

Valencia, junio 2019



**UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA**

Trabajo final de grado en Biotecnología

**Diseño de herramientas biotecnológicas
para el estudio de la mitofagia selectiva en
Saccharomyces cerevisiae.**

Autora:

Irene Bayo Cano

Tutora: Amparo Pascual-Ahuir Giner

Tutor externo: Dr. Markus Proft

Curso:

2018-2019



**Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural**



RESUMEN

Datos del TFG:

Autor:	Irene Bayo Cano
Tutor de la UPV:	Dra. Amparo Pascual-Ahuir
Tutor externo:	Dr. Markus Proft
Titulación:	Grado en Biotecnología
Título del trabajo:	<i>“Diseño de herramientas biotecnológicas para el estudio de la mitofagia selectiva en Saccharomyces cerevisiae.”</i>
Lugar de realización:	Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP)
Localidad y fecha:	Valencia, junio de 2019

Palabras clave:

Mitofagia, estrés, *Saccharomyces cerevisiae*

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. 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 trabajo se pretende diseñar nuevas herramientas biotecnológicas que permitan un estudio molecular de la mitofagia selectiva.

Keywords:

Mitophagy, stress, *Saccharomyces cerevisiae*

Abstract:

Mitophagy is a specific type of autophagy that plays an essential role in the maintenance of mitochondrial homeostasis. It is also a process that ensures the maintenance of mitochondrial quality in 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 system highly valued in the molecular biology of basic processes, and an excellent tool for the study of mitophagic processes. Recently, it has been found that adaptation to stress requires selective mitochondrial activation, for example, in the case of the pyruvate transporter Mpc, it is based on the coordinated regulation of specific subunits of the complex. So far, the study of mitophagy in yeast has focused almost exclusively on the mitophagy induced by fasting nutrients, while in mammalian cells it is well established that mitophagy counteracts the damage caused by the depolarization of mitochondria, and its incorrect functioning is associated with Parkinson's disease. In this work, it is intended to design new biotechnological tools that allow a molecular study of selective mitophagy.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo supone el fin de mi etapa universitaria, y por tanto, la finalización del grado de Biotecnología. Estos cuatro años han sido un periodo de aprendizaje y maduración a nivel académico que me han permitido adquirir herramientas que me servirán para mi futuro profesional. Asimismo, esta maduración también ha sido a nivel personal ayudándome a adoptar nuevos valores imprescindibles como futura trabajadora como el respeto y saber el trabajo en grupo.

Para comenzar, quería agradecer a todo el profesorado de Biotecnología de la UPV por compartir sus conocimientos tanto teóricos como prácticos con nosotros, por su paciencia y amabilidad en todo momento. En especial, quería dar las gracias a Amparo Pascual-Ahuir Giner por aceptar ser mi tutora y ayudarme a hacer posible este trabajo. Su apoyo, consejos y explicaciones en el laboratorio han sido de gran ayuda en todo el transcurso de este proceso.

No puedo dejar de dar las gracias a mis padres por tener siempre su apoyo a lo largo de toda mi etapa estudiantil, incluida la universitaria. Por ser los que siempre me han ayudado en los momentos más difíciles, haciendo de mis problemas también los suyos, haciéndolos más pequeños y superándolos juntos. Mamá, papá, gracias por siempre escucharme con la máxima atención cuando os cuento lo que estoy estudiando o haciendo en el laboratorio, aunque no entendáis la mayoría de lo que os esté diciendo. Gracias por enseñarme que ser constante y trabajador son dos de las más importantes cualidades en estas etapas. Y gracias por hacer todo lo que ha estado en vuestra mano para que estudiar haya sido lo más fácil posible. Otro punto de apoyo siempre ha sido mi tío Fernando. Gracias, tío, por tu continuo interés en mis estudios, gracias por tus consejos y por ejercer como un segundo padre para mí.

Por último, mencionar a todas las nuevas amistades que he hecho gracias a este grado, y también a las que han estado ahí desde siempre.

ABREVIATURAS

ATP adenosín trifosfato
ADN ácido desoxirribonucleico
NADH nicotinamida adenina dinucleótido
SOD superóxido dismutasa
CAT catalasa
ANT Translocasa de nucleótido de adenina
VDAC canal de aniones dependiente de voltaje
GPx glutatión peroxidasa
ATG autofagia
CK2 creatina quinasa 2
PINK1 protein induced kinase 1
MOMP membrana mitocondrial externa
AIF factor inductor de la apoptosis
MAC canal mitocondrial inducido por apoptosis
PTP poro de transición de la permeabilidad
FADH2 dinucleótido de adenina flavina reducida
ETC cadena transportador de electrones
GTP guanosín trifosfato
OXPHOS fosforilación oxidativa
ETC cadena de transporte electrónica
VDAC canal de aniones dependiente de voltaje
ROS especies de oxígeno reactivas
YPD Medio rico: extracto de levadura Peptona-Dextrosa
Tris (Hidroximetil) Aminometano
TAE Tris-Acetato-EDTA
SD Medio sintético con glucosa
SGal Medio sintético con galactosa
PEG Polietilenglicol
DsRed Proteína roja fluorescente de *Discosoma sp.*
mtRosella Rosella mitocondrial
Coh cohesina
Doc doquerina
pb pares de bases
PCR reacción en cadena de la polimerasa
dNTP desoxirribonucleótidos trifosfato
TAP Tandem affinity purification
FosfATP fosfatasa alcalina termosensible

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1. LA MITOCONDRIA.....	1
a. FUNCIONES.....	1
b. CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL	2
c. LA MITOCONDRIA Y EL ESTRÉS OXIDATIVO	3
2. LA LEVADURA COMO MODELO DE ESTUDIO DE LA MITOCONDRIA.....	4
3. LA AUTOFAGIA Y LA MITOFAGIA	5
a. LA MITOFAGIA EN LEVADURA.....	6
b. LA MITOFAGIA EN CÉLULAS DE MAMÍFEROS.....	7
4. APOPTOSIS	9
5. ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS.....	10
OBJETIVOS.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
Material biológico y condiciones de crecimiento	12
Condiciones de crecimiento de levadura.....	12
Condiciones de crecimiento de bacteria.....	12
Cepas, plásmidos y cebadores utilizados.....	12
Métodos generales para la obtención de DNA recombinante	13
Extracción de ADN genómico	13
Digestión.....	13
Ligación	13
Utilización de fosfatasas	14
Purificación de ADN.....	14
PCR + Gel de electroforesis para comprobar la PCR.....	14
Transformación en levadura.....	14
Transformación en bacterias.....	15
Microscopía y fluorescencia	15
RESULTADOS.....	16
DISEÑO Y OBTENCIÓN DE CEPAS OM45-COH.....	16
DISEÑO Y OBTENCIÓN DE CEPAS ATG11-TAP-DOC	18
DISEÑO Y OBTENCIÓN DE CEPAS ATG11-TAP-DOC + OM45-COH	19
INSERCIÓN DEL GEN ROSELLA (de pVT100) EN p415	20
PCR, Purificación y digestión de Rosella	20
Digestión, purificación y tratamiento con fosfatasa del plásmido p415	20
Ligación de Rosella-p415 y transformación con células competentes.....	21
CONSTRUCCIONES DE LEVADURA CON ROSELLA	22
DISCUSIÓN.....	23
Cepas BY4741 y Atg11-Tap-doc+OM45-coh transformadas con mtRosella.....	24

Cepas BY4741 y Atg11-Tap-doc+OM45-coh transformadas con p415+Rosella-doc.....	26
CONCLUSIONES	29
EXPERIMENTOS FUTUROS:	30
BIBLIOGRAFÍA.....	31
ANEXO	34

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Esquema del metabolismo mitocondrial (Owens et al.; 2009)	2
Figura 2. Representación esquemática de los modelos de mitofagia de mamífero y levadura.	8

RESULTADOS

Figura 3. Diseño de cebadores OM45 forward y reverse	16
Figura 4. Gel de electroforesis comprobación del producto de PCR del plásmido pUG27-coh-myc	17
Figura 5. Gel de electroforesis de agarosa para comprobar la existencia de positivos en las 7 colonias de <i>S. cerevisiae</i> OM45-coh de las que se realizó la extracción de ADN genómico.	18
Figura 6. (A) Amplificación con los cebadores TAPDoc forward y reverse del fragmento Doc-loxP-Kan-loxP del plásmido pUG6 para su posterior inserción en el genoma de las cepas Atg11-Tap. (B) Inserción por recombinación homóloga del fragmento obtenido por amplificación en la figura A en el genoma de las cepas Atg11-Tap, sustituyendo la auxotrofia histidina por kanamicina, obteniendo como resultado cepas ATG11-TAP-DOC.....	19
Figura 7. Gel de electroforesis de agarosa para comprobar que la ligación del inserto Rosella y el plásmido p415 era la esperada.....	21

DISCUSIÓN

Figura 8. Detección de mitofagia con microscopio de fluorescencia en cepas de levadura BY4741 con el sistema mtRosella crecidas en medio de activación parcial Sgal.	24
Figura 9. Detección de mitofagia con microscopio de fluorescencia en cepas de levadura Atg11-TAP-Doc+OM45-coh con el sistema mtRosella crecidas en medio de activación parcial Sgal.	25
Figura 10. Detección de mitofagia con microscopio de fluorescencia en cepas de levadura BY4741 transformadas con la construcción p415+Rosella crecidas en medio de activación parcial Sgal.	26
Figura 11. Detección de mitofagia con microscopio de fluorescencia en cepas de levadura Atg11-TAP-Doc+OM45-coh transformadas con la construcción p415+Rosella crecidas en medio de activación parcial Sgal.	27

ÍNDICE DE TABLAS

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados en el estudio.	12
Tabla 2. Cebadores utilizados en el estudio.....	13

DISCUSIÓN

Tabla 3. Tabla comparativa de emisión de la fluorescencia verde y roja por el marcador Rosella en las diferentes cepas observada al microscopio transformadas con mtRosella y la construcción Rosella-doquerina.	28
---	----

INTRODUCCIÓN

1. LA MITOCONDRIA

La mitocondria es un orgánulo celular cuya función más destacable es la obtención mediante fosforilación oxidativa de adenosín trifosfato (ATP), aporte energético necesario en las reacciones bioquímicas que tienen lugar en el interior de la célula. Estos orgánulos, participantes en el metabolismo celular, son uno de los componentes citoplasmáticos de las células eucariotas. Las mitocondrias están involucradas en otras funciones esenciales de la célula como la regulación de Ca^{2+} intracelular, la producción y eliminación de especies reactivas de oxígeno, la regulación de la muerte celular apoptótica y la activación de la familia de proteasas caspasas (Alberts et al., 2008).

Actualmente, el origen de la presencia de estos orgánulos en los eucariotas se explica mediante la teoría endosimbiótica postulada por Lynn Margulis en 1967. Según dicha teoría, las mitocondrias tienen su origen a partir de la fagocitosis de una bacteria aeróbica por una célula eucariótica ancestral (LECA) (Archivald, 2015). Dotando así a los eucariotas de una maquinaria energética más eficiente que la glicólisis anaeróbica de la que antes disponían.

Cabe destacar, la semiautonomía de las mitocondrias, ya que tienen su propio ADN mitocondrial. Su genoma está formado por dobles hebras circulares, cada mitocondria dispone entre cinco o diez copias de este material genético, cuya herencia es únicamente materna. El genoma mitocondrial codifica en humanos para 13 proteínas, todas ellas implicadas en la síntesis de energía (Birky, 2001).

En cuanto a su distribución, las mitocondrias son orgánulos heterogéneamente repartidos entre las diferentes células de un mismo organismo dependiendo del requerimiento energético de cada una de ellas. Su aspecto es sumamente variable, aunque comúnmente se trata de elementos cilíndricos, alargados y rígidos. En cuanto a su tamaño, son lo suficientemente grandes para poder ser observados mediante un microscopio, y fue así como fueron por primera vez identificados en el siglo XIX (Martin et al., 2016; Lorenzo, asturnatura).

Las mitocondrias tienen una configuración claramente definida compuesta por cuatro estructuras indispensables para su correcto funcionamiento. Son orgánulos con una doble membrana: membrana mitocondrial externa y membrana mitocondrial interna que no solo se diferencian estructuralmente pero también a nivel funcional (Alberts et al., 2008). La membrana externa encierra todo el contenido de la mitocondria. La membrana interna tiene un área de superficie mucho mayor y forma una serie de pliegues, o invaginaciones, llamadas crestas. Estas permiten una mayor capacidad para la fosforilación oxidativa y la producción de energía. Las dos membranas forman dos compartimentos dentro de la mitocondria. Entre ambas membranas, se encuentra el espacio intermembrana. Y por último, la matriz mitocondrial que está definida por la membrana mitocondrial interna (Owens et al., 2009).

a. FUNCIONES

La mitocondria es un orgánulo que lleva a cabo funciones muy importantes y dispares en la célula. La función principal conocida es la de producción de energía, en forma de ATP. No obstante, el aporte de energía a la célula no es su única función, también participa en el almacenamiento de calcio, producción de calor, regulación de la apoptosis y proliferación celular. Estas funciones son exclusivas de este orgánulo de ahí la importancia y necesidad de un correcto funcionamiento mitocondrial (Zorov *et al.*, 1997).

INTRODUCCIÓN

Las mitocondrias desempeñan un papel fundamental en el metabolismo oxidativo en el que los carbohidratos y los ácidos grasos son catabolizados en equivalentes de energía (Tzagoloff 1982; Gibson 2005). . En la mayoría de los eucariotas, a partir de los ácidos grasos y del piruvato que se encuentran en el citosol se obtendrá Acetil-coA en la matriz mitocondrial. Los ácidos grasos del citosol entran a la matriz mitocondrial mediante translocación en un transportador de carnitina. Esto ocurre si los ácidos grasos son transformados en el retículo endoplasmático en aciles-CoA para ser reconocidos por el transportador de carnitina (Friedman and Nunnari, 2014). Una vez dentro de la matriz son oxidados a acetil-CoA por medio de un proceso de 4 reacciones, denominado β -oxidación. En levaduras, la β -oxidación ocurre únicamente en los peroxisomas, existiendo un intercambio y conexión entre los peroxisomas y las mitocondrias en estos organismos (Van Roermund et al., 2003).

El piruvato del citosol es importado a la mitocondria donde la enzima piruvato deshidrogenasa lo transforma a dos moléculas de Acetil-coA. Este entra en el ciclo de Krebs y se somete a un proceso catabólico de ocho pasos, obteniéndose como resultado tres moléculas de dinucleótido de nicotinamida adenina (NADH), una molécula de dinucleótido de adenina flavina reducida (FADH₂), una molécula de GTP (equivalente energético de ATP), y dos moléculas de CO₂ por ciclo (Owens et al., 2009). Estos electrones entrarán en la cadena de transporte de electrones de la membrana mitocondrial interna, donde mediante un proceso denominado fosforilación oxidativa (OXPHOS) su energía se utilizará para sintetizar ATP (Alberts et al., 2008).

b. CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL

La fosforilación oxidativa es el proceso metabólico que usa la célula para oxidar nutrientes produciendo ATP. En la gran parte de eucariotas, este proceso tiene lugar en la membrana interna de la mitocondria y se lleva a cabo gracias a la enzima encargada de la síntesis de ATP conocida como el complejo V o complejo F₁F₀-ATP sintasa y la cadena de transporte electrónica (ETC). Esta cadena está constituida por cuatro complejos: el complejo I, que presenta diferencias estructurales entre mamíferos y levaduras, corresponde a la NADH-ubiquinona oxidoreductasa; el complejo II es la denominada succinato-ubiquinona oxidoreductasa; el complejo III o ubiquinona-citocromo-c oxidoreductasa; y, por último, el complejo IV que es la citocromo-c oxidasa. La transferencia de los electrones entre estos complejos se realiza mediante la ubiquinona y el citocromo c.

