



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Programa de Doctorado en Biotecnología

**Mecanismos de adaptación de
la actividad mitocondrial en respuesta
a estrés**

Alba Timón Gómez

TESIS DOCTORAL

Directores

Dr. Markus Proft
Dra. Amparo Pascual-Ahuir

Valencia, marzo 2016



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



La Dra. **Amparo Pascual-Ahuir Giner**, Doctora en Biología y con cargo docente como profesora titular de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural de la Universidad Politécnica de Valencia,

Y el Dr. **Markus H. Proft**, Doctor en Biología y Científico Titular del Instituto de Biomedicina de Valencia del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

CERTIFICAN:

Que la licenciada en Biotecnología por la Universidad Politécnica de Valencia, **Alba Timón Gómez**, ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación que lleva por título **“Mecanismos de adaptación de la actividad mitocondrial en respuesta a estrés”** y autorizan para su presentación para optar al grado de Doctora en Biotecnología.

Para que así conste, firman el presente documento en Valencia, a 9 de marzo de 2016.

Amparo Pascual-Ahuir

Markus H. Proft

Esta Tesis Doctoral ha sido financiada por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) (Beca/Contrato JAE PREDOC 2011) y por el Ministerio de Ciencia e Innovación (Proyecto nacional BFU2011-23326). Los financiadores no tuvieron ningún papel en el diseño del estudio, la recolección y análisis de los datos, la decisión de publicar o la preparación del manuscrito.

*Si he hecho descubrimientos
invaluables ha sido más por
tener paciencia que cualquier
otro talento.*

Isaac Newton

A mis padres, Ricardo y Pilar



AGRADECIMIENTOS

Al empezar el doctorado, la esperanza de todos nosotros es conseguir presentar relativamente pronto y bien la tesis, y sin demasiados contratiempos. Sin embargo, ahora que estoy en este punto, me doy cuenta de que siento mucha nostalgia al recordar todos los momentos, buenos (y no tan buenos), que he pasado mientras llevaba a cabo esta tesis. No quiere decir que no me guste lo que ahora viene, sino que siento que se acaba una etapa que es difícil que se vuelva a dar. Así que antes de finalizarla por completo, me gustaría agradecer a todos los que me habéis acompañado a lo largo de este trabajo y habéis hecho posible que llegara a buen fin.

En primer lugar, me gustaría dar las gracias por esta tesis a mis directores, Markus y Payo, por confiar en mí desde el primer momento y darme la oportunidad de trabajar con vosotros. Habéis sido los primeros directores en darme la autoestima suficiente para trabajar, pensar y actuar por mí misma, haciendo que me interesara por todo. Siempre me habéis animado a aportar mis propias ideas, la mayoría erróneas, para luego dirigirme por el buen camino. Sólo espero algún día poder imitaros y alcanzar esa capacidad para generar buenas hipótesis, incluso a partir de resultados que en un principio yo consideraba malos. Gracias por hacerme ver que el hecho de que no salga lo esperado, sólo hace al resultado mucho más interesante. Esta experiencia ha sido muy valiosa para mí y siempre recordaré vuestros consejos. Sois una gran inspiración, no sólo a nivel profesional, sino también personal. Habéis formado una gran familia aquí en el laboratorio (además de la vuestra, que ya suficiente trabajo os da) gracias a vuestra empatía y a vuestras ganas de crear un buen ambiente de trabajo; y creo que hablo por todos al decir que

cualquiera que haya trabajado aquí, no desaprovecharía la oportunidad de volver.

Muchas gracias también a Ramón, Mariche, Lynne, Pepe y Joserra, por estar ahí siempre como grandes “vecinos” en el IBMCP. Ya que no sólo hemos compartido reactivos y lugares comunes, sino que siempre me habéis ayudado en todo lo necesario y habéis colaborado para que las cosas saliesen bien. Gracias a Mariche y Ramón, por todos vuestros consejos y por enseñarme la química más básica detrás de cada reactivo. Gracias Lynne, por las conversaciones y las carreras a por café, por dejarme usar esa Nespresso (sin la cual mi eficiencia hubiese decaído estos años) y por lo bien que lo hemos pasado en las cenas. Gracias Pepe y Joserra, porque compartir el laboratorio con vosotros fue muy fácil y agradable.

Gracias a mis compañeros de laboratorio 1.09, por el buen rollo que siempre ha existido. Gracias Fernando, Marta, Ale y Rafa, por ser mis primeros mentores en el laboratorio. Gracias a Mar, porque aunque no nos conocimos mucho, tu tesis ayudó a que surgiese la mía. En especial, me acuerdo de Leti, que me ayudó al principio con todo lo relativo al análisis de proteínas a pesar del poco tiempo que estuvo de estancia. Cuando empecé, todos vosotros hicisteis que me sintiese muy a gusto. Al ir acabando vuestros proyectos, el laboratorio pareció quedarse vacío, pero llegó gente nueva con la que he pasado también grandes momentos. Gracias Isa, Elena y Sara, por las risas, las cenas, las cervezas, el belén “científico” de navidad, las locuras, la canción de “Emborracharme” que sonaba cada tarde, y un largo etcétera. Sé que os hago mucha broma con el hecho de que estoy más tranquila sin vosotras, pero os echaré mucho de menos y espero una visitilla en Miami.

No me puedo olvidar de la gente que ha pasado brevemente por el laboratorio, especialmente Dani y Laura (entre tantos otros), por colaborar en ese buen rollo general. Gracias Pilar, por tus conversaciones que

siempre acababan en debate. También tengo que agradecer la compañía de personas de todo el instituto, porque hemos compartido grandes momentos y muchos consejos, hemos hecho desde una excursión por la montaña hasta un lípdub por el IBMCP, pasando por cenas, carreras de San Silvestre y escapadas a por un helado ;) Gracias Jesús, Gaetano, Carla, Marcos, Lola, Enric, Félix, Guillem, Vicent, Alba, Mari Carmen y tantos otros, por estar siempre ahí y hacer más alegres los pasillos. Gracias a las "viejas glorias", aunque ya no estén por el instituto, Balta y Cándido. Gracias a mis "runners", Ceci, Patrí (my moon!), Laura y Crís, por enseñarme quién era Thor y por hacerme salir a correr 3 veces al año (bolsa del corredor conseguida!!). Gracias Bea, porque a pesar de estar en el piso de abajo, nuestros encuentros siempre eran una alegría y nos ayudábamos moralmente con los malos resultados o las semanas de más faena. Y, finalmente, tengo un recuerdo especial para Edu, por ser un gran amigo y compartir tantas meriendas que nos ayudaron a ambos psicológicamente a aguantar malos momentos personales y profesionales. Gracias por esa actitud tan "juvenil" que alegra incluso a los que tenemos mala cara por la mañana (aunque no sepamos demostrarlo en esos momentos de sueño :P).

Pero mi tesis no acabó en el IBMCP. En estos últimos meses de traslado, tengo que agradecer también por su compañía a Pascual, nuestro vecino en el IBV. No sólo transmite conocimiento, sino también una alegría muy necesaria. Me ha encantado compartir bromas contigo y con todos los miembros de tu laboratorio. Tanto vosotros como el resto del instituto nos habéis facilitado mucho la incorporación a un nuevo lugar de trabajo. Gracias a todos por hacerme (y hacernos) sentir tan aceptados en el nuevo instituto, y por nombrarme "Ministra de Exteriores" de la Comisión de Festejos 2016. En especial, gracias Carla, Carmen y Ada, por

vuestra compañía por las tardes, por las risas y por prestarme ayuda sin necesidad de que os la pidiera.

Además de los compañeros de laboratorio, quiero referirme también a mis compañeros en la Junta Directiva de FEBiótec; en la cual entré casi "por coacción" de Joa, pero al final resultó una de las mejores experiencias que he tenido. Gracias Ale, Ángela, Sandra, Álex, Alba Olivares, Roi y un gran número de gente que continúa haciendo posible que se conozca y se respete la biotecnología en España. Me enseñasteis a trabajar en grupo y sacar adelante proyectos, simplemente con ilusión, trabajo y muchas reuniones por Skype. Sois grandes personas y, aunque estemos repartidos por España (y por el mundo), siempre acabamos juntándonos (a pesar de que luego utilizéis esos encuentros para liarme en nuevos proyectos). Gracias por estar ahí incluso en los malos momentos. Se os echa de menos, Clara y Albert.

También tengo un especial cariño a todas mis compañeras de vóley, tanto de Píccassent como de Sedaví, que habéis sido mi vía de escape durante estos 4 años. Empecé a jugar de nuevo creyendo que no tendría tiempo, pero al final os convertisteis en una parte del día sin la cual no podía estar. Lo único de lo que me arrepiento es de no haber vuelto a jugar antes. Me habéis demostrado que sois grandes amigas, dentro y fuera del campo. Gracias también a mis "niñas" de Salesianos, porque siempre me habéis hecho sonreír y me habéis enseñado más cosas que yo a vosotras (sobre todo la paciencia!).

Gracias a mis Oceanic Six, compañeros de carrera que os habéis convertido en inseparables incluso en la distancia. Charlie, Sara, Estre, Meri, Batir y Estefi (no eres de la carrera, pero te adoptamos :P), cuesta mucho reunirnos pero hemos sido grandes compañeros de clase y de viajes (Oporto, Berlín, Suecia...), y cuando nos juntamos parece que no pase el tiempo. El día 16 de abril nos volvemos a ver todos! Gracias Shey y Javi

(y Nera y Jana), porque cuando voy a Castellón me hacéis sentir como si no me hubiese ido nunca. Aunque ahora me vaya aún más lejos, sé que no va a cambiar nuestra amistad con todos vosotros y eso me tranquiliza y me alegra muchísimo. Todos vosotros sois mis constantes ;)

Y finalmente, gracias a mi familia. Gracias Inma, por ayudar a que este trabajo tuviese un toque de diseño y no fuese “tan científico”. Gracias Eva, mamá y papá, por ayudarme a llegar donde estoy. Os habéis implicado muchísimo a lo largo de mi formación y durante el doctorado, en los resultados que tenía y en los progresos, aunque “no sea especialista en nada”. Siempre me habéis animado y si algo no salía, me decíais que tocaba volverlo a repetir (y que para algo me tenía que servir haber perdido tantos partidos en vóley). Y aunque no entendéis la mayor parte de lo que hago, me escucháis cuando os explico mis cosas con los “bichitos” y me preguntáis por mis progresos. También me habéis enseñado a no darle más importancia a las cosas de la que tiene y a priorizar. Incluso me habéis ayudado a retocar y corregir la tesis! Por último, gracias a Pere, por haber escogido estar a mi lado, aquí y en cualquier parte del mundo, por tener tantas ganas de viajar y tener nuevas experiencias como yo, por la paciencia que has tenido cuando me frustraba y porque, a pesar de “no poder ayudarme a escribir la tesis”, has hecho todo lo posible para que yo no tuviese que pensar en nada más. Sin tí, me hubiese costado mucho más acabar esta tesis y no me habría lanzado a buscar un postdoc como lo he hecho. ¿Tu recompensa?... ¿Qué te parece empezar una nueva vida juntos en la otra parte del mundo?



RESUMEN

Las células eucariotas responden a cambios en su entorno (“estrés”) a través de rutas de transmisión de señales que coordinan respuestas adaptativas muy complejas. Las mitocondrias son orgánulos muy dinámicos capaces de responder a diversos estímulos externos. En estudios anteriores, se demostró que la mitocondria tiene un papel en la adaptación a estrés hiperosmótico, ya que los mutantes con defectos en diversos componentes mitocondriales muestran mayor sensibilidad a este estrés. En este trabajo, se ha investigado nuevos mecanismos de adaptación de la actividad mitocondrial en respuesta a estrés.

Por una parte, se ha estudiado el papel del complejo transportador de piruvato mitocondrial (MPC) en esta adaptación. Este transportador está conformado por tres proteínas en levadura: Mpc1, Mpc2 y Mpc3. El gen *MPC3* sufre una fuerte inducción transcripcional en condiciones de estrés osmótico y cambio diáxico, que se traduce en un aumento de la cantidad de proteína Mpc3. Esta regulación se vio que dependía de la ruta HOG, implicada en la respuesta a estrés osmótico, y no ocurría en Mpc1 y Mpc2. Se comprobó, además, que los cambios en la composición de MPC en la mitocondria regulaban la biosíntesis de aminoácidos, la capacidad respiratoria y la tolerancia a estrés oxidativo de la célula. De esta forma, Mpc2 es la proteína más abundante en condiciones fermentativas sin estrés y es necesaria para la biosíntesis de aminoácidos; mientras que Mpc3 es el miembro más abundante ante estrés salino o cuando se requiere una elevada tasa respiratoria. Además, Mpc3 estimula la respiración y aumenta la tolerancia a estrés oxidativo. Por tanto, nuestros resultados identifican que la entrada de piruvato en la mitocondria y su posterior uso están

regulados por la composición específica de las subunidades del transportador y determina la tasa respiratoria y la resistencia a estrés.

Por otra parte, dado que el flujo de piruvato a la mitocondria se modificaba en función de las condiciones ambientales, se quiso estudiar qué ocurría en los complejos de la cadena de transporte de electrones en estas condiciones. Se observó que los complejos I y III se degradaban ante elevadas tasas respiratorias, al parecer como un mecanismo de reciclaje. Además, ante un daño mitocondrial específico utilizando valinomicina, también existía una degradación específica de los complejos respiratorios I y III, para mantener la homeostasis celular. Este proceso es dependiente de Atg11, e independiente de Atg32. También parecen implicadas proteínas de la maquinaria de dinámica mitocondrial (Fzo1 y Fis1) y algunas proteasas mitocondriales (Yme1, Pim1 y Afg3). El inicio de este proceso parece producirse ante la aparición de *foci* de Atg11 cercanos a la mitocondria. Se describe por primera vez en levadura un mecanismo específico de mitofagia inducida por daño, que contrasta con el concepto de degradación generalizada del orgánulo.



RESUM

Les cèl·lules eucariotes responen a canvis al seu entorn (“estrès”) a través de rutes de transmissió de senyals que coordinen respostes adaptatives molt complexes. Les mitocòndries són orgànuls molt dinàmics capaços de respondre a diversos estímuls externs. A estudis previs, es va demostrar que la mitocòndria té un paper en l’adaptació a estrès hiperosmòtic, ja que els mutants amb defectes en diversos components mitocondrials mostren major sensibilitat a aquest estrès. A aquest treball, s’ha analitzat nous mecanismes d’adaptació de l’activitat mitocondrial en resposta a estrès.

Per una banda, s’ha estudiat el paper del complex transportador de piruvat mitocondrial (MPC) a aquesta adaptació. Aquest transportador està conformat per tres proteïnes en llevat: Mpc1, Mpc2 i Mpc3. El gen *MPC3* pateix una forta inducció transcripcional en condicions d’estrès osmòtic i canvi diàuxic, que es tradueix en un augment de la quantitat de proteïna Mpc3. Aquesta regulació depèn de la ruta HOG, implicada en la resposta a estrès osmòtic, i no tenia lloc en Mpc1 i Mpc2. A més, es va comprovar que els canvis en la composició de MPC a la mitocòndria regulaven la biosíntesi de aminoàcids, la capacitat respiratòria i la tolerància a estrès oxidatiu de la cèl·lula. D’aquesta manera, Mpc2 és la proteïna més abundant en condicions fermentatives en absència d’estrès, mentre que Mpc3 és el membre més abundant davant d’estrès salí o quan és necessària una elevada taxa respiratòria. A més, Mpc3 estimula la respiració i augmenta la resistència a estrès oxidatiu. Per tant, els nostres resultats identifiquen que l’entrada de piruvat a la mitocòndria i el seu posterior ús estan regulats per

la composició específica de les subunitats del transportador i determina la taxa respiratòria i la resistència a estrès.

Per altra banda, com el flux de piruvat a la mitocòndria es modifica en funció de les condicions ambientals, es va voler estudiar què succeïa als complexos de la cadena de transport electrònic a aquestes condicions. Es va observar que els complexos I i III es degradaven davant d'elevades taxes respiratòries, com a mecanisme de reciclatge. A més, davant d'un dany mitocondrial específic utilitzant valinomicina, també existia una degradació específica dels complexos respiratoris I i III, per a mantenir l'homeòstasi cel·lular. Aquest procés és depenent d'Atg11, però independent d'Atg32. També semblen implicades proteïnes de la maquinària de dinàmica mitocondrial (Fzo1 i Fis1) i algunes proteases mitocondrials (Yme1, Afg3 i Pim1). L'inici d'aquest procés sembla produir-se per l'aparició de *foci* d'Atg11 propers a la mitocòndria. Per primera volta, es descriu en llevat un mecanisme específic de mitofagia induïda per dany, que contrasta amb el concepte de degradació generalitzada de l'òrganul.



SUMMARY

Eukaryotic cells adapt to environmental changes (“stress”) through signal transduction pathways which coordinate complex adaptive responses. Mitochondria are able to respond to different external stimuli in a dynamic manner. In previous studies, mitochondria were shown to play an important role in adaptation to hyperosmotic stress and defects in many mitochondrial functions cause sensitivity to this stress. In the present work, we investigate novel mechanisms of mitochondrial adaptation in response to stress.

First of all, the role of the mitochondrial pyruvate carrier complex (MPC) in this adaptation was analyzed. This carrier is composed by three proteins in yeast: Mpc1, Mpc2 and Mpc3. *MPC3* is upregulated upon salt stress and during a diauxic shift, which leads to an increase in Mpc3 protein abundance. HOG pathway, implicated in osmostress response, is needed for the efficient induction of *MPC3* transcription. Our analysis suggests that amino acid biosynthesis, respiration rate and oxidative stress tolerance are regulated by changes in the Mpc protein composition of the mitochondria. In this way, Mpc2 is most abundant under fermentative non stress conditions and important for amino acid biosynthesis, while Mpc3 is the most abundant family member upon salt stress or when high respiration rates are required. In addition, Mpc3 stimulates respiration and enhances tolerance to oxidative stress. Therefore, our results identify that the regulated mitochondrial pyruvate uptake via different Mpc proteins might be an important determinant of respiration rate and stress resistance.

Secondly, since pyruvate flux to mitochondria is modified according to environmental conditions, here we study also possible changes in

electron transport chain complex subunits. We found that a switch to partially or completely respiratory energy sources causes selective degradation of respiratory complex I and III subunits. Moreover, this degradation was also observed when there was a specific organelle damage caused by valinomycin, to maintain cell homeostasis. Interestingly, the loss of Atg32 function only partially affected the respiratory complex specific degradation, while the Atg11 protein was absolutely required in this process. Fission and fusion machinery proteins (Fzo1 and Fis1) and some mitochondrial proteases (Yme1, Pim1 and Afg3) also have a role in the valinomycin-mediated mitophagy. This process might start by Atg11 accumulation in foci close to the mitochondria shortly after valinomycin treatment. In this work, we describe for the first time a specific mechanism of mitophagy mediated by damage in yeast, which opposes to the concept of a generalized degradation of the organelle.



ABREVIATURAS

- a.a.** Aminoácido
AD Enfermedad de Alzheimer
AD Dominio de activación
AIM Motivo de interacción con la proteína Atg8
Amp Ampicilina
AmpR Gen de resistencia a ampicilina
APS Persulfato amónico
ATG Autofagia
ATP Adenosín trifosfato
BD Dominio de unión
BLAST Programa informático (*Basic Local Alignment Search Tool*)
BSA Albúmina de suero bovino
ccdB Gen letal bacteriano
cDNA Ácido desoxirribonucleico complementario
CDS Secuencia codificante
Cit c Citocromo c
CJ *Cristaejunction*
CM Membrana interna de crestas
CMT Charcot-Marie-Tooth
CoA Coenzima A
CoQ Coenzima Q
DB71 *DirectBlue 71*
DCF Diclorofluoresceína
DDM Ditiotritol
DMSO Dimetilsulfóxido
DsRed Proteína verde fluorescente de *Discosoma sp.*
DTT Ditiotritol
EDTA Ácido etilenodiaminotetracético
FAD Flavín Adenín Dinucleótido
Gal Galactosa
GFP Proteína verde fluorescente
Glc Glucosa
Glic Glicerol
GTP Guanosín trifosfato
GYT Glicerol-extracto de levadura (*yeast extract*)-triptona
HA Hemaglutinina
HRP Peroxidasa del rábano (*horseradish peroxidase*)
HXT Transportadores de hexosas
IBM Membrana interna de unión
IgG Inmunoglobulina G
IM Membrana mitocondrial interna
IP Inmunoprecipitación
Kan Kanamicina
KanR Gen de resistencia a kanamicina
LB Medio Luria Bertani
LDH Lactato deshidrogenasa
MAD Degradación asociada a la mitocondria
MAE MOPS-Acetato de etilo-EDTA
MAP Proteína activada por mitógeno
MAPK Proteína MAP quinasa
MCS Sitio de clonación múltiple (*Multicloning Site*)
MPC Transportador de piruvato mitocondrial
MQ Milli Q
mRNA RNA mensajero
mt Mitocondrial
mtHsp Proteína de respuesta a choque térmico mitocondrial
NAD Nicotinamida Adenína Dinucleótido

NC Nitrocelulosa
o/n toda la noche (*overnight*)
OD Densidad óptica
OM Membrana mitocondrial externa
ONPG orto-nitrofenil- β -galactopiranosido
ORF Marco abierto de lectura (*Open Reading Frame*)
OXPHOS Fosforilación oxidativa
PAGE Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAS Estructura pre-autofagosomal
pb Pares de bases
PC Piruvato carboxilasa
PCR Reacción en cadena de la polimerasa
PD Enfermedad de Parkinson
PDH Piruvato deshidrogenasa
PEG Polietilenglicol
PK Piruvato quinasa
PKA Proteína quinasa A
PMSF Fenilmetilsulfonil fluorido
PVDF Polivinilideno de difluorido
p/v Peso/volumen
RNS Especies reactivas de nitrógeno
ROS Especies reactivas de oxígeno
rRNA RNA ribosomal
rpm Revoluciones por minuto
RT Transcripción reversa
RTG Ruta retrógrada
SD Medio sintético con glucosa
SDS Dodecil sulfato sódico
SC Supercomplejo
SGal Medio sintético con galactosa

SGD Base de datos de levadura: *Saccharomyces Genome Database*
SGlic Medio sintético con glicerol
SOB Medio (*Super Optimal Broth*)
SOC *Super Optimal Broth with Catabolite Repression*
TAE Tris-Acetato-EDTA
TAP Proteína activadora de células T
TBS Tampón salino de Tris
TCA Ácido tricarboxílico
TE Tris-EDTA
TEMED N',N',N',N'-Tetrametiletilenodiamida
TM Transmembrana
TRIS (Hidroximetil) Aminometano
tRNA RNA de transcripción
UPS Sistema ubiquitin-proteasoma
v/v Volumen/volumen
Val Valinomicina (o valina, según el contexto)
wt Cepa silvestre (*wild-type*)
X-Gal 5-bromo-4-cloro-3-indolil-galactopiranosido
YFP Proteína fluorescente amarilla
YNB Base nitrogenada de levadura (*Yeast nitrogen base*)
YPD Medio rico: extracto de levadura Peptona-Dextrosa
YPL Extracto de levadura-Peptona-Lactato



Índices



ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	VII
RESUMEN	XIII
RESUM	XV
SUMMARY	XVII
ABREVIATURAS	XIX
ÍNDICE DE CONTENIDO	XXIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XXXI
ÍNDICE DE TABLAS	XXXVII
INTRODUCCIÓN	1
1. La mitocondria	3
1.1. Funciones mitocondriales	4
1.2. Dinámica mitocondrial	9
1.2.1. <i>Fisión mitocondrial</i>	9
1.2.2. <i>Fusión mitocondrial</i>	11
1.2.3. <i>Procesos celulares relacionados con la dinámica mitocondrial</i>	12
1.2.4. <i>Patologías humanas asociadas a fallos en la dinámica de la mitocondria</i>	14
1.3. La levadura como modelo de estudio de la mitocondria	16
2. Adaptación a estrés de la mitocondria	20
2.1. Consideraciones generales sobre el estrés	20

2.2. La mitocondria como orgánulo productor y detoxificador de estrés oxidativo	22
2.3. Cambios en el metabolismo mitocondrial ante estrés	24
2.3.1. Señalización por glucosa	25
2.3.2. La ruta retrógrada	28
2.4. Cambios adaptativos de la mitocondria durante estrés	30
2.4.1. Caso particular: proteína Mpc3	31
3. Control de calidad mitocondrial	34
3.1. Sistemas de control de calidad moleculares	35
3.2. Función de la dinámica mitocondrial en el control de calidad	37
3.3. Mitofagia	38
3.3.1. La mitofagia en levadura	39
3.3.2. La mitofagia en mamíferos	41
3.3.3. Alternativas a la mitofagia	42
OBJETIVOS	45
MATERIALES Y MÉTODOS	49
1. Material biológico y condiciones de crecimiento	51
1.1. Cepas y condiciones de cultivo de bacterias	51
1.2. Cepas y condiciones de cultivo de levadura	52
1.3. Plásmidos utilizados	53
2. Ensayos de sensibilidad	54
2.1. Ensayos de crecimiento en medio líquido	54
2.2. Ensayos de crecimiento en medio sólido (Goteos)	55
3. Técnicas de transferencia génica	55
3.1. Transformación de bacterias	55
3.1.1. Preparación de bacterias quimiocompetentes	55

