCR2	YPR191W	Subunidad 2 de ubiquinol citocromo-c reductasa (Complejo III); componente de la cadena de transporte de electrones de la membrana interna mitocondrial.
------	---------	---