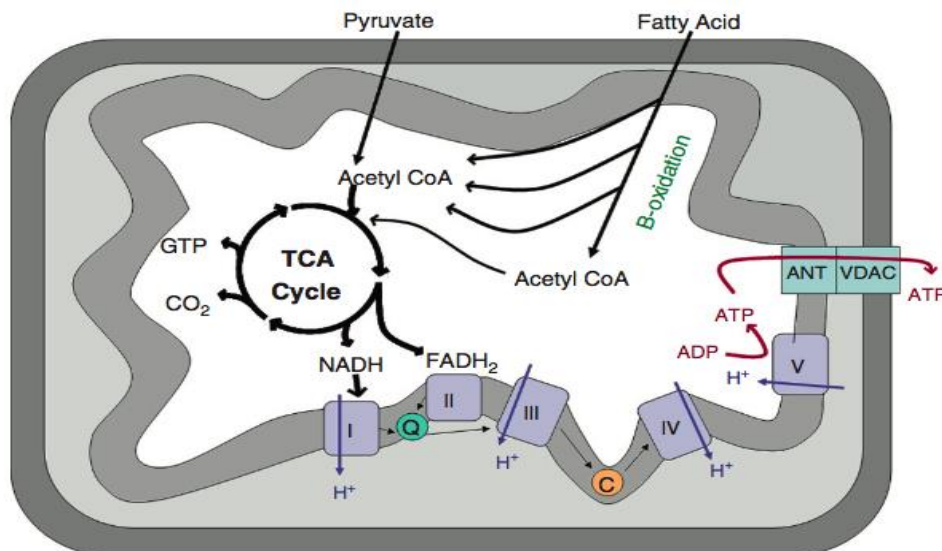


Figura 1. Esquema del metabolismo mitocondrial (Owens et al., 2009)

INTRODUCCIÓN

La ETC toma los electrones de NADH y FADH del ciclo de Krebs y los pasan a O₂ para formar H₂O y en el proceso, los protones (H⁺) se trasladan de la matriz mitocondrial al espacio intermembrana (Owens et al., 2009).

Los electrones procedentes del NADH entran en la ETC a través del complejo I, paralelamente los electrones provenientes del FADH₂ son aceptados por el complejo II mediante la deshidrogenación de los intermediarios del ciclo de Krebs. A continuación, los electrones se transfieren al complejo III a través de la ubiquinona. Luego, el citocromo c transfiere los electrones al complejo IV (citocromo c oxidasa), en el cual el O₂ es el receptor final de electrones, experimentando una reducción de cuatro electrones a H₂O (Voet et al. 2002).

En este proceso, los complejos I, III y IV bombean protones hacia el espacio intermembrana de la mitocondria. La translocación de estos protones de un área de baja concentración protónica a una de alta concentración por los complejos de la ETC crea una fuerza motriz protónica que impulsa la síntesis de ATP por el complejo V (Nelson and Cox 2000). El ATP producido se usa en las propias mitocondrias o se transporta a través de su membrana mitocondrial interna gracias a la translocasa de nucleótido de adenina (ANT) o través de la membrana mitocondrial externa mediante el canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC) (Owens et al., 2009).

En levadura, se ha descrito una organización distinta de estos complejos mitocondriales de la ETC (Barrientos and Ugalde, 2013). En este modelo animal, existe una asociación entre los distintos complejos dando lugar así a tres supercomplejos: el supercomplejo mitocondrial deshidrogenasa; el supercomplejo citocromo bc₁-COX, en dos formas predominantes III₂-IV₂ y III₂-IV; y el complejo dimérico/oligomérico F₁F₀-ATP sintasa (stuart, 2008). La asociación en estos complejos es una estrategia de adaptación a las diferentes necesidades de cada tipo celular o cambios en las fuentes de energía (Lapuente-Brun et al., 2013). En cuanto a la funcionalidad, esta reorganización por supercomplejos en levaduras ha dotado a las células de ventajas como una mayor eficiencia en el transporte de los electrones a través de la canalización del sustrato (Barrientos and Ugalde, 2013). Asimismo, se ha demostrado que sin la existencia de estos supercomplejos hay un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Ghelli et al., 2013; Maranzana et al., 2013). Cabe destacar que toda esta información es reciente y son necesarios más estudios para conocer las proteínas implicadas en la formación de estas asociaciones de complejos, para tener una visión más clara de su función y de los defectos de ensamblaje de los supercomplejos. Por todo ello, existe una necesidad biomédica para entender, entre otras cuestiones, como los supercomplejos alterados se traducen en disfunción mitocondrial y cómo esta puede influir en el desarrollo de diversas patologías (Vartak et al., 2013).

c. LA MITOCONDRIA Y EL ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo es un estado celular en el cual la homeostasis óxido-reducción intracelular está alterada. Esto ocurre como consecuencia de un incremento en la producción de ROS o por el fallo de los mecanismos antioxidantes dando lugar a daños en las células (Ríos De Molina, 2003).

Las mitocondrias son las principales causantes del estrés oxidativo en las células mediante la producción de ROS a través del proceso de fosforilación oxidativa. Estas especies reactivas de oxígeno son generadas en la cadena de transporte de electrones de la mitocondria. La ETC es un proceso imperfecto, por lo que una parte del oxígeno es reducido de forma incompleta, conduciendo a la producción de ROS. Entre los distintos ROS están incluidos: radicales libres como el anión superóxido (O₂⁻) y el radical hidroxilo (OH), y no radicales como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Li et al., 2013). En condiciones normales, entre el 0,4 y el 4% del oxígeno consumido por las mitocondrias da lugar a ROS (Halliwell and Gutteridge,

2007; Murphy, 2009). Esta producción de especies reactivas ocurre fundamentalmente en dos sitios concretos de la cadena de transporte de electrones, el complejo I y el complejo III (Selivanov et al., 2011).

Las células disponen de mecanismos de seguridad que minimizan los daños del estrés oxidativo. Aproximadamente, el 90% del superóxido producido en las células se genera en el interior de las mitocondrias. Por ello, las mitocondrias presentan enzimas propias con funciones antioxidantes para reducir los niveles de ROS, tales como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) (Alberts et al., 2008).

En condiciones controladas, las ROS median y regulan las funciones fisiológicas del cuerpo. De hecho, las especies reactivas de oxígeno mitocondriales sirven como moléculas antimicrobianas, así como señales del sistema inmune y de la autofagia (Dunn et al., 2015). Asimismo, están relacionadas con las modificaciones postraduccionales y aquellas ROS producidas en el complejo III presentan funciones como la adaptación a hipoxia (Bhat et al., 2015; Bleier and Dröse, 2013).

No obstante, la pérdida del equilibrio de eliminación y producción de ROS provoca una acumulación excesiva de estas especies reactivas (Li et al., 2013). La generación excesiva del anión superóxido estimula su interacción con otros compuestos generando ROS “secundarias”. Por otro lado, las interacciones del radical hidroxilo con el ADN provoca daños en las bases nitrogenadas, purina y pirimidina, y en el esqueleto de la desoxirribosa (Halliwell and Gutteridge, 2007). La producción excesiva de ROS daña las proteínas y las enzimas mitocondriales, las membranas y el ADN, y consecuentemente interrumpe la generación de ATP y otras funciones clave de la mitocondria (Murphy, 2009; Droge, 2002). Los daños del ADN mitocondrial que no son reparados producen defectos en los complejos de la ETC, aumentando la generación de ROS. Este ciclo de daños mitocondriales puede conducir a la apoptosis celular (Bhat et al., 2015). Los daños en el ADN mitocondrial que alteran la ETC y producen déficits de ATP pueden provocar enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer o el Parkinson.

2. LA LEVADURA COMO MODELO DE ESTUDIO DE LA MITOCONDRIA

Dentro del reino *Fungi*, existe el grupo de hongos más abundante, con más de 64.000 especies diferentes, llamado *Phylum Ascomycota* al que pertenece *Saccharomyces cerevisiae*, comúnmente conocida como la levadura de la cerveza. Esta se caracteriza por tener un genoma pequeño y compacto, cuya secuencia fue obtenida en 1996. Es considerado el genoma eucariota más conocido tanto estructural como funcionalmente ya que de la mayoría de los 6183 genes (Dujon, 1996) que presenta se conocen sus funciones (Seres modélicos, CSIC).

En cuanto a su homología con el ser humano, aproximadamente un tercio de los genes de *S. cerevisiae* también son hallados en humanos y muchos con funciones semejantes. A pesar de que ambas especies hayan tenido durante millones de años una evolución distinta comparten diferentes genes de un antepasado común. Los sistemas celulares fundamentales entre ambas especies son bastante similares: división celular, cromosomas o respuesta al estrés. Esta homología entre la levadura y los animales superiores es lo que ha conducido a que la levadura sea un modelo eucariota a nivel celular y molecular.

Las ventajas que han hecho a la levadura un modelo animal útil empiezan con el hecho de ser un microorganismo eucariota y unicelular, que presenta rapidez y sencillez de crecimiento. Asimismo, la existencia de un genoma compacto en comparación con el del ser humano. A mediados del siglo XX, fue descubierta su capacidad para ser modelo de estudio de la mitocondria en vista de su habilidad para activar y desactivar la respiración frente a cambios en la fuente de carbono disponible en el medio debido a su capacidad fermentativa. Esta

habilidad fue descubierta debido a su supervivencia ante mutaciones en el sistema OXPHOS en presencia de azúcares fermentables (Ephrussi and Slonimski, 1955).

En los seres humanos, las enfermedades relacionadas con disfunción mitocondrial se pueden clasificar de una forma más general en aquellas que surgen de genes de origen nuclear y aquellas que surgen de mutaciones en el ADN mitocondrial. Las de origen nuclear pueden subdividirse en enfermedades debidas a biogénesis mitocondrial defectuosa, importación y exportación de proteínas mitocondriales defectuosas, ensamblaje defectuoso del sistema de fosforilación oxidativa, actividad defectuosa del sistema OXPHOS, enzimas defectuosas del metabolismo intermediario, mantenimiento defectuoso de ADN mitocondrial, y proteínas de control de calidad defectuosas (Rea et al., 2010). *S. cerevisiae* se ha usado como modelo animal para estudiar varias enfermedades humanas que se encuentran dentro de estas clases informando a nivel fisiológico y patológico (Baile and Claypool, 2013). El estudio de alguna de estas enfermedades facilitó la identificación de la mutación genética o el mecanismo causante de la patología humana (Rea et al., 2010). Por tanto y debido a la existente conservación de las funciones mitocondriales entre *S. cerevisiae* y humanos, esta levadura es un modelo imprescindible actualmente para el estudio de este tipo de enfermedades.

No obstante, hay que tener en consideración la limitación que tiene el uso de *S. cerevisiae* al ser un organismo unicelular a la hora de trasladar los resultados a organismos multicelulares más complejos como el ser humano. Por ello, habrá que realizar un escalado con células humanas. Sin embargo, este impedimento no entorpece las grandes ventajas que tiene este microorganismo, por lo que es considerado un modelo animal con gran potencial como herramienta biotecnológica para el estudio de las enfermedades mitocondriales.

3. LA AUTOFAGIA Y LA MITOFAGIA

La autofagia es un proceso fisiológico presente en todas las células eucariotas mediante el cual se digieren proteínas u orgánulos citoplasmáticos en los lisosomas. El término autofagia fue acuñado por C. de Duve en 1963 y su significado es comida (fagia) propia (auto). La autofagia participa en diversos procesos celulares como en el metabolismo energético, reciclaje de orgánulos, regulación del crecimiento y envejecimiento. Asimismo, este proceso ejerce de mecanismo de control de calidad citoplasmática, eliminando aquellos orgánulos dañados, microorganismos infecciosos o proteínas que sean defectuosas o estén mal plegadas (Murrow, 2013). También, se produce una activación de este proceso ante el estrés celular debido a que mediante la degradación de componentes citoplasmáticos posibilita la obtención de energía y nutrientes (Klionsky, 2007).

La autofagia es inducida en gran variedad de circunstancias de estrés como el déficit de alimento, la carencia de factores de crecimiento, infecciones o estrés oxidativo. Este proceso se activa y comienza con la formación del fagóforo, estructura de doble membrana o cisterna membranosa. Posteriormente, se produce la extensión de estas membranas concluyendo en la unión de sus extremos, produciendo una estructura cerrada denominada autofagosoma. Este recibirá vesículas provenientes de los endosomas facilitándole proteínas lisosomales, o el autofagosoma puede fusionarse a lisosomas/vacuolas para llevar a cabo la degradación de componentes citoplasmáticos.

Se pueden diferenciar tres tipos de autofagia: la macroautofagia proceso que ocurre mediante los autofagosomas; la microautofagia en la cual los componentes que deben ser degradados son recogidos por la membrana lisosomal que sufre pequeñas invaginaciones, estas se separan de la membrana y quedan en el interior del lisosoma donde los componentes que han sido invaginados son degradados; y la autofagia mediada por chaperonas en la cual la chaperona citosólica (hsc70) incorpora proteínas citosólicas al lisosoma mediante un

transportador que se encuentra en la membrana del lisosoma (LAMP-2A) (Singh, 2011; Cuervo, 2011).

Asimismo, se puede diferenciar entre autofagia selectiva y no selectiva. En la primera aquello que se va a englobar primero es marcado y después es reconocido por receptores de autofagia, un ejemplo de autofagia selectiva sería la mitofagia, degradación específica de mitocondrias disfuncionales. En la no selectiva, se engloba parte del citoplasma de forma inespecífica, tal y como ocurre en periodos de ayunas en los que se degradan componentes para poder producir la energía y nutrientes necesarios.

Concretamente, la mitofagia es un proceso selectivo ya que el único componente que se degrada es la mitocondria. Sin embargo, la maquinaria que participa en el proceso de autofagia de las mitocondrias es dependiente de la del proceso no selectivo, la mayoría de genes *AuTophagy related* (ATG) participantes en la autofagia general son necesarios en la mitofagia (Eiyama et al., 2013). La mitofagia puede desempeñar un papel importante en el mantenimiento de la función e integridad mitocondrial. Una deficiencia en la mitofagia causa la acumulación de mitocondrias dañadas y un aumento del daño oxidativo (Zhang et al., 2007). Por ello, la mitofagia puede ser importante en la prevención de ciertas enfermedades, de ahí, la necesidad de que haya una mayor comprensión de los mecanismos moleculares y las vías reguladoras que controlan este proceso.

a. LA MITOFAGIA EN LEVADURA

Los avances moleculares en la autofagia se han producido solo durante la última década como la identificación de los componentes moleculares de la vía Cvt y la pexofagia (Kanki and Klionsky, 2008). Aunque la morfología de la autofagia se estudió por primera vez en células de mamíferos, la mayoría de los componentes moleculares se identificaron inicialmente en levaduras. El inicio del estudio del ámbito molecular de la autofagia comenzó con la identificación de los genes *AuTophagy related* (ATG) mediante la selección genética en levaduras (Xie and Klionsky, 2007; Klionsky, 2007). Los estudios en *Saccharomyces cerevisiae* y otros hongos han permitido el aislamiento de genes ATG y caracterizar las propiedades biológicas de algunas proteínas Atg (Kanki et al., 2011).