3.1.2. Transformación de bacterias quimiocompetentes	56
3.1.3. Preparación de bacterias electrocompetentes	56
3.1.4. Transformación de bacterias electrocompetentes	57
3.2. Transformación de levadura	57
4. Manipulación y análisis de proteínas	58
4.1. Obtención de extractos proteicos totales	58
4.2. Electroforesis de proteínas	58
4.3. Transferencia a membrana de proteínas (<i>Western Blot</i>) y tinción de membranas	59
4.4. Detección inmunológica de proteínas y cuantificación	60
4.5. Co-inmunoprecipitación de proteínas	61
4.5.1. Co-inmunoprecipitación de proteínas mitocondriales	61
4.5.2. Co-inmunoprecipitación de proteínas citosólicas.....	62
5. Técnicas de manipulación génica	63
5.1. Purificación de DNA genómico total de levadura	63
5.2. Manipulación de fragmentos de DNA	63
5.3. Extracción de plásmidos de bacteria y levadura	64
5.4. Diseño de construcciones de delección y amplificación génica	64
6. Análisis de expresión mediante RT-PCR	65
6.1. Obtención de RNA total mediante el método de fenol ácido	65
6.2. Purificación y concentración del RNA total	66
6.3. Síntesis de cDNA mediante transcripción reversa	66
6.4. PCR cuantitativa en tiempo real	67
7. Análisis de las especies reactivas de oxígeno (ROS)	68
8. Consumo de oxígeno	69

9. Inducción y detección de mitofagia	69
10. Ensayo de doble híbrido en levadura	70
10.1. Análisis de la interacción proteína-proteína en placa	71
10.2. Ensayo cuantitativo de la actividad β -galactosidasa	71
10.3. Amplificación de una colección de plásmidos pACT	72
10.4. Transformación y <i>screening</i> de una colección de plásmidos en levadura	73
10.5. Comprobación de los clones positivos en el ensayo de doble híbrido	74
11. Microscopía confocal	75
12. Aplicaciones bioinformáticas	76
13. Análisis estadístico	77
RESULTADOS	79

CAPÍTULO 1. Función del transportador de piruvato mitocondrial (MPC) en la adaptación de la actividad mitocondrial	79
1. Análisis bioinformático de la secuencia proteica de la familia MPC en <i>S. cerevisiae</i>	81
2. Estudio de la expresión de las proteínas Mpc en respuesta a diferentes tipos de estrés	84
3. Regulación transcripcional de los genes <i>MPC</i> ante estrés salino y cambio diáuxico	87
4. Estudio fenotípico de los mutantes Δmpc	89
5. Análisis fenotípico de las cepas de sobreexpresión de los genes <i>MPC</i>	93
6. Análisis del efecto de la pérdida y ganancia de función de los genes <i>MPC</i> en la tasa respiratoria	97
7. Cuantificación de los niveles de oxidación intracelular	99

8. Caracterización de las interacciones de Mpc3 con otras proteínas de la familia MPC	102
9. Relación funcional entre las proteínas Mpc y el transportador de carnitina mitocondrial	104
10. Análisis del efecto de los genes MPC en la morfología mitocondrial	109
CAPÍTULO 2. Caracterización de una mitofagia específica para complejos individuales de la cadena electrónica mitocondrial	111
1. Análisis de los complejos mitocondriales de la cadena de transporte de electrones en condiciones de elevada tasa respiratoria	113
1.1. Análisis de las proteínas de los complejos respiratorios mediante <i>Western Blot</i>	113
1.2. Análisis de los genes responsables de la degradación de los complejos de la cadena de transporte electrónico ante una elevada tasa respiratoria	116
2. Análisis del crecimiento de cepas de levadura mutantes para genes de autofagia	119
3. Generación de un modelo de estudio de daño mitocondrial específico para levadura	121
4. Efecto de la valinomicina en las proteínas de los complejos respiratorios mitocondriales	125
4.1. Análisis de las proteínas de los complejos mitocondriales por el ensayo de <i>Western Blot</i>	125
4.2. Comprobación de la degradación de los complejos I y III mediante microscopía confocal	127
5. Comprobación de que la degradación controlada de la mitocondria en presencia de valinomicina ocurre en la vacuola en levadura: Sistema mtRosella	132
5.1. Análisis de la degradación mitocondrial en diferentes condiciones	133

5.2. Análisis de la mitofagia mediante microscopía confocal en los mutantes <i>Δatg11</i> y <i>Δatg32</i>	136
6. Análisis de crecimiento de mutantes de levadura en presencia de valinomicina	138
7. Análisis de los genes implicados en la degradación de los complejos de la cadena de transporte de electrones en presencia de valinomicina	139
8. Análisis de condiciones alternativas en las que se activa la mitofagia en levadura	144
CAPÍTULO 3. Caracterización funcional de la proteína Atg11 en el proceso de mitofagia inducida por daño mitocondrial	147
1. Estudio de la regulación génica y proteica de Atg11	149
2. Estudio del efecto de la sobreexpresión de Atg11	150
2.1. Análisis de la localización celular de Atg11 tras su sobreexpresión	151
2.2. Efecto de la sobreexpresión de Atg11 en los complejos I y III de la cadena de transporte electrónico analizado por <i>Western Blot</i>	153
2.3. Efecto de la sobreexpresión de Atg11 en los complejos I y III de la cadena de transporte electrónico analizado por microscopía confocal	155
3. Localización de Atg11 en niveles endógenos	157
4. Estudio de las interacciones proteicas de Atg11	159
4.1. Comprobación del sistema de doble híbrido: interacción Atg11-Atg32	160
4.2. Rastreo de proteínas que interaccionan con Atg11 en presencia y ausencia de valinomicina	163
4.3. Verificación de los principales genes obtenidos por doble híbrido	167
5. Estudio de la interacción Atg11-Atg11	170

6. Análisis de la conservación de Atg11 en organismos superiores: <i>Arabidopsis thaliana</i>	173
DISCUSIÓN	177
CONCLUSIONES	203
REFERENCIAS	207
FIGURAS SUPLEMENTARIAS	237
TABLAS SUPLEMENTARIAS	257
ANEXO. Timón-Gómez, A., Proft, M., Pascual-Ahuir, A. (2013). Differential regulation of mitochondrial pyruvate carrier genes modulates respiratory capacity and stress tolerance in yeast. <i>Plos one</i> , 8(11): e79405	267



ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Reorganización dinámica de los complejos respiratorios mitocondriales y sus implicaciones funcionales en levadura	6
Figura 2. Esquema de la fusión y fisión mitocondrial	10
Figura 3. Estructura mitocondrial ante un desajuste en los procesos de dinámica	13
Figura 4. Representación de la biomasa mitocondrial en levadura en presencia de diferentes fuentes de carbono	18
Figura 5. Representación gráfica de la cadena de transporte de electrones de la mitocondria y sus principales puntos de producción de ROS	23
Figura 6. Esquema de las rutas principales de señalización en respuesta a glucosa en <i>S. cerevisiae</i>	27
Figura 7. Esquema de la ruta retrógrada	29
Figura 8. Resumen de las rutas metabólicas que convergen en el piruvato	33
Figura 9. Esquema de los sistemas de control de calidad mitocondriales	35
Figura 10. Modelos de rutas de mitofagia en diferentes sistemas celulares	43

RESULTADOS

CAPÍTULO 1

Figura 11. Comparación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas Mpc en levadura	82
Figura 12. Esquema de la predicción de las regiones transmembrana en levadura de las proteínas Mpc	83

Figura 13. Inmunodetección de las proteínas Mpc1, Mpc2 y Mpc3 en extractos totales de levadura en diferentes condiciones ambientales	86
Figura 14. Niveles relativos de mRNA de los genes <i>MPC</i> en respuesta a estrés salino y cambio diáuxico	88
Figura 15. Ensayos de crecimiento en medio líquido de la cepa silvestre y de los mutantes Δmpc en diferentes condiciones	91
Figura 16. Ensayos de crecimiento de los mutantes Δmpc y de la cepa silvestre (wt) en condiciones fermentativas con glucosa (SD) y de crecimiento respiratorio en lactato y glicerol (SLac y SGlic, respectivamente)	93
Figura 17. Localización de las proteínas Mpc fusionadas a DsRed en las cepas de levadura de sobreexpresión	94
Figura 18. Efecto de la sobreexpresión de los genes <i>MPC</i> en el crecimiento respiratorio	95
Figura 19. Efecto de la sobreexpresión de los genes <i>MPC</i> en la tolerancia a estrés oxidativo	96
Figura 20. Efecto de la ganancia y pérdida de función de las proteínas Mpc en la tasa de consumo de oxígeno en levadura	98
Figura 21. Efecto de la ganancia de función de Mpc en la acumulación de ROS intracelular	101
Figura 22. Supervivencia en fase estacionaria de los mutantes Δmpc y de la cepa silvestre	102
Figura 23. Co-inmunoprecipitación de la proteína Mpc3-HA con la familia de proteínas Mpc marcadas con el epítipo TAP en el genoma	103
Figura 24. Esquema de las reacciones enzimáticas en <i>S. cerevisiae</i> para la entrada de piruvato en la mitocondria y vías alternativas	105
Figura 25. Ensayo de crecimiento de los mutantes Δmpc y $\Delta crc1$, y sus respectivos dobles mutantes	106
Figura 26. Niveles relativos de mRNA del gen <i>CRC1</i> en respuesta a estrés salino y cambio diáuxico	108

CAPÍTULO 2

Figura 27. Inmunodetección de las proteínas de los complejos respiratorios en extractos totales de levadura en condiciones fermentativas y respiratorias	115
Figura 28. Inmunodetección de la proteína Qcr2 del complejo III en mutantes de levadura en condiciones fermentativas y respiratorias	118
Figura 29. Ensayo de crecimiento en medio sólido (<i>Droptest</i>) para los mutantes de autofagia	120
Figura 30. Eficiencia de crecimiento de la cepa silvestre en presencia de diferentes concentraciones de valinomicina	123
Figura 31. Consumo de oxígeno de la cepa BY4741 ante diferentes concentraciones de valinomicina	124
Figura 32. Inmunodetección de las proteínas de los complejos respiratorios en extractos totales de levadura tras el tratamiento con valinomicina	126
Figura 33. Cuantificación de la masa mitocondrial de levadura en diferentes condiciones	129
Figura 34. Cuantificación de la densidad integrada de las proteínas Ndi1 y Qcr2 mediante microscopía confocal	131
Figura 35. Detección de mitofagia en levadura mediante el sistema mtRosella por microscopía confocal	135
Figura 36. Porcentaje de mitofagia detectado mediante el sistema mtRosella en los mutantes $\Delta atg11$ y $\Delta atg32$	137
Figura 37. Ensayo de crecimiento en mutantes de levadura en presencia de valinomicina	139
Figura 38. Inmunodetección de las proteínas de los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones en diferentes mutantes, tras el tratamiento con valinomicina	142
Figura 39. Inmunodetección de las proteínas Ndi1 y Qcr2 en los mutantes de proteasas tras un tratamiento con valinomicina	143

Figura 40. Inmunodetección de las proteínas Ndi1 y Qcr2 ante un tratamiento con NaCl y LiCl	145
---	-----

CAPÍTULO 3

Figura 41. Recuperación del crecimiento respiratorio del mutante $\Delta atg11$ en presencia de la construcción exógena con <i>ATG11</i>	151
Figura 42. Localización de Atg11 tras su sobreexpresión en levadura	152
Figura 43. Inmunodetección de las proteínas Ndi1 y Qcr2 ante una sobreexpresión de <i>ATG11</i>	154
Figura 44. Detección de mitofagia mediante el sistema mtRosella ante la sobreexpresión de <i>ATG11</i> en la cepa silvestre y en un mutante $\Delta atg32$	156
Figura 45. Detección de Atg11 en niveles endógenos por microscopía confocal	158
Figura 46. Ensayo de doble híbrido de las proteínas Atg11 y Atg32	161
Figura 47. Actividad β -galactosidasa obtenida a partir de la interacción Atg11-Atg32 en diferentes condiciones	162
Figura 48. Verificación de los genes obtenidos en el ensayo de doble híbrido.....	168
Figura 49. Co-inmunoprecipitación de la proteína Atg11 con las proteínas glicolíticas obtenidas en el ensayo de doble híbrido	170
Figura 50. Estudio de la dimerización de Atg11	172
Figura 51. Ensayo de crecimiento para comprobar la complementación de función de At4g30790 de <i>Arabidopsis</i> en levadura	175
Figura 52. Localización de la proteína At4g30790 de <i>A. thaliana</i> tras su sobreexpresión en levadura	176

DISCUSIÓN

Figura 53. Modelo de los complejos del transportador de piruvato mitocondrial según las condiciones ambientales	183
---	-----

Figura 54. Modelo simplificado de los diferentes mecanismos de mitofagia en levadura y mamífero	201
---	-----

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Figura suplementaria S1. Motivos compartidos entre las secuencias proteicas de la familia MPC por el programa MEME	239
Figura suplementaria S2. Inmunodetección de las proteínas Mpc1, Mpc2 y Mpc3 ante estrés oxidativo y ante ayuno de nitrógeno	240
Figura suplementaria S3. Efecto de la delección de los genes <i>MPC</i> en la acumulación de ROS intracelular	241
Figura suplementaria S4. Análisis de la morfología mitocondrial en los mutantes Δmpc mediante microscopía confocal	242
Figura suplementaria S5. Inmunodetección de las proteínas Mpc en extractos totales de levadura en crecimiento fermentativo y respiratorio	243
Figura suplementaria S6. Ensayo de crecimiento en medio fermentativo y respiratorio de los mutantes de proteasas mitocondriales	244
Figura suplementaria S7. Búsqueda de fenotipos de crecimiento en diferentes condiciones del mutante $\Delta fmp48$ con respecto a la cepa silvestre	245
Figura suplementaria S8. Inmunodetección de las proteínas Qcr2 y Ndi1 en diferentes mutantes de levadura	246
Figura suplementaria S9. Ensayo de crecimiento en medio sólido para evaluar la interferencia de función del epítipo GFP.....	247
Figura suplementaria S10. Representación esquemática del sistema mtRosella para la detección de mitofagia mediante microscopía confocal en levadura	248
Figura suplementaria S11. Detección de mitofagia mediante el sistema mtRosella en los mutantes $\Delta atg11$ y $\Delta atg32$ de levadura	249

Figura suplementaria S12. Inmunodetección de las proteínas Ndi1 y Qcr2 en diferentes mutantes de levadura tras el tratamiento con valinomicina	250
Figura suplementaria S13. Análisis del efecto del NaCl sobre la estructura y función mitocondrial	251
Figura suplementaria S14. Estudio de la regulación transcripcional y traduccional de <i>ATG11</i> en diferentes condiciones	252
Figura suplementaria S15. Detección de Atg11 en niveles endógenos por microscopía confocal en el mutante <i>Δatg32</i>	253
Figura suplementaria S16. Esquema del proceso de glicólisis en levadura	254
Figura suplementaria S17. Inmunodetección de las proteínas glicolíticas en extractos proteicos totales de levadura en presencia y ausencia de <i>ATG11</i>	255
Figura suplementaria S18. Detección por <i>Western Blot</i> de las proteínas glicolíticas Gpm1, Fba1, Hxk2 y Tpi1 ante la sobreexpresión de <i>ATG11</i>	256



ÍNDICE DE TABLAS

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 1. Plásmidos utilizados	53
Tabla 2. Anticuerpos empleados durante la inmunodetección de proteínas mediante <i>Western Blot</i>	60
Tabla 3. Fluoróforos y tinciones utilizadas en los análisis mediante microscopía confocal	75

RESULTADOS

CAPÍTULO 3

Tabla 4. Relación de las proteínas más características obtenidas en el ensayo de doble híbrido en condiciones fermentativas	165
Tabla 5. Relación de las proteínas más características obtenidas en el ensayo de doble híbrido en presencia de valinomicina	166

TABLAS SUPLEMENTARIAS

Tabla suplementaria TS1. Cepas de <i>S. cerevisiae</i> durante la realización de este trabajo	259
Tabla suplementaria TS2. Secuencias de los oligonucleótidos empleados a lo largo del trabajo	262



Introducción

1. La mitocondria

La mitocondria es un orgánulo semiautónomo y dinámico de la célula, con su propio programa de biogénesis y su propio DNA mitocondrial (mtDNA). Se encuentra en el citoplasma de las células eucariotas y es capaz de adaptarse a diferentes estímulos ambientales y a estrés. El tamaño, el número y la morfología de las mitocondrias de una célula dependen del estado fisiológico y metabólico de ésta.

A nivel estructural, está caracterizada por una estructura de doble membrana. Estas membranas, la membrana mitocondrial externa (OM) y la interna (IM), se encuentran diferenciadas estructural y funcionalmente; y entre ambas, hay un espacio acuoso denominado espacio intermembrana. La IM es extraordinariamente rica en proteínas, con un ratio proteína:lípido de 75:25, cuando en la mayoría de membranas es cercano a 50:50 (Chazotte and Hackenbrock, 1991). Esta membrana forma unas invaginaciones muy especializadas, denominadas crestas mitocondriales (o *cristae*). De hecho, algunos autores subdividen la IM en dos: la membrana interna límite (*Inner boundary membrane*, IBM), opuesta a la membrana externa, y la membrana *cristae* (CM) (Frey *et al.*, 2002; Vogel *et al.*, 2006). Estas dos partes conectan entre sí mediante pequeños poros, denominados *cristajunction* (CJ), que se encargan de la difusión de componentes entre los diferentes compartimentos de la IM (Wurm and Jakobs, 2006). La OM, menos estudiada, es más permeable que la interna y también es necesaria en diversos procesos de producción de ATP, en la regulación del transporte de metabolitos y en la regulación de la homeostasis mitocondrial.

El genoma mitocondrial (mtDNA) es poco complejo y se organiza en moléculas circulares de doble hebra empaquetadas en partículas muy compactas, denominadas nucleoides. El mtDNA codifica para 8 proteínas en *S. cerevisiae* (Foury *et al.*, 1998) y para 13 en humanos, así como para diversos rRNAs y tRNAs (Boore, 1999). Estas proteínas incluyen diversas subunidades imprescindibles de complejos de la cadena respiratoria, por lo que la herencia de mitocondrias funcionales requiere la replicación y partición del mtDNA con mecanismos selectivos que únicamente transmiten las moléculas intactas (Westermann, 2014). Aun así, la mayor parte de las proteínas mitocondriales están codificadas en el núcleo celular, se sintetizan en el citosol y se importan a la mitocondria por mecanismos complejos (Schmidt *et al.*, 2010).

1.1. Funciones mitocondriales

La mitocondria es un orgánulo que lleva a cabo procesos metabólicos muy importantes en la célula, como la producción de ATP, el almacenamiento de iones de calcio o la regulación de la apoptosis. Principalmente, este orgánulo es conocido por su papel como “fábrica de energía de la célula” (Zhang and Qi, 2008). La mitocondria proporciona a la célula energía en forma de ATP a través de una red metabólica interconectada a partir de diferentes fuentes de energía, como aminoácidos, lípidos y azúcares.

Los ácidos grasos se encuentran en el citosol, pero son oxidados a acetil-CoA en la matriz mitocondrial de algunos organismos por medio de un proceso de 4 reacciones, denominado β -oxidación. A diferencia de otros eucariotas, en levadura, la β -oxidación se produce íntegramente en los

peroxisomas (Van Roermund *et al.*, 2003). Del mismo modo, el piruvato obtenido de la glicólisis de azúcares en el citosol, entra en la mitocondria, donde la piruvato deshidrogenasa lo transforma en 2 moléculas de acetil-CoA. Estas moléculas de acetil-CoA (del metabolismo de azúcares o del de lípidos) se oxidan a CO₂ en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ciclo TCA) y se obtienen 3 moléculas de NADH, 1 de FADH₂ y 1 de GTP.

La fosforilación oxidativa (OXPHOS) es el proceso por el que se produce ATP a través de la transferencia de electrones desde NADH y FADH₂ al O₂. Este mecanismo es el principal productor de especies reactivas de oxígeno (ROS) mitocondriales. En la mayoría de eucariotas, este proceso se produce en la membrana mitocondrial interna y consta de una enzima que sintetiza el ATP, el complejo F₁F₀-ATP sintasa (o complejo V); y de cuatro complejos de la cadena de transporte de electrones: la NADH deshidrogenasa (complejo I o CI), la succinato deshidrogenasa (CII), el complejo citocromo bc₁ (CIII) y la citocromo c oxidasa (CIV). La transferencia de electrones entre complejos se produce mediante la ubiquinona y el citocromo c. El flujo de electrones provoca un bombeo de protones (H⁺) hacia el exterior de la matriz, el cual genera un potencial de membrana necesario tanto para la síntesis de ATP a través de la F₁F₀-ATP sintasa como para el transporte de proteínas y metabolitos al interior de la matriz mitocondrial (revisado por Stuart, 2008). Estos complejos han sido muy estudiados a lo largo de la historia y se suponía que se distribuían por la membrana interna de forma independiente (modelo del mosaico fluido). Sin embargo, recientemente, se ha demostrado por co-inmunoprecipitación que, pese a que no es necesario para su función, estas proteínas se pueden asociar en forma de supercomplejos respiratorios.

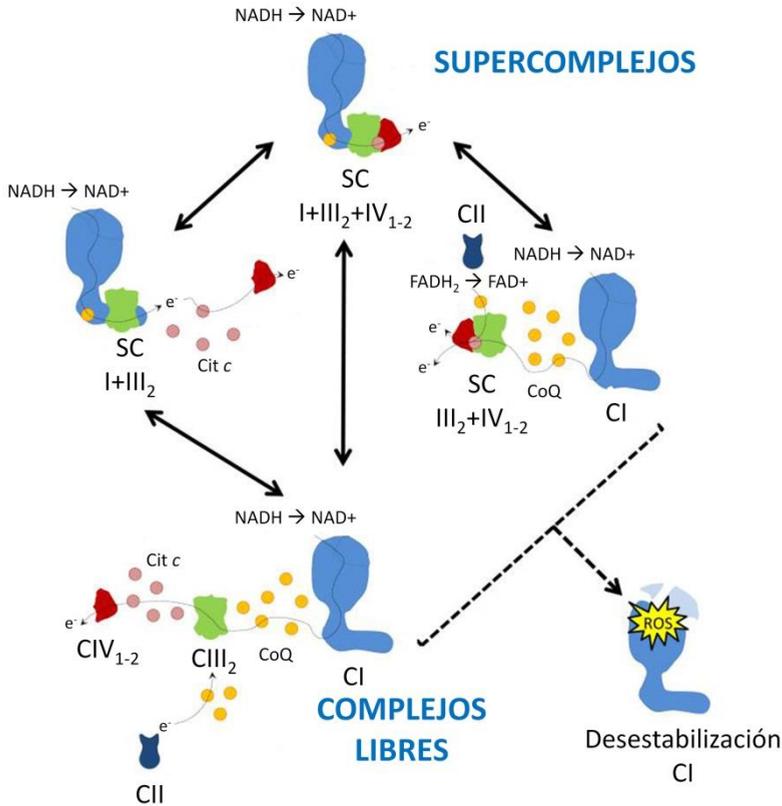


Figura 1. Reorganización dinámica de los complejos respiratorios mitocondriales y sus implicaciones funcionales en levadura. La reorganización de los complejos respiratorios en supercomplejos se ha propuesto como un mecanismo dinámico que confiere ciertas ventajas a la célula: mejora la transferencia de los electrones a través de la canalización del sustrato, aumenta la prevención de ROS y ayuda en el ensamblaje y estabilización del complejo I. Los complejos se pueden agrupar o desagrupar para regular diversas funciones fisiológicas, como la señalización por ROS. SC I+III₂+IV₁₋₂ es el supercomplejo formado por una subunidad del CI, un dímero de CIII y varias subunidades del CIV. Los supercomplejos intermedios se pueden encontrar en la naturaleza en combinación con el CII. El CI requiere esta asociación para minimizar su desestabilización y la producción de ROS. Cit c: citocromo c; CoQ: coenzima Q. Imagen modificada de Barrientos and Ugalde, 2013.

En levadura, se ha observado la asociación principalmente del complejo I con el III y el IV; el supercomplejo III-IV, en dos formas

predominantes III₂-IV₂ y III₂-IV; y la dimerización/oligomerización de la F₁F₀-ATP sintasa (revisado por Chaban *et al.*, 2014). El hecho de que se asocien o no en supercomplejos depende de la disponibilidad de fuentes de energía y del tipo celular (Lapiente-Brun *et al.*, 2013). Se han propuesto varias posibles funciones para la formación de estos supercomplejos (ver Figura 1), como un aumento de la eficiencia en el transporte de electrones o en la catálisis (Genova *et al.*, 2003). Por otra parte, Ghelli y Maranzana demostraron, de forma independiente, que en ausencia de los supercomplejos se generaba mayor cantidad de ROS (Ghelli *et al.*, 2013; Maranzana *et al.*, 2013). Sin embargo, la función concreta, el grado de interacción y las proteínas que ayudan en la formación de estos supercomplejos todavía no se conocen (revisado por Acin-Perez and Enriquez, 2014).

La mitocondria, además, está implicada tanto en el metabolismo de aminoácidos, ya que se producen dos reacciones del ciclo de la urea en la matriz mitocondrial; como en el metabolismo de la cardiolipina (difosfatidilglicerol), un fosfolípido único de la membrana mitocondrial interna implicado en numerosas funciones, como el mantenimiento de la membrana (Schlame *et al.*, 2000), la regulación de la dinámica mitocondrial en mitofagia/autofagia y apoptosis (Schug *et al.*, 2012), e, incluso, se ha demostrado su papel en la estabilización de los supercomplejos respiratorios (McKenzie *et al.*, 2006).

Este orgánulo también es el responsable de algunas reacciones de la biosíntesis del grupo hemo, presente en la hemoglobina y en los citocromos; y de los centros Fe-S, que forman cofactores en proteínas vitales para el funcionamiento celular. La biogénesis de estos centros Fe-S

está conservada en todos los eucariotas, sin embargo, su mecanismo de regulación varía fundamentalmente entre las células de levadura y de mamífero. Mientras que en levadura se utiliza un mecanismo de regulación mediante factores de transcripción sensibles a hierro, en mamíferos se emplea un mecanismo regulatorio post-transcripcional mediante dos proteínas reguladoras (Lill *et al.*, 2012). El hecho de que la mitocondria genere estos centros Fe-S para proteínas esenciales tanto mitocondriales como citosólicas, lo convierte en su principal función y provoca que mutaciones en proteínas relacionadas con esta maquinaria generen diversas enfermedades hematológicas, metabólicas y neurológicas (revisado por Stehling *et al.*, 2014).