En comparación con la autofagia, los mecanismos genéticos y moleculares de la mitofagia aún no se conocen bien. Esto se debe en parte a la ausencia de un método sensitivo y conveniente para la inducción y detección de mitofagia (Kanki and Klionsky, 2008). Por ejemplo, Tal et al. cultivan células durante más de 3 días para inducir la mitofagia, y Kissova et al. utilizan microscopía electrónica para detectar la presencia de mitocondrias en la vacuola (Kanki and Klionsky, 2008). Actualmente, la mitofagia puede inducirse mediante el cultivo de las levaduras en medios con fuentes de carbono no fermentables por ejemplo con lactato o glicerol. De hecho, fue así como se identificó que los genes esenciales para la mitofagia son los Atg.

En 2004, Kissova et al. informó que se requiere ATG5 para la mitofagia en levadura. A raíz de ello, varios grupos de investigación informaron del requisito de varios genes ATG para la mitofagia y, recientemente, todos los genes ATG se examinaron para detectar mitofagia. Se ha identificado el complejo Atg17-Atg29- Atg31 (Kanki and Klionsky, 2008); también se ha demostrado la importancia de la presencia de Atg11, Atg20 y Atg24; así como la existencia de receptores específicos de mitofagia, como el Atg32.

Atg32 es una proteína específica de mitofagia de 59 kDa localizada en la membrana externa de la mitocondria. Su dominio N-terminal se encuentra orientado hacia el citosol, mientras que el C-terminal hacia el espacio intermembrana (Müller et al., 2015). En levadura, Atg32 actúa como un receptor de mitofagia interaccionando con la proteína adaptadora Atg11 y la

proteína tipo ubiquitina Atg8 para señalar la mitocondria a la estructura preautofagosómica (PAS) (Farre and Subramani, 2016).

En cuanto al mecanismo molecular en levaduras, el estímulo de mitofagia es detectado por los sensores celulares de superficie, Sln1 y Wsc1 que activan las rutas de señalización de Hog1 y Stl2 (Liu et al., 2014). Seguidamente, se produce la activación de la casein kinasa-2 (CK2) que fosforilará las Ser-114 y la Ser-119 en Atg32. La interacción de Atg11 con Atg32 dependerá de la fosforilación de esas serinas. Atg11 recluta la mitocondria al sitio de ensamblaje del fagóforo (PAS) donde el autofagosoma se genera y engulle a la mitocondria. En la región PAS, Atg32 interacciona con Atg8 mediante el motivo AIM facilitando la formación del autofagosoma. Por tanto, las interacciones de Atg32 tanto con Atg11 y Atg8 ayudan al reclutamiento de mitocondrias al PAS en la superficie de la vacuola donde se forma la maquinaria autofagosómica.

Se ha establecido que Atg17, Atg29 y Atg31 son proteínas importantes en la mitofagia en condiciones de ayuno. Esto es debido a que forma un complejo adaptador entre Atg11 y el complejo proteína quinasa Atg1-Atg13 colaborando así en la formación del autofagosoma (Eiyama et al., 2013).

Estudios recientes en nuestro laboratorio han demostrado que el Atg11, y no el receptor Atg32, es la proteína esencial en la inducción de la mitofagia por daño mitocondrial. Esto se pudo demostrar mediante la inducción de la mitofagia en cepas de levadura tratadas con valinomicina. Los resultados mostraron en qué medida participan tanto la proteína Atg11 como la Atg32, y se obtuvo que la Atg11 era totalmente necesaria en la mitofagia, mientras que la Atg32 no es necesaria en la degradación de la mitocondria inducida por valinomicina. Asimismo, se comprobó que la mitofagia ocurre con mayor velocidad si hay un daño específico mediante la valinomicina comparado con la falta de nutrientes.

Por ello, aunque en pocos años ha habido grandes avances y nuevos conocimientos acerca del mecanismo molecular de la mitofagia en levaduras, esto es solo el principio. Aún son necesarios muchos estudios enfocados en el descubrimiento de las funciones de ciertas proteínas y sus homólogos en humanos, entre otras cuestiones, que nos ayudasen a entender mejor las enfermedades relacionadas con fallos en este tipo de procesos.

b. LA MITOFAGIA EN CÉLULAS DE MAMÍFEROS

En mamífero existen dos tipos de mitofagia identificada: la mitofagia mediada por receptores de membrana y la mediada por Parkin/PINK1. También existen receptores análogos a Atg32 localizados en la membrana externa mitocondrial que presentan la secuencia W/F/YxxL/I encargada de mediar la interacción con LC3, ortólogo de Atg8, para la autofagia selectiva. Existen dos familias de receptores NIX (o BNIP3L) y BNIP3, y FUNDC1 (Liu et al., 2014).

En referencia a NIX y BNIP3, esta familia de receptores tiene diversas funciones: actúan como reguladores de la apoptosis y la necrosis; interaccionan con LC3 a través de la fosforilación en las serinas 17 y 24 para activar la mitofagia en reticulocitos (Zhu et al., 2013), inducen la mitofagia por hipoxia mediante su interacción con Rheb, GTPasa que activa la mitofagia en aquellas células con alta activación de la fosforilación oxidativa (Melser et al., 2013). La familia NIX/BNIP3L contiene un dominio LIR, homólogo al AIM de levaduras, que interacciona con LC3 (Novak et al., 2010). BNIP3 contiene el dominio LIR también, así pues, lleva a cabo las funciones mitofágicas (Hanna et al., 2012; Zhu et al., 2013).

Por otro lado, el receptor FUNDC1 se relaciona con la inducción de la mitofagia por hipoxia, a través de su desfosforilación ante estrés hipóxico o pérdida del potencial de membrana. Su desfosforilación incrementa la afinidad por LC3, favoreciendo el reclutamiento específico del

INTRODUCCIÓN

autofagosoma y desechando la mitocondria afectada (Liu et al., 2014). En condiciones normales, su tirosina 18 es fosforilada por una quinasa Src y la serina 13 por CK2, estas quinasas inhiben la mitofagia. Para que tenga lugar la mitofagia, tiene que ocurrir la inactivación de ambas. Asimismo, un descubrimiento reciente es que la fosfatasa PGMA5, encargada de la defosforilación de la serina 13, desfosforilada tiene alta afinidad por LC3, provocando la incorporación selectiva del autofagosoma (Chen et al., 2014).

El otro modelo de mitofagia en mamíferos es la mediada por PINK1. En el Modelo PINK1-Parkin de la inducción de mitofagia, hay dos proteínas que la median, la PINK1 que es una quinasa de la membrana mitocondrial externa y la parkina es una E3 ubiquitina ligasa citosólica. Las mutaciones en los genes que codifican estas dos proteínas se han relacionado con la enfermedad del Parkinson. En condiciones fisiológicas, PINK1 ejerce la función de sensor de daño mitocondrial que entra en el interior de la mitocondria y es velozmente degradado por proteólisis, quedándose en niveles muy bajos. En el caso de que exista daño mitocondrial, la proteólisis es inhibida produciéndose la acumulación de PINK1 únicamente en las mitocondrias dañadas (Youle and Narendra, 2011). Esta estabilización de PINK1 promueve la translocación de parkina, PINK1 recluta a parkin. Esto permite la fosforilación de PINK1 en varios residuos, permitiéndole fosforilar a parkin en la Ser-65, y esto activará la actividad de E3 ligasa (Kondapalli et al., 2012). La fosforilación de parkin, hace que se activa y ubiquitine diversas proteínas mitocondriales que ejercerán de señales moleculares reclutando maquinaria autofágica y promoviendo la formación del autofagosoma (Nguyen et al., 2016). Un ejemplo de proteínas mitocondriales que se ubiquitan son la mitofusina 1 y 2 (Dengjel and Abeliovich, 2017).

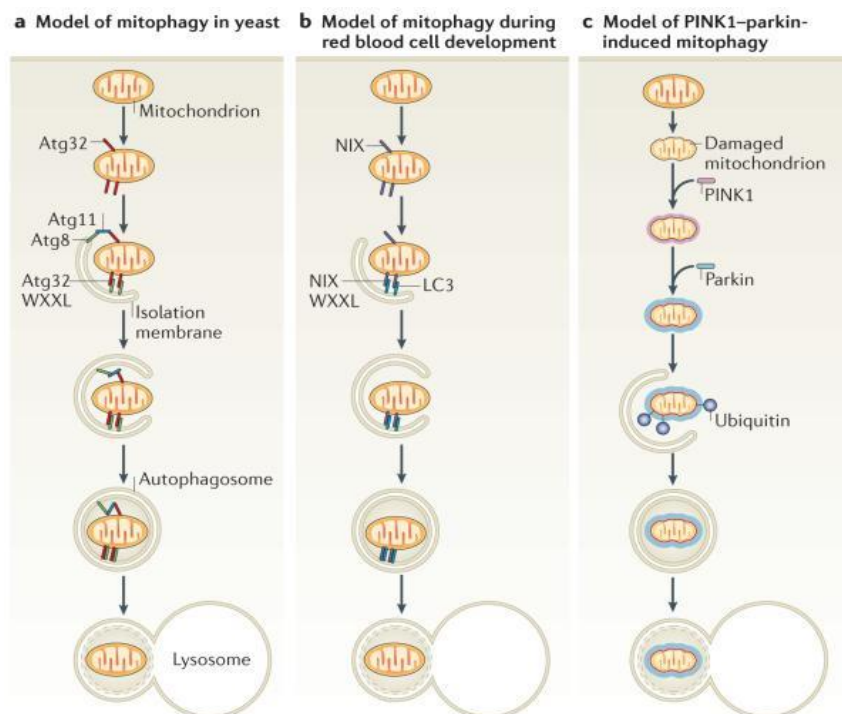


Figura 2. . Representación esquemática de los modelos de mitofagia de mamífero y levadura. (a) Modelo de mitofagia en Levadura, es necesario el receptor Atg32 que puede unirse o a Atg8 por su dominio WXXL o puede unirse a Atg 11 (proteína adaptadora) y esta, a Atg8. Cuando se produce la unión la doble 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. En 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. En mitocondrias dañadas empieza a acumularse 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. (Youle and Narendra, 2011).

4. APOPTOSIS

La mitocondria no solo puede sufrir mitofagia, también puede protagonizar un proceso de apoptosis. La mitofagia y la apoptosis son procesos relacionados, ya que cuando una mitocondria empieza a fallar, comienzan a degradarse aquellos complejos que no están funcionando adecuadamente. Si tras esas degradaciones no hay cambios positivos en el funcionamiento de la mitocondria se procede con la apoptosis. La mitofagia y la apoptosis son respuestas de la célula al estrés, una es de mantenimiento y la otra es una muerte celular programada, respectivamente. Ambos tienen una característica común, ya que son procesos que están controlados por la membrana externa mitocondrial, por el reclutamiento continuo de componentes en esa membrana.

En mamíferos, los mecanismos de la apoptosis han sido extensamente estudiados. En este proceso altamente regulado participan diversas familias de proteínas, algunas de ellas interactuando con la mitocondria, como la familia Bcl-2, cuyas proteínas están localizadas mayoritariamente en la membrana externa de la mitocondria. Este tipo de proteínas, por ejemplo, la proteína BAX, cuando han sido incorporadas en la mitocondria se encargan de la permeabilización de las membranas mitocondriales (Priault et al., 2003).

En la apoptosis, la mitocondria tiene la función de expulsar algunas proteínas desde el espacio intermembrana al citosol. Esta liberación tiene lugar mediante un proceso denominado permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP). De las proteínas liberadas por la mitocondria, actualmente, se conocen cuatro: el smac/diablo; la endonucleasa G; el factor inductor de la apoptosis (AIF); y el citocromo c. La liberación de esta última proteína se considera el inicio de la apoptosis (Priault et al., 2003).

La proteína BAX localizada en el citosol de células sanas de mamífero, se trasloca a la membrana mitocondrial externa cuando se produce la inducción de la apoptosis. BAX presenta una α -hélice, llamada $\alpha 1$, localizada en el extremo N-terminal entre los aminoácidos 24 y 37, la cual dota a BAX de la función de señal de localización mitocondrial (Cartron et al., 2003). Actualmente se apoya la hipótesis que postula que tras interactuar BAX y la mitocondria, se forma un canal mitocondrial inducido por apoptosis (MAC). Este posibilita la permeabilización selectiva de la membrana al citocromo c, liberándose al citosol. Aquí, el citocromo c interacciona con Apaf1 y la procaspasa 9 iniciando la activación de las caspasas 3, 6 y 7 (Li et al., 1997). Estas proteasas ejecutoras de los procesos apoptóticos actúan en la membrana mitocondrial y desencadenan la expulsión del AIF, el smac/diablo y la endonucleasa G a través del "poro de transición a la permeabilidad" (PTP) (Bernardi, 1999). El citocromo c ejerce un papel importante en la apoptosis, porque es el encargado de activar los siguientes pasos de este proceso, que permiten la apertura del PTP, y con ello la liberación de otras proteínas como el AIF y el smac/diablo (Priault et al., 2003).

No obstante, en *S. cerevisiae* el citocromo c no produce la misma activación de las caspasas ni la permeabilización de la membrana mitocondrial externa como ocurre en mamíferos. Lo que supone una ventaja para utilizar la levadura como organismo modelo, ya que se puede estudiar la liberación del citocromo c en detalle, independientemente de los siguientes pasos posteriores (Priault et al., 1999). De hecho, existe mucha controversia sobre si la apoptosis en humanos ocurre totalmente por BAX. Por tanto, la levadura también podría servir para descubrir una forma nueva desencadenante de la apoptosis que posiblemente en humanos también esté. La levadura es una versión simple molecular de todos los eucariotas, por lo que, si descubres una proteína nueva estudiando en levadura, en humanos posiblemente también exista.

5. ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Las enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y el Alzheimer son muy complejas ya que la patogénesis no se debe únicamente a la mutación de un gen, pero también a una serie de procesos alterados en las células, como por ejemplo el estrés oxidativo, los daños en la mitocondria y la apoptosis, que terminan en la muerte neuronal.

Existe una relación entre este tipo de enfermedades y la autofagia selectiva. Las mitocondrias están involucradas en procesos celulares que resultan esenciales para la supervivencia de la célula. Las disfunciones mitocondriales incrementan la producción de ROS afectando al DNA mitocondrial, los componentes de la membrana y los componentes de la fosforilación oxidativa. Las mutaciones y alteraciones en cualquier fase de la autofagia y de las proteínas que participan en ella, presentes en la membrana externa mitocondrial, conducen a fallos neuronales y, por tanto, a enfermedades neurodegenerativas.