Otra función importante de este orgánulo es la captación de calcio citosólico, gracias al potencial de la membrana mitocondrial, que tiene importantes consecuencias en la señalización celular (Rizzuto *et al.*, 2012). Este proceso está muy regulado, ya que un aumento continuado de la concentración de calcio mitocondrial puede llevar a la liberación de citocromo *c* y a la muerte celular programada (Santo Domingo and Demaurex, 2010). Además, se ha demostrado que el calcio mitocondrial está implicado también en la producción de ATP, estimulando a tres deshidrogenasas del ciclo TCA sensibles a calcio (Jouaville *et al.*, 1999).

Por último, la mitocondria es el componente central en la maquinaria de la apoptosis o muerte celular programada. Se ha comprobado que en organismos unicelulares también ocurre y se han encontrado proteínas reguladoras similares a las de mamíferos (Strich, 2015). Durante la apoptosis, se producen muchos cambios en la mitocondria. La permeabilización de la membrana externa inducida por

proteínas de la familia Bcl-2 se considera el “punto de no retorno” (Eisenberg *et al.*, 2007) y va seguida de la transferencia de lípidos a otros orgánulos, la remodelación de las crestas, la liberación del citocromo *c*, la pérdida de función mitocondrial (pérdida del potencial de membrana y de la capacidad de mantener la homeostasis del calcio) y la fragmentación del orgánulo (revisado por Consentino and García-Sáez, 2014).

1. 2. Dinámica mitocondrial

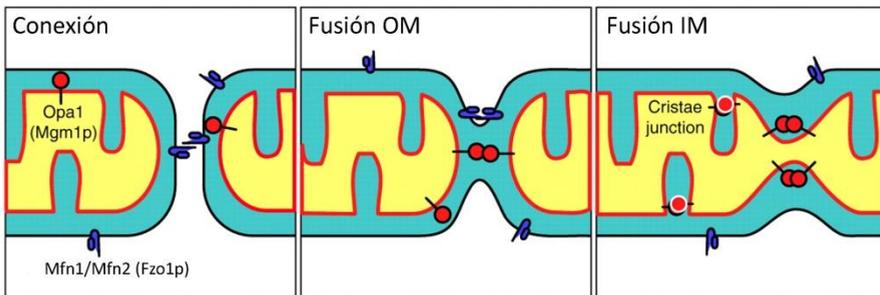
La mitocondria, incluso en organismos unicelulares como la levadura, muestra un comportamiento muy dinámico. Esta dinámica incluye cambios en el tamaño, forma, distribución, transporte y número de mitocondrias en la célula y está muy controlada por un balance entre los eventos de fusión y fisión. Una disfunción de este proceso se ha relacionado con procesos de desarrollo embrionario, envejecimiento y un amplio rango de condiciones patológicas, incluyendo enfermedades neurodegenerativas (Itoh *et al.*, 2013; Burte *et al.*, 2015), diabetes (Yoon *et al.*, 2011), enfermedades cardiovasculares (Ikeda *et al.*, 2015), atrofia muscular (Romanello *et al.*, 2010) y cáncer (Caino and Altieri, 2015). Ciertos autores también han sugerido que las especies ROS y/o RNS actúan directamente sobre las proteínas de fusión y fisión mitocondriales (Willems *et al.*, 2015).

1.2.1. Fisión mitocondrial

La fisión es un proceso activo mediado por una GTPasa conservada evolutivamente, denominada Drp1 en mamíferos y Dnm1 en levadura. El proceso en levadura se inicia con el reclutamiento de las proteínas Mdv1 o de Caf4 a la membrana mitocondrial por parte del receptor de membrana

Fis1. Este complejo dimérico recluta a Dnm1, el cual forma estructuras multiméricas tubulares, mediante hidrólisis de GTP en los sitios de constricción, que llevan a la fisión (Zhao *et al.*, 2013) (ver Figura 2). Sin embargo, todavía se desconoce cómo se recluta a Dnm1 a los sitios de constricción de forma específica, aunque las proteínas Num1 y Mdm30 parecen estar relacionadas en dicho reclutamiento durante la división de las mitocondrias en la gemación (Kleckner *et al.*, 2013).

Fusión mitocondrial



Fisión mitocondrial

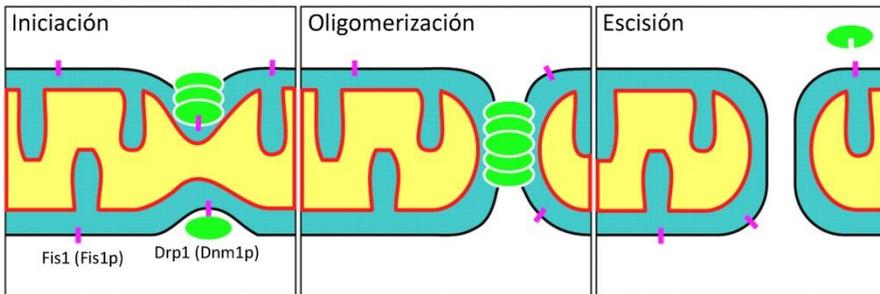


Figura 2. Esquema de la fusión y fisión mitocondrial. Representación esquemática de las fases de la fusión y fisión mitocondrial, y de su maquinaria principal en mamífero y levadura (en paréntesis). La estequiometría de los complejos de fusión y fisión todavía no se conoce, pero cada vez se van descubriendo nuevos componentes de estas maquinarias. Imagen modificada de Seo *et al.*, 2010.

En mamíferos, se creía que el modelo era muy similar, donde Drp1 era reclutada a la mitocondria por medio de hFis1 (ambas homólogas a sus respectivas en levadura), pero no se conocía la proteína adaptadora.

Recientemente, se han identificado un factor de fisión mitocondrial (Mff) y un factor de elongación mitocondrial 1 (MIEF1 o MiD49/51) en humanos, ambos capaces de unirse a Drp1 y que no se distribuyen de forma homogénea en la membrana mitocondrial, al contrario que hFis1 (Liu *et al.*, 2013; Palmer *et al.*, 2013). Esto ha llevado a un nuevo modelo donde hFis1, Mff y MIEF1 son receptores potenciales de Drp1, pero con una mejor regulación del proceso (revisado por Zhao *et al.*, 2013). La unión de Drp1 a Mff promueve la fisión mitocondrial; mientras que la unión a MIEF1, inhibe su actividad y promueve la fusión. hFis1 puede unirse a Drp1 en condiciones de estrés o hipoxia para producir la fisión mitocondrial; pero alternativamente también puede formar un complejo con MIEF1, para evitar su unión a Drp1 y promover la fusión (Hoppins, 2014).

1.2.2. Fusión mitocondrial

La maquinaria de fusión mitocondrial se ha caracterizado muy bien en *S. cerevisiae*. En levadura, se requiere al menos de tres componentes clave: dos proteínas de la membrana externa mitocondrial, Fzo1 y Ugo1; y una proteína de la membrana interna, Mgm1. Durante la fusión, las proteínas Fzo1 de mitocondrias adyacentes forman complejos *trans*, mediante su interacción C-terminal, y utilizan su función GTPasa para fusionar las membranas externas (Zhao *et al.*, 2013). Del mismo modo, Mgm1 es capaz de formar complejos para yuxtaponer las membranas internas de dos mitocondrias mediante hidrólisis de GTP. Ugo1 interacciona tanto con Fzo1 como con Mgm1, formando un complejo que coordina la fusión de ambas membranas (Hoppins *et al.*, 2009).

En mamíferos, son necesarias 3 GTPasas para la fusión mitocondrial, dos mitofusinas de la membrana mitocondrial externa, Mfn1 y Mfn2; y una de la membrana interna, OPA1; que funcionan del mismo modo que en levadura. Estas proteínas están sujetas a un control muy estricto por medio de ubiquitinación y degradación proteosomal (revisado por Itoh *et al.*, 2013).

1.2.3. Procesos celulares relacionados con la dinámica mitocondrial

La morfología mitocondrial está regulada por un balance entre los eventos de fusión y fisión. Esta morfología influye en la función mitocondrial, ya que aquellas mitocondrias que presentan un aspecto filamentosos son más eficientes en la generación de ATP, comparadas con las mitocondrias esféricas y pequeñas. Esto es debido a que se facilita la distribución espacial de la fuerza motriz de protones y el transporte de metabolitos (Skulachev, 2001). Por otra parte, las mitocondrias pequeñas son más fáciles de transmitir a la descendencia durante la división celular.

Además, como se observa en la Figura 3, una interrupción de la fusión provoca la fragmentación mitocondrial, hecho que se observa durante la apoptosis (Goyal *et al.*, 2007), durante la progresión mitótica en el ciclo celular (Mittra *et al.*, 2009) o ante la generación de ROS durante un estrés (Yu *et al.*, 2006); mientras que la anulación de la fisión provoca un estado “hiperfusionado” de la mitocondria, que sólo ocurre en ciertas condiciones de estrés para prevenir la apoptosis (Tondera *et al.*, 2009) o en ciertos casos dependientes del ciclo celular (Mittra *et al.*, 2009). Se ha comprobado que estos eventos de fusión y fisión están controlados por algunos reguladores del ciclo celular, que actúan principalmente sobre Drp1 o Dnm1 (Taguchi *et*

al., 2007; Horn *et al.*, 2011; Rambold *et al.*, 2011). Pero esta regulación no es unilateral, por lo que los componentes de fusión y fisión celular pueden, a su vez, regular el ciclo celular. De esta forma, la fisión mitocondrial puede promover la proliferación celular y la inhibición de la diferenciación, mientras que la fusión mitocondrial parece tener el efecto contrario (Mitra, 2013); aunque el mecanismo exacto todavía se desconoce.

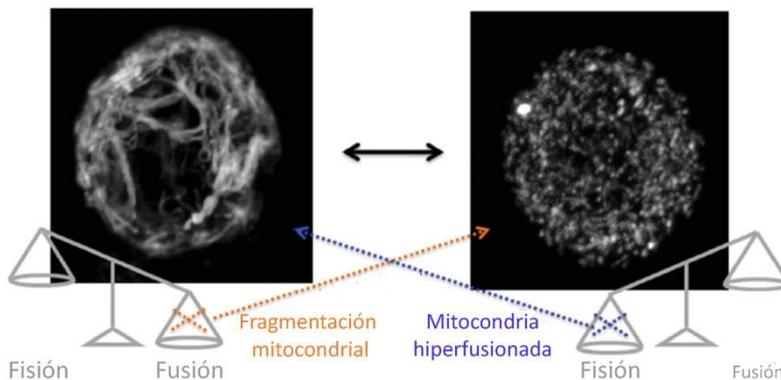


Figura 3. Estructura mitocondrial ante un desajuste en los procesos de dinámica. La fusión y la fisión tienen que mantener un balance entre ellas en las células vivas. Una disrupción de la fisión provoca una hiperfusión de la mitocondria (flecha azul); mientras que la disrupción de la fusión da lugar a un aumento de la fisión y a una fragmentación mitocondrial (flecha naranja). La imagen muestra la mitocondria de células N2a que expresan mito-YFP. Imagen modificada de Mitra, 2013.

Además, la morfología de la mitocondria cambia durante procesos de apoptosis y necrosis; pero mientras que en la apoptosis la mitocondria juega un papel activo en la liberación del citocromo *c*; durante la necrosis, la fragmentación mitocondrial impide generar la energía suficiente para la muerte celular (revisado por Itoh *et al.*, 2013).

La fisión mitocondrial está también relacionada con la mitofagia, la cual consiste en la degradación específica de las mitocondrias dañadas de la célula a través de los lisosomas (o en la vacuola en levadura). La mitofagia

es un proceso esencial, que mantiene la cantidad y la calidad mitocondrial necesaria para obtener la energía suficiente para sobrevivir, sin sobrepasar la producción de ROS mitocondrial que puede provocar daños en el orgánulo (Kurihara *et al.*, 2012). La fisión es necesaria para fragmentar la mitocondria que será degradada (Knorre *et al.*, 2013) y, de hecho, se ha determinado que si la mitocondria es demasiado alargada, no puede ser envuelta de forma eficiente para su degradación (Gomes *et al.*, 2011).

Otro proceso en el que son importantes la fisión y la fusión mitocondrial es en el transporte y distribución de las mitocondrias, principalmente en neuronas, donde sin estos procesos, no son capaces de desplazarse a las dendritas (Sheng and Cai, 2012). También son necesarios para la respiración celular, ya que una disrupción de estos procesos provocan una deficiencia respiratoria en diversos tipos celulares (Dhingra and Kirshenbaum, 2014). Finalmente, en estudios recientes se ha relacionado la dinámica mitocondrial con el metabolismo. Concretamente, existen evidencias de que la insulina estimula la fusión mitocondrial (Melser *et al.*, 2015); pero además, se ha comprobado que la correcta dinámica mitocondrial de las neuronas NPY–AgRP y POMC es vital en la regulación del hambre y de la saciedad en el organismo (Nasrallah and Horvath, 2014).

1.2.4. Patologías humanas asociadas a fallos en la dinámica de la mitocondria

El mantenimiento de esta dinámica mitocondrial es esencial para la función mitocondrial, y su disfunción se relaciona con múltiples enfermedades. Por ejemplo, se ha asociado a patologías neurológicas; ya que mutaciones en los genes *MFN2* (fusión) y *GDAP1* (fisión) causan diferentes tipos de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT)

(Cassereau *et al.*, 2014); pacientes con mutaciones en *OPA1* pueden presentar neuropatías periféricas (Davies *et al.*, 2007); y proteínas de transporte axonal dañadas también se asocian con neuropatías y CMT (Pareyson *et al.*, 2015).

Además, las enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson (PD) o de Alzheimer (AD), presentan una etiología similar con 3 características básicas: un funcionamiento aberrante de proteínas que dan lugar a agregaciones, fallos en el sistema de eliminación de proteínas y una disrupción de la función mitocondrial, principalmente en el balance de fusión y fisión (Li and Ghering, 2015). La PD ocurre como consecuencia de la pérdida de las neuronas dopaminérgicas en el sistema nervioso, y puede ser familiar o esporádica. En la PD familiar se han identificado diversos *loci* (*PARK2* o *Parkin*, *PARK6* o *PINK1* y *PARK1* o α -sinucleína) relacionados con la degradación de proteínas a partir del proteasoma y que provocan disfunción mitocondrial (Norris *et al.*, 2015). Este efecto se ha observado incluso en células no neuronales, como los fibroblastos (Zanellati *et al.*, 2015). Estas proteínas relacionadas con la PD regulan la fusión y fisión mitocondrial. En los últimos años, la activación de Parkin dependiente de PINK1 se ha reconocido como la ruta principal de mitofagia (Youle and Narendra, 2011); por lo que el fallo de estas proteínas o su mutación provoca una acumulación de mitocondrias dañadas, que resulta en un aumento de ROS y en la muerte celular neuronal (Luo *et al.*, 2015). Un estudio reciente de Buhlman y su equipo demuestra que Parkin estimula la fisión mediante un mecanismo dependiente de Drp1 (Buhlman *et al.*, 2014), y, de hecho, la pérdida de Drp1 parece también provocar la pérdida de mitocondrias en los axones de las neuronas dopaminérgicas,

llevando a la degeneración de los cuerpos celulares (Berthet *et al.*, 2014). En la enfermedad de Alzheimer, causada por la acumulación de oligómeros A β , también se ha visto que se produce una fragmentación mitocondrial acompañada de bajos niveles de Mfn1 y Mfn2 (Park *et al.*, 2015). Esta reducción en las proteínas de fusión y fisión también se ha descrito en otras enfermedades, como en la de Huntington (Guedes-Dias *et al.*, 2015) o en la esclerosis lateral amiotrófica (Jiang *et al.*, 2015).

La mitocondria de los cardiomiocitos adultos es hipo-dinámica; sin embargo, resultados recientes muestran que las proteínas de fusión y fisión son muy abundantes en este tejido (Ong *et al.*, 2015) y parecen estar relacionadas con cardiomiopatías e insuficiencia cardiaca en modelos de mosca y ratón (Galloway and Yoon, 2015; Dorn, 2015). De hecho, la delección de estas proteínas provoca fallos en las células cardiacas, debido a la generación de ROS y a defectos en la homeostasis de Ca²⁺ (Chung and Kang, 2015). Finalmente, una disfunción de la dinámica de este orgánulo también se ha relacionado con la aparición de quimioresistencia al tratamiento de diferentes tipos de cáncer (Kong *et al.*, 2015) y con un mayor daño hepático provocado por el alcohol (García-Ruiz *et al.*, 2013).

1.3. La levadura como modelo de estudio de la mitocondria

La secuenciación del genoma completo de la levadura *S. cerevisiae* se completó en 1995 y la primera colección de mutantes de delección de genes estuvo disponible en el año 2002. Pero este organismo fue establecido hace ya 60 años como sistema genético para estudiar la mitocondria por Boris Ephrussi y Piotr Slonimski, debido a su habilidad para sobrevivir a mutaciones en el sistema OXPHOS en presencia de azúcares

fermentables (Ephrussi and Slonimski, 1955). Esto se debe a que *S. cerevisiae* tiene la capacidad de activar y desactivar la respiración en respuesta a cambios en la fuente de carbono disponible en el medio, gracias a su capacidad fermentativa. De hecho, incluso cuando la disfunción mitocondrial es tan severa que el crecimiento respiratorio es imposible, la levadura ofrece la ventaja única de que dichos mutantes pueden mantenerse vivos y propagarse en medios fermentativos (Lasserre *et al.*, 2015). De este modo, un estudio simple de crecimiento en presencia de fuentes de carbono no fermentables permite evaluar la disfunción mitocondrial ante alguna mutación patogénica (Baile and Claypool, 2013). Este ensayo también es una forma fácil de descubrir nuevos fármacos contra la disfunción mitocondrial (St Onge *et al.*, 2012). Por último, es de destacar que se aprecia fácilmente el aumento de biomasa mitocondrial en este organismo al cambiar el tipo de fuente de carbono (ver Figura 4).

Tal y como describen Rutter y Hughes, la levadura se ha utilizado para la caracterización de múltiples rutas mitocondriales, desde el ensamblaje del sistema OXPHOS al sistema de transporte de metabolitos o a la comunicación con otros orgánulos (revisado por Rutter and Hughes, 2015). Y, gracias al elevado grado de conservación de estos mecanismos entre humano y levadura, se ha convertido en un modelo muy valioso para el estudio de enfermedades mitocondriales humanas.

En primer lugar, *S. cerevisiae* se ha utilizado como modelo de estudio de enfermedades provocadas por mutaciones en el mtDNA; gracias a la relativa facilidad de obtener una población de levaduras que presente una determinada mutación en todas las moléculas de mtDNA (revisado por Lasserre *et al.*, 2015). Varios grupos han estudiado mutaciones patogénicas;

por ejemplo, en el complejo IV (Meunier *et al.*, 2013) o en el gen *ATP6*, responsable de neuropatías, ataxia, retinitis pigmentosa o síndrome de Leigh (Kabala *et al.*, 2014).

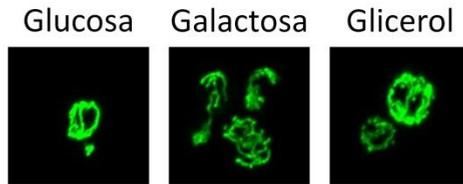


Figura 4. Representación de la biomasa mitocondrial en levadura en presencia de diferentes fuentes de carbono. La imagen muestra células de levadura silvestre, con el plásmido pVT100U que expresa GFP fusionado con un péptido de localización mitocondrial (mtGFP). Las células son crecidas durante toda la noche en medios con diferentes fuentes de carbono y se observa un incremento de la biomasa desde las condiciones de fermentación (glucosa) a las condiciones donde se induce parcial o totalmente la respiración (galactosa y glicerol, respectivamente). La mitocondria forma una red tubular por toda la célula cuando es necesaria su actividad respiratoria.

En segundo lugar, la levadura también ha ayudado a resolver casos de enfermedades mitocondriales de origen genético nuclear, como en el caso de mutaciones de genes de ensamblaje de OXPHOS (Ostojic *et al.*, 2013); en defectos en el mantenimiento del mtDNA, por mutaciones en el gen *POLG* (Szczepanowska and Foury, 2010); en daños en el transporte de metabolitos (Ersoy Tunalı *et al.*, 2014) y de proteínas (Di Fonzo *et al.*, 2009); o en fallos en la síntesis o ensamblaje de la cardiolipina (Claypool, 2009). También se ha utilizado para el estudio de enfermedades debidas a la disrupción de la dinámica mitocondrial o en el control de calidad de este orgánulo, como previamente se ha descrito en el apartado 1.2.4. Incluso se ha generado un modelo en levadura para estudiar la biología de la proteína Parkin humana (Pereira *et al.*, 2015).

Por otra parte, *S. cerevisiae* comparte muchos rasgos similares a las células tumorales desde el punto de vista metabólico (Diaz-Ruiz *et al.*, 2010), ya que los tumores muestran un aumento en la actividad glicolítica y una fosforilación oxidativa disminuida (Efecto Warburg). Además, diversos análisis genómicos en este organismo sugieren que la respuesta retrógrada (apartado 2.3.4) ante una disfunción mitocondrial juega un papel en la mutagénesis y en la inestabilidad genómica, y podría estar implicada en la carcinogénesis (Singh *et al.*, 2004).

Finalmente, estudios en *S. cerevisiae* han permitido mostrar que la función mitocondrial tiene un papel central en la coordinación del proceso de envejecimiento; el cual implica una serie de cambios muy complejos en el metabolismo energético, en la fosforilación oxidativa, en la biogénesis y morfología mitocondrial, en la autofagia, en la transducción de señales y en la señalización intracelular (Barros *et al.*, 2010). Todo esto refleja un escenario muy complejo relacionado con la longevidad humana.

Sin embargo, también hay que tener en cuenta las limitaciones de utilizar un organismo unicelular a la hora de traducir los resultados a organismos multicelulares o a condiciones clínicas. La levadura no puede ser utilizada como modelo de enfermedad a escala de un órgano o de un organismo multicelular complejo. De hecho, los mecanismos moleculares de las patologías, una vez analizados en levadura, deben ser evaluados en modelos animales y en células humanas. Aun así, *S. cerevisiae* ha demostrado su potencial para descubrir tanto los mecanismos moleculares como los posibles candidatos para el tratamiento de enfermedades mitocondriales.

2. Adaptación a estrés de la mitocondria

2.1. Consideraciones generales sobre el estrés

El estrés celular se puede definir como el estado de la célula en el que las condiciones de crecimiento no son óptimas, por lo que ésta debe desencadenar una serie de mecanismos de percepción y respuesta que permitan su adaptación, crecimiento y supervivencia. El estrés se puede generar a través de cambios en el medio externo en factores como la temperatura, la osmolaridad, el pH, la presencia de nutrientes o la presencia de agentes tóxicos, entre otros. La célula es capaz de percibir estas condiciones de estrés y genera señales que son detectadas por receptores específicos, encargados de transducir la señal. Esta señalización lleva a una reprogramación génica, para activar los mecanismos de adaptación de la célula y producir una serie de cambios en la fisiología celular que le permitan sobrevivir.

Algunos estreses son anómalos y aparecen sólo en condiciones específicas, mientras que otros son recurrentes y pueden ocurrir incluso de forma regular; por ejemplo, las fluctuaciones en la temperatura (Wijnen and Young, 2006) o en los niveles de nutrientes durante los ciclos circadianos (Van der Linden *et al.*, 2010). Los organismos disponen de diversos mecanismos para evitar estos estreses recurrentes. En primer lugar, existe la protección inducida, donde el organismo muestra una mayor capacidad para mantener la homeostasis durante un estrés si previamente ha estado sometido a condiciones menos severas de ese mismo estrés. En segundo lugar, un estrés ambiental puede proteger a las células frente a un estrés posterior. Esto se denomina protección cruzada y se ha observado

que no es universal ni ocurre con todos los estreses (Berry and Gasch, 2008; Rienzo *et al.*, 2015). Por último, existe un tercer mecanismo, denominado anticipación, en el cual el propio ambiente actual de la célula la prepara para un posible cambio futuro (Mitchell *et al.*, 2009). Estudios en levadura han demostrado que las poblaciones de células utilizan estos tres mecanismos para evolucionar en el tiempo y superar estos cambios cíclicos en el ambiente (revisado por Dhar *et al.*, 2013).

La regulación de la expresión génica es uno de los mecanismos fundamentales de la célula para mantener su función e integridad ante cambios en el medio ambiente. Se ha realizado múltiples estudios para saber qué genes intervienen en la respuesta de *S. cerevisiae* ante diversos estreses, como el osmótico (revisado por Martínez-Montañes *et al.*, 2010) o el oxidativo (revisado por Torre-Ruiz *et al.*, 2015). También se han hecho importantes avances en el estudio transcriptómico y metabolómico, por ejemplo, ante una acidificación del medio por ácido láctico (Nugroho *et al.*, 2015) o ácido sulfúrico (De Lucena *et al.*, 2015); o ante un cambio de nutrientes en el medio (revisado por Conrad *et al.*, 2014).

Algunos de estos genes responden de forma específica a un determinado estrés, mientras que otros genes se activan o reprimen de forma general ante diversos tipos de estrés. También se ha descrito diferencias en la activación de genes ante un mismo estrés, según el agente que lo produzca. Por ejemplo, en estrés oxidativo, la respuesta es diferente según sea causado por H₂O₂ o menadiona (Dolz-Edo *et al.*, 2013), y en estrés osmótico se diferencia el aumento de NaCl en el medio de un exceso de glucosa (Gomar-Alba *et al.*, 2015). La forma de activación de estos genes también cambia según se trate de respuesta a un cambio de nutrientes en

el medio o a un estrés (Rienzo *et al.*, 2015). Pero además, se ha observado que la tolerancia a ciertos estreses se produce a través de diferentes mecanismos moleculares, dependiendo tanto del estado fisiológico de la célula (Vanacloig-Pedrós *et al.*, 2015) como de las experiencias anteriores de la célula (Berry *et al.*, 2011), enfatizando el hecho de que la tolerancia a estrés depende del contexto celular.

2.2. La mitocondria como orgánulo productor y detoxificador de estrés oxidativo

La mitocondria es la principal fuente de estrés oxidativo en la célula, a causa de la generación de ROS durante la fosforilación oxidativa. En condiciones normales, entre el 1-5% de oxígeno celular es convertido en ROS (Wei *et al.*, 2001) y su producción ocurre principalmente en dos puntos clave de la cadena de transporte de electrones: el complejo I y el complejo III (Selivanov *et al.*, 2011), como se muestra en la Figura 5 (Bhat *et al.*, 2015). Estas especies ROS provocan daños en proteínas, DNA y lípidos; y los daños en el mtDNA se traducen en la generación de complejos respiratorios defectuosos, lo que a su vez aumenta la producción de ROS, creando un círculo vicioso de daño mitocondrial y celular.

Diversas enfermedades neurodegenerativas humanas se han relacionado con este exceso de ROS producido por defectos en la cadena de transporte electrónico. Por ello, la mitocondria contiene enzimas propias que se encargan de reducir los niveles de ROS, como la glutatión peroxidasa o la peroxiredoxina, y la vida media de la levadura se ve reducida con la eliminación de estas enzimas (Unlu and Koc, 2007). También se ha descrito un efecto protector del citocromo *c* contra estrés oxidativo, incluso cuando

éste es añadido de forma exógena (Barros *et al.*, 2003). Aunque otros autores aseguran que es la actividad de la catalasa mitocondrial Cta1 la que contribuye a la detoxificación de H_2O_2 mitocondrial, no la actividad del citocromo (Kathiresan *et al.*, 2014). Además, se ha visto que, ante un defecto en el complejo I, la simple introducción de la enzima Ndi1 (NADH deshidrogenasa) es capaz de restablecer el funcionamiento de la cadena de transporte de electrones y elimina el exceso de ROS (Seo *et al.*, 2006).

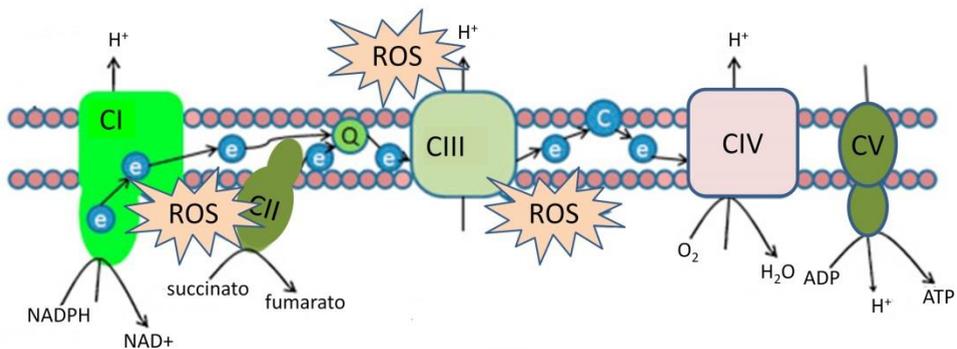


Figura 5. Representación gráfica de la cadena de transporte de electrones de la mitocondria y sus principales puntos de producción de ROS. La producción de radicales superóxidos mitocondriales ocurre principalmente en dos puntos concretos de la cadena de transporte electrones, los complejos I y III. En condiciones metabólicas normales, tanto el CI como el CIII se consideran los puntos de formación de ROS mitocondrial, por lo que el ataque de radicales libres suele ocurrir en los complejos de la cadena respiratoria. Imagen modificada de Bhat *et al.*, 2015.

Las especies ROS mitocondriales se consideran uno de los puntos clave en la longevidad cronológica. En un principio, se pensó que un exceso de ROS estaba provocado por un aumento de la respiración, y se corroboraba por el hecho de que la restricción calórica (y, por tanto, una menor respiración) aumentaba la longevidad en diversos organismos modelo. Sin embargo, diversos estudios han demostrado precisamente lo contrario: la restricción calórica potencia la cadena de transporte de

electrones a nivel transcripcional y traduccional (Choi *et al.*, 2011) y mejora la eficiencia del metabolismo energético, generando un mayor potencial en la membrana mitocondrial (Choi and Lee, 2013). Recientemente, se ha demostrado *in vivo* que individuos con un aumento en el metabolismo energético pueden mostrar menores niveles de ROS (Salin *et al.*, 2015). Por tanto, parece ser que la activación del consumo de oxígeno mitocondrial promueve la formación de ROS; y esto sirve como señal molecular que induce la defensa celular. Este proceso culmina en una mayor resistencia a estrés y una mayor vida media de la levadura. Esta respuesta adaptativa se denomina hormesis mitocondrial (mitohormesis) y aparece en la mayoría de organismos (Ristow and Zarse, 2010; Ristow and Schmeisser, 2011).

Finalmente, cabe destacar que, a pesar de haber sido consideradas durante mucho tiempo como especies indeseadas del metabolismo celular, las ROS mitocondriales pueden funcionar como moléculas anti-microbianas y de señalización en el sistema inmune y en la autofagia (revisado por Dunn *et al.*, 2015). Además, las ROS producidas en el complejo III parecen tener funciones fisiológicas adicionales, como la adaptación a hipoxia (Bleier and Dröse, 2013) o un papel protector ante un tratamiento con peróxido de hidrógeno, aumentando la tolerancia (Thorpe *et al.*, 2013).

2.3. Cambios en el metabolismo mitocondrial ante estrés

La mitocondria es un orgánulo altamente especializado y dinámico, que juega un papel importante en la adaptación a estrés, modificando tanto sus procesos metabólicos como su morfología para adaptarse a diferentes situaciones ambientales. Una de las adaptaciones mejor descritas es su actividad reguladora de las especies reactivas de oxígeno, para evitar daños

por estrés oxidativo (apartado 2.2.); pero existen otros mecanismos que se activan ante cambios en el ambiente celular.

2.3.1. Señalización por glucosa

Una ruta muy importante en el metabolismo mitocondrial es la señalización por glucosa. *S. cerevisiae* está sometida a fluctuaciones en la disponibilidad de nutrientes. En presencia de glucosa, la fermentación es la ruta metabólica principal del metabolismo energético; mientras que la fosforilación oxidativa se activa en ausencia de una fuente de carbono fermentable (etanol, glicerol, lactato, etc.). La glucosa es la fuente de carbono preferida en levadura, aunque esté en presencia de oxígeno y de otras fuentes de carbono no fermentables. Ante un consumo de glucosa, la célula acelera la glicólisis y arresta la respiración mitocondrial, lo que se denomina como efecto Crabtree (Van Urk *et al.*, 1990). Este efecto incluye una represión de los genes gluconeogénicos y del metabolismo respiratorio (ruta de represión por glucosa), e incrementa la expresión de enzimas glicolíticos y transportadores de glucosa (ruta de inducción por glucosa) (Santangelo, 2006).

La glucosa es una molécula muy importante de señalización. Gpr1, Rgt2 y Snf3 son sensores de la glucosa extracelular (revisado por Choi *et al.*, 2015). Por una parte, en respuesta a glucosa, el receptor de membrana Gpr1 interacciona con Gpa2, que es la subunidad α de la proteína G. Esta ruta actúa de forma paralela a Ras para activar la proteína quinasa A (PKA) (Kraakman *et al.*, 1999). PKA es un complejo heterotetramérico, compuesto por dos subunidades reguladoras (Bcy1) y dos subunidades catalíticas (Tpk1, Tpk2 o Tpk3). La ruta de señalización PKA tiene un papel

fundamental en el metabolismo, la biogénesis ribosomal, el crecimiento, la respuesta a estrés y el ciclo celular (ver Figura 6A). Rgt2 y Snf3, por otra parte, son dos proteínas transmembrana que funcionan como sensores de baja o alta afinidad a glucosa, respectivamente. En presencia de glucosa, la quinasa Yck (codificada por Yck1 y Yck2) asociada a Rgt2/Snf3 fosforila a Mth1 y Std1, dos reguladores negativos de la ruta, que son eliminadas por proteólisis. Esto permite la liberación de Rgt1 del promotor de los genes de transportadores de hexosas HXT (ver Figura 6B) (Flick *et al.*, 2003). Se consideraba que estas dos rutas de sensibilidad a glucosa (Gpr1 y Rgt2/Snf3) eran independientes. Sin embargo, estudios recientes muestran que PKA fosforila y regula la función de Rgt1, por lo que sí que existe una conexión entre ambas (Jouandot *et al.*, 2011).

En ausencia o ante bajos niveles de glucosa, se activa la quinasa Snf1, a través de una serie de quinasas como Sak1, Tos3 y Elm1 (revisado por Turcotte *et al.*, 2010), aunque todavía se desconoce el mecanismo exacto. La pérdida de Snf1, de hecho, provoca un aumento de la actividad glicolítica y una mayor acumulación de aminoácidos (Nicastro *et al.*, 2015). Snf1 forma parte de un complejo que incluye la subunidad activadora Snf4 y una tercera subunidad beta alternativa (Sip1, Sip2 o Gal83). Snf1 tiene múltiples dianas, como la histona H3 y activadores o represores transcripcionales (Hedbacker and Carlson, 2008). Una de ellas es el represor transcripcional Mig1, el cual al ser fosforilado, se disocia del co-represor Ssn6-Tup1 y es exportado al citoplasma (Papamichos-Chronakis *et al.*, 2004), lo que lleva a un aumento de la expresión de genes inhibidos en presencia de glucosa (ver Figura 6C). Snf1 también fosforila a Cat8, un activador de los genes gluconeogénicos (Schüller, 2003); y a otras proteínas

como Sip4, Rds2 o Adr1, que también actúan en la reprogramación de la expresión génica. Ert1 es otro factor implicado que actúa inactivando directamente a *PDC1*, un gen clave en la fermentación (Gasmi *et al.*, 2014).

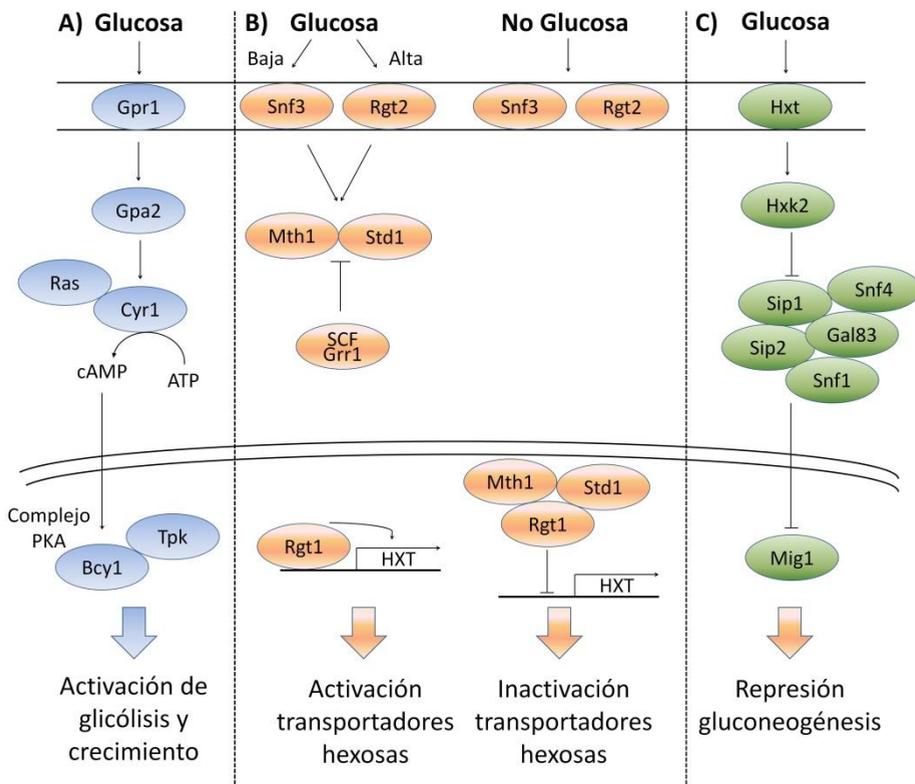


Figura 6. Esquema de las rutas principales de señalización en respuesta a glucosa en *S. cerevisiae*. **A)** La ruta Grp1/Gpa2. Es una ruta de fosforilación que se activa ante elevadas concentraciones de glucosa y se activa la síntesis de cAMP a través de Cyr1 (dependiente de RAS). Esto resulta en la activación de la proteína quinasa A (PKA), que afecta a una serie de genes relacionados con el metabolismo de azúcares y la resistencia a estrés. **B)** La ruta Snf3/Rgt2. En ausencia de glucosa, Rgt1 actúa en un complejo junto a Mth1 y Std1 para reprimir transcripcionalmente los genes HXT. En presencia de glucosa, Mth1 y Std1 se unen a los receptores Snf3 y Rgt2 y son fosforilados y degradados, lo que lleva a la disociación del complejo y a la activación de la transcripción de los genes HXT. Snf3 lleva a la inducción de estos genes ante bajas concentraciones de glucosa, mientras que Rgt2 activa la transcripción en condiciones de elevada concentración de glucosa. **C)** La ruta SNF1. En respuesta a altas concentraciones de glucosa, el complejo que contiene Snf1 inhibe a Mig1 y esto reprime genes relacionados con la respiración, la gluconeogénesis y el metabolismo de fuentes de carbono alternativas. En ausencia de glucosa, Snf1 se activa, lo que impulsa la transcripción de estos genes.

Pero la reprogramación génica no es suficiente ante un cambio diáxico (de fermentación a respiración) y más del 54% de enzimas implicadas en el metabolismo respiratorio son modificadas de forma post-traducciona, mediante fosforilación, acetilación y ubiquitinación (Tripodi *et al.*, 2015). Por tanto, un cambio de fuente de carbono en el medio provoca una remodelación transcripcional, post-transcripcional y metabólica de toda la célula, pero especialmente en la mitocondria.

2.3.2. La ruta retrógrada

La ruta retrógrada es una ruta de señalización entre la mitocondria y el núcleo que se descubrió en *S. cerevisiae*, aunque también ocurre en otros organismos, como en humanos. La activa el daño mitocondria, y el caso más estudiado es la pérdida total o parcial del mtDNA (células *petite* o ρ^0). Los genes implicados en esta ruta son *RTG1*, *RTG2* y *RTG3*. *RTG1* y *RTG3* codifican para un factor de transcripción heterodimérico, que se une a la secuencia GTCAC (*R box*) en los promotores de los genes diana de la respuesta retrógrada. El complejo Rtg1-Rtg3 se encuentra en el citoplasma y se transloca al núcleo mediante la fosforilación por Rtg2 (revisado por Jazwinski, 2015). Mks1 es un regulador negativo de esta respuesta retrógrada, ya que se une de forma reversible a Rtg2, impidiendo la translocación al núcleo de Rtg1-Rtg3 (Dilova *et al.*, 2004). Grr1 degrada a Mks1, por lo que funciona como regulador positivo. Finalmente, el complejo TORC1 también parece regular de forma negativa esta ruta (ver Figura 7) (Jazwinski, 2014).

La respuesta retrógrada juega un papel anabólico en la célula y es reprimida por glutamato. De hecho, los mutantes *RTG* son auxótrofos para

este metabolito (Liao *et al.*, 1993). Además, esta ruta interactúa con múltiples rutas de señalización en la célula.

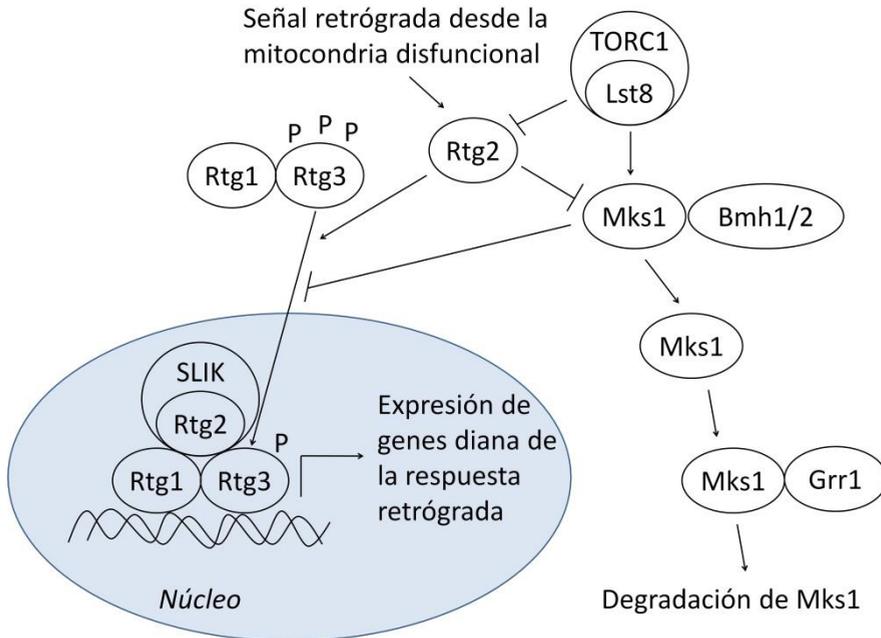


Figura 7. Esquema de la ruta retrógrada. La señal de daño mitocondrial es transducida por Rtg2, cuya actividad fosfatasa desfosforila parcialmente Rtg3, facilitando la translocación al núcleo del factor de transcripción heterodimérico Rtg1-Rtg3. Allí induce la expresión de un amplio número de genes diana de la respuesta retrógrada. Este factor de transcripción es asistido por el complejo co-activador transcripcional SLIK (*SAGA-like*), con Rtg2 como componente integral. La translocación de Rtg1-Rtg3 es inhibida por Mks1, que promueve la hiperfosforilación de Rtg3 con las proteínas Bmh1/2. Rtg2 puede prevenir esto secuestrando a Mks1. Mks1 es degradado por un mecanismo dependiente de ubiquitina. Por otra parte, el sensor de nutrientes TORC1 inhibe la respuesta retrógrada aguas arriba y aguas debajo de Rtg2, regulando negativamente a Rtg2 y positivamente a Mks1. Imagen modificada de Jazwinski, 2013.

El complejo TORC1, por ejemplo, fosforila a la proteína Sch9 en levadura, lo que induce una respuesta a estrés en la célula. El estrés osmótico lleva a una reducción transitoria de la fosforilación de Sch9 por TORC1 y recluta Rtg1-Rtg3 (Zhang *et al.*, 2011). Además, Rtg1-Rtg3 está regulado también por la proteína quinasa activada ante estrés

hiperosmótico, Hog1, la cual es necesaria para su translocación al núcleo, su unión a la cromatina y su actividad transcripcional (Ruiz-Roig *et al.*, 2012). Por tanto, parece que la ruta retrógrada responde tanto a estrés metabólico como a estrés osmótico (revisado por Wang *et al.*, 2010).

La señal que producen las mitocondrias disfuncionales para activar la respuesta retrógrada es una bajada del potencial de membrana mitocondrial. Se ha visto que, a medida que envejece la célula, el potencial de membrana disminuye y aumenta la respuesta retrógrada. Por lo que parece que esta respuesta es activada para compensar la acumulación de mitocondrias dañadas o no funcionales (Jazwinski, 2014). Ante la activación de esta ruta, se altera la expresión de 410 genes, lo que lleva a cambios en el metabolismo celular (Epstein *et al.*, 2001). Uno de gran importancia es la activación del ciclo del glioxilato en los peroxisomas, que funciona como alternativa (*bypass*) al ciclo TCA.

2.4. Cambios adaptativos de la mitocondria durante estrés

Las funciones mitocondriales se adaptan de forma dinámica a cambios en el entorno o en el estado fisiológico de la célula. Un ejemplo son los reajustes que ocurren en el orgánulo durante la respuesta a estrés salino. De esta forma, los mutantes de levadura de muchos genes que codifican para proteínas mitocondriales muestran una mayor sensibilidad ante estrés salino (Pastor *et al.*, 2009). Además, ante una situación de estrés hiperosmótico, las células que carecen de mtDNA activan la apoptosis mediada por el citocromo *c* (Gao *et al.*, 2011). Los mutantes mitocondriales también muestran una menor capacidad de adaptación a estrés oxidativo (Thorpe *et al.*, 2004). Un estudio proteómico indicó los

cambios en el proteoma mitocondrial ante estrés hiperosmótico (Martínez-Pastor *et al.*, 2010). De esta forma, se identificó una mayor abundancia en proteínas relacionadas con la defensa a estrés oxidativo, la biosíntesis de aminoácidos o ubiquinona, el metabolismo del piruvato y acetato, y una serie de proteínas de la membrana mitocondrial externa. En cambio, se reducían las proteínas glicolíticas o relacionadas con el retículo endoplasmático.

2.4.1. Caso particular: proteína Mpc3

Uno de los genes que sufre una fuerte inducción transcripcional en levadura durante la adaptación a estrés osmótico es *YGR243W* o *MPC3* (anteriormente *FMP43*) (Viladevall *et al.*, 2004). Previamente, la información que se conocía era únicamente que este gen se regulaba a través del factor de transcripción Sko1, que es uno de los principales activadores de la respuesta a estrés osmótico por la ruta HOG (Proft *et al.*, 2005) y que la proteína Fmp43 se localizaba en la membrana mitocondrial interna (Huh *et al.*, 2003; Reinders *et al.*, 2006). Posteriormente se vio que este gen estaba conservado a lo largo de la evolución y se comprobó que la proteína homóloga humana podía restaurar el fenotipo de crecimiento de una cepa de delección de este gen de levadura, por lo que, además de la secuencia, se conservaba la función entre diferentes especies (Otero *et al.*, 2010). A través del análisis de datos de microarrays y de la literatura previa, algunos autores llegaron a la conclusión de que la expresión de *MPC3* estaba correlacionada con la de los genes activos durante el metabolismo de carbohidratos y la oxidación de compuestos orgánicos (Pir *et al.*, 2006).

Finalmente, dos grupos independientes identificaron este gen como perteneciente a la familia de genes de levadura que constituyen el transportador de piruvato mitocondrial (*Mitochondrial Pyruvate Carrier, MPC*) (Herzig *et al.*, 2012; Bricker *et al.*, 2012). El piruvato tiene un papel muy importante en el metabolismo mitocondrial, ya que es el producto final de la glicólisis y el principal sustrato del ciclo TCA (ver Figura 8) (Vanderperre *et al.*, 2015). El piruvato en la mitocondria puede participar en la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada (leucina o valina) o ser convertido en acetil-CoA por la piruvato deshidrogenasa (PDH), para donar átomos de carbono en el ciclo TCA o sintetizar ácido octanoico (precursor del ácido lipoico).

La familia MPC consta de tres proteínas: Mpc1 (*YGL080W*), Mpc2 (*YHR162W*) y Mpc3 (*YGR243W*); y transporta el piruvato al interior mitocondrial. Herzig y colaboradores demostraron la falta de Mpc1 impedía a la levadura crecer en medio sin leucina y disminuía la abundancia de ácido lipoico. Además, la delección de los tres genes *MPC* (de forma individual o conjunta) llevaba a una disminución en el piruvato mitocondrial. Finalmente, comprobaron que la sustitución de estos genes por sus homólogos murinos complementaba la ausencia de transporte de piruvato, tanto en levadura como en *Lactococcus lactis*.

De forma paralela, el grupo de Bricker demostró que la función de Mpc1 estaba conservada en levadura, *Drosophila melanogaster* y humano. En mosca, de hecho, la delección de *MPC1* provocaba un defecto en el metabolismo de azúcares, con elevadas cantidades de piruvato en el citosol y bajas concentraciones de los intermediarios del ciclo TCA; y no estaba relacionado con un fallo en la actividad PDH. Además, describieron dos

familias en humanos con mutaciones en el gen *MPC1* que llevaba a un defecto en la oxidación de piruvato mitocondrial.

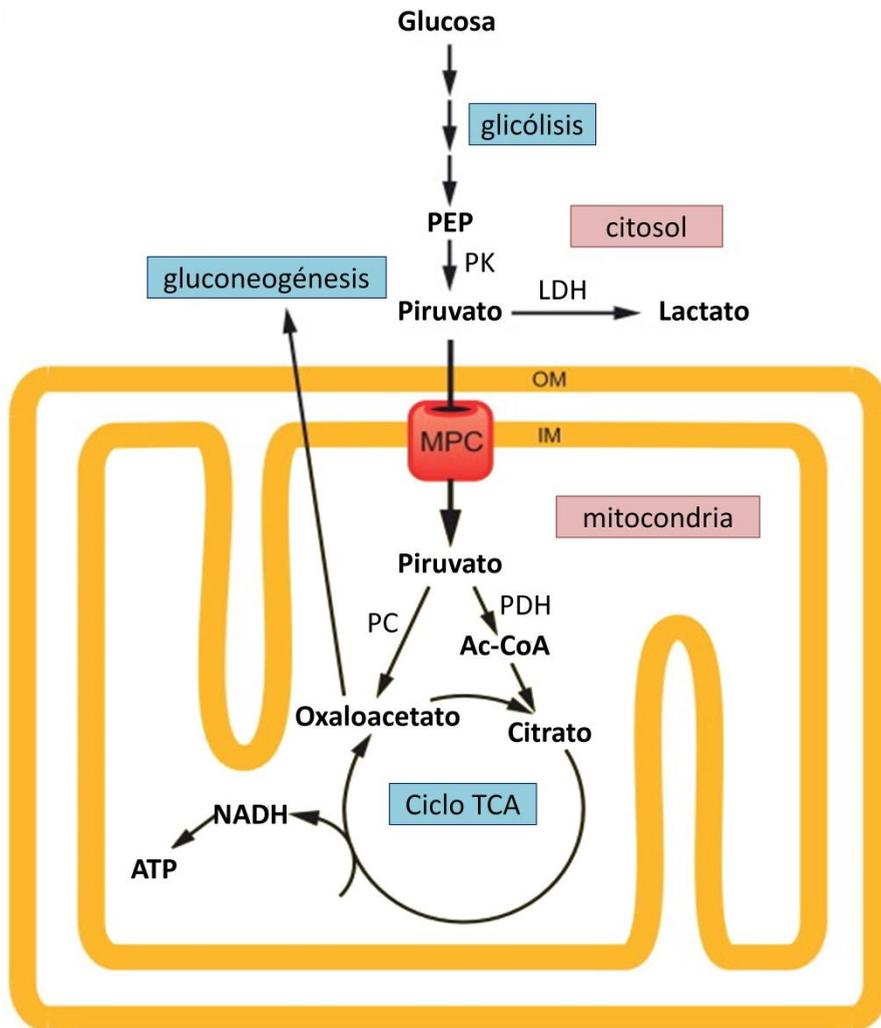


Figura 8. Resumen de las rutas metabólicas que convergen en el piruvato. La producción de ATP a partir de la oxidación de la glucosa tiene lugar en dos compartimentos celulares: la glicólisis en el citosol, y el ciclo TCA y la OXFOS en la mitocondria. El transportador de piruvato mitocondrial (MPC) hace converger ambas rutas, la fermentativa esencialmente citosólica y la oxidativa, que es mitocondrial; por lo que el importe de piruvato a la mitocondria es un punto clave del metabolismo celular. PK: piruvato quinasa; LDH: lactato deshidrogenasa; PDH: complejo piruvato deshidrogenasa; PC: piruvato carboxilasa; OM: membrana mitocondrial externa; IM: membrana mitocondrial interna; TCA: ácidos tricarbóxicos; Ac-CoA: Acetil-CoA. Imagen modificada de Vanderperre *et al.*, 2015.