Por tanto, se puede comprender la importancia de usar la levadura como modelo debido a que permite establecer de manera sencilla y clara la conexión existente entre aquellos genes que pueden estar implicados en este tipo de enfermedades. Los estudios con levaduras humanizadas han proporcionado conocimientos que han ayudado a una mayor comprensión de estas enfermedades. Asimismo, los estudios con levadura pueden permitir una mejor comprensión a nivel molecular de aquellos componentes que fallan en la mitofagia selectiva para diseñar nuevos fármacos para el tratamiento de estas enfermedades tan complejas.

En estudios anteriores de este laboratorio, se ha demostrado que los componentes de la cadena de transporte electrónico se degradan de forma selectiva. El tratamiento con valinomicina provoca daños que derivan en la degradación de los complejos I y el III, en cambio, los complejos II, IV y V no se degradan; existe una degradación selectiva de los complejos que acumulan más estrés oxidativo (Timón et al., 2018).

El estudio de la mitofagia selectiva tiene mayor dificultad debido a que su visualización resulta más compleja porque solo tiene lugar en una parte de la membrana externa, mientras que en la mitofagia no selectiva la fluorescencia está presente en toda la mitocondria. Los fallos en la reparación de daños puntuales de la mitocondria está relacionado con enfermedades neurodegenerativas. La existencia de fallos en el control de calidad mitocondrial tiene como consecuencia que no se detecten las proteínas dañadas, y por tanto que no se puedan sustituir por una proteína nueva mediante mitofagia selectiva. En este control de calidad mitocondrial participan componentes esenciales como el Atg11. En este mismo estudio también se demostró que la sobreexpresión de Atg11 induce por sí misma la degradación de los complejos I y III dependiente de la presencia de un daño mitocondrial específico (Timón et al., 2018).

OBJETIVOS

La mitofagia selectiva es un proceso mitocondrial cuyo campo de estudio aún está por desarrollar ya que tiene una gran implicación biomédica debido a su relación directa con las enfermedades neurodegenerativas. El objetivo de este trabajo es profundizar en el estudio de la mitofagia selectiva, así como los genes y componentes que están implicados. Para cumplir este objetivo se han desarrollado dos objetivos específicos en el modelo experimental de levadura:

1. Crear una herramienta biotecnológica que nos permita alterar la localización de las proteínas que participan en la mitofagia, en este caso, en la membrana externa mitocondrial.
2. Diseño de un instrumento que nos permita visualizar el proceso de degradación selectiva mitocondrial.

Por tanto, la combinación de este instrumento que nos permite visualizar la mitofagia selectiva junto con la herramienta que nos permite realizar una relocalización de forma artificial de componentes de la mitofagia selectiva para que estén continuamente actuando en la membrana mitocondrial externa, da lugar a un sistemas aún más efectivo y completo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico y condiciones de crecimiento

Condiciones de crecimiento de levadura

Las células de levadura fueron cultivadas según métodos estándar (Holz *et al.*, 2003) y crecieron en medio rico YPD o medio mínimo SD a 28°C en agitación a 200 rpm. El medio YPD está compuesto por glucosa (2%, m/v), peptona bacteriológica (2%, m/v) y extracto de levadura (1%, m/v). El medio SD tiene glucosa (2%, m/v), *yeast nitrogen base* (YNB, 0,7%, m/v) y ácido succínico (50 mM) a pH 5,5 ajustado con Tris. El medio SD se utilizó para la selección de cepas mediante auxotrofías, suplementando los aminoácidos necesarios, como histidina (100 µg /mL), leucina (100 µg /mL), metionina (100 µg /mL) y uracilo (30 µg/mL). En el caso de comparar condiciones con fuentes de carbono diferentes a la glucosa, esta se reemplazó por galactosa (2%, m/v) o glicerol (3%, v/v) /etanol (3%, v/v). En la selección de cepas también se complementó el medio con ampicilina.

Condiciones de crecimiento de bacteria

Las células bacterianas crecieron a 37°C en sólido o en líquido con agitación (200 rpm) en medio Luria Bertani (LB), cuyos componentes son: extracto de levadura (0,5%, m/v), triptona (1%, m/v) y cloruro sódico (1%, m/v). Asimismo, para la selección de plásmidos, se suplementó con ampicilina (50 µg/ml).

Cepas, plásmidos y cebadores utilizados

Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados en el estudio.

Nombre	Características relevantes	Procedencia
Cepa <i>Escherichia coli</i>		
DH5α	Células quimiocompetentes eficientes para subclonaje	ThermoFisher Scientific
Cepas de levadura		
BY4741	MATα; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0	Euroscarf
ATG11-TAP	BY4741 ATG11-TAP-His3	Ghaemmaghami et al., 2003
ATG11-Doc	BY4741 ATG11-TAP-Doc-Kan	En este laboratorio
OM45-Coh	BY4741 OM45-Coh-His3	En este estudio
ATG11-Doc-OM45-Coh	BY4741 ATG11-TAP-Doc-Kan, OM45-Coh	En este estudio
Plásmidos		
pUG6-Doc	Doc-[loxP-Kan+-loxP]	En este laboratorio
pUG27-Cohx2-Myc	Cohx2-Myc-[loxP-His5+-loxP]	Sujin et al., 2016
p415GPD-Doc	LEU2, P _{TDH3} -Doc-T _{CYC1} (Dockerin tagging plasmid)	Sujin et al., 2016
pVT100U-mtRosella	Resistencia a Ampicilina, gen <i>URA3</i>	Rosado <i>et al.</i> , 2008

Tabla 2. Cebadores utilizados en el estudio.

Cebadores	Secuencia (5' a 3')	Procedencia
GPDPro_F	CAGAATTACAATCAATACCTACCG	Thermofisher Scientific
Cyc1	GCGTGAATGTAAGCGTGAC	Thermofisher Scientific
TAPDoc forward	CTAAATGATGCTCAGGCGCCGAAAGTAGACGCG AATCATCAGTCTACTAAATTATACGGCGACGTC	Thermofisher Scientific
TAPDoc reverse	TCGATGAATTCGAGCTCGTTAAACTGGATGGCGG CGTTAGGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	Thermofisher Scientific
OM45ChkTag	ATGGGGTGAAACAGCCGCTC	Thermofisher Scientific
Chktapdoc	ATTCCAACACTACTGCTAGCGAG	
KanB	CTGCAGCGAGGAGCCGTAAT	Thermofisher Scientific
Rosella NheI	CGGCGCTAGCGTGATCAGATTTGTATAGTT	Thermofisher Scientific
Rosella Sall	TGCAGTCGACGGTACCGCGGGC	Thermofisher Scientific
OM45 forward	GATAAGGGTGATGGTAAATTCTGGAGCTCGAAAA AGGACCCTGTAACAACACCACCTGC	En este laboratorio
OM45 reverse	TAGATATATAACGGTATTTTATGTATGCAGCTATA CCCCGCATAGGCCACTAGTGGATC	En este laboratorio

Métodos generales para la obtención de DNA recombinante

Extracción de ADN genómico

Para la extracción de ADN genómico, se usó el protocolo Fast isolation of chromosomal DNA from yeast de X. Primero, se eliminó el sobrenadante de los precultivos, el sedimento se resuspendió con 200 uL del tampón de protoplastos y se incubó durante 1 hora a 37°C. Después, se añadió el tampón de lisis e incubó de nuevo 20 minutos a 65°C. Tras esos 20 minutos, se pipetearon 200 uL de Acetato potásico 5M y se centrifugó 3 minutos. El sobrenadante se recuperó en un nuevo eppendorf, se añadieron 600 uL de isopropanol, se centrifugó y se eliminó el sobrenadante. Después se realizó el paso del lavado añadiendo 1 mL de etanol 70%, se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y se añadió 50 uL de H₂O estéril.

Digestión

Para la digestión son necesarios los siguientes componentes: enzimas de restricción, tampón, agua estéril y el ADN a digerir, una vez pipeteados se incuban a 37°C durante 1 hora para que ocurra la digestión. En concreto, la construcción OM45-coh se llevó a cabo en un solo paso. En el caso de la construcción de Rosella, la digestión del inserto y del plásmido se llevó a cabo en una digestión escalonada, debido a que las enzimas de restricción NheI y Sall son eficientes con una concentración distinta de tampón. A continuación, se realizó la inactivación por calor de enzimas, siendo a 65°C durante 30 minutos para Sall y NheI. Se realizó una comprobación de la digestión mediante un gel de electroforesis de un 0,7% de agarosa.

Ligación

La ligación se realizó con el protocolo de ligación de Thermo Fisher Scientific para el cual eran necesarios los siguientes componentes en una reacción de volumen 20 uL: 1 uL de ADN ligasa T4, 5 uL de tampón 5X rapid ligation, 2-4 uL de ADN del inserto, 2-4 uL de ADN del plásmido lineal y 8 uL de agua libre de nucleasas. La ligación se realizó a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Utilización de fosfatasas

El tratamiento con fosfatasas del plásmido que se usó en la ligación con el inserto de Rosella se llevó a cabo mediante Protocol for nucleic acid dephosphorylation de Thermo Fisher Scientific. Para ello, se realizó una reacción de un volumen total de 20uL con los siguientes componentes: ADN linear del plásmido digerido, 10X tampón de reacción fosfatasa alcalina, FastAP fosfatasa alcalina termosensible y agua libre de nucleasas. Tras añadir todos los componentes, se incubaron durante 10 minutos a 37°C, y finalmente para parar esta reacción se usó un tratamiento con calor durante 5 minutos a 75°C.

Purificación de ADN

Tras las transformaciones de plásmidos ligados, se procedió a la purificación del ADN mediante el protocolo de purificación del kit comercial de NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel). En primer lugar, se centrifuga el cultivo 30 segundos a 11000 g, se elimina el sobrenadante y se resuspende el sedimento añadiendo 250 uL de tampón A1, 250 uL de tampón A2, se incuba 5 minutos a temperatura ambiente y se añaden 300 uL de tampón A3. Después, se centrifuga 5-10 minutos a 11000 g y el sobrenadante se recupera en un nuevo eppendorf con una columna del kit. Al sobrenadante se añaden 500 uL del tampón A4, centrifuga 1 minuto a 11000 g y otros 2 minutos, se elimina el contenido que ha pasado por la columna. Finalmente, se pipetea 50 uL de agua estéril, se incuba 1 minuto a temperatura ambiente, se centrifuga 1 minuto a 11000 g, y el ADN contenido en el eppendorf ya está purificado.

Por otro lado, tras las PCR, se usó el protocolo de purificación GeneClean de MP Biomedicals. El protocolo consiste en añadir la solución proporcionada por el kit llamada GeneClean Turbo Salt 5 veces el volumen de producto de la PCR. Una vez se haya añadido al producto de PCR esta solución se centrifuga durante 5 segundos a 14000 g. Después se pasa el contenido a una columna, se pipetea a este contenido 500 uL de la solución llamada GeneClean Turbo Wash solution, y se centrifuga igual que en el paso anterior. A continuación, se realiza otra centrifugación de 4 minutos a 14000 g. La columna se traspa a un nuevo eppendorf y se añaden 30 uL de H₂O estéril y se centrifuga 1 minuto a 14000 g. Se desecha la columna y el ADN recogido en el eppendorf está listo para usarse.

A continuación, se cuantificó la cantidad de ADN (ng/uL) empleando el NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific).

PCR + Gel de electroforesis

Se realizó la reacción en cadena polimerasa (PCR) para la amplificación de fragmentos específicos de ADN con los cebadores específicos (tabla 2) con un termociclador automático programado para llevar a cabo los siguientes pasos y tiempos: desnaturalización a 95°C durante 2 minutos, alineamiento a 55°C durante 1 minuto y la extensión a 72°C durante 2 minutos, así con las repeticiones que se deseen, siendo generalmente entre 15 y 35 ciclos como este. Seguidamente, se realizó un gel de electroforesis de un 1% de agarosa para comprobar si el producto de PCR era el correcto.

Transformación en levadura

Para realizar la transformación en levadura se usó un protocolo publicado en *Nature* (Gietz & Schiestl, 2007). Una vez realizado el cultivo celular se centrifugaron las células a 3000 g durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 1 mL de agua estéril. De esta suspensión celular se recogieron 100 uL en un nuevo eppendorf y se centrifugaron a 3000 g durante 30 segundos, de ahí se eliminó el sobrenadante y a continuación se usó el sedimento. Este se resuspendió con una mezcla maestra de transformación de un volumen de 360 uL compuesta por: 240 uL de PEG 3350 (50% (w/v)) esterilizado por filtración, 36 uL de Acetato de Litio 1M, 50 uL de Carrier de ADN

monocatenario (2 mg/mL) y 34 uL de ADN del plásmido con agua estéril. Una vez resuspendido se colocó a 42°C durante 40 minutos, después se centrifugaron a 13000 g durante 30 segundos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento con 200 uL de agua estéril. Este volumen se pipeteó a placas con medio SD y las auxotrofías adecuadas y se extendió por la placa con una varilla de vidrio, esterilizándola usando el mechero Bunsen y mojándose en alcohol cada vez. Las placas se incubaron durante 3-4 días a 30°C.

Transformación en bacterias

Para la transformación en bacterias se usaron células competentes DH5 α y el protocolo subcloning efficiency DH5 α competent cells de Invitrogen. En condiciones de esterilidad en el laboratorio, se pipetearon 50 uL de las células competentes y 10 uL de ADN a transformar en un eppendorf. Se mezclaron ligeramente las células y el ADN de la transformación, se incubó durante 30 minutos en hielo, se realizó un choque térmico a las células de 20 segundos a 42°C y se incubó de nuevo 2 minutos en hielo. Se añadió 500 uL de medio (en este caso medio LB sin ampicilina) y crecieron a 37°C durante 1 hora. A continuación, se centrifugaron las células y se eliminaron 300 uL del sobrenadante y con los 200 uL restantes las células fueron diluidas para plaquearlas en placas con medio (LB con ampicilina) y se dejaron incubar a 37°C durante la noche.

Microscopía y fluorescencia

Para los ensayos de microscopía se utilizaron células que crecieron a 28°C durante toda la noche en diferentes medios: Sgal y SD suplementados con aminoácidos, se concentraron las cepas 10 veces para poder observarlas al microscopio. Se empleó un microscopio de fluorescencia Leica DM5000 con el objetivo de 100x con aceite de inmersión. Para poder observar la fluorescencia de las cepas se usaron diferentes filtros: el GFP de fluorescencia verde con frecuencia de excitación BP 470/40 y frecuencia de emisión BP 525/50, y el filtro N21 de fluorescencia roja con frecuencia de excitación BP 515-560 y frecuencia de emisión LP 590.

RESULTADOS

DISEÑO Y OBTENCIÓN DE CEPAS OM45-COH

Las cepas de *S. cerevisiae* OM45-coh se obtuvieron mediante ingeniería genética y técnicas generales para la obtención de ADN recombinante. Estas cepas se han obtenido realizando una inserción en el genoma de la proteína cohesina a continuación de la proteína ya existente OM45.