Ambos grupos coincidieron en que Mpc1 formaba un complejo multimérico con Mpc2, donde Mpc1 sería la subunidad minoritaria y Mpc2 la mayoritaria; ya que Mpc2 era capaz además de interactuar consigo misma. Este complejo tiene un papel esencial en el metabolismo de carbohidratos de la mitocondria y podría estar implicado en diabetes, obesidad y cáncer. Pero estos autores no explican la inducción de Mpc3 ante estrés salino, ni su posible función.

3. Control de la calidad mitocondrial

La mitocondria tiene funciones clave para la célula, por lo que la reparación de los daños o la eliminación de las mitocondrias dañadas son imperativas para la supervivencia celular. El daño mitocondrial se ha relacionado con envejecimiento (Osiewacz and Bernhardt, 2013), diabetes (Gómez-Valadés *et al.*, 2015) o enfermedades neurodegenerativas (Lionaki *et al.*, 2015), entre otros. Para prevenir el daño celular, existen varios mecanismos de control de calidad que mantienen una población sana de mitocondrias. Estos mecanismos actúan a nivel molecular, organular y/o celular y forman una red eficiente y coordinada frente a daño mitocondrial (ver Figura 9) (Sheng and Cai, 2012). Dependiendo del tipo de daño, se activa unos mecanismos u otros a diferentes niveles (Bohovych *et al.*, 2015). El nivel molecular incluye una red muy conservada de proteasas y chaperonas mitocondriales, y de sistemas proteolíticos citosólicos, como el sistema ubiquitin-proteasoma; así como de sistemas de reparación del mtDNA. A nivel organular, la maquinaria de dinámica mitocondrial juega un papel muy importante en el control de calidad; y, a nivel celular, se activa la

ruta retrógrada y/o la degradación selectiva de la mitocondria dañada (mitofagia).

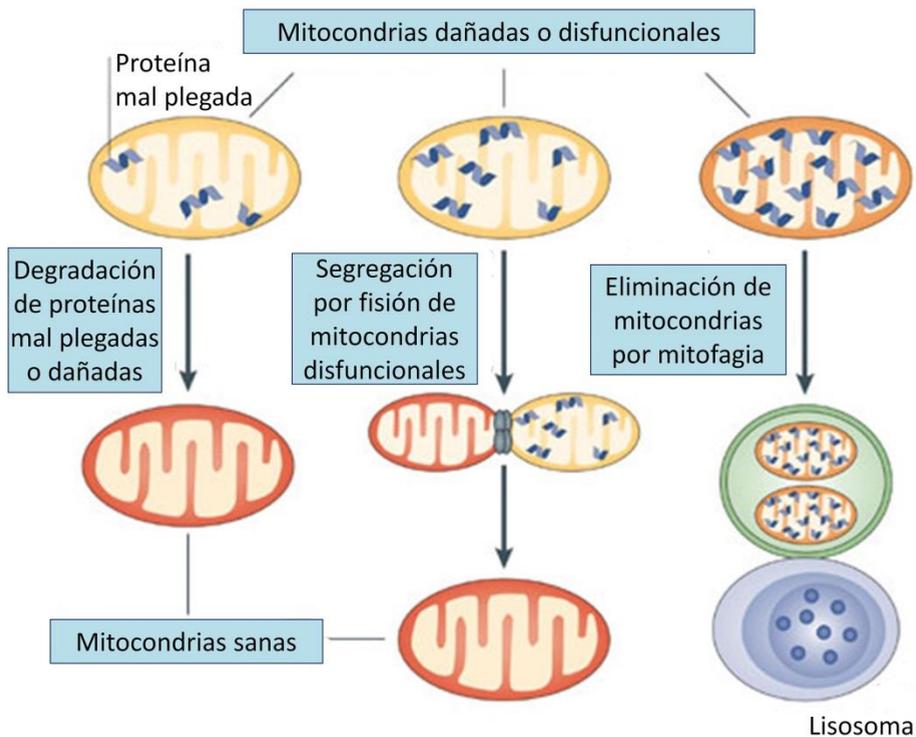


Figura 9. Esquema de los sistemas de control de calidad mitocondriales. El control de calidad mitocondrial incluye estrategias de supervivencia y protección para limitar el daño mitocondrial y asegurar la integridad de este orgánulo. En el nivel molecular, está el sistema de degradación de proteínas dañadas o mal plegadas. En el nivel organular, es necesaria la segregación de las mitocondrias disfuncionales por fisión. Y, finalmente, ante una acumulación generalizada de daños, se degrada la mitocondria de forma específica por mitofagia (en el lisosoma o la vacuola). Figura modificada de Sheng and Cai, 2012.

3.1. Sistemas de control de calidad moleculares

La mitocondria contiene diferentes enzimas que controlan la calidad de sus proteínas. En primer lugar, existen chaperonas dependientes de ATP que se encargan de la ordenación y plegamiento de las proteínas, como mtHsp70 o mtHsp60 en la matriz mitocondrial (Voos, 2013). En segundo lugar, la enzima metionina reductasa es capaz de reducir aquellas proteínas

con la metionina oxidada. La oxidación de la metionina es una forma de daño oxidativo de las proteínas, que altera su estructura y/o función y funciona como herramienta en la señalización redox (Kaya *et al.*, 2015). Y finalmente, la mitocondria dispone de un sistema proteolítico, que incluye múltiples proteasas conservadas y distribuidas por los diferentes compartimentos del orgánulo. Se dividen en dos grupos principales: las proteasas dependientes de ATP o AAA⁺ y las enzimas proteolíticas independientes de ATP. Las proteasas AAA⁺ existen como complejos homooligoméricos (como Lon/Pim1) o hetero-oligoméricos (como ClpXP) en la matriz mitocondrial, y su actividad proteolítica está ligada a la hidrólisis de ATP (Venkatesh *et al.*, 2012; Baker and Sauer, 2012). Su estructura permite que actúen como chaperonas, reconociendo proteínas mal plegadas o no ensambladas, para su correcto plegamiento o eliminación (Sauer and Baker, 2011). El segundo grupo de proteasas es más heterogéneo e incluye peptidasas de procesamiento, peptidasas solubles y proteasas unidas a la membrana interna.

Además, el sistema ubiquitin-proteasoma (UPS) también parece tener un papel importante en el mantenimiento de la calidad proteica en la mitocondria. Se ha visto que participa en la eliminación de proteínas que se dirigen a la mitocondria antes o durante su transporte al orgánulo (Bragoszewski *et al.*, 2013). Pero el UPS también puede acceder al subproteoma de la membrana externa y mediar la degradación de sus proteínas, por un proceso denominado degradación asociada a la mitocondria (MAD). En este proceso, las proteínas son retro-translocadas a la membrana externa para su ubiquitinación y degradación (Taylor and Rutter, 2011). Este mecanismo depende en levadura de la proteína Vms1,

que recluta a Cdc48/p97 y Npl4 a la mitocondria ante estrés, para iniciar el proceso (Tran *et al.*, 2011).

En el caso del mantenimiento de la calidad del mtDNA, la mitocondria contiene diversas rutas muy eficientes de reparación de DNA mutado. Entre ellas, se encuentra la reparación de la escisión de bases o la actividad de la polimerasa gamma durante la replicación del mtDNA (Larsson, 2010). En *S. cerevisiae* la reparación del mtDNA también se puede llevar a cabo a través de la recombinación homóloga.

3.2. Función de la dinámica mitocondrial en el control de calidad

Cuando los mecanismos moleculares de control no son suficientes, se activan los mecanismos de fisión y fusión mitocondrial. Por una parte, ante la aparición de daños en el mtDNA o proteínas de las mitocondrias, se activa la fusión mitocondrial para generar una nueva mitocondria funcional, a partir de dos dañadas, en la que los componentes de ambas estén mezclados. De esta forma, aunque ambas contengan mutaciones en el DNA (que llevan a daños en ciertos procesos), los componentes intactos de cada una de ellas complementarán las funciones y restaurarán la actividad mitocondrial. Este es un mecanismo de defensa contra el envejecimiento celular (Westermann, 2010). Por otra parte, la fisión se ha descrito como un componente muy importante para separar aquellas partes de la mitocondria cuando existe un daño muy severo o una acumulación de componentes dañados. En este caso, la separación de esta parte dañada es un prerequisite para su eliminación mediante mitofagia, como se ha comentado en el apartado 1.2.3. (Youle and van der Bliek, 2012).

3.3. Mitofagia

La mitofagia es un proceso selectivo de autofagia, que funciona como mecanismo de control de calidad mitocondrial reduciendo la cantidad de ROS y las mutaciones del mtDNA (Kurihara *et al.*, 2012). La autofagia es un proceso catabólico donde proteínas u orgánulos citoplasmáticos son transportados a los lisosomas en mamíferos o a la vacuola en levadura, a través de su encapsulación en estructuras de doble membrana, denominadas autofagosomas. Este proceso se activa en respuesta a estrés, ayuno o infección y consta de varios pasos, que incluyen la aparición de una estructura de doble membrana llamada fagóforo, en forma de copa; la elongación de esta estructura hasta la contención de componentes citoplasmáticos; y su posterior fusión a lisosomas/vacuolas para llevar a cabo la degradación de dichos componentes. Hay tres tipos de autofagia: la macroautofagia, que ocurre mediante los autofagosomas; la microfagia, donde los componentes a degradar son secuestrados directamente por la invaginación de la membrana lisosomal o vacuolar; y la autofagia mediada por chaperonas, en la que estas proteínas reconocen y translocan ciertas proteínas, y únicamente se ha descrito en eucariotas superiores. Dentro de estos tipos, la autofagia puede ser no selectiva, ante condiciones de ayuno de nutrientes para obtener los componentes necesarios para sobrevivir; o selectiva, donde se degrada específicamente orgánulos disfuncionales.

Se sabe que la mitofagia es un proceso selectivo, debido a que únicamente se degrada este orgánulo y a que la morfología mitocondrial cambia con respecto a la de la autofagia no selectiva (Eiyama *et al.*, 2013); pero, a pesar de esto, la maquinaria es muy similar a la del proceso no

selectivo y la mayoría de genes *ATG* (*AuTophaGy related*) relacionados con autofagia general son necesarios también en mitofagia.

3.3.1. La mitofagia en levadura

En *S. cerevisiae* se conocen pocos mecanismos para inducir la mitofagia y, en todos los casos conocidos, es inducida simultáneamente junto con la autofagia no selectiva. Uno de los mecanismos es crecer las células en medios con fuentes de carbono no fermentables, como glicerol o lactato, y llevarlas a fase estacionaria (Tal *et al.*, 2007, revisado por Abeliovich, 2011). Otros autores han inducido este proceso mediante ayuno de nitrógeno o por tratamiento con rapamicina, para inhibir el complejo TOR (la cual es una forma de inducir a su vez autofagia no selectiva) (Kanki and Klionski, 2008). Recientemente, se ha descrito un protocolo en el que se crecen las células 2-3 días en medio respiratorio, y posteriormente se someten a un ayuno de nitrógeno durante 8 horas (Mao *et al.*, 2011). En estas condiciones, dos grupos independientes llevaron a cabo un rastreo genómico de mutantes, para saber qué genes eran necesarios en mitofagia; y ambos identificaron a *ATG32* como un gen esencial en mitofagia, a pesar de no serlo en autofagia (Okamoto *et al.*, 2009; Kanki *et al.*, 2009).

Atg32 es una proteína de la OM que se une a la proteína adaptadora Atg11. Ante la inducción de mitofagia, Atg32 es fosforilada en el N-terminal en el citosol en dos residuos principales, la Ser-114 y la Ser-119 (Aoki *et al.*, 2011). Esta fosforilación es esencial para la interacción Atg11-Atg32, que lleva a la mitocondria al sitio de ensamblaje del fagóforo (PAS, *Phagophore assembly site*). Dos proteínas MAP quinasas, Slt2 y Hog1, se describieron como imprescindibles en mitofagia (Mao *et al.*, 2011; Aoki *et al.*, 2011),

aunque no parecen fosforilar directamente a Atg32. Recientemente, Kanki y su grupo demostraron que Atg32 se fosforila en ambas serinas de forma directa por la caseína quinasa 2 (CK2), y que, a pesar de que Slt2 y Hog1 son necesarias para que se induzca la mitofagia, únicamente Hog1 interviene en la fosforilación de Atg32 (Kanki *et al.*, 2013).

La región transmembrana de Atg32 es necesaria para su localización mitocondrial, y su región C-terminal en el espacio intermembrana parece afectar a la eficiencia de la mitofagia ya que, por ejemplo, se ha visto que su procesamiento por Yme1 es un mecanismo regulador del proceso (Wang *et al.*, 2013). Atg32 también posee un motivo WXXL en su región citosólica, que es un motivo de interacción con la proteína Atg8 (AIM) (Kondo-Okamoto *et al.*, 2012), necesaria para el crecimiento de la membrana autofagosomal (ver Figura 10A) (Youle and Narendra, 2011). Esta unión a Atg8 ocurre de forma indirecta a través de Atg11 y también está regulada por fosforilación (Farre *et al.*, 2013). Otros autores han mostrado que Atg17, Atg29 y Atg31 son esenciales en el proceso ante ayuno, formando un complejo adaptador entre Atg11 y el complejo proteína quinasa Atg1-Atg13, que colabora en la formación del autofagosoma (Eiyama *et al.*, 2013). Además, Atg11 parece interaccionar con la proteína Dnm1 de fisión, sugiriendo un papel de la dinámica mitocondrial en la mitofagia (Mao *et al.*, 2013). Por lo que es un proceso muy regulado en el que la morfología y la dinámica mitocondrial tienen un papel importante, pero en el que todavía queda por conocer los mecanismos que lo regulan de forma positiva y negativa (Müller *et al.*, 2015).

La cuestión más abierta sobre mitofagia en levadura es si ésta se activa para eliminar mitocondrias disfuncionales o dañadas. En células de

mamífero, la acumulación de mitocondrias despolarizadas induce la mitofagia. En levadura se sabe que la mitofagia degrada de forma selectiva este orgánulo, pero no hay evidencias experimentales de que sea capaz de seleccionar aquellas mitocondrias dañadas.

3.3.2. La mitofagia en mamíferos

En mamíferos, está muy documentado que la pérdida del potencial de membrana mitocondrial causa mitofagia. Pero no se ha encontrado el homólogo de Atg32, y el mecanismo y la regulación de la mitofagia parecen específicos. Existen dos mecanismos principales: la mitofagia mediada por receptores de membrana y la mediada por Parkin/PINK1. Los receptores de membrana de mitofagia, igual que en levadura, están localizados en la OM y presentan la secuencia W/F/YxxL/I que media la interacción con LC3 para la autofagia selectiva. Hay dos familias, una incluye NIX (BNIP3L) y BNIP3, y la otra FUNDC1 (revisado por Liu *et al.*, 2014). NIX y BNIP3 son reguladoras de la apoptosis y la necrosis, pero también interaccionan con LC3 a través de la fosforilación en las serinas 17 y 24 (Zhu *et al.*, 2013), para activar la mitofagia en reticulocitos (ver Figura 10B), un proceso esencial en la maduración de los glóbulos rojos (Sandoval *et al.*, 2008); y la mitofagia inducida por hipoxia, a través de su interacción con la proteína Rheb (Melser *et al.*, 2013). FUNDC1 está relacionada con la mitofagia inducida por hipoxia, a través de su desfosforilación. En condiciones normales, la Src quinasa y CK2, muy abundantes y activas de forma constitutiva, la mantienen fosforilada para asegurar la inhibición de la mitofagia (Chen *et al.*, 2014).

La otra ruta mitofágica está mediada por PINK1, una serina/treonina quinasa, y Parkin, una E3 ubiquitin ligasa citosólica. Como se ha comentado, mutaciones en ambas se han relacionado con la enfermedad de Parkinson. Gracias a numerosos estudios, se ha visto que PINK1 es un sensor del estrés mitocondrial (revisado por Wei *et al.*, 2015). De esta forma, en condiciones normales, PINK1 se importa a la mitocondria y es rápidamente degradado en la IM. Sin embargo, cuando hay una disrupción en el potencial de membrana, PINK1 se estabiliza en la OM y recluta a Parkin. Esta interacción ocurre gracias a la fosforilación de PINK1 en múltiples residuos, lo que le permite fosforilar a Parkin en la Ser-65, activando la actividad E3 ligasa (Kondapalli *et al.*, 2012). Al activar Parkin, ésta ubiquitina diversas proteínas de la OM, lo que podría llevar a su secuestro por el fagóforo (ver Figura 10C), aunque todavía se desconoce la función exacta de la ubiquitinación. Una de las hipótesis es que entre estas proteínas ubiquitinadas, se encuentran Mfn1 y Mfn2, lo que podría llevar a la fragmentación mitocondrial para facilitar la mitofagia (Tanaka *et al.*, 2010). Además, ante condiciones de estrés, se ha visto que Parkin puede inducir la fusión mitocondrial en lugar de la mitofagia, inactivando a la α -sinucleína. De esta forma, Parkin, PINK1 y α -sinucleína forman un circuito regulador de la respuesta mitocondrial a estrés.

3.3.3. Alternativas a la mitofagia

Ante un fallo en el mecanismo de mitofagia, la célula activará la ruta retrógrada para compensar la acumulación de mitocondrias disfuncionales y para intentar activar genes que le permitan sobrevivir en estas condiciones. En el caso de que ninguno de los procesos tenga el efecto

deseado, la célula activa como último recurso la apoptosis, liberando proteínas pro-apoptóticas al espacio intermembrana.

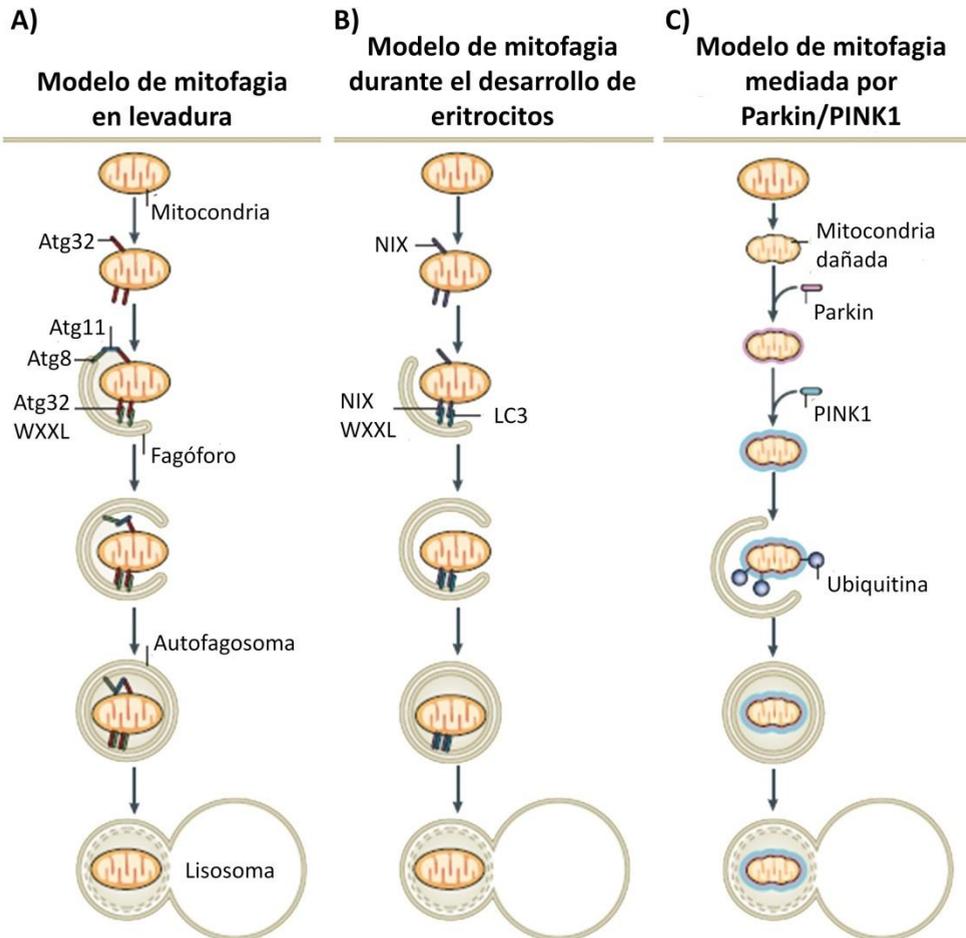


Figura 10. Modelos de rutas de mitofagia en diferentes sistemas celulares. La mitofagia requiere el etiquetado específico de la mitocondria y su reclutamiento en membranas de aislamiento (fagóforos). **A)** Modelo en levadura. Atg32 es el receptor de membrana que se une a Atg8 mediante su motivo WXXL. Atg11 se une al fagóforo. Finalmente, se cierra la membrana entorno a la mitocondria, formando el autofagosoma, que se une a la vacuola para su degradación. **B)** Modelo en el desarrollo de eritrocitos. Durante su diferenciación, los glóbulos rojos pierden sus mitocondrias expresando NIX en la membrana mitocondrial. Éste se une a LC3 de la membrana del fagóforo para eliminar la mitocondria. **C)** Modelo mediado por Parkin/PINK1. Ante un fallo en el potencial de membrana de la mitocondria, PINK1 se acumula en la membrana externa y recluta a Parkin, la cual ubiquitina las proteínas mitocondriales y provoca la encapsulación. Imagen modificada de Youle and Narendra, 2011.



Objetivos

La mitocondria tiene una gran importancia a la hora de adaptar el metabolismo celular a diferentes condiciones ambientales. Además, la composición proteica del orgánulo se regula de forma dinámica en respuesta a situaciones de estrés. El objetivo de este trabajo es estudiar nuevos mecanismos de adaptación mitocondriales a elevadas tasas respiratorias, estrés osmótico y daño mitocondrial. Para cumplir este objetivo general, se han desarrollado los siguientes objetivos específicos en el modelo experimental de levadura:

1. Estudiar la regulación y la función de las proteínas Mpc en condiciones de elevada tasa respiratoria y de estrés osmótico, para entender el papel del ajuste del importe de piruvato a la mitocondria.
2. Analizar posibles cambios en las proteínas de los complejos de la cadena de transporte de electrones ante un cambio de metabolismo fermentativo a respiratorio.
3. Establecer un sistema de daño específico a la mitocondria en la célula de levadura, para poder analizar posibles adaptaciones de los complejos de la cadena respiratoria en estas condiciones.
4. Comprender los mecanismos moleculares específicos que utiliza la mitocondria a la hora de adaptarse a las condiciones ambientales y relacionarlos con mecanismos que producen patologías humanas.



Materiales y métodos

1. Material biológico y condiciones de crecimiento

1.1. Cepas y condiciones de cultivo de bacterias

La propagación y el aislamiento de plásmidos se realizó mediante la cepa de *E. coli* DH5 α (*F'* Φ 80*dlacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) *deoRrecA1 endA1 hsdR17(rK mK⁺)phoA supE44 λ^{-1} thi⁻¹*). La cepa KC8 (*hsdR leuB600 trpC9830 pyrF::Tn5 hisB463 lac Δ X74 strA galU,K*) se utilizó para recuperar selectivamente y secuenciar los plásmidos pACT de los co-transformantes positivos en el rastreo o *screening* de la librería de doble híbrido.

El cultivo y la manipulación de bacterias se realizaron mediante métodos estándar (Sambrook and Russell, 2006). Las células bacterianas se crecieron a 37^o C en sólido o en líquido con agitación (200 rpm) en medio Luria Bertani (LB) compuesto por extracto de levadura (0,5%, m/v), triptona (1%, m/v) y cloruro sódico (1%, m/v). A su vez, para la selección de plásmidos, se suplementó con kanamicina (100 μ g/ml), ampicilina (50 μ g/ml) y/o cloranfenicol (50 μ g/ml). Para la selección de los plásmidos pACT en la cepa KC8 en el ensayo de doble híbrido, se creció las células en medio mínimo M9 sin leucina, con un contenido de sales M9 (13 g/L Na₂HPO₄, 3 g/L KH₂PO₄, 0,5 g/L NaCl, 1 g/L NH₄Cl), NaOH (14 mM), Glucosa (0,1%, m/v), ampicilina (100 μ g/ μ l), Tiamina (1 mM), MgSO₄ (2 mM), CaCl₂ (0,1 mM) y 1xDO (20mg L-Isoleucina, 150mg L-Valina, 20mg L-Adenina, 20mg L-Arginina, 20mg L-Histidina, 30mg L-Lisina, 20mg L-Metionina, 50mg L-Fenilalanina, 200mg L-Treonina, 20mg L-Triptófano, 30mg L-Tirosina, 20mg L-Uracilo).

Para la preparación y crecimiento de bacterias electro-competentes se utilizó el medio SOB (*Super Optimal Broth*), compuesto por triptona (2%,

m/v), extracto de levadura (0,5%, m/v), cloruro sódico (10 mM), cloruro potásico (2,5 mM) y cloruro de magnesio (10 mM); y el medio SOC (*Super Optimal broth with Catabolite repression*), que es igual al SOB suplementado con glucosa (20 mM). Ambos medios se ajustaron a pH 7 (Hanahan, 1983). Estos dos medios se utilizaron para producir un mayor número de unidades formadoras de colonias al ser más ricos en nutrientes que el LB. A los medios sólidos se les añadió agar bacteriológico (2%, m/v).

1.2. Cepas y condiciones de crecimiento de levadura

Las cepas de *S. cerevisiae* empleadas se muestran en la Tabla suplementaria TS1. Las células de levadura se cultivaron según métodos estándar (Holz *et al.*, 2003) y se 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). Se suplementó con geneticina (G418; 200 µg/ml) a la hora de seleccionar mutantes de delección con marcador de resistencia a kanamicina. El medio SD, con un contenido en glucosa (2%, m/v), *yeast nitrogen base* (YNB, 0,7%, m/v) y ácido succínico (50 mM) a pH 5,5 ajustado con Tris; se utilizó en la selección de cepas mediante auxotrofías. Para ello, se suplementó con los aminoácidos y las bases nitrogenadas necesarias, como adenina (30 µg/mL), uracilo (30 µg/mL), triptófano (50 µg/mL), histidina (100 µg/mL), leucina (100 µg/mL) y metionina (100 µg/mL), esterilizadas por filtración. En los ensayos de la actividad de β-galactosidasa, a las placas se les añadió el reactivo X-Gal (80 mg/L) y una solución de sales BU para mantener el pH óptimo, con 70g Na₂HPO₄·H₂O y 30g NaH₂PO₄ en 1L total de agua, ajustado a pH 7 (stock 10x).

En ambos medios se añadió agar bacteriológico (2%, m/v) en los casos en los que se requería de medios sólidos. Cuando se necesitaba una fuente de carbono distinta a la glucosa, se reemplazó por galactosa (2%, m/v), lactato (2%, v/v), glicerol (3%, v/v) o etanol (3%, v/v). El ayuno de nitrógeno se provocó utilizando un medio SD preparado con un YNB (Formedium[®]) sin fuente de aminoácidos ni de sulfato amónico (0,125%, m/v).

1.3. Plásmidos utilizados

Los plásmidos fueron empleados en este trabajo para introducir construcciones génicas en las cepas de bacteria y levadura (ver Tabla 1).

Plásmido	Características	Procedencia
pUG6	AmpR, loxp-KANMX-loxp	Güldener <i>et al.</i> , 1996
pDONR TM 221	KanR2, 2 micron	Invitrogen
pAG423GPD-ccdB-TAP	AmpR, 2 micron, <i>HIS3</i>	Alberti <i>et al.</i> , 2007
pAG423GPD-ccdB-DsRed	AmpR, 2 micron, <i>HIS3</i>	Alberti <i>et al.</i> , 2007
pAG416GPD-ccdB-HA	AmpR, centromérico, <i>URA3</i>	Alberti <i>et al.</i> , 2007
pAG415GPD-ccdB-TAP	AmpR, centromérico, <i>LEU2</i>	Alberti <i>et al.</i> , 2007
pAG415GPD-ccdB-DsRed	AmpR, centromérico, <i>LEU2</i>	Alberti <i>et al.</i> , 2007
pAG426GAL1-ccdB-HA	AmpR, 2 micron, <i>URA3</i>	Alberti <i>et al.</i> , 2007
pVT100U-mtGFP	AmpR, 2 micron, <i>URA3</i>	Westermann and Neupert, 2000
pVT100U-mtRosella	AmpR, 2 micron, <i>URA3</i>	Rosado <i>et al.</i> , 2008
pBTM116	pADH1-LexA-MCS, AmpR, 2 μ , <i>TRP1</i>	ClonTech
pACT (librería Y2H)	pADH1-GAL4AD-MCS, AmpR, <i>LEU2</i>	ClonTech, cedida por P. Sanz
pACT2	pADH1-GAL4AD-MCS, AmpR, <i>LEU2</i>	ClonTech

Tabla 1. Plásmidos utilizados. La tabla muestra los plásmidos empleados a lo largo de este trabajo, junto con sus características principales (resistencias a antibióticos, auxotrofías y secuencias importantes) y su procedencia. Y2H: *Yeast two-hybrid*, librería del sistema de doble híbrido.

2. Ensayos de sensibilidad

2.1. Ensayos de crecimiento en medio líquido

La densidad óptica (OD) de los cultivos de levadura se utilizó para cuantificar la capacidad de crecimiento de las células en medio líquido a lo largo del tiempo (Burke *et al.*, 2000), donde una OD = 1 equivale a 1mg de peso fresco de levadura en 1mL. Se partió en todos los casos de cultivos celulares saturados, diluidos 1:200 en los diferentes medios a estudiar. Los cultivos se analizaron por triplicado, en microplacas de 100 pocillos. Como control negativo, se utilizó los diferentes medios (con los respectivos tratamientos) analizados en ausencia de células, para descartar la existencia de contaminaciones.

La OD se analizó mediante la estación microbiológica Bioscreen C (Thermo Labsystems), utilizando un filtro de banda ancha (420-580nm) para reducir la contribución del medio a la lectura de la absorbancia. La temperatura de crecimiento fue de 28º C y se midió la OD cada 30 minutos durante las siguientes 72 horas. Los cultivos se sometieron a agitación fuerte durante los 30 segundos previos a cada lectura. El procesado de datos incluyó un ajuste para corregir la pérdida de linealidad de la lectura de absorbancia con respecto a la concentración de células a partir de ciertos valores (Warringer and Blomberg, 2003). Las medidas se corrigieron del siguiente modo, para obtener la curva de crecimiento típica sigmoideal:

$$OD_{\text{corregida}} = OD_{\text{medida}} + 0,449*(OD_{\text{medida}})^2 + 0,19*(OD_{\text{medida}})^3$$

2.2. Ensayos de crecimiento en medio sólido (Goteos)

Para comparar posibles diferencias en el crecimiento de las cepas de levadura, también se empleó la técnica de goteos o *droptest*, a partir de cultivos saturados en medio líquido. Se realizaron diluciones seriadas (1:10, 1:100 y 1:1000) de cada cepa en una placa de 96 pocillos y, con ayuda de un replicador manual (Sigma), se depositó una gota de cada dilución en placas de medio sólido con las condiciones a estudiar. Las placas se incubaron entre 2 y 5 días a 28° C. En el análisis se tuvo en cuenta tanto el diámetro de la colonia como la mayor dilución a la que se observaba crecimiento.

3. Técnicas de transferencia génica

3.1. Transformación de bacterias

3.1.1. Preparación de bacterias quimiocompetentes

Para obtener cepas competentes, capaces de incorporar DNA exógeno del ambiente, se partió de cultivos de *E. coli* DH5 α (Taylor *et al.*, 1993) en medio SOB a una OD₆₆₀ = 0,4-0,8. Las células se incubaron en hielo y se repartió el contenido del matraz en tubos Sorvall (Thermo Scientific). Se centrifugó las células 5 min a 5000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en tampón TB, compuesto por 2,42g de Pipes, 8mL CaCl₂ (1 M), 28mL de KCl (3 M), 20mL MnCl₂ (1 M) y hasta 500mL de H₂O MQ estéril. Todo el contenido se pasó a 2 tubos Sorvall, se incubó 10 min en hielo y se volvió a centrifugar. El contenido de cada tubo se resuspendió en 4mL de tampón TB frío y se juntó en un único tubo, añadiendo tampón TB hasta alcanzar los 10mL. Se le añadió 750 μ L de DMSO y se repartió en alícuotas

de 100µL, para guardarlas a -80º C. La eficiencia de transformación se calculó con el número de colonias transformantes/µg DNA.

3.1.2. Transformación de bacterias quimiocompetentes

La transformación química de bacterias se realizó mediante el método por choque térmico (Hanahan, 1983). Se inoculó una alícuota de 100µl de *E. coli* competentes con 0,1-10ng de DNA y se mantuvo en hielo durante 30 min. A continuación, se provocó un choque térmico a 42º C durante 45 segundos y se depositaron las células de nuevo en hielo. A continuación, se inoculó 1mL de medio LB y se incubó a 37º C durante 1h, para posteriormente extender las células en placas de LB con el antibiótico correspondiente para la selección del plásmido.

3.1.3. Preparación de bacterias electrocompetentes

Para obtener células electrocompetentes con una eficiencia de $>10^9$ transformantes/µg de plásmido, se partió de un cultivo bacteriano crecido en medio LB a 37º C a una $OD_{660} = 0,35-0,4$. Se transfirió el contenido del matraz a tubos Sorvall en frío y se centrifugó a 1000 rpm durante 15 min a 4º C. Las células se resuspendieron en agua fría y se centrifugaron de nuevo, concentrándose a continuación en glicerol (10%, v/v) frío. Se realizaron dos nuevas centrifugaciones, resuspendiéndose en glicerol y en 1mL de medio GYT, respectivamente. El medio GYT está compuesto por glicerol (10%, v/v), extracto de levadura (0,125%, m/v) y triptona (0,25%, m/v). En este punto, se diluyó a una concentración entre 2×10^{10} - 3×10^{10} células/mL en medio GYT (sabiendo que una $OD_{660} = 1$ corresponde aproximadamente a $2,5 \times 10^8$ células/mL). La suspensión resultante se dividió en alícuotas de 50µL, que se guardaron a -80º C.

3.1.4. Transformación de bacterias electrocompetentes

Para transformar células mediante electroporación se recomienda que la concentración de DNA sea menor a 10 ng/mL (Dower *et al.*, 1988) y que se lleve a cabo a 4° C. Se transfirió 1µL de DNA a una alícuota de células electrocompetentes. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación (0,1 cm) y se sometió a pulsos en un electroporador (Gene Pulser®, BioRad) en las siguientes condiciones: 1,8kV, 25µF y 200Ω. Inmediatamente, se añadió 1mL de medio SOC a Tª ambiente, para mejorar la eficiencia de transformación por choque térmico, y se incubó a 37° C durante una hora en agitación. Las bacterias se crecieron en placas de medio SOB con el antibiótico apropiado a 37° C durante 12-16 horas.

3.2. Transformación de levadura

La transformación de levadura se realizó mediante el método del acetato de litio modificado (Gietz *et al.*, 1995). Se partió de un cultivo de levadura a una OD₆₆₀ = 0,7-1,2 y se centrifugaron las células a 3000 rpm 3 min. Se lavaron con agua estéril y se resuspendieron en tampón LiTE 1x, compuesto por acetato de litio (0,1 M) en tampón TE 1x (TE: Tris/HCl pH 7,6 (10 mM) y EDTA (1 mM)). Se incubó las células durante 15 min a 30° C para hacerlas competentes. A 60µL de células competentes, se les añadió entre 1 y 10µg de DNA, 5µL de una solución de DNA monocatenario de salmón (0,1%, m/v) (Gietz *et al.*, 2007) y 300µL de LiTE/PEG4000 (40%, v/v). La mezcla se incubó 30 min a 30° C y se sometió a un choque térmico a 42° C durante 20 minutos, para que el DNA entrara en la célula. Finalmente, se lavaron las células y se sembraron en placas con el medio selectivo adecuado a 30° C.

4. Manipulación y análisis de proteínas

4.1. Obtención de extractos proteicos totales

A partir de células de levadura, la obtención de extractos proteicos totales se realizó mediante el método de hervido en Laemmli. El tampón Laemmli 5x está compuesto por Tris/HCl pH 6,8 (0,3 M), SDS (7,5%, m/v), DTT (0,1 M), EDTA (10 mM), sacarosa (30%, m/v) y azul de bromofenol (0,25 mg/mL). Las células se crecieron hasta una $OD_{660} = 0,8-1,2$ y se recogió 10mL de cultivo. Se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos y se lavó con agua fría. Finalmente, se añadió 150 μ L de tampón Laemmli 2x y se hirvió durante 5 minutos a 95 $^{\circ}$ C.

4.2. Electroforesis de proteínas

La electroforesis de proteínas se llevó a cabo mediante el sistema *Mini Protean 3* (BioRad), utilizando geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), para que la movilidad electroforética de los complejos sólo dependiera del peso molecular de las proteínas. Los geles tienen dos capas diferenciadas, una de empaquetamiento y una de separación. La composición de la capa de empaquetamiento es de acrilamida:bisacrilamida 40:0,8 (3%, m/v), SDS (0,1%, m/v), Tris/HCl (125 mM), APS (1%, m/v) y TEMED (0,1%, v/v) a pH 6,8. Y la del gel de separación es de acrilamida:bisacrilamida 40:0,8 (10%, m/v), SDS (0,1%, m/v), Tris/HCl (375 mM), APS (1%, m/v) y TEMED (0,1%, v/v) a pH 8,8. La electroforesis se llevó a cabo a una diferencia de potencial constante de 80V utilizando el tampón de resolución SDS-PAGE 1x, compuesto por glicina (0,19 M) y SDS (0,1%, m/v) ajustado a pH 8,3 con

Tris. Las muestras (apartado 4.1) fueron inyectadas en el gel junto a un marcador de peso molecular (*PageRuler™ Prestained Protein Ladder*, Fermentas).

4.3. Transferencia a membrana de proteínas (*Western Blot*) y tinción de membranas

Las proteínas deben ser transferidas a membranas para que sean más accesibles a la hora de realizar reacciones de detección mediante anticuerpos. Las membranas utilizadas fueron *Immunoblot® PVDF 0,45µm* (Amersham™ Hybond™, GE Healthcare) y las proteínas se transfirieron mediante corriente eléctrica con el sistema *Mini-Trans Blot* (BioRad). El tampón de transferencia estaba compuesto por SDS-PAGE 1x y metanol (20%, v/v), que rompe el complejo SDS-proteína y permite la unión de ésta a la membrana. La transferencia se realizó a una diferencia de potencial constante de 10V a 4º C durante toda la noche.

La tinción de proteínas transferidas se realizó mediante *DirectBlue 71* (DB71), para comprobar la eficiencia de la transferencia y como control interno de carga. Las membranas de PVDF se sumergieron en la solución de tinción DB71 (0,008%, m/v) durante 5 minutos en agitación y se eliminó el exceso de colorante mediante la solución de lavado, compuesta por etanol absoluto (40%, v/v) y ácido acético glacial (10%, v/v). Tras escanear la membrana, se incubó durante 10 minutos en la solución de desteñido, preparada con etanol absoluto (50%, v/v) y bicarbonato sódico (1 M).

4.4. Detección inmunológica de proteínas y cuantificación

Para detectar las proteínas mediante anticuerpos, lo primero que se hizo fue bloquear todos los sitios de unión no específicos mediante una solución de bloqueo compuesta por TBS 1x y leche desnatada en polvo (2%, m/v). El tampón TBS 10x está compuesto por NaCl (1,5 M) y Tris/HCl (0,2 M) a pH 7,6. A continuación, se incubó la membrana con el anticuerpo primario específico (ver Tabla 2) diluido en la solución de bloqueo, durante 1h en agitación. Tras la incubación, se lavó la membrana 3 veces durante 10 min con tampón TBS 1x, para eliminar el exceso de anticuerpo primario, y se incubó de nuevo con el anticuerpo secundario durante 1h, disuelto en el tampón TBS 1x. Finalmente, se realizaron 3 lavados de 10 min con TBS 1x.

Anticuerpo primario	Organismo	Dilución	Ig	Anticuerpo secundario	Dilución
α -GFP (Roche)	Monoclonal ratón	1:10000	IgG	α -HRP-ratón	1:5000
α -HA (Roche)	Monoclonal ratón	1:5000	IgG	α -HRP-ratón	1:5000
α -Pgk1 (Abcam)	Monoclonal ratón	1:5000	IgG	α -HRP-ratón	1:5000
α -PAP (Sigma)	Policlonal conejo	1:10000	IgG	α -HRP-conejo	1:10000

Tabla 2. Anticuerpos empleados durante la inmunodetección de proteínas mediante Western Blot. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para detectar proteínas en las membranas PVDF, junto con la dilución empleada para cada uno de ellos. α -PAP reconoce el epítipo TAP.

La detección se realizó con el sistema *ECL Prime Western Blotting Detection System* (GE Healthcare - Amersham Biosciences) y la señal de quimioluminiscencia se obtuvo de forma electrónica mediante la cámara LAS-3000 (Fujifilm). Las imágenes se procesaron en el software *Image Reader LAS-3000* y se analizaron mediante *Image Gauge*. La cuantificación

de la intensidad de banda se realizó mediante la herramienta *Quant Result*, y se normalizó en función a la proteína control Pgc1.

4.5. Co-inmunoprecipitación de proteínas

4.5.1. Co-inmunoprecipitación de proteínas mitocondriales

La co-inmunoprecipitación de proteínas mitocondriales se realizó en cepas de levadura marcadas en los genes *MPC* con el epítipo TAP, que contenían el plásmido pGAL1-Mpc3-HA. Las células se crecieron en 100mL de medio SGal hasta una $OD_{660} = 1-2$ y se centrifugaron, lavándose a continuación con agua fría y tampón TSB, formado por Tris/HCl pH 7,5 (10 mM) y sorbitol (0,6 M). Las células se resuspendieron en 1mL de tampón TSB frío con PMSF (1 mM) e inhibidor de proteasas (Roche). Se añadió la misma cantidad de bolas de cristal (0,5mm de diámetro) y se rompió las células en 4 ciclos de vórtex durante 1 minuto y dejando reposar en hielo. El lisado se transfirió a un tubo nuevo y se centrifugó 5 min a 3500g a 4º C para transferir el sobrenadante que contenía la mitocondria a un nuevo tubo. Se centrifugó de nuevo 10 min a 16000g a 4º C y se descartó el sobrenadante, para resuspender el pellet en 1mL de tampón frío TSB con PMSF e inhibidor de proteasas, y se repitieron de nuevo las dos últimas centrifugaciones. Finalmente, se resuspendió en 0,25mL de tampón A frío (compuesto por Tris/HCl pH 7,5 (50 mM), EDTA (15 mM), DTT (2 mM) y NaCl (150 mM)) con PMSF (1 mM) e inhibidor de proteasas.

En este punto, se cogieron 50µL de cada muestra como control y se les añadió 12,5µL de tampón Laemmli 5x (*Input*). El resto de la muestra se utilizó en la co-inmunoprecipitación. Las mitocondrias se solubilizaron con 40µL de DDM (10%, m/v) durante 20 min a 4º C. La inmunoprecipitación se

realizó a 4º C durante 2 horas con el anticuerpo α -HA (12CA5, Roche) y las bolas magnéticas *Dynabeads*[®] *Protein A* (Invitrogen), lavadas previamente con tampón A 3 veces. Finalmente, las bolas magnéticas se lavaron cuatro veces con 1mL de tampón A frío y se resuspendieron en 50 μ L de tampón Laemmli 1x. Tanto el extracto total (*Input*) como el extracto obtenido tras la co-inmunoprecipitación, se incubaron a 95º C durante 5 min y se analizaron mediante el ensayo *Western Blot*.

4.5.2. Co-inmunoprecipitación de proteínas citosólicas

Se utilizaron cepas de levadura marcadas en algunos genes con el epítipo TAP en el genoma que expresaban el plásmido pGPD-ATG11-HA. La obtención del extracto proteico fue similar, añadiendo Triton X-100 (0,1%, v/v) al tampón A. Una vez obtenido el extracto total de proteínas, se midió la concentración de proteínas mediante el ensayo de Bradford. Se utilizó el reactivo *5X BioRad Protein Assay* (BioRad) y se empleó la seroalbúmina bovina (BSA) como proteína patrón para la recta de calibrado. La absorbancia del ensayo de Bradford se midió a 595nm en el VICTOR™ X (PerkinElmer).

Se incubó entre 1-5mg de proteína total con 20 μ L de *Dynabeads*[®] *Pan mouse IgG* (Invitrogen), lavadas previamente 3 veces con tampón A, durante 2 horas en rotación. Finalmente, se lavaron 5 veces las bolas magnéticas con tampón A, PMSF e inhibidor de proteasas, durante 3 min a 4º C y se resuspendieron en 50 μ L de Laemmli 1x, para ser analizadas por *Western Blot*.

5. Técnicas de manipulación génica

5.1. Purificación de DNA genómico total de levadura

Para obtener DNA genómico de cepas de levadura, se crecieron cultivos saturados de 3mL durante toda la noche y se lavaron con agua. Las células se resuspendieron en 200 μ L de tampón PP, compuesto por Tris/HCl pH 7,5 (100 mM), EDTA (10 mM), β -mercaptoetanol (10 μ L/mL) y lisozima (0,2 mg/mL). Se incubó 1h a 37 $^{\circ}$ C y se añadió 200 μ L del tampón de lisis, con NaOH (0,2 M) y SDS (1%, m/v). La mezcla se incubó a 65 $^{\circ}$ C 20 minutos y se añadió 200 μ L de acetato potásico pH 5,5 (5 M). Tras centrifugar a máxima velocidad durante 3 minutos, se precipitó el DNA con isopropanol y se lavó con etanol (70%, v/v), para ser resuspendido en 50 μ L de agua.

5.2. Manipulación de fragmentos de DNA

La amplificación de fragmentos específicos de DNA se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con la enzima DNA polimerasa (1 U/ μ L) de Biotools o con la *TrueStart™ Hot Start Taq* DNA polimerasa (Thermo Scientific). La cuantificación del DNA obtenido se llevó a cabo con el aparato *NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific), y su calidad y tamaño se comprobó en un gel de agarosa (1%, m/v). En los casos en los que fue necesario purificar fragmentos de DNA de geles, se utilizó el *GeneClean® Turbo Kit* (QBiogene, Inc). Las enzimas de restricción (Fermentas) se utilizaron en la digestión de DNA y la enzima T4 ligasa (Roche) permitió unir extremos próximos cohesivos 3'-hidroxilo y 5'-fosfato.

5.3. Extracción de plásmidos de bacteria y levadura

El DNA plasmídico de bacteria se obtuvo a partir de cultivos de 3mL mediante el sistema NucleoSpin[®] Plasmid (Macherey-Nagel), eluyendo en 50µL de agua. Los plásmidos de levadura se obtuvieron mediante el sistema anterior modificado (Singh and Weil, 2002), en el cual las células se resuspendieron en 200µL de tampón P1 y se añadió 100µL de solución lisozima, compuesta por sorbitol (1,2 M), NaPO₄ (0,1 M) y lisozima (5 mg/mL). La mezcla se incubó durante 30 min a 37° C y se le añadió 300µL del tampón P2. De nuevo, se incubó a 22° C 10 min y se añadió 420µL de tampón P3. Los lisados se centrifugaron a 10000 rpm 10 min y se continuó con el protocolo descrito por el fabricante, hasta eluir en 50µL de agua.

5.4. Diseño de construcciones de delección y amplificación génica

La generación de plásmidos para la introducción de fragmentos de DNA se realizó mediante el sistema Gateway[®] (Invitrogen), que utiliza una serie de secuencias de recombinación para transferir DNA entre plásmidos (Katzen, 2007). Los plásmidos utilizados se muestran en la Tabla 1. Los genes se clonaron (a partir de DNA genómico del fondo genético BY4741) en los diferentes vectores mediante dos métodos: bien por recombinación homóloga utilizando los sitios *att* del vector aguas arriba y aguas abajo del ORF seleccionado; o bien con sitios de restricción, para digerirlos con las enzimas de restricción correspondientes e introducirlos por ligación de extremos. Todos los oligonucleótidos utilizados se muestran en la Tabla suplementaria TS2. Todos los plásmidos generados en esta Tesis Doctoral se comprobaron mediante el Servicio de Secuenciación del IBMCP.

Para construir cepas de delección se utilizó el sistema PCR-*KanMX* (Güldener *et al.*, 1996). Se amplificó la secuencia *KanMX* a partir del plásmido pUG6 (Tabla 1), mediante oligonucleótidos diseñados con sitios de recombinación homóloga 200pb aguas arriba y aguas abajo del ORF de interés (Tabla suplementaria TS2). Esta construcción se transformó en levadura y se seleccionó las cepas en medio YPD con geneticina. Posteriormente, la delección se comprobó mediante PCR de DNA genómico, con el primer cebador situado en el promotor del gen y el segundo situado en el ORF *KanMX* (Tabla suplementaria TS2). El producto de PCR se obtuvo en aquellos casos en los que la inserción se producía en el lugar correcto.

6. Análisis de expresión mediante RT-PCR

6.1. Obtención de RNA total mediante el método de fenol ácido

Para extraer el RNA total de las células de levadura, se crecieron las células hasta fase exponencial y se recogieron 10mL, que se lavaron con agua. Se resuspendieron en 400µL de tampón TES, que contiene Tris/HCl pH 7,5 (10 mM), EDTA (10 mM) y SDS (0,5%, m/v), y se mezclaron con 400µL de fenol ácido (pH 4). Se incubó la suspensión a 65° C durante 45 min e inmediatamente se puso las muestras en hielo 5 min. Se centrifugó durante 1 min a 10000 rpm y se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo, donde se repitió de nuevo la extracción con 400µL de fenol ácido. La nueva fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se añadió 40µL de acetato de sodio pH 5 (3 M) y 2,5 volúmenes de etanol. Se centrifugó de nuevo a 14000 rpm durante 10 min, se lavó el pellet con etanol (70%, v/v) y se dejó secar para resuspenderlo en 100µL de agua MQ.