En primer lugar, se procedió al diseño de los cebadores con extremos colgantes denominados OM45 forward (5' GATAAGGGTGATGGTAAATTCTGGAGCTCGAAAAAGG ACCCTGTAACAACACCACCGC3') y OM45 reverse (5' TAGATATATAACGGTATTTTATG TATGCAGCTATACCCCGCATAGGCCACTAGTGGATC 3'). Se diseñaron dos cebadores en los cuales se ha mantenido la parte fija, procedente del plásmido pUG27-coh-myc descrito en el artículo (Sujin et al.; 2016); y, por otro lado, la parte colgante se creó de nuevo para poder producir la recombinación homóloga en el sitio del genoma donde se encuentra OM45, lugar diferente de inserción al del artículo original (Figura 3).

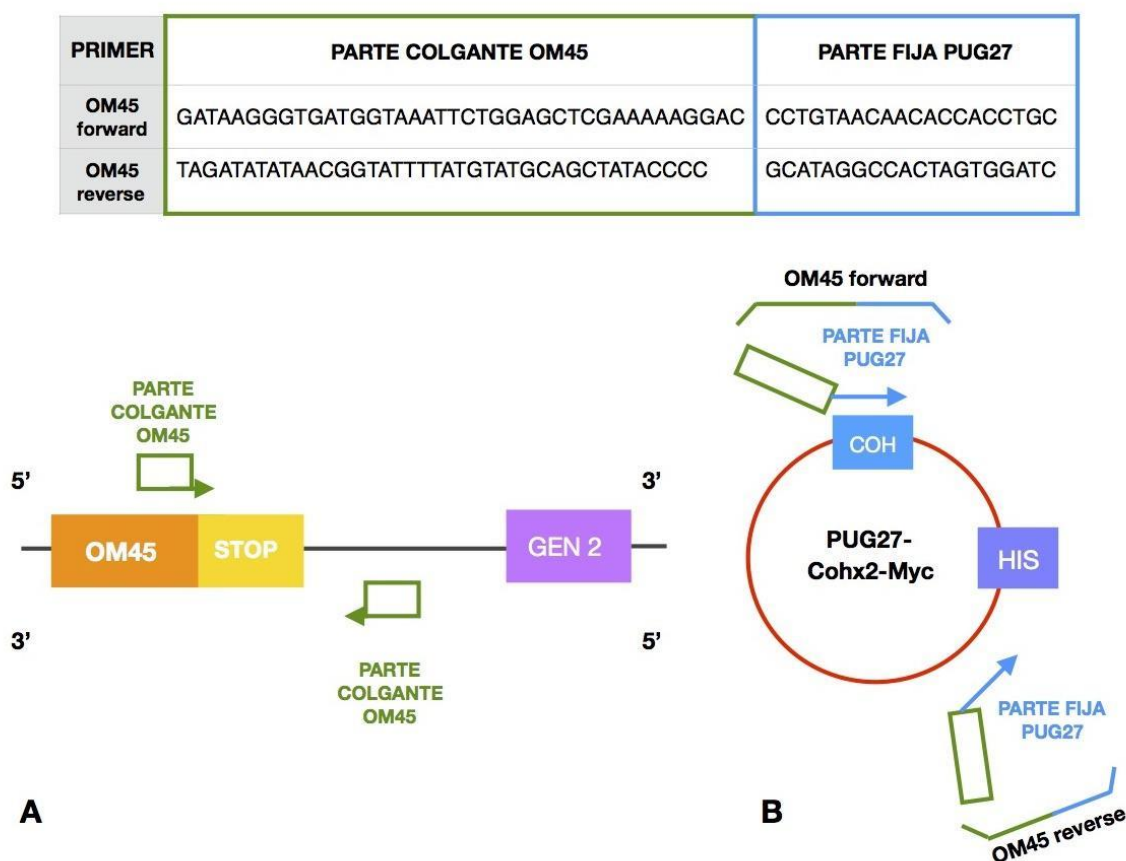


Figura 3. Diseño de cebadores OM45 forward y reverse. En la tabla superior están explicadas las secuencias de ambos, con cada una de las partes. Estos están formados por una parte fija, procedente de un artículo publicado (x), y una parte colgante diseñada en este estudio para que produzca la recombinación homóloga a continuación del gen OM45. En la figura A, está explicado el diseño de la parte colgante para que la recombinación se haga a continuación del gen OM45 sin el stop, y el cebador reverse, la parte colgante está una distancia mínima del gen OM45 y también a la distancia adecuada del siguiente gen. En la figura B, se observan los cebadores completos (con parte fija y colgante) por donde amplificarán el plásmido pUG27-coh2-myc. La parte fija (ya diseñada en el artículo Sujin et al.; 2016) de los cebadores será la encargada de hibridar con este plásmido y el producto de PCR (2 Kpb) contendrá la cohesina y la histidina.

RESULTADOS

Existen ciertos aspectos importantes que se consideraron a la hora de diseñar los cebadores. En primer lugar, en la parte colgante del cebador, por donde se realiza la recombinación homóloga con OM45, no se ha incluido el “stop” para que la inserción de la cohesina se haga a continuación del gen OM45 y se traduzcan de forma seguida. Asimismo, otra cuestión a la que se dio importancia es la distancia entre los cebadores, existe una separación de 200 nucleótidos aproximadamente, distancia establecida para editar mínimamente el genoma. Otra consideración que se tuvo en cuenta fue no afectar ningún promotor, el siguiente gen más próximo en dirección 3'-5' es VHS2, y está a una distancia adecuada del OM45 reverse, suficiente para que no afecte a su expresión.

Una vez diseñados los cebadores, se llevó a cabo una PCR del plásmido pUG27-coh-myc para amplificar la proteína cohesina. Para ello, las condiciones que se usaron fueron las descritas en materiales y métodos, y la reacción de volumen total 50 uL constaba de los siguientes componentes: 1uL de pUG27-coh-myc, 1 uL de OM45 forward, 1 uL de OM45 reverse, 5 uL de tampón X, 5 uL de dNTPs 10X, 2 uL de magnesio, 1 uL de polimerasa y 34 uL de H₂O estéril. Posteriormente, se realizó la comprobación de la PCR con un gel de electroforesis de agarosa. En este, se inyectaron 12 uL del producto de PCR con loading buffer. Los resultados del gel fueron positivos, ya que el producto obtenido tiene aproximadamente 2 Kpb, tamaño que coincide con el fragmento de pUG27 (que contiene cohesina y la auxotrofia histidina) que se amplificó en la PCR.

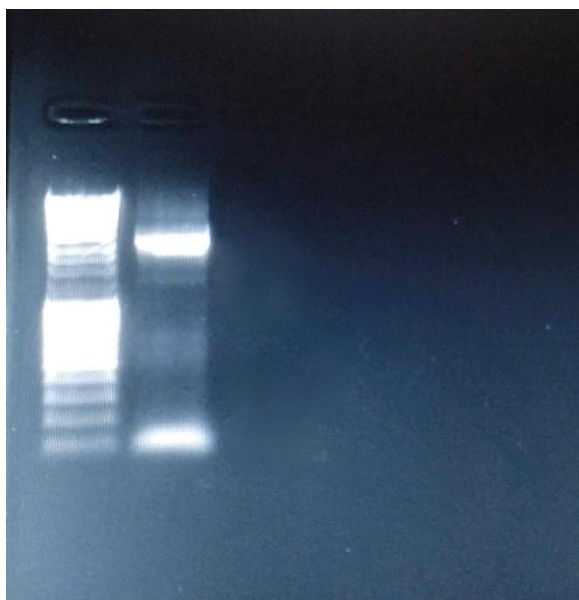


Figura 4. Gel de electroforesis comprobación del producto de PCR del plásmido pUG27-coh-myc. El producto de PCR esperado es el fragmento de 2 Kpb que contiene el gen de cohesina y la auxotrofia histidina. En la imagen se pueden observar dos líneas, la de arriba corresponde al tamaño esperado de 2 Kpb y el de menor tamaño es debido a primer-dímero, común en este tipo de PCRs.

A continuación, este producto de la PCR se utilizó para realizar la transformación en levadura con el protocolo publicado en *Nature* (Gietz & Schiestl, 2007) tal y como viene detallado en el apartado de materiales y métodos. Tras la transformación, se crecieron las cepas de levadura en placas con SD e histidina, y para proceder con el siguiente paso, se crecieron 7 colonias en medio SD e histidina a 28°C durante toda la noche.

Posteriormente, se realizó una extracción de ADN genómico, para comprobar que la integración de la cohesina a continuación del gen OM45 había sido correcta. Para ello, se usó el protocolo Fast isolation of chromosomal DNA from yeast, tal y como está detallado en materiales y métodos. Y de la extracción del ADN genómico se realizó una PCR con las

RESULTADOS

condiciones y componentes anteriormente explicados para comprobar la inserción, cambiando esta vez únicamente el ADN que es el genómico obtenido en el paso anterior, y los cebadores son el KANB (como forward) y OM45ChkTag (como reverse). Ambos cebadores fueron diseñados para amplificar específicamente la inserción de cohesina a continuación del gen OM45 cuyo producto fuera de 400 pb.

A modo de comprobación se realizó un gel de electroforesis de agarosa para observar si había positivos en las transformaciones realizadas. El gel indicó que de las 7 colonias obtenidas hubo positivos en las número 3, 4 y 6 ya que el tamaño del producto de PCR, es decir, del fragmento amplificado por los cebadores KANB y OM45ChkTag es de 400 pb y solo se ven tres líneas que tengan ese tamaño en el gel.



Figura 5. Gel de electroforesis de agarosa para comprobar la existencia de positivos en las 7 colonias de *S. cerevisiae* OM45-coh de las que se realizó la extracción de ADN genómico. De las 7 colonias, las número 3, 4 y 6 son positivas, con un tamaño de 400 pb, indicando una correcta inserción de la proteína cohesina en el genoma de la levadura.

Una vez comprobada la transformación con el gel, las colonias positivas de la transformación se crecieron en nuevas placas para separarlas de las colonias con resultado negativo en la transformación. Por tanto, las colonias de la transformación que estaban en placas de SD e histidina, esta vez crecieron solo en YPD, sin histidina, ya que como son positivas, la inserción de la cohesina tiene la auxotrofia histidina y, por tanto, no necesitan un medio que le proporcione ese aminoácido, ya que la inserción se encuentra ya formando parte del genoma de la levadura. Las placas de YPD con las levaduras ya transformadas con OM45-coh2 crecieron a 26°C durante toda la noche, y al día siguiente se comprobó que habían crecido como era de esperar.

DISEÑO Y OBTENCIÓN DE CEPAS ATG11-TAP-DOC

En el laboratorio en paralelo se hizo la construcción del plásmido pUG6 con el inserto de la doquerina. Este fue usado para la obtención de cepas Atg11-tap-doc, para ello se procedió a la obtención del fragmento del plásmido pUG6 con la doquerina, para transformarlo en cepas de la colección con el gen Atg11 unido al epítipo Tap.

RESULTADOS

En primer lugar, se realizó la PCR del plásmido pUG6 usando los cebadores TAPDoc forward y reverse, con el fin de amplificar el fragmento Doc-loxP-Kan-loxP. El producto de la PCR fue analizado con un gel de agarosa y la banda coincidía con el tamaño del fragmento amplificado. Tras la PCR, se procedió a la purificación del producto con el protocolo de purificación GeneClean de MP Biomedicals, detallado en materiales y métodos.

A continuación, se hizo la transformación en levadura de las cepas de levadura que contenían el Atg11 unido a TAP y la auxotrofia HIS3 usando el protocolo publicado en *Nature* (Gietz & Schiestl, 2007) descrito en el apartado de materiales y métodos. Como resultado, al realizar la recombinación homóloga se sustituyó un fragmento del genoma en el que se encontraba la auxotrofia histidina y se insertó la auxotrofia de kanamicina junto a la doquerina. Y, por último, las células de levadura transformadas que contienen ATG11-TAP-Doc fueron plaqueadas en YPD con 100µl de antibiótico Geneticina (Life Technologies).

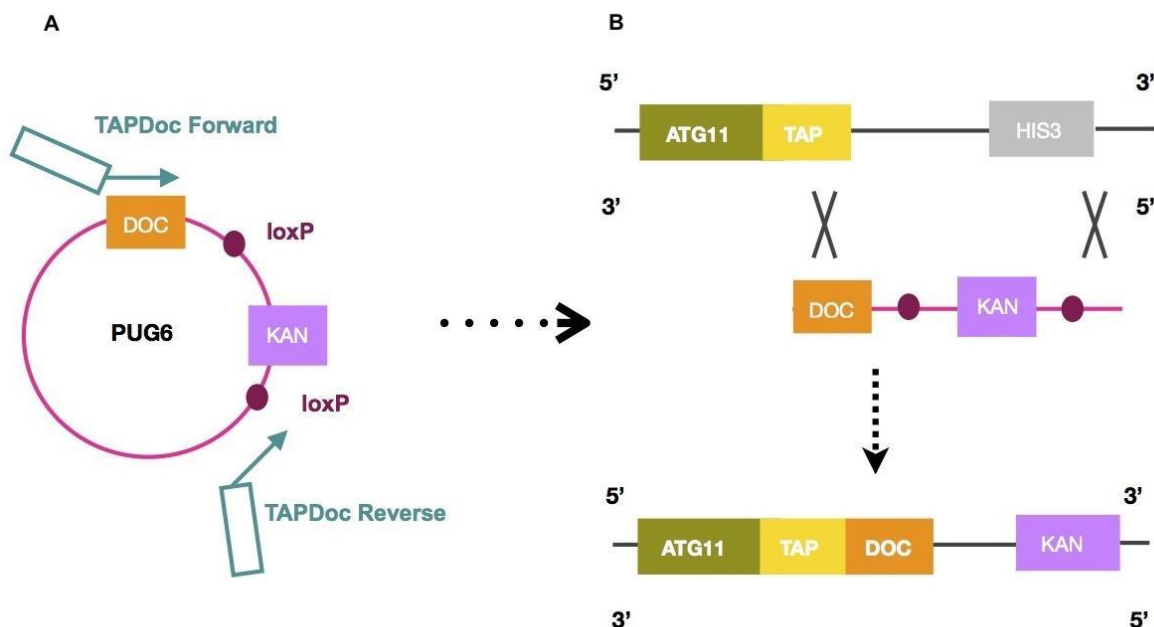


Figura 6. (A) Amplificación con los cebadores TAPDoc forward y reverse del fragmento Doc-loxP-Kan-loxP del plásmido pUG6 para su posterior inserción en el genoma de las cepas Atg11-Tap. (B) Inserción por recombinación homóloga del fragmento obtenido por amplificación en la figura A en el genoma de las cepas Atg11-Tap, sustituyendo la auxotrofia histidina por kanamicina, obteniendo como resultado cepas ATG11-TAP-DOC.