El contenido de RNA se midió mediante Nanodrop y se comprobó la calidad en un gel de agarosa con formaldehído, para romper la estructura secundaria de las moléculas de RNA. El gel se preparó con agarosa (1%, m/v) y tampón MAE 1x, el cual contiene MOPS pH 7 (0,2 M), acetato de sodio (5 mM) y EDTA (1 mM). A este gel, se le añadió 6mL de formaldehído (37%, v/v). El tampón de electroforesis se preparó con 100mL de tampón MAE 10x y 30mL de formaldehído (37%, v/v), en un volumen final de 1L. Para las muestras, se preparó un tampón de carga con 2,2mL de formamida, 0,8mL de formaldehído, 0,5mL de tampón MAE 10x, 0,4mL de glicerol (80%, v/v) y 0,1mL de azul de bromofenol (2%, m/v). Se cogieron 40µL de este tampón junto con 10µL de muestra y 2µL de bromuro de etidio (0,1%, m/v). La mezcla se calentó a 56º C 10 min y se corrieron en el gel a 150V durante 2-3 horas, para poder apreciar los rRNAs a 3,5 y 1,8 kb.

6.2. Purificación y concentración del RNA total

Una vez extraído el RNA, se eliminó el posible DNA residual de la muestra mediante la enzima *DNase I Amplification Grade* (1 U/µL, Invitrogen). Se incubó 30min a 37º C una mezcla con 50µg de RNA total, 10µL de tampón 10x, 2µL de enzima DNasa I, 1µL de inhibidor de ribonucleasas (*RNase Out*, Invitrogen) y agua, hasta un volumen de 100µL. A continuación, se utilizó el *RNeasy Mini Kit* (Qiagen), siguiendo los pasos indicados por el fabricante para purificar y concentrar el RNA.

6.3. Síntesis de cDNA mediante transcripción reversa

Se realizó la transcripción reversa (RT) a partir del RNA mediante el kit *Superscript III First-Strand Synthesis System* (Invitrogen). Las muestras se

prepararon por duplicado, para tener un control “no RT” de cada una (en ausencia de la enzima). Se preparó una solución con 5µg de muestra de RNA purificada, 1µL de primer oligo (dT)₂₀ (50 µM), 1µL de mezcla de dNTPs (10 mM) y 3µL de agua. Se incubó durante 5 minutos a 65° C y se puso en hielo durante al menos un minuto. A continuación, se preparó la solución de síntesis de cDNA con 2µL de tampón RT 10x, 4µL de MgCl₂ (25 mM), 2µL de DTT (0,1 M), 1µL de *RNase Out* (40 U/µL) y 1µL de *SuperScriptIII RT* (200 U/µL) para cada reacción. Se añadió esta solución a cada muestra y se incubó 50 min a 50° C, y se terminó la reacción incubando las muestras a 85° C 5 min. Inmediatamente, se pusieron en hielo y se añadió 1µL de RNase H, incubándose durante 20 minutos a 37° C. Finalmente, se añadió 90µL de agua MQ y se guardaron las muestras a -20° C.

6.4. PCR cuantitativa en tiempo real

Para analizar la expresión de los genes de interés, se utilizó la técnica de PCR cuantitativa mediante *Fast EVA Green™ qPCR Master Mix* (Biotium), donde se detecta la incorporación de este fluoróforo durante la síntesis de los productos de PCR. Las reacciones de PCR contenían 2µL del cDNA molde, 3µL de una solución de ambos cebadores (3,3 µM) y 5µL de Master Mix junto con un fluoróforo de referencia 5(6)-carboxi-X-rodamina (ROX™, Molecular Probes) diluido a 0,1 µM. Cada reacción de PCR se realizó por triplicado en una placa óptica de 96 pocillos (Applied Biosystems) y la detección se llevó a cabo en un lector de secuencias *7500 Fast Applied Biosystems*. Se incluyeron los controles negativos de la transcripción reversa para evitar posibles contaminaciones de DNA y el gen de referencia empleado fue *ACT1*, que es un gen endógeno no regulado.

El parámetro más importante en función del cual se realizan todos los cálculos analíticos es el Ciclo Umbral (*Threshold Cycle, Ct*), que se define como el ciclo a partir del cual la fluorescencia emitida por encima del ruido de fondo es estadísticamente significativa. El análisis de la expresión génica normalizada frente al gen de referencia se realizó mediante la siguiente fórmula: $2^{Ct(ACT1-GEN)}$.

7. Análisis de las especies reactivas de oxígeno (ROS)

Para la detección de ROS, se utilizó el compuesto 2',7'-dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato (H₂DCF-DA, Sigma). Éste es permeable a la célula y no es fluorescente en estado reducido, pero cuando se eliminan los grupos acetato y se oxida, se convierte en la 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) que sí emite fluorescencia. Se crecieron cultivos de levadura hasta una OD₆₆₀ = 0,6-0,8 y se tomaron 9mL de cultivo para el tratamiento con fluoresceína y 9mL para la muestra sin tratamiento (*mock*). Se añadió el compuesto H₂DCF-DA (10 µM) y se incubó las muestras 30 min en agitación a 30º C. Las muestras se dividieron en 3 tubos, se lavaron con agua y se añadió 1mL de Tris/HCl a pH 7,5 (50 mM), 10µL de cloroformo y 5µL de SDS (0,1%, m/v). Se agitó con el vórtex durante 30 segundos, para romper las células, y se centrifugaron a 13000 rpm 3 min. El sobrenadante se cargó en una placa multipocillo negra (Costar) y la fluorescencia se midió en un lector de microplacas *Glomax®-Multi Detection System* (Promega), con un filtro de excitación a 492nm y de emisión a 525nm. El valor obtenido para cada muestra fue normalizado frente al valor obtenido para la muestra *mock* y frente a la OD inicial de cada cultivo.

8. Consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno se determinó mediante un electrodo de oxígeno *MitoCell S200 Respirometry System with MT200 Respirometer* (Strathkelvin Instruments), mediante el protocolo de Béve y colaboradores (Béve *et al.*, 2005). Las células se crecieron en 3mL de medio mínimo SD durante toda la noche, se diluyeron a una $OD_{660} = 0,15$ y se crecieron en el medio de interés hasta una $OD_{660} = 0,3$. La suspensión celular se lavó una vez con agua y con $NaPO_4$ pH 7,4 (40 mM). Se añadió glucosa (1%, m/v) para medir el consumo de O_2 y se cargó 500 μ L de suspensión celular en el electrodo. Las medidas se tomaron durante 30 minutos. El análisis de datos se llevó a cabo mediante el software *Strathkelvin 782 System*, que calcula en μ mol/h el consumo de oxígeno en función del volumen celular.

9. Inducción y detección de mitofagia

La inducción de mitofagia se realizó de diversas maneras. La primera de ellas, descrita por Kanki y Klionski, se basa en crecer las células durante 24-48h en medio YP con lactato (YPL) hasta fase exponencial. Se diluyó las células a una $OD_{660} = 0,2$ y se crecieron durante 14-16h hasta una $OD_{660} = 0,8-1,5$. Se lavaron las células con agua y se resuspendieron en ayuno de nitrógeno (SD-N) durante 6 horas (Kanski and Klionski, 2008). La detección de mitofagia se realizó por microscopia u obteniendo extractos proteicos y analizando por *Western Blot* las muestras.

Una modificación a este protocolo se realizó creciendo las células en medio mínimo en condiciones respiratorias (SGalactosa o SGlicerol) durante

toda la noche. Se lavaron las células con agua dos veces y se añadió medio SD-N durante 8h para inducir la mitofagia (Mao *et al.*, 2011). Finalmente, un método más específico desde el punto de vista biológico para inducir mitofagia fue a través de un antibiótico, llamado valinomicina (Pressman, 1965). Las células se crecieron en medio SGal o SGlic durante toda la noche hasta fase exponencial y se añadió valinomicina (4 μ M) durante 8h. En estos dos últimos protocolos, se recogió muestra cada 2 horas y se extrajo proteínas para luego analizarlas por *Western Blot*.

10. Ensayo de doble híbrido en levadura

La técnica de doble híbrido es una herramienta que permite la identificación de interacciones proteína-proteína *in vivo* en levadura, por medio de la reconstitución de un factor de transcripción (Fields and Song, 1989). Es un ensayo genético en el que se co-transformó la cepa THY.AP4 con dos plásmidos: pBTM116, que posee el dominio LexA de unión (*BD*) al DNA proveniente de bacteria fusionado a una proteína; y pACT o pACT2, con el dominio de activación de la transcripción Gal4AD de levadura fusionado a otra proteína o librería de proteínas (para hacer un *screening*).

Si las proteínas de ambos plásmidos interactúan físicamente, los dominios de unión y activación se encontrarán lo suficientemente cercanos para activar la transcripción de los genes reporteros. En este caso, LexA tenía una secuencia de reconocimiento aguas arriba de 3 genes reporteros: *HIS3*, *ADE2* y *LacZ* (actividad β -galactosidasa). La limitación de esta técnica se centra en que únicamente detecta las interacciones de proteínas que son capaces de entrar en el núcleo celular.

10.1. Análisis de interacción proteína-proteína en placa

Para estudiar de forma cualitativa la interacción entre dos proteínas, se utilizó ensayos de goteos en condiciones restrictivas de crecimiento. Como control positivo, se crecieron las cepas en medio mínimo sin triptófano ni leucina, que son los marcadores de selección que contienen los plásmidos; con lo que la cepa THY.AP4 sin transformar no es capaz de crecer. Para observar la interacción, se hicieron ensayos en medios de restricción media (SD-Trp-Leu-His) y restricción alta (SD-Trp-Leu-His-Ade), donde únicamente son capaces de crecer cuando ambas proteínas interaccionan. Además, se crecieron las cepas en un medio SD-Trp-Leu+X-Gal. El X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-galactopiranosido) es un reactivo que se hidroliza por la β -galactosidasa a galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol, y éste último es oxidado a 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, un compuesto azul insoluble. Por tanto, las colonias en placa presentan una coloración azul si existe interacción.

10.2. Ensayo cuantitativo de la actividad β -galactosidasa

Para evaluar de forma cuantitativa la actividad β -galactosidasa de las diferentes cepas, se utilizó el reactivo orto-nitrofenil- β -galactopiranosido (ONPG, Merck), que se hidroliza en galactosa y orto-nitrofenol (ONP). Este último compuesto tiene una coloración amarilla que se puede utilizar en medio líquido para cuantificar la actividad de la enzima midiendo la absorbancia a 420nm.

En el ensayo, se recogieron 3mL de células a una $OD_{660} = 0,5-0,6$ en diferentes condiciones y se resuspendieron en 100 μ L de tampón GTED, formado por glicerol (20%, v/v), Tris pH 7,6 (10 mM), EDTA pH 8 (1 mM) y

DTT (1 mM). A continuación, para permeabilizar las células se les añadió 6µL de una solución TET (tolueno, etanol y triton X-100, en proporciones 1:4:0,5, respectivamente). Las muestras se sometieron al vórtex durante 3 min y se pusieron en hielo inmediatamente. Cada reacción se llevó a cabo con 5µL de células en 95µL de tampón Z, formado por fosfato de sodio a pH 7 (1 M), KCl (10 mM), MgSO₄ (1 mM) y β-mercaptoetanol (50 mM). Se añadió 20µL de ONPG (13,3 mM) y se incubó a 28° C hasta que apareció una coloración amarilla. La reacción se terminó añadiendo 50µL de Na₂CO₃ (1 M) y se midió la absorbancia a 415nm en un lector de microplaca MultiScan (Thermo Scientific). La actividad enzimática se determinó en las unidades arbitrarias Miller, que cuantifican la cantidad de enzima capaz de hidrolizar 1nmol de ONPG por minuto a 28° C y pH 7. Los cálculos se realizan de la siguiente forma:

$$\text{Unidades Miller} = (680 \times \text{OD}_{420}) / (t \times V_c \times \text{OD}_{660})$$

Donde t es el tiempo del ensayo (en min), V_c es el volumen del ensayo corregido (V_{cultivo} × V_{GTED}/V_{ensayo}) en mL y 680 es un factor específico de corrección para la medición en microplacas.

10.3. Amplificación de una colección de plásmidos pACT

Para realizar un estudio de interacción de la proteína Atg11 más amplio, se enfrentó esta proteína contra una librería de fragmentos genómicos introducidos en los plásmidos pACT. La librería de plásmidos fue aportada por el Dr. Pascual Sanz, en una concentración de 2 µg/µL en un volumen de 5µL, por lo que fue necesario amplificar dicha colección.

Se quería obtener 6×10^6 clones independientes de *E.coli*, que es aproximadamente 3 veces el tamaño de la librería original. Para ello, se generaron bacterias electrocompetentes de alta eficiencia (apartado 3.1.3), se transformaron con la cantidad necesaria de la colección de plásmidos y se plaquearon los clones a alta densidad en 150 placas de LB con ampicilina (aproximadamente 40000 clones independientes/placa). Estas células se incubaron a 37° C durante 48 horas y se recogieron añadiendo 5mL de medio LB con glicerol (25%, v/v) a las placas y arrastrando las colonias. La suspensión celular se introdujo en un matraz y se incubó durante 4 horas a 30° C en agitación para obtener una mayor producción de DNA plasmídico. La mitad del cultivo se utilizó para la extracción de plásmidos y el resto se dividió en alícuotas de 50mL para guardarlas a -80° C. La extracción de los plásmidos se realizó por medio del *QIAGEN Plamid Mega Kit* (Qiagen), para un volumen de 400mL.

10.4. Transformación y *screening* de una librería de plásmidos en levadura

La co-transformación de levadura con la colección de plásmidos pACT y el plásmido pBTM116-ATG11 se llevó a cabo con el método anteriormente descrito en el apartado 3.2 modificado. El protocolo fue el mismo pero antes de provocar el choque térmico, se inoculó 40µL de DMSO a las células y se mezcló por inversión. Las células se seleccionaron en medio SD-Leu-Trp, para obtener todas las colonias posibles. Se incubaron a 30° C hasta que aparecieron las colonias de co-transformantes y se incubó a 4° C las placas durante 3-4 h. Para recoger las colonias, se añadió 2mL de tampón 1xTE a cada placa y se combinó todas las soluciones celulares en alícuotas de 50mL. Se generó un stock de glicerol añadiendo la misma

cantidad de células que solución glicerol (65%, v/v)/MgSO₄ en un volumen final de 15mL. El resto de suspensión celular se inoculó en placas de SD-Leu-Trp-His y SD-Leu-Trp-His-Ade, con y sin 4μM de valinomicina, y se dejó crecer durante 4-5 días para ver si aparecían colonias positivas.

Las placas en las que aparecían colonias se replicaron en nuevas placas del mismo medio, para realizar un ensayo colorimétrico de la actividad β-galactosidasa. Este método no se produce *in vivo*, pero permite observar de forma rápida si existe expresión del gen *LacZ*. Para cada placa, se preparó una placa Petri vacía con dos filtros Whatman y se inoculó una solución con 6mL de tampón Z (apartado 10.2), 11μL de β-mercaptoetanol y 100μL de X-Gal, eliminando el exceso de líquido. Paralelamente, se colocó sobre las placas replicadas de colonias un filtro de nitrocelulosa (NC, Amersham™ Protran™ 0,45μm) y, una vez empapado, se introdujo en un baño de nitrógeno líquido durante 10 segundos. Posteriormente, se colocó el filtro, con las colonias hacia arriba, sobre los filtros Whatman y se incubó a 37° C hasta que apareció una coloración azul en algunas de las colonias.

10.5. Comprobación de los clones positivos del ensayo doble híbrido

Aquellas colonias que mostraron una coloración azul, se seleccionaron en placas para posteriores análisis. Se realizó la extracción de plásmidos de estos clones positivos de levadura y se volvió a transformar dichos plásmidos en bacterias KC8 en medio M9+Amp-Leu, para escoger únicamente los plásmidos pACT, y se seleccionaron una segunda vez en LB+Amp+Kan. Una vez obtenida la cepa KC8 con cada plásmido pACT positivo, se extrajo los plásmidos de bacteria y se volvió a re-transformar en la cepa de levadura THY.AP4 que expresaba el plásmido pBTM116-ATG11,

para comprobar de nuevo que se repetía el fenotipo. Los plásmidos de aquellas cepas que volvieron a dar positivas, se enviaron a secuenciar para saber qué ORF contenían e interaccionaba con Atg11.

11. Microscopía confocal

La microscopía confocal se utilizó para el estudio de localización celular de proteínas y para el análisis de la morfología mitocondrial. Se empleó el microscopio confocal Zeiss LSM 780 con un objetivo de plano acromático 40X aceite/1,3 de apertura numérica. Se utilizaron proteínas fusionadas a diferentes fluoróforos (Tabla 3), bien en plásmidos o bien integrados en el genoma, para el estudio de su localización y distribución celular.

<i>Fluoróforo</i>	$\lambda_{emisión}(nm)$	$\lambda_{excitación}(nm)$	<i>Láser utilizado</i>
GFP	488	509	Argón 488
DsRed	545	572	Argón 514
CMAC	353	466	Diodo 504
DsRed.T3	543	587	Argón 514
pHluorin	488	508	Argón 488

Tabla 3. Fluoróforos y tinciones utilizadas en los análisis mediante microscopía confocal. Se muestran las longitudes de onda (λ) de emisión y excitación de cada fluoróforo, y el láser empleado en cada caso para su detección a dichas λ en el microscopio confocal Zeiss.

La morfología mitocondrial se analizó mediante el plásmido pVT100U-mtGFP, con el fluoróforo GFP fusionado a una secuencia de localización mitocondrial (mtPreSu9, mt), que marca la mitocondria con fluorescencia verde. A la hora de visualizar las vacuolas, se incubó las

células con el *CellTracker™ Blue CMAC* (7-amino-4-clorometilcumarina, Life Technologies) a 100 mM durante los 30 minutos previos a la observación, y se lavó 3 veces con H₂O MQ para eliminar el exceso de tinción. El CMAC se vuelve de color azul por la acción de proteasas vacuolares. En todos los casos, las células se crecieron en medio mínimo hasta fase exponencial, para que el número de células no influyese en su comportamiento bajo el microscopio. El análisis de imagen y la cuantificación de la fluorescencia se realizaron mediante el programa Fiji (ImageJ).

12. Aplicaciones bioinformáticas

Se empleó la URL del *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov), para acceder a información desde tipo genómico hasta bibliográfico, gracias a las bases de datos contenidas (Gene, Protein, PubMed) y a las herramientas disponibles (BLAST, CD Search). Se empleó el algoritmo BLAST para rastrear las bases de datos EMBL/GenBank/Swissprot y obtener secuencias similares a las de interés, tanto de genes como de proteínas.

Para obtener información biológica sobre la levadura *S. cerevisiae* se utilizó *The Saccharomyces Genome Database* (SGD), que proporciona además herramientas para la búsqueda y el análisis de estos datos, tanto de secuencia como de función de genes y proteínas. En especial, se emplearon los algoritmos de análisis de los sitios de restricción de una secuencia. Para el diseño de cebadores se utilizó el programa *Primer3*.

13. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el programa Statgraphics®. Los experimentos se realizaron por triplicado y se calculó la media y la desviación típica de los datos. En el caso de repeticiones biológicas, se utilizó el error estándar de la media (o error típico), que cuantifica cuánto se apartan los valores de la muestra de sus correspondientes valores en la población (Abraira, 2015). A la hora de comparar dos muestras se utilizó la prueba *t de Student* para determinar la diferencia de medias entre dos muestras independientes. Para saber si había diferencias entre los valores de varias condiciones, se realizó un análisis de la varianza de las poblaciones (ANOVA), donde el intervalo de confianza para la media se calculó por defecto al 95% de confianza. En todos los casos, un valor *p*-valor < 0,05 fue considerado significativo estadísticamente.



Capítulo 1

**Función del transportador de
piruvato mitocondrial (MPC) en
la adaptación de la actividad
mitocondrial**

1. Análisis bioinformático de la secuencia proteica de la familia MPC en *S. cerevisiae*

En *S. cerevisiae* se ha identificado tres genes pertenecientes a la familia del transportador de piruvato mitocondrial (MPC): *YGL080w*, *YHR162w* y *YGR243w*, que codifican para las proteínas Mpc1, Mpc2 y Mpc3, respectivamente. Se ha propuesto que Mpc1 y Mpc2 forman parte del sistema transportador de piruvato mitocondrial para la biosíntesis de aminoácidos (Bricker *et al.*, 2012; Herzig *et al.*, 2012). En cambio, no se ha descrito una función para Mpc3. Mediante el programa ClustalW2 (Goujon *et al.*, 2010; McWilliam *et al.*, 2013), se llevó a cabo un alineamiento múltiple de las secuencias proteicas y se comprobó que existe entre ellas una gran similitud. Mpc2 y Mpc3 presentan un elevado grado de homología entre ellas, con más de un 80% de identidad entre los aminoácidos 1 y 106, y una mayor diferencia en la zona C-terminal. En cambio, Mpc1 comparte menos del 30% de identidad con Mpc2 y Mpc3 (Figura 11). Este elevado grado de similitud entre Mpc2 y Mpc3 podría significar que son resultado de una duplicación génica y que son redundantes funcionalmente.

Para realizar un análisis más exhaustivo de su similitud, se realizó una búsqueda de motivos conservados entre las secuencias a través del programa MEME (*Multiple EM for Motif Elicitation*) (Bailey *et al.*, 2010). Se encontraron tres motivos compartidos entre las secuencias Mpc2 y Mpc3, lo que reafirma el elevado grado de homología observado en el alineamiento (Figura suplementaria S1). Y de nuevo, Mpc1 era la secuencia más diferente ya que únicamente presentaba dos de los motivos y el segundo de ellos se encontraba desplazado en la secuencia. Analizándolo

Resultados

más detenidamente, el primero de los motivos de las tres secuencias parecía coincidir en localización (N-terminal) y tamaño (10-15 aminoácidos) con el péptido señal que dirige estas proteínas a la mitocondria.

```

MPC3-YGR243W  MSASAFNFAFRRFWNSEIGPK-----TVHFWAPTLKWGLVFAGLNDIKRPVEKVSQAQN  54
MPC2-YHR162W  MSTSSVRFAFRRFQSEIGPK-----TVHFWAPTLKWGLVFAGFSDMKRPVEKISQAQN  54
MPC1-YGL080W  MSQPVQRAAARSFLQKYINKETLKYIFTTTFWGPVSNFGIPIAAIYDLKKDPTLISGPMT  60
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

MPC3-YGR243W  LLLALAIWTRWSFVIKPKNYLLASVNFLLGCTAGYHLTRIANFRIRNGDSFKQVIHYI  114
MPC2-YHR162W  LLLSTALIWTRWSFVIKPRNILLASVNSFLCLTAGYQLRIANYRIRNGDSISQLCSYI  114
MPC1-YGL080W  FALVTYSGVFMKYALSVPKNYLLFGCHLINETAQLAQGYRFLKYTYFTTDEEKALDKE  120
      : * : : : : : : : : : : * * * * : : : : : * : : : * . : :

MPC3-YGR243W  IKGETPAAVAAKQTASTSMNKGVIGTNPPITH  146
MPC2-YHR162W  LSGAD----ESKKEITTGR-----  129
MPC1-YGL080W  WKEKE-----KTGKQ-----  130
      . *

```

Figura 11. Comparación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas Mpc en levadura. Alineamiento múltiple de las secuencias mediante el programa ClustalW2 (EMBL-EBI). Mpc2 y Mpc3 presentan un 78% de identidad de forma global, mientras que las comparaciones de Mpc1 con Mpc2 y Mpc1 con Mpc3 únicamente muestran un 22,5% y un 20% de identidad, respectivamente. Los aminoácidos rojos son los pequeños e hidrofóbicos, incluidos los aromáticos; los magenta son básicos; los azules son ácidos; y los verdes incluyen los hidroxilo, los sulfhidrido, los amina y la glicina.

A continuación, dado que estas proteínas se localizan en la membrana interna (IM) mitocondrial (Huh *et al.*, 2003; Reinders *et al.*, 2006), se llevó a cabo una búsqueda de regiones transmembrana (TM) en la secuencia a través del programa TMPred (Swiss EMBnet), que predice qué regiones son lo suficientemente hidrofóbicas como para encontrarse en el interior de la membrana y genera un modelo con su orientación. La predicción más fuerte, mostrada de forma esquemática en la Figura 12, concluye que las proteínas Mpc en levadura contienen al menos dos dominios TM cada una, con una pequeña región entre ambos, y con los extremos N y C-terminal en el exterior de la IM. Como se esperaba, de

nuevo, Mpc2 y Mpc3 muestran una localización idéntica de estas hélices transmembrana, mientras que en la proteína Mpc1 estos dominios se localizan más cercanos al extremo N-terminal. Este modelo es puramente especulativo. Recientemente, se han realizado nuevos experimentos que demuestran que, tal y como se predice, Mpc1 tiene dos dominios TM separados por un pequeño segmento localizado en el espacio intermembrana, y tiene los extremos N- y C-terminal en la matriz mitocondrial. Mientras que Mpc2 y Mpc3 contienen un tercer dominio transmembrana que lleva a la proyección del extremo C-terminal al espacio intermembrana (Bender *et al.*, 2015).

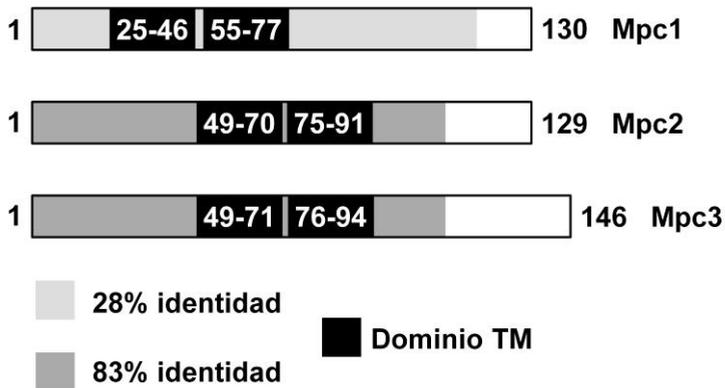


Figura 12. Esquema de la predicción de las regiones transmembrana en levadura de las proteínas Mpc. Predicción de las regiones transmembrana (dominio TM) a partir del programa TMPret en el ch.EMBNet.org. Mpc2 y Mpc3 son idénticas en el 83% de los 106 aminoácidos de la región N-terminal. Mpc1 es un 28% idéntica a Mpc2 o Mpc3 en los 116 aminoácidos del N-terminal. Los dominios TM de Mpc2 y Mpc3 se encuentran en aminoácidos muy similares.