DISEÑO Y OBTENCIÓN DE CEPAS ATG11-TAP-DOC + OM45-COH

De la misma forma que se ha explicado la obtención en los dos apartados anteriores de las cepas OM45-COH y ATG11-TAP-DOC, se obtuvo la combinación de ambas. En primer lugar, las cepas de ATG11-TAP que contenían la auxotrofia HIS3, al transformarlas y obtener las cepas de levadura ATG11-TAP-DOC se sustituyó la auxotrofia histidina por la de kanamicina. A continuación, sobre esta cepa ATG11-TAP-DOC se pudo transformar, se repitió el procedimiento explicado en los apartados anteriores, para obtener la cepa ATG11-DOC-OM45-COH.

INSERCIÓN DEL GEN ROSELLA (de pVT100) EN p415

PCR, Purificación y digestión de Rosella

En primer lugar, se realizó una PCR del plásmido pVT100. Para ello, en los primeros intentos de PCR lo realizábamos con el cebador BamHI, pero como este cebador tiene actividad estrella cortaba el plásmido por sitios no deseados. Por tanto, se decidió usar otro cebador que sustituyese a BamHI y ese fue SALI. La reacción de PCR constaba de un volumen total de 50 uL con los siguientes componentes y volúmenes: 1 uL del plásmido pVT100, 2 uL del cebador NheI, 2 uL del cebador Sall, 5 uL del tampón KCL, 5 uL de dNTPs, 2 uL de magnesio, 1 uL de ADN polimerasa y 32 uL de H₂O estéril; y las condiciones que se aplicaron en el termociclador fueron las descritas en el apartado materiales y métodos. El PCR con SALI y NheI proporcionó el gen Rosella como producto, que posteriormente, se introducirá en el plásmido p415. Seguido de la PCR, se realizó una purificación del producto de la PCR usando el protocolo de purificación denominado GeneClean y se usó el nanodrop para realizar una cuantificación de la concentración del ADN del producto de Rosella y la concentración obtenida fue 145,9 ng/uL. Y, por último, para comprobar la PCR se realizó un gel de electroforesis con los productos obtenidos, siendo los resultados del gel positivos para las dos reacciones de PCR que se llevaron a cabo.

A continuación, se procedió con la digestión del producto Rosella, para ello se deben usar las mismas enzimas de restricción que se usarán en la digestión del plásmido p415 al que se ligará el producto de PCR Rosella. Por tanto, se usaron las enzimas de restricción NheI y Sall. En este caso, será una digestión escalonada ya que las enzimas de restricción NheI y Sall son eficientes con una concentración distinta de tampón, por tanto, la digestión se realiza en dos fases. En la primera digestión el volumen total es 20 uL y los componentes usados fueron: 5 uL del producto de PCR Rosella, 2 uL del tampón Tango 1X, 1 uL de la enzima de restricción NheI y 12 uL de H₂O estéril. Se dejó incubar 1 hora a 37°C, y a esa primera digestión, se le añadieron los componentes de la segunda digestión, es decir, más volumen del tampón Tango y la enzima de restricción Sall: 4,4 uL del tampón tango 1X y 1 uL de la enzima de restricción Sall. Y se dejó digerir durante 2 horas incubándolo a 37°C. Por último, se realizó la inactivación de las enzimas usadas en la digestión tratándolas con calor: 65°C durante 30 minutos.

Digestión, purificación y tratamiento con fosfatasa del plásmido p415

El plásmido p415 fue seleccionado, tras realizar varios intentos con el plásmido P413 y no obtener buenos resultados. En primer lugar, se procedió a realizar la digestión del plásmido seleccionado, primero con NheI y Buffer Tango 1X, y segundo con Sall y Buffer Tango 2X, de la misma manera que la descrita en la digestión del producto de PCR Rosella y con condiciones idénticas. Y a modo de comprobación se realizó un gel de electroforesis y se obtuvieron resultados positivos, indicando que la digestión se había realizado de la manera correcta.

Seguidamente, se purificó el plásmido digerido con el protocolo de purificación denominado GeneClean, explicado en materiales y métodos, y se usó el Nanodrop para la cuantificación de la concentración del ADN de p415, siendo esta 11,9 ng/uL. Después, se trató el plásmido digerido con fosfatasa para inactivar el fosfato del extremo 5' del ADN para que no ligase por esa zona. Esto se realizó con el protocolo de Thermo scientific llamado "Protocol for nucleic acid dephosphorylation", explicado en el apartado de materiales y métodos.

Ligación de Rosella-p415 y transformación con células competentes

Una vez amplificado el gen Rosella y digerido el plásmido p415, se realizó la ligación de este inserto y este plásmido. Se realizaron dos ligaciones con el protocolo de ligación de Thermo Fisher Scientific con un volumen total de reacción de 20 uL: 1 uL de ADN ligasa T4, 5 uL de tampón 5X rapid ligation, 2-4 uL de ADN del inserto, 2-4 uL de ADN del plásmido lineal y 8 uL de agua libre de nucleasas. La única diferencia entre las dos reacciones de ligación que se hicieron fue el volumen del inserto y del plásmido, en la ligación 1 se añadieron 4 uL de inserto Rosella y 2 uL de p415, mientras que en la ligación 2, 2 uL de inserto Rosella y 4 uL de p415. Ambas ligaciones se realizaron a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Por último, se realizó la transformación en levadura usando el protocolo subcloning efficiency DH5 α competent cells de Invitrogen detallado en materiales y métodos. El último paso del protocolo fue plaquear las células transformadas en placas de LB y ampicilina (solo las células transformadas que contengan el plásmido ligado al inserto serán las que desarrollen la resistencia ampicilina, ya que el plásmido se replicará produciendo la resistencia a ampicilina, y las células al ser resistentes crecerán en medio con ampicilina) y crecieron a 37°C durante 1 día. Tras ese período de tiempo, en las placas habían crecido colonias, estas se cogieron y pusieron el LB y ampicilina en tubos de cultivo, y se dejaron incubando a 37°C durante una noche. Por último, se aplicó el protocolo de purificación Nucleospin plasmid detallado en el apartado de materiales y métodos.

Por último, se realizó una digestión con las enzimas de restricción BamHI y NheI para comprobar si había inserción. Para ello, con un gel de electroforesis se observaron 8 líneas con un tamaño de X correspondiente al tamaño del inserto de Rosella, por tanto, 8 de las 12 transformaciones eran positivas. De esas 8 se seleccionaron 4 y se midieron con Nanodrop sus concentraciones de ADN (siendo 512,6 ng/uL; 516,9 ng/uL; 430,6 ng/uL; 433,8 ng/uL). Como paso final, se comprobó por secuenciación que la ligación había ocurrido de la forma esperada. La secuenciación realizada fue Sanger por capilar, con el aparato 3130x/Genetic Analyzer de Applied Biosystems y con el cebador GPDpro_F.

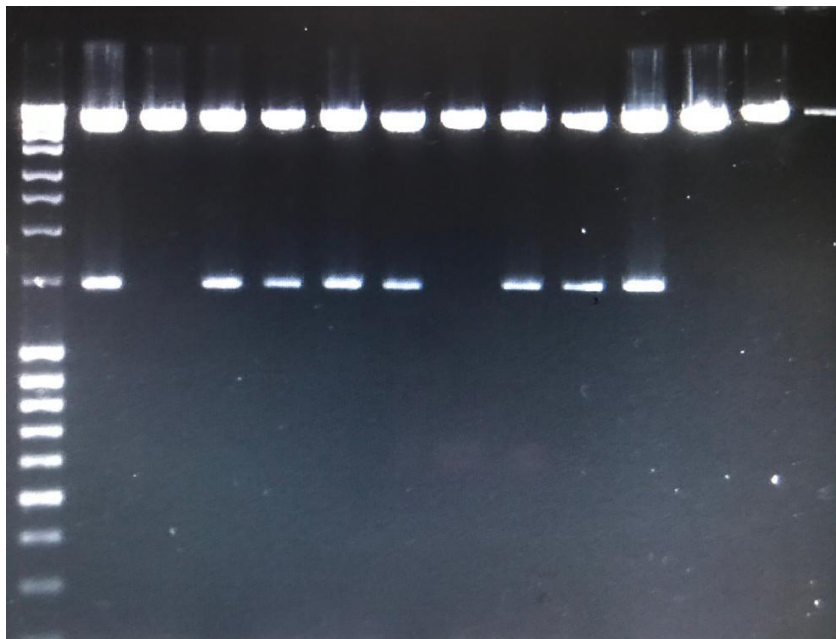


Figura 7. Gel de electroforesis de agarosa para comprobar que la ligación del inserto Rosella y el plásmido p415 era la esperada. De las 12 transformaciones realizadas, se obtuvieron 8 positivos de ligación ya que se observan 8 líneas de tamaño X, correspondiente al inserto Rosella.

CONSTRUCCIONES DE LEVADURA CON ROSELLA

Por último, se procedió a la transformación de las tres diferentes cepas ya explicadas: OM45-COH, ATG11-TAP-DOC y ATG11-DOC-OM45-COH con el plásmido obtenido en el apartado anterior, y en paralelo, como control, se ha transformado con la versión mitocondrial de Rosella (Mijaljica et al.; 2011). Se realizaron cultivos de las transformaciones con medios SD y Sgal suplementados con los aminoácidos URA3 (uracilo), HIS3 (histidina) y MET17 (metionina), ya que el plásmido p415 usado en la construcción de rosella tiene la auxotrofia LEU3 (leucina), es decir, el control. Las cepas que crecieron en estos medios se concentraron 10 veces y se observó con el microscopio de fluorescencia Leica DM5000 con el objetivo de 100x con aceite de inmersión.

DISCUSIÓN

En este estudio se hizo uso de Rosella, un marcador fluorescente que se caracteriza por ser un biosensor de doble emisión formado por una proteína fluorescente roja estable al pH y una proteína fluorescente verde sensible al pH. Bajo condiciones de crecimiento, las células “wild-type” muestran tanto la fluorescencia roja como verde de forma característica a la mitocondria. Ante escasez de nitrógeno, condición que induce la mitofagia, las células muestran fluorescencia roja pero no verde. Por tanto, Rosella se puede usar para la medición y observación del proceso de mitofagia en células.

La construcción de Rosella se transformó con cepas de levadura con la inserción Atg11-tap-doc+OM45-coh. La elección de plásmidos en los que estuviesen incluidas la doquerina y cohesina se realizó porque las interacciones cohesina-doquerina son de las más potentes del tipo proteína-proteína en la naturaleza.

En cuanto a la proteína OM45 fue elegida porque es una proteína embebida en la membrana externa mitocondrial, con una parte hacia el espacio intermembrana (extremo N-terminal) y otra hacia el citoplasma (extremo C-terminal); se localiza exclusivamente en la membrana externa mitocondrial y se caracteriza por ser una proteína muy abundante. Así pues, se sitúa donde se desea que se localice la proteína Atg11 que participa en la mitofagia y donde queremos situar el marcador Rosella para estudiar este proceso. Asimismo, el mutante de OM45 no tiene un fenotipo claro, es decir, su función no está definida, pero se conoce que no es esencial para el funcionamiento de la mitocondria. A la hora de iluminar con el marcador Rosella es imprescindible que no sea una proteína esencial para la modificación no afecte al funcionamiento de la mitocondria y no rompa la homeostasis. Por tanto, la proteína OM45 fue elegida también porque no tiene una función esencial.

Paralelamente en el laboratorio, se hizo un estudio para demostrar mediante un goteo que la adición de la cohesina a la proteína OM45 no tenía ningún efecto en el crecimiento con glicerol y por tanto que la mitocondria estaba en buen estado. Esto evidencia que la inserción de la cohesina a OM45 modificará la función de esta proteína, pero la mitocondria tiene otras vías para poder llevar a cabo esa función, es decir, la mitocondria se adapta a este cambio al no ser una función esencial.

Por otra parte, la elección del adaptador Atg11 porque en estudios anteriores en este laboratorio se demostró que participa en la mitofagia selectiva. Se han llevado a cabo distintos estudios en los que se obtuvieron buenos resultados, y el tema de mi TFG es una continuación de ellos.

Todos estos componentes se utilizaron para obtener tres cepas de levadura diferentes: la cepa OM45-coh, la cual se obtuvo mediante la inserción de la cohesina a continuación del gen OM45 presente en el genoma; la cepa Atg11-Tap-doc, la cual se consiguió a través de la inserción de la doquerina seguida del epítipo Tap que se encontraba al lado del gen ATG11; y, por último, la cepa Atg11-Tap-doc+OM45-coh, que se consiguió de la combinación de las dos anteriores.

Por otro lado, la construcción del plásmido p415+Rosella con el fragmento Rosella-doquerina se transformó con estas tres cepas, el cual se espera que se localice e ilumine la membrana mitocondrial externa. Asimismo, como control también se transformaron las tres cepas con el sistema Rosella mitocondrial (mtRosella), el cual se localiza en la matriz mitocondrial (Mijaljica et al.; 2011). Finalmente, se observaron bajo microscopio solo: los controles de la cepa silvestre y la cepa Atg11-Tap-doc+OM45-coh transformadas con

DISCUSIÓN

mtRosella; y la cepa silvestre y la cepa Atg11-Tap-doc+OM45-coh transformadas con el p415+Rosella-doquerina.

Cepas BY4741 y Atg11-Tap-doc+OM45-coh transformadas con mtRosella

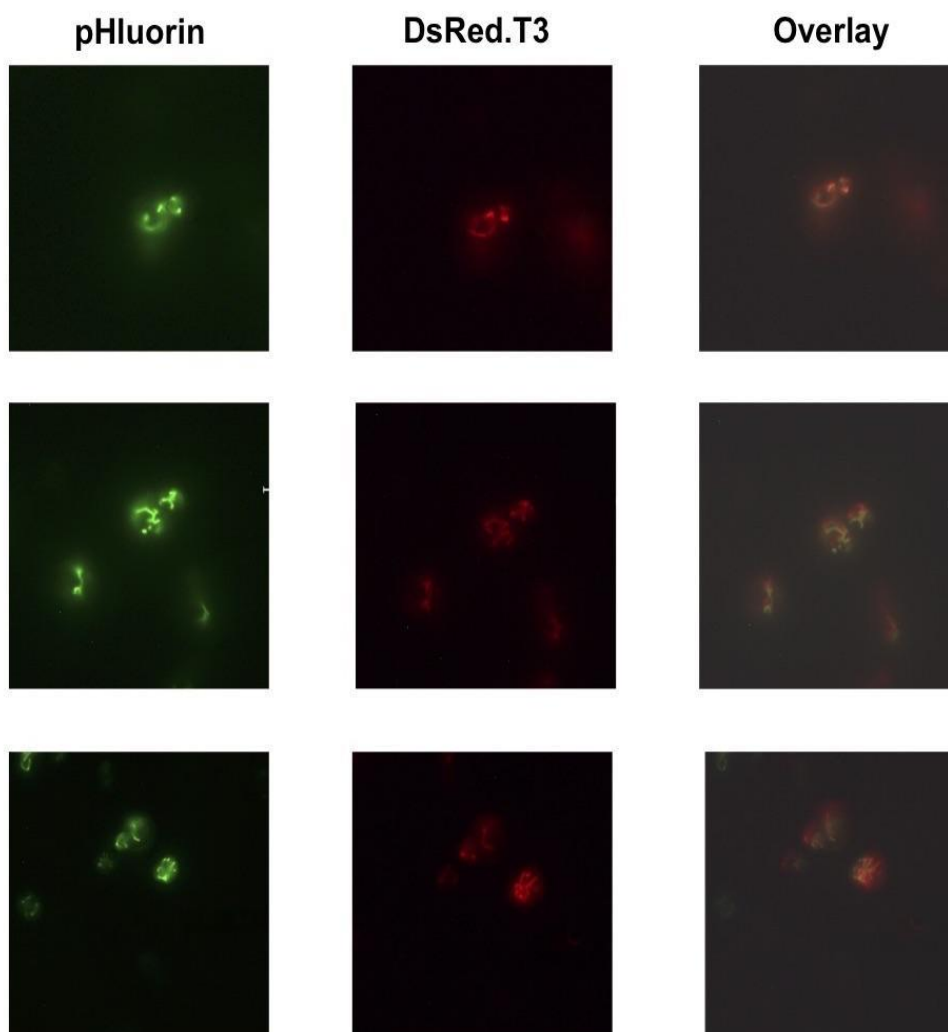


Figura 8. Detección de mitofagia con microscopio de fluorescencia en cepas de levadura BY4741 con el sistema mtRosella crecidas en medio de activación parcial Sgal.

En las cepas silvestres al insertar el sistema mtRosella, sin modificar, este marcador se localiza en la matriz mitocondrial debido a la secuencia líder mitocondrial. Al estar en la matriz mitocondrial, formando parte de una solución y con un pH de 8,2 ambas proteínas, verde y roja, fluorescen. Como podemos observar en la figura 8, se visualizó en el microscopio la fluorescencia verde (pHluorin) y roja (DsRed.T3) del marcador Rosella y no se vio ninguna diferencia entre ellos.

DISCUSIÓN

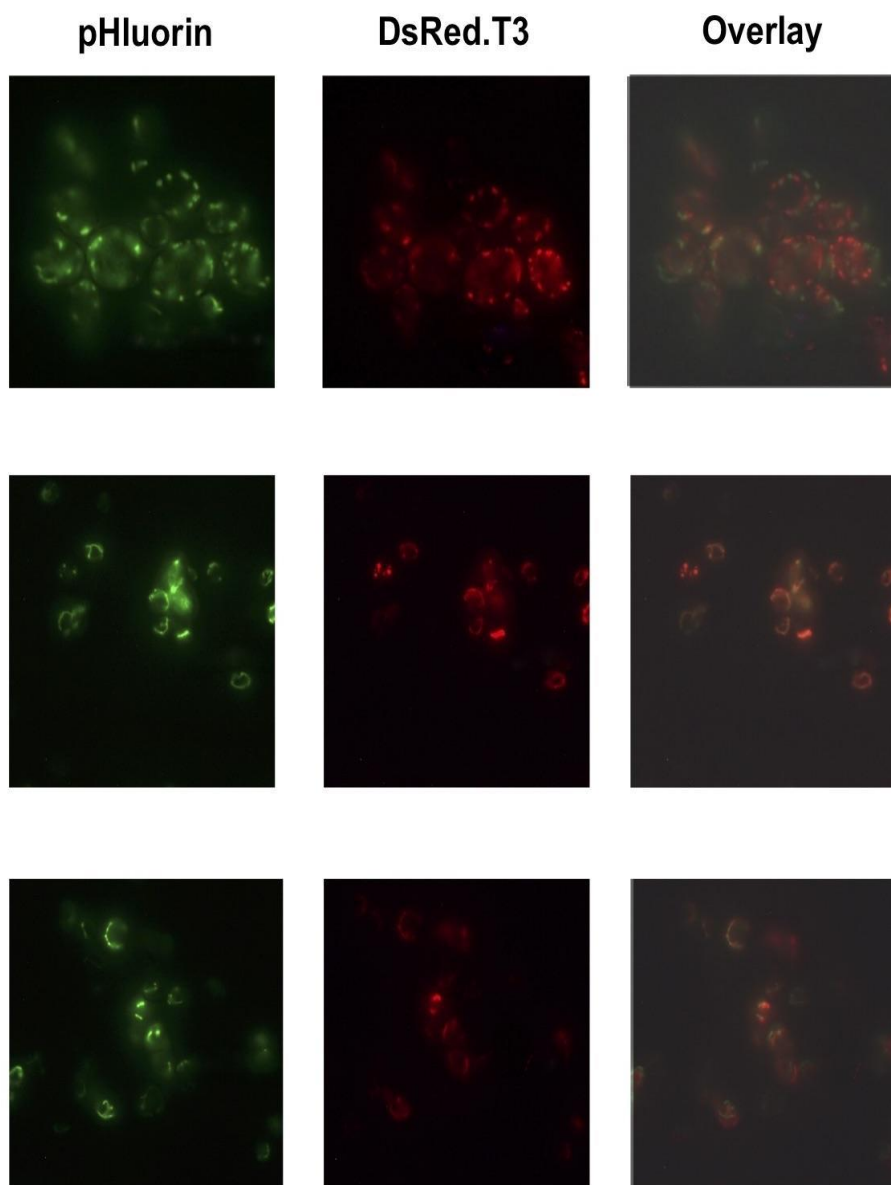


Figura 9. Detección de mitofagia con microscopio de fluorescencia en cepas de levadura Atg11-TAP-Doc+OM45-coh con el sistema mtRosella crecidas en medio de activación parcial Sgal.

En la figura 9, se puede observar la fluorescencia de las proteínas verde (pHluorin) y roja (DsRed.T3) en la matriz mitocondrial porque se usó el mtRosella que se localiza en la matriz gracias a la secuencia líder mitocondrial. A pesar de que la cepa de levadura Atg11-TAP-Doc+OM45-coh disponga de la cohesina, como el marcador Rosella no es el de la construcción del plásmido p415 con doquerina, no puede anclarse a la membrana mitocondrial externa. Por otro lado, no se observan diferencias entre la fluorescencia verde y roja como se esperaba, ya que el marcador Rosella al encontrarse diluido en la matriz puede expresar ambas proteínas correctamente.

Cepas BY4741 y Atg11-Tap-doc+OM45-coh transformadas con p415+Rosella-doc

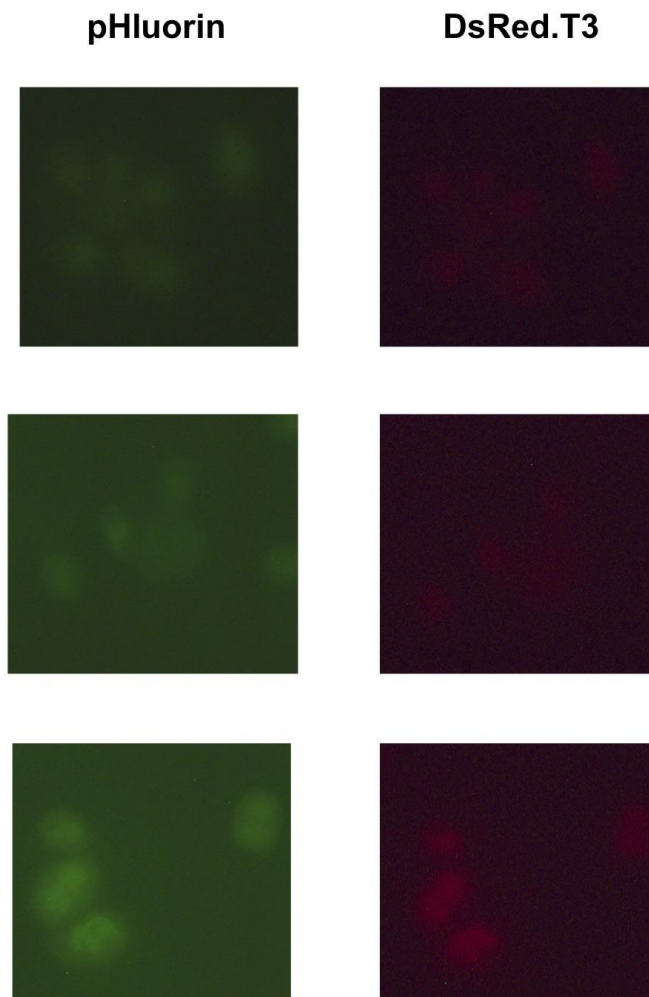


Figura 10. Detección de mitofagia con microscopio de fluorescencia en cepas de levadura BY4741 transformadas con la construcción p415+Rosella crecidas en medio de activación parcial Sgal.

En este caso, las cepas han sido transformadas con la construcción de Rosella realizada en este estudio. Esta construcción consistía en la inserción del fragmento Rosella del pVT100 al lado de la doquerina del plásmido p415, inhabilitando así que Rosella se localice en la matriz mitocondrial ya que no dispone de la secuencia líder mitocondrial. Al tener esta cepa silvestre Rosella+doquerina, necesitaría la existencia de la proteína cohesina junto a una proteína de la membrana mitocondrial externa (como OM45) para que existiese la interacción cohesina-doquerina y Rosella pudiese localizarse e iluminar esta membrana. Sin embargo, el Rosella-doquerina en la figura 10 se ve difuso ya que no se puede localizar en la membrana porque al tratarse de la cepa silvestre no se ha realizado la inserción de la cohesina al lado de OM45. Por tanto, como se puede observar en la figura no hay fluorescencia de Rosella se ve difusa.

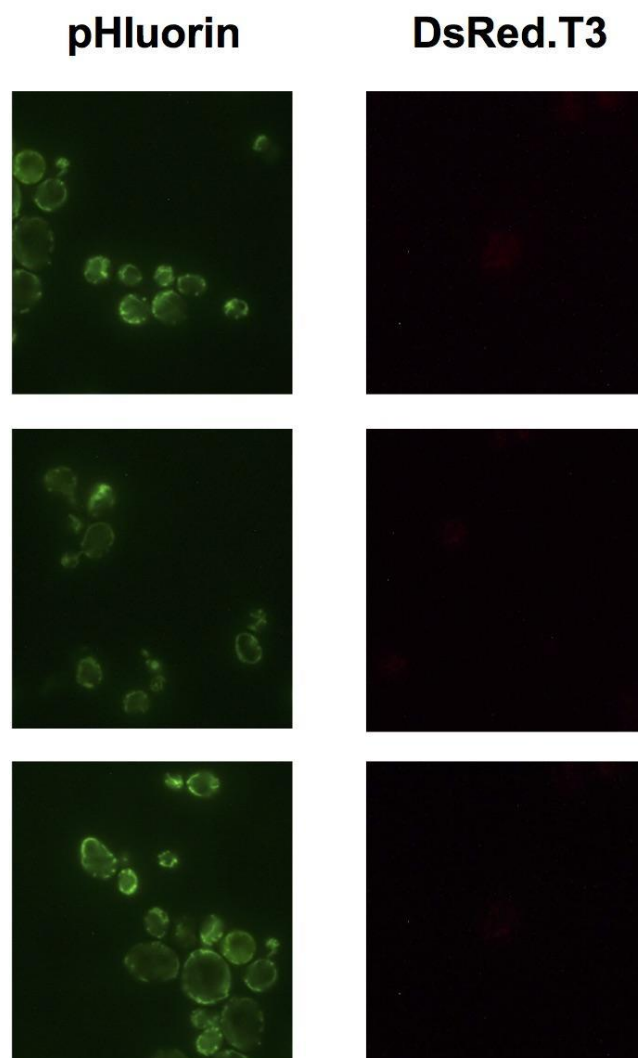

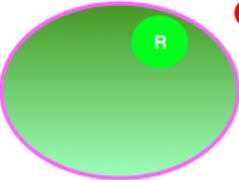
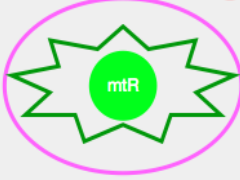
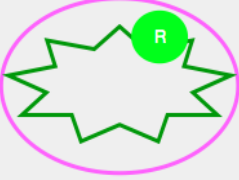


Figura 11. Detección de mitofagia con microscopio de fluorescencia en cepas de levadura Atg11-TAP-Doc+OM45-coh transformadas con la construcción p415+Rosella crecidas en medio de activación parcial Sgal.

Las cepas Atg11-TAP-Doc+OM45-coh, contienen el OM45 embebido en la membrana mitocondrial externa y unido a él, la cohesina. Esta será capaz de interaccionar con la doquerina unida a la rosella y, por tanto, como era de esperar habrá fluorescencia verde. Esto significa que el marcador Rosella se localiza en la membrana mitocondrial externa gracias a la interacción cohesina-doquerina. Sin embargo, en la figura 11, se observa que no hay fluorescencia roja, eso es debido a que la proteína DsRed.T3 necesita formar tetrámeros para producir la fluorescencia. Sin embargo, solo es capaz de hacerlo cuando está soluble en la matriz o en el citoplasma como es el caso de las cepas anteriores. No obstante, en esta cepa como está anclada a la superficie de la membrana mitocondrial externa por la cohesina, no le permite formar los tetrámeros y no emite fluorescencia roja (Figura 12).

DISCUSIÓN

Tabla 3. Tabla comparativa de emisión de la fluorescencia verde y roja por el marcador Rosella en las diferentes cepas observada al microscopio transformadas con mtRosella y la construcción Rosella-doquerina. Se puede observar que las cepas BY4741 y Atg11-Tap-doc+OM45-coh transformadas con mtRosella, se observa la fluorescencia verde y la fluorescencia roja DsRed.T3, ya que se localiza en la matriz y al estar en una solución puede formar los tetrámeros para poder producir fluorescencia roja. En contraposición, cuando estas dos cepas son transformadas con la construcción Rosella-doc es necesaria la existencia de la cohesina junto el OM45 en la membrana mitocondrial para que Rosella produzca fluorescencia verde. Por tanto, en el caso de la cepa BY4741 con Rosella-doc al no disponer en el genoma de OM45-cohesina, Rosella no se localiza en la membrana y se queda soluble en el citoplasma, por tanto, la fluorescencia verde se ve difusa y la roja sí que se expresa al estar soluble en el citoplasma puede formar los tetrámeros necesarios para producir la fluorescencia roja. Sin embargo, en la cepa Atg11-Tap-doc+OM45-coh, Rosella sí que se localiza en la membrana externa mitocondrial al interactuar la cohesina y la doquerina, por tanto, se aprecia la mitofagia de la membrana con la fluorescencia verde; pero, la proteína DsRed.T3 de Rosella no es capaz de producir fluorescencia roja (ausente el punto rojo), ya que al estar fija en la superficie de la membrana por topología no puede formar los tetrámeros.

	mtROSELLA	ROSELLA-DOC
BY		
ATG11-DOC+ OM45-COH		

En cuanto a la construcción Rosella-doquerina se ha observado que se localiza en la membrana mitocondrial externa por la interacción cohesina-doquerina como se observa en la Figura 11. Asimismo, en las cepas en las que se ha transformado con Rosella-doquerina pero que no constan en el genoma de la proteína OM45 (en la membrana mitocondrial externa) unida a la cohesina, la fluorescencia se ve difusa porque Rosella no puede localizarse en la membrana (Figura 12). Esto es debido a que no existe interacción cohesina-doquerina, y, por tanto, como era de esperar no existe fluorescencia. Por tanto, se ha podido observar que la herramienta biotecnológica que nos permite alterar la localización de las proteínas que participan en la mitofagia se ha diseñado con éxito. Y, además, se puede afirmar que la construcción Rosella-doquerina es un buen instrumento para visualizar el proceso de mitofagia selectiva en una zona concreta, ya que los resultados de microscopía son buenos.

Por otro lado, la localización del Atg11 con el sistema cohesina-doquerina en las cepas Atg11-Tap-doc+OM45-coh nos da evidencia de que la proteína Atg11 por sí misma no está induciendo la mitofagia selectiva de la membrana mitocondrial, ya que en la Figura 11 no se observan muchas vesículas, y tampoco se aprecia que la mitocondria esté amorfa o con alguna malformación. Por tanto, se deduce que hace falta algún componente más. El experimento siguiente sería estudiarlo en mitofagia, con medios sin aminoácidos y eso es un trabajo de unos cuantos meses más. Por tanto, se puede concluir que el sistema funciona, y además este mutante no es tan fuerte como para impedir que se use ya que no destruye toda la mitocondria. Se espera que el sistema se potencie cuando se induzca la mitofagia, ya que al ser un proceso multifactorial al haber ya uno de los factores reclutado (Atg11) el proceso irá más acelerado.

CONCLUSIONES

1. La inserción de la cohesina a continuación de la proteína OM45 es correcta porque hay producción de ambas proteínas. La interacción cohesina-doquerina es potente, la unión es fuerte y, por tanto, es un sistema que funciona. Esta herramienta OM45-coh que nos permite alterar la localización de las proteínas que participan en la mitofagia y fijarlas a la membrana mitocondrial externa funciona.
2. La construcción Rosella-doquerina se une bien al sistema de anclaje de membrana mitocondrial externa diseñado (OM45-coh).
3. La construcción de Rosella-doquerina como instrumento que nos permita visualizar el proceso de degradación selectiva mitocondrial tiene buenos resultados en microscopía, ayudando al estudio de la mitofagia selectiva.

EXPERIMENTOS FUTUROS

Esta herramienta se va a usar en estudios de mitofagia en las que las condiciones serán de ausencia de aminoácidos, se analizaría la mitofagia en diferentes condiciones como en presencia de valinomicina, cambio diáuxico y ayuno de nitrógeno; como se realizó en estudios de mitofagia anteriores en este laboratorio (Timón et al., 2018). Asimismo, se puede usar para estudios posteriores diferentes a la mitofagia como por ejemplo para estudiar la peroxifagia. Si en vez del OM45, se inserta la cohesina a una proteína de membrana externa del peroxisoma, se puede estudiar la peroxifagia. Por tanto, se podrían reclutar otros componentes que no fueran el Atg11, y además participaran en otros procesos de interés científico. Desarrollar estas herramientas permite cambiar la localización de cualquier proteína, o incluso inducir de forma permanente la interacción de dos proteínas. Esto último es interesante para reconducir el metabolismo en la célula, por lo tanto, se continuará en el laboratorio con su estudio.

BIBLIOGRAFÍA

1. ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. (2008). *Molecular biology of the cell*, 5th edition. Editorial EDICIONES OMEGA.
2. ARCHIVALD, JM. (2015). *Endosymbiosis and eukaryotic cell evolution*. Current biology, 25(19), 911-921.
3. 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.
4. BARRIENTOS, A.; UGALDE, C. (2013). *I function, therefore I am: Overcoming skepticism about mitochondrial supercomplexes*. Cell Metabolism, 18(2), 147- 149.
5. Bernardi, P. (1999) *Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers and permeability transition*. Physiological Reviews, 79, pp.1127-1155.
6. BHAT, A. H.; DAR, K. B.; ANEES, S.; ZARGAR, M. A.; MASOOD, A.; SOFI, M. A.; GANIE, S. A. (2015). *Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases: a mechanistic insight*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 74 (8), 101–110.
7. BIRKY CW JR. (2001) *The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models*. Annu Rev Genet, 35, 125-48.
8. BLEIER, L.; DRÖSE, S. (2013). *Superoxide generation by complex III: From mechanistic rationales to functional consequences*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 1827(11-12), 1320–1331. <http://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.12.002>
9. CARTRON, P.F., PRIAULT, M., OLIVER, L., MEËAH, K., MANON, S.; VALLETTE, F.M. (2003) *The N- terminal end of BAX contains a mitochondrial-targeting signal*. Journal of Biological Chemistry, 278, pp.11633-11641.
10. 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
11. CUERVO, A. (2011). *Chaperone-mediated autophagy: Dice’s “wild” idea about lysosomal selectivity*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 12, 535-541.
12. DENGJEL, J.; ABELIOVICH, H. (2017). *Roles of mitophagy in cellular physiology and development*. Cell and Tissue Research, 367(1), 95–109.
13. DROGE W. (2002). *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiological reviews, 82(1), 47–95.
14. DUJON B. (1996). *The yeast genome project: what did we learn?*. Trends in Genetics, 12(7): 263-270.
15. DUJON, B. (1996). *The Yeast Genome Project: What did we learn?* Trends in Genetics, 12(7), 263-70
16. DUNN, D.J.; ALVAREZ, L.A.; ZHANG, X.; SOLDATI, T. (2015). *Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis*. Redox Biology, 6, 472-485. doi: 10.1016/j.redox.2015.09.005.
17. EIYAMA, A.; KONDO-OKAMOTO, N.; OKAMOTO, K. (2013). *Mitochondrial degradation during starvation is selective and temporally distinct from bulk autophagy in yeast*. FEBS Letters, 587(12), 1787–1792.
18. EPHRUSSI, B.; SLONIMSKI, P. P. (1955). *Yeast Mitochondria: Subcellular Units involved in the Synthesis of Respiratory Enzymes in Yeast*. Nature, 176(4495), 1207–1208.
19. 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.
20. FRIEDMAN, JR.; NUNNARI, J. 2014. *Mitochondrial form and functions*. Nature, 505(7483) 335-343.

21. GHAEMMAGHAMI, S.; HUH, W.-K.; BOWER, K.; HOWSON, R. W.; BELLE, A.; DEPHOURE, N.; ... WEISSMAN, J. S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*, 425(6959), 737–741.
22. GHELLI, A.; TROPEANO, C. V.; CALVARUSO, M. A.; MARCHESINI, A.; IOMMARINI, L.; PORCELLI, A. M.; ... RUGOLO, M. (2013). *The cytochrome b p.278Y>C mutation causative of a multisystem disorder enhances superoxide production and alters supramolecular interactions of respiratory chain complexes*. *Human Molecular Genetics*, 22(11), 2141–2151.
23. GIBSON, B.W. (2005). *The human mitochondrial proteome: Oxidative stress, protein modifications and oxidative phosphorylation*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 911–1144.
24. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, JMC. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed.. Oxford University Press; Nueva York.
25. 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.
26. KANKI, T; KLIONSKY, D.J. (2008). *Mitophagy in Yeast Occurs through a Selective Mechanism*. *The Journal of Biological Chemistry*, 283 (47), 32386–32393.
27. KANKI, T; KLIONSKY, D.J.; OKAMOTO, K. (2011). *Mitochondria Autophagy in Yeast*. *Antioxid Redox Signal*, 14(10), 1989–2001.
28. KLIONSKY, D. (2007). *How shall I eat thee?* *Autophagy*, 3, 413-416.
29. KLIONSKY, D.J. (2007). *Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade*. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 8, 931–937.
30. KONDAPALLI, C., A. KAZLAUSKAITE, N. ZHANG, H.I. WOODROOF, D.G. CAMPBELL, R. GOURLAY, L. BURCHELL, H. WALDEN, T.J. MACARTNEY, M. DEAK, A. KNEBEL, D.R. ALESSI, M.M. MUQIT., (2012). *PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine 65*. *FEBS Open Biology*, 2, 120080.
31. LAPUENTE-BRUN, E.; MORENO-LOSHUERTOS, R.; ACIN-PEREZ, R.; LATORRE-PELLICER, A.; COLAS, C.; BALSÀ, E.; ... ENRIQUEZ, J. A. (2013). *Supercomplex Assembly Determines Electron Flux in the Mitochondrial Electron Transport Chain*. *Science*, 340(6140), 1567–1570.
32. LI J.; O W.; LI W.; JIANG Z.-G.; GHANBARI H. (2013). *Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders*. *International Journal of Molecular Science*, 14, 24438-24475.
33. LI, P., NIJHAWAN, D., BUDIHardjo, I., SRINIVASULA, S.M., AHMAD, M., ALNEMRI, E.S., WANG, X. (1997). *Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade*. *Cell*, 91(4), pp.479-489
34. LIU, L.; SAKAKIBARA, K.; CHEN, Q.; OKAMOTO, K. (2014). *Receptor-mediated mitophagy in yeast and mammalian systems*. *Cell Research*, 24(7), 787–795.
35. LORENZO CORCHÓN, A. “La teoría endosimbiótica”. *asturnatura.com*. Núm. 510. <https://www.asturnatura.com/articulos/organulos-energeticos/autonomia-mitocondria-cloroplasto.php> ISSN 1887-5068 Visto el 29 de mayo de 2019.
36. MARANZANA, E.; BARBERO, G.; FALASCA, A. I.; LENAZ, G.; GENOVA, M. L. (2013). *Mitochondrial respiratory supercomplex association limits production of reactive oxygen species from complex I*. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(13), 1469–80. <http://doi.org/10.1089/ars.2012.4845>
37. MARTIN, W.F.; NEUKIRCHEN, S.; ZIMORSKI, V.; GOULD, S.B.; SOUSA, F.L. (2016). *Energy for two: New archaeal lineages and the origin of mitochondria*. *Bioessays*, 38(9), 850-856.
38. MELSER, S.; CHATELAIN, E. H.; LAVIE, J.; MAHFOUF, W.; JOSE, C.; OBRE, E.; ... BÉNARD, G. (2013). *Rheb regulates mitophagy induced by mitochondrial energetic status*. *Cell Metabolism*, 17(5), 719–730.

39. MIJALJICA, DALIBOR.; PRESCOTT, MARK.; DEVENISH, RODNEY J. (2011). A Fluorescence Microscopy Assay for Monitoring Mitophagy in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Visualized Experiments*, 53, 2779.
40. 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.
41. MURPHY MP. (2009). *How mitochondria produce reactive oxygen species*. *The Biochemical journal*, 417 (1), 1–13.
42. MURROW, L. (2003). *Autophagy as a stress-response and quality-control mechanism: implications for cell injury and human disease*. *Annu Rev Pathol.*, 8, 105-37.
43. NELSON, D.L.; COX, M.M. (2000). *Lehninger Principles of Biochemistry*. Worth Publishers. Nueva York.
44. NGUYEN, T. N.; PADMAN, B. S.; LAZAROU, M. (2016). *Deciphering the Molecular Signals of PINK1/ Parkin Mitophagy*. *Trends in Cell Biology*, xx(10), 1–12.
45. 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.
46. OWENS, KJERSTIN M.; MODICA-NAPOLITANO, J.S.; SINGH, KESHAV K. (2009). *Mitochondria and cancer*, en: *Mitochondria and cancer*. Springer Science + Business Media. Nueva York, 1-22.
47. PRIAULT, M., CAMOUGRAND, N., KINNALLY, K., VALLETTE, F. AND MANON, S. (2003). *Yeast as a tool to study BAX/mitochondrial interactions in cell death*. *FEMS Yeast Research*, 4(1), pp.15-27.
48. PRIAULT, M., CHAUDHURI, B., CLOW, A., CAMOUGRAND, N., MANON, S. (1999) *Investigation of BAX- induced release of cytochrome c from yeast mitochondria permeability of mitochondrial membranes, role of VDAC and ATP requirement*. *European Journal of Biochemistry*, 260(3), pp.684-691.
49. REA, SL.; GRAHAM, B.; NAKAMARU-OGISO, E.; KAR, A.; FALK, M. (2010). *Bacteria, yeast, worms, and flies: Exploiting simple model organisms to investigate human mitochondrial diseases*. *Developmental Disabilities Research Reviews*, 16(2), 200-218.
50. RÍOS DE MOLINA, M. (2003). *El estrés oxidativo y el destino celular*. *Química viva*, 2: <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/Actualizaciones/estres%20oxidativo.htm>
51. 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.
52. SELIVANOV, V. A.; VOTYAKOVA, T. V.; PIVTORAIKO, V. N.; ZEAK, J.; SUKHOMLIN, T.; TRUCCO, M. (...); CASCANTE, M. (2011). *Reactive Oxygen Species Production by Forward and Reverse Electron Fluxes in the Mitochondrial Respiratory Chain*. *PLoS Computational Biology*, 7(3), e1001115. <http://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1001115>
53. Seres modélicos. *Entre la naturaleza y el laboratorio. Proyectos genoma blog. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)*. Delegación de cataluña. <http://seresmodelicos.csic.es/llevat.html> Visto el 29 de mayo de 2019.
54. SINGH, R. (2011). *Autophagy in the cellular energetic balance*. *Cell Metab*, 13, 495-504
55. STUART, R. A. (2008). *Supercomplex organization of the oxidative phosphorylation enzymes in yeast mitochondria*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 40(5), 411–417.
56. SUJIN, KIM; SANG-JEONG, BAE; JI-SOOK, HAHN. (2016). *Redirection of pyruvate flux toward desired metabolic pathways through substrate channeling between pyruvate kinase and pyruvate-converting enzymes in Saccharomyces cerevisiae*. *Nature, Scientific Reports*.

57. 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.
58. TZAGOLOFF, A. (1982). *Mitochondria*. Plenum Press. Nueva York.
59. VAN ROERMUND, C. W. T.; WATERHAM, H. R.; IJLST, L.; WANDERS, R. J. A. (2003). *Fatty acid metabolism in Saccharomyces cerevisiae*. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60(9), 1838–1851.
60. VARTAK, R.; PORRAS, C. A. M.; BAI, Y. (2013). *Respiratory supercomplexes: Structure, function and assembly*. *Protein and Cell*, 4(8), 582–590.
61. VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. (2002). *Fundamentals of Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., New York
62. XIE, Z.; KLIONSKY, D.J. (2007). *Autophagosome formation: core machinery and adaptations*. *Nat.Cell Biol*, 9, 1102–1109.
63. YOULE, R. J.; NARENDRA, D. P. (2011). *Mechanisms of mitophagy*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(1), 9–14.
64. ZHANG, Y., QI, H., TAYLOR, R., XU, W., LIU, L. F.; JIN, S. (2007) *Autophagy* 3, 337–346.
65. ZHU, Y., MASSEN, S., TERENCEIO, M., LANG V, CHEN-LINDNER S, EILS R, NOVAK I, DIKIC I, HAMACHER-BRADY A, BRADY NR. (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, 1099-1113.
66. ZOROV, D. B.; KRASNIKOV, B. F.; KUZMINOVA, A. E.; VYSOKIKH, M. Y.; ZOROVA, L. D. (1997). *Mitochondria Revisited. Alternative Functions of Mitochondria*. *Bioscience Reports*, 17(6), 507 LP-5.