2. Estudio de la expresión de las proteínas Mpc en respuesta a diferentes tipos de estrés

Para obtener más datos sobre la función de las proteínas Mpc, se cuantificó su abundancia en diferentes condiciones ambientales a través del ensayo *Western Blot*. Se llevó a cabo análisis de inmunodetección de estas proteínas, utilizando cepas de levadura con el fondo genético BY4741, con las proteínas Mpc etiquetadas con el epítipo TAP, bajo el control de sus promotores naturales. Previamente, se había descrito que el gen *MPC3* (o *YGR243w*) sufre una fuerte inducción transcripcional ante diversos estreses osmóticos (Viladevall *et al.*, 2004) y que la proteína Sko1 (*Supressor of Kinase Overexpression*), responsable de inducir la expresión génica ante estrés osmótico (Proft *et al.*, 2005), se une a su promotor. Por lo que se planteó estudiar si esta regulación transcripcional se traducía en una acumulación proteica final de Mpc3 y si esto también ocurría en el resto de proteínas Mpc. Para ello, se trató las células en medio rico YPD con 0,4 M NaCl y se extrajo muestras a las 2 horas. Además, dado que Mpc1 y Mpc2 se habían relacionado con la biosíntesis de leucina y valina (Bricker *et al.*, 2012; Herzig *et al.*, 2012), se analizó también qué ocurría con estas proteínas ante un ayuno de aminoácidos en medio mínimo. Por último, se escogieron otras condiciones ambientales en las que la mitocondria podría estar afectada, como ante estrés oxidativo (50 μ M menadiona durante 2 horas) o durante la activación del metabolismo respiratorio (cambio de medio con glucosa a glicerol durante 4 horas).

Como se observa en la Figura 13A, los niveles de Mpc3 se inducen rápidamente ante condiciones de estrés osmótico y durante el cambio de

un medio con glucosa a un medio con azúcares no fermentables, en este caso, glicerol. Mientras que la abundancia de Mpc1 y Mpc2 se mantenía sin cambios ante los mismos tratamientos. En los tratamientos con estrés oxidativo y ante un ayuno de aminoácidos, no se pudo observar ningún cambio en la abundancia de estas proteínas (Figura suplementaria S2).

A continuación, se determinó los niveles basales de las proteínas Mpc en células adaptadas a condiciones normales (YPD), ante estrés osmótico (0,4 M NaCl) y a condiciones de crecimiento respiratorio (YPGlic). Los resultados, descritos en la Figura 13B, mostraron que Mpc2 es la proteína Mpc más abundante en condiciones de crecimiento fermentativo. En cambio, la abundancia relativa de Mpc3 aumentaba en condiciones de crecimiento en presencia de alta salinidad y era la proteína predominante en condiciones que requerían una elevada capacidad respiratoria (glicerol). La abundancia relativa de Mpc1 no variaba en ninguna de las diferentes condiciones de crecimiento estudiadas.

Por tanto, dado que el estrés osmótico y el crecimiento en glicerol provocan una inducción (limitada y total, respectivamente) de la respiración mitocondrial, estos datos muestran la existencia de una correlación entre la abundancia de Mpc3 y la capacidad respiratoria de la célula. Además, ratifican el hecho de que Mpc2 y Mpc3, a pesar del elevado grado de identidad entre sus secuencias, parecen estar implicadas en funciones diferenciadas; ya que estas dos proteínas no parecen inducirse por los mismos estímulos y los niveles de Mpc3 en la célula están fuertemente regulados.

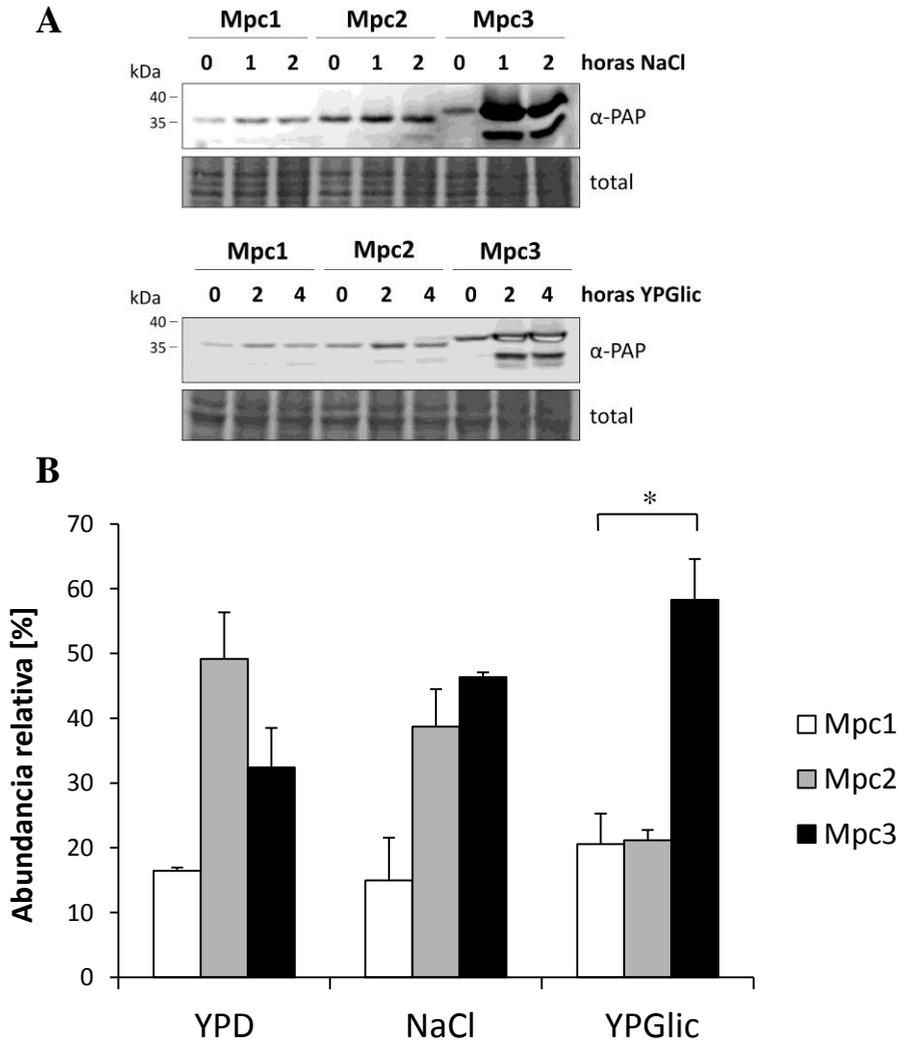


Figura 13. Inmunodetección de las proteínas Mpc1, Mpc2 y Mpc3 en extractos totales de levadura en diferentes condiciones ambientales. (A) La expresión de Mpc3 se induce ante un cambio diaúxico y estrés salino. Las cepas de levadura con las proteínas Mpc etiquetadas con el epítipo TAP en el genoma se analizaron por *Western Blot*. Se sometieron las células a estrés osmótico (0,4 M NaCl 2h) y a un cambio de medio fermentativo a respiratorio (Glicerol 4h). Las proteínas se detectaron con el anticuerpo α -PAP y como control de carga se utilizó la tinción de membrana con DB71. **(B)** La distribución relativa de las proteínas Mpc cambia durante la adaptación a estrés salino o a condiciones de crecimiento no fermentativas. Los niveles de cada proteína Mpc se cuantificaron en crecimiento continuo en medio rico (YPD), en medio salino (0,4 M NaCl) y en medio con glicerol (YPGlic). Los datos de abundancia relativa de cada Mpc se muestran con la media y el error típico de tres experimentos independientes. Los niveles de Mpc3 son significativamente mayores comparados con los de Mpc1 y Mpc2 en medio respiratorio. El asterisco (*) muestra que existe una significación estadística con un p-valor < 0,05, según el test *t de Student*.

3. Regulación transcripcional de los genes *MPC* ante estrés salino y cambio diáuxico

Una vez obtenidos los datos sobre la expresión de las proteínas Mpc, se determinó si la distribución diferencial de estas proteínas podía atribuirse a cambios en la expresión genética en todos los genes *MPC*, tal y como ya se había comprobado previamente para *MPC3* ante estrés osmótico (Viladevall *et al.*, 2014). Para ello, se cuantificó la regulación transcripcional de los tres genes en tratamiento con 0,4 M NaCl durante 10 minutos o ante un cambio de medio fermentativo (YPD) a respiratorio (YPGlicerol) durante 30 minutos. Los ensayos de transcripción reversa se llevaron a cabo en la cepa salvaje (*wild type*, wt) con el fondo genético BY4741 y en el mutante $\Delta hog1$, y los niveles de expresión génica se cuantificaron mediante RT-PCR. El gen *HOG1* (*High Osmolarity Glycerol response*) codifica para una MAPK implicada en la cascada de trasducción de señal ante estrés osmótico y regula a factores de transcripción, como Sko1, que parecía actuar sobre Mpc3.

Los resultados mostrados en la Figura 14 manifestaban que los niveles de mRNA de *MPC3* aumentan de forma significativa tanto tras el tratamiento con estrés salino como tras el cambio a medio respiratorio. En cambio, *MPC1* y *MPC2* mantienen sus niveles de expresión constantes independientemente de las condiciones de estrés. Estos datos mostraron que los cambios en la expresión genética de los diferentes genes *MPC* coinciden con los cambios en la abundancia de las proteínas Mpc en estas condiciones.

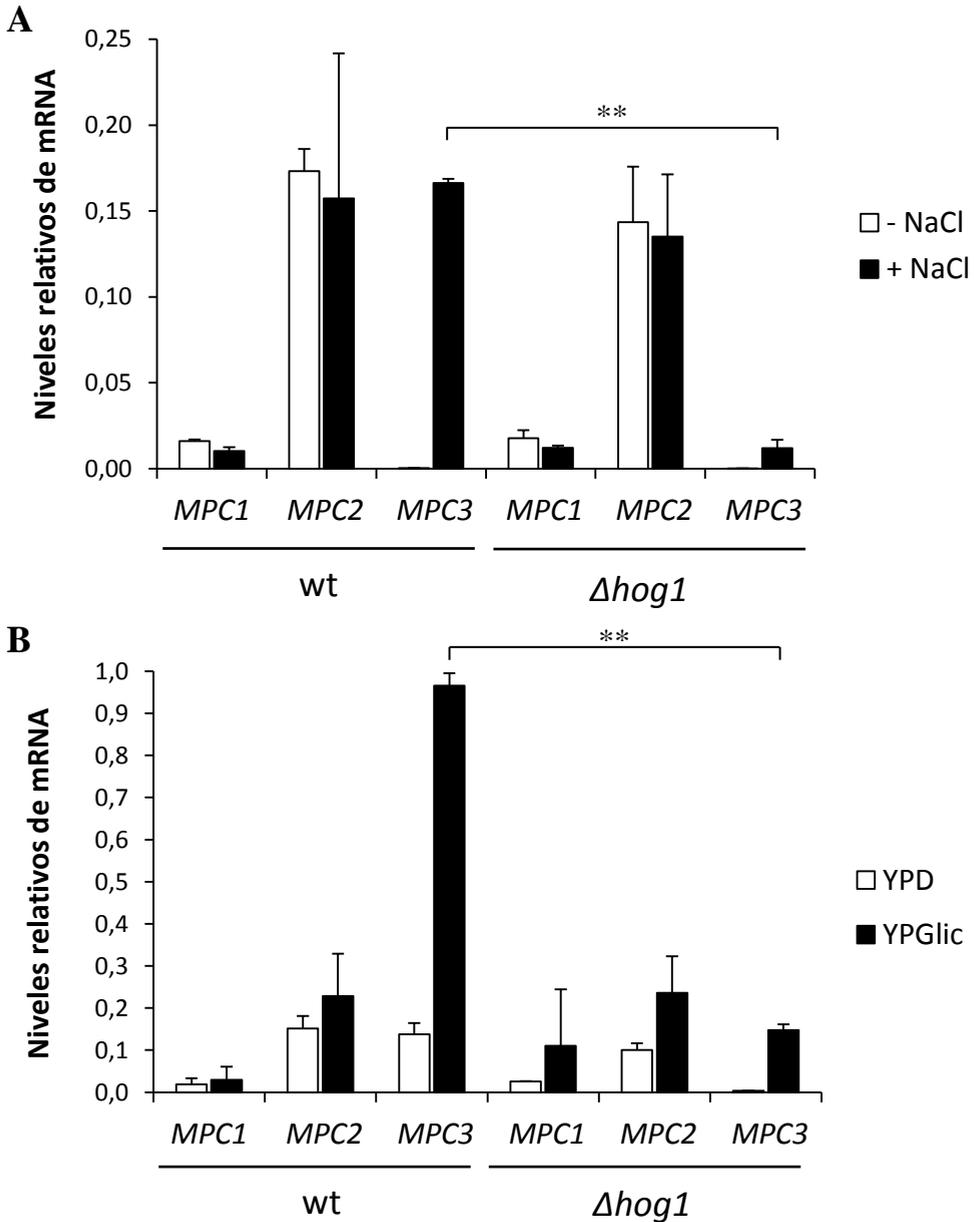


Figura 14. Niveles relativos de mRNA de los genes MPC en respuesta a estrés salino y cambio diáuxico. La cepa silvestre (wt) de levadura y el mutante $\Delta hog1$ se trataron con (A) 0,4 M NaCl 10 minutos o (B) se cambió el medio de fermentativo a respiratorio 30 minutos. Los niveles de expresión se calcularon mediante RT-PCR y se normalizaron frente a los niveles de expresión del gen *ACT1*. Los datos mostrados son la media y el error típico de dos experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con el test *t de Student* y el asterisco (**) indica que existe una significación estadística con un valor $p < 0,01$ con respecto al valor de la cepa silvestre.

Por tanto, se pudo concluir que un control transcripcional estricto del gen *MPC3* contribuye a la expresión diferencial de las proteínas Mpc en condiciones normales, ante estrés osmótico y en condiciones de crecimiento respiratorio de levadura. Además, los niveles de mRNA de *MPC3* eran significativamente menores en la cepa mutante *Δhog1* respecto a la cepa salvaje tras el tratamiento salino ($p = 0,0001$) y tras el cambio a crecimiento respiratorio ($p = 0,0003$). Los niveles de *MPC1* y *MPC2*, de nuevo, no parecían afectados en ninguna de las condiciones. Esto parece significar que la ruta HOG es necesaria en la inducción transcripcional de *MPC3* tanto ante estrés salino como durante un cambio diáuxico.

4. Estudio fenotípico de los mutantes *Δmpc*

En los resultados anteriores se ha observado que la distribución relativa de las proteínas Mpc cambia con la activación del metabolismo respiratorio y en respuesta a estrés osmótico. Además, ya se había descrito que Mpc1 y Mpc2 estaban involucradas en la biosíntesis de aminoácidos ramificados (Leu y Val) en el interior de la mitocondria (Bricker *et al.*, 2012; Herzig *et al.*, 2012). Por ello, se decidió investigar la contribución de las diferentes proteínas Mpc a la biosíntesis de aminoácidos y al crecimiento respiratorio.

El estudio se llevó a cabo mediante los mutantes para los genes *MPC*, *Δmpc1*, *Δmpc2* y *Δmpc3*, y se utilizó la cepa silvestre BY4741 como control. Se realizaron ensayos de cinética de crecimiento para comprobar si estos genes eran factores determinantes y/o limitantes del crecimiento en diferentes condiciones ambientales. El análisis se realizó en medio mínimo

SD, para poder observar mejor los cambios en la cinética de las cepas, y se monitorizó el crecimiento entre 24 y 72 horas. En primer lugar, se analizó la cinética de crecimiento de los mutantes de delección para los genes *MPC* de forma individual en medio sin valina. Como control se utilizó el medio con todos los aminoácidos (Leu, Val, His, Met y Ura), donde los mutantes, tal y como se observa en la Figura 15A, no mostraban ninguna diferencia de crecimiento con respecto a la cepa silvestre. A pesar de que Otero y colaboradores describían un aumento del 15% de la biomasa ante la delección del gen *MPC3* (Otero *et al.*, 2010), en nuestro caso no se pudo observar dicho aumento de crecimiento con respecto a nuestra cepa silvestre.

Como previamente ya se había descrito en un medio sin leucina por Bricker y colaboradores, en este ensayo se comprobó que, en ausencia de valina, los mutantes $\Delta mpc1$ y $\Delta mpc2$ mostraron un retraso en el crecimiento (Figura 15B). Sin embargo, la pérdida de *MPC3* no provocaba ningún cambio en el fenotipo en estas condiciones. Tomando como punto de partido lo obtenido en los apartados anteriores, donde ante un estrés salino se inducía drásticamente la expresión del gen *MPC3*, se repitió el mismo ensayo en medio sin valina en presencia de NaCl (0,4 M), para determinar si el aumento en la abundancia de la proteína Mpc3 provocado por el estrés salino podía compensar bien la falta de Mpc1 o la de Mpc2. Sin embargo, en condiciones de estrés osmótico, no se mejoraba el crecimiento de los mutantes $\Delta mpc1$ y $\Delta mpc2$ en ausencia de valina (Figura 15C). Por lo que Mpc3 no parecía complementar la función de ninguna de estas dos proteínas. Esto parece indicar que el papel fisiológico de Mpc3 es diferente

al de Mpc2, a pesar de su elevada similitud de secuencia, y no está ligado a la biosíntesis de aminoácidos.

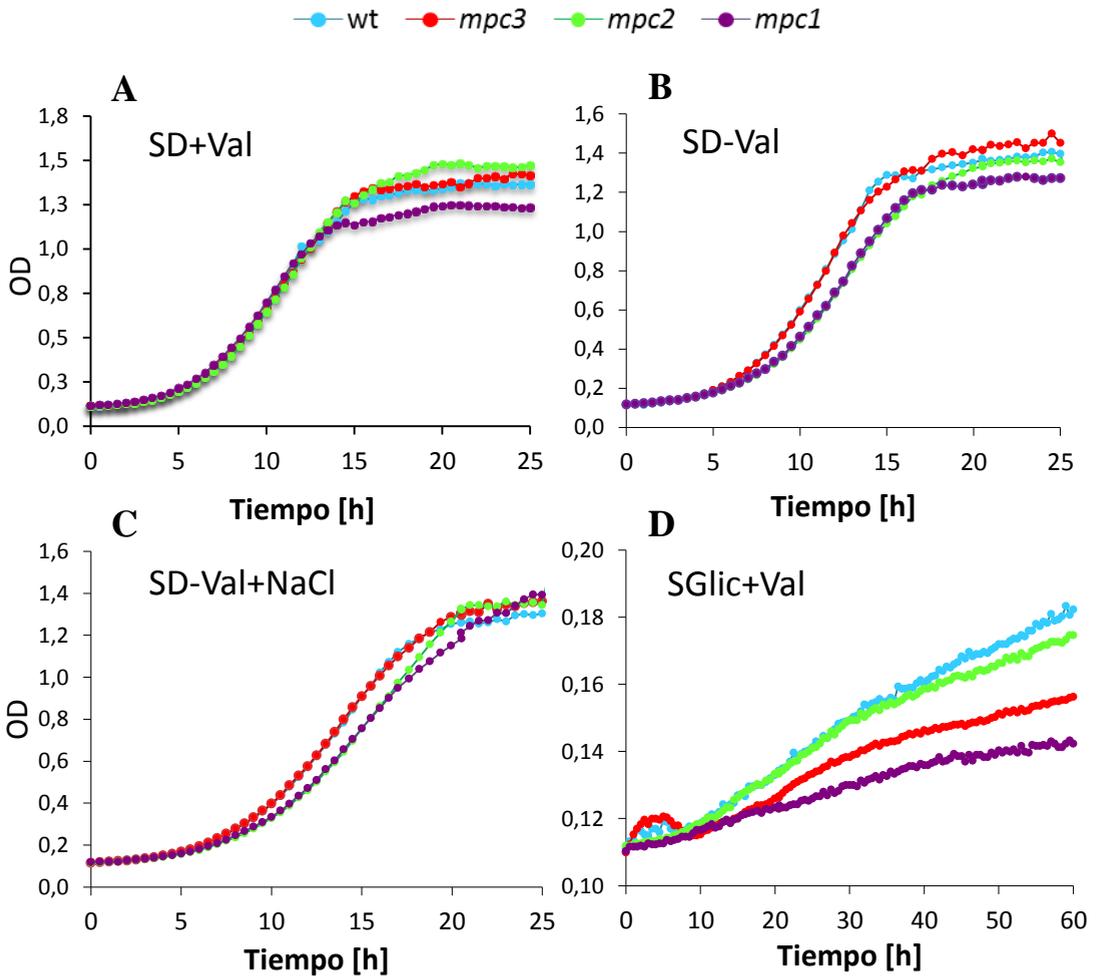


Figura 15. Ensayos de crecimiento en medio líquido de la cepa silvestre y de los mutantes Δmpc en diferentes condiciones. El crecimiento se monitorizó en medio mínimo SD durante 25 horas con (A) o sin valina (B), sin valina en presencia de 0,4 M NaCl (C) y en medio SGlicero con valina durante 60 horas (D). Los datos presentados son los valores medios de tres replicas biológicas para cada cepa, con el procesado de datos explicado en el apartado de Materiales y Métodos. La desviación estándar es 2-5% para (A), 2-4% para (B) y (C), y 0,5-1% para (D).

Por último, se estudió el papel de las tres proteínas Mpc en el crecimiento ante una fuente de carbono no fermentable (glicerol), ya que Mpc3 parecía inducirse en estas condiciones. En este caso, en los resultados se detectó una menor eficiencia en el crecimiento de los mutantes $\Delta mpc1$ y $\Delta mpc3$ (Figura 15D), mientras que el mutante $\Delta mpc2$ mostraba un crecimiento similar a la cepa silvestre. Estos datos sugieren que la función de Mpc2 no es necesaria para el crecimiento en condiciones respiratorias.

Sin embargo, el crecimiento en medio SGlicerol líquido era muy lento en las microplacas del sistema Bioscreen (utilizado para medir el crecimiento de forma continua), seguramente debido a las limitaciones de oxígeno del aparato. Por tanto, se decidió repetir el ensayo en medio sólido en placas de agar en condiciones fermentativas (glucosa) y respiratorias (lactato y glicerol). En este caso, también se añadió al ensayo la cepa triple mutante $\Delta mpc1,2,3$. Los datos confirmaron de nuevo que hay una evidente reducción de la tasa de crecimiento de la cepa mutante $\Delta mpc3$ y del triple mutante, en presencia de fuentes de carbono no fermentables, tanto en lactato como en glicerol (Figura 16). La ausencia de Mpc1 también afectaba al crecimiento respiratorio, aunque de una forma menos severa; mientras que la ausencia de Mpc2 no tenía ningún efecto en el crecimiento de levadura. Por lo que se confirma que las proteínas Mpc contribuyen de forma diferencial al crecimiento en diferentes condiciones. De esta forma, la función de Mpc2 parece importante en la biosíntesis de aminoácidos en condiciones fermentativas, mientras que la inducción de *MPC3* está muy regulada y es necesaria en condiciones respiratorias.

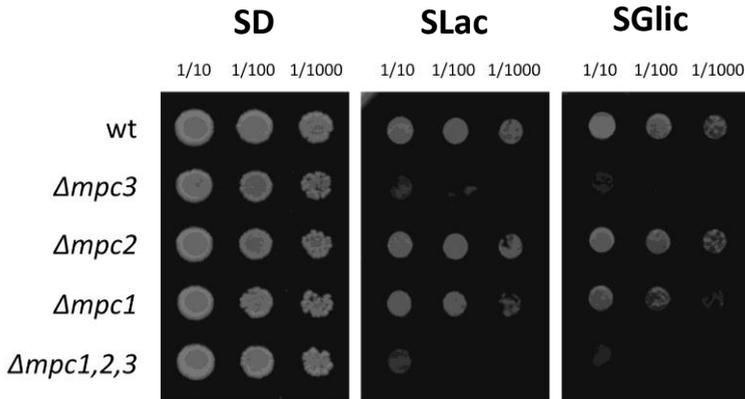


Figura 16. Ensayos de crecimiento de los mutantes Δmpc y de la cepa silvestre (wt) en condiciones fermentativas con glucosa (SD) y de crecimiento respiratorio en lactato y glicerol (SLac y SGlic, respectivamente). El ensayo se realizó en medio mínimo con todos los aminoácidos necesarios para la cepa BY4741 (Leu, Ura, His, Met) para comparar los fenotipos de crecimiento de las diferentes cepas. Se tomaron imágenes de dos experimentos independientes a las 48-72 horas de incubación a 28° C.

5. Análisis fenotípico de las cepas de sobreexpresión de los genes *MPC*

El análisis de los mutantes de delección de los genes *MPC* aportó ciertos datos sobre la función de éstos, por lo que se decidió abordar el procedimiento contrario y estudiar las cepas de sobreexpresión de estos genes. La construcción de los plásmidos se realizó mediante el sistema Gateway® y se utilizó el plásmido pAG423 (*HIS3*, AmpR) de la colección, con promotor constitutivo GPD y con un epítipo DsRed para su fusión C-terminal con el gen de interés introducido en el plásmido. El plásmido final (pAG423GPD-*MPC*-DsRed) se transformó en cepas de levadura BY4741 y, como control, se utilizó una cepa con el plásmido vacío, para descartar el efecto del plásmido por sí mismo en el crecimiento de las cepas.

En primer lugar, se quiso confirmar que la sobreexpresión de los genes *MPC* se producía de forma específica en la mitocondria. Para ello, se co-transformó las cepas de sobreexpresión con el plásmido pVT100-mtGFP, que contiene una fusión de la proteína fluorescente GFP con un péptido de localización mitocondrial, mtPreSu9. De esta forma, se analizaron las cepas en medio mínimo co-transformadas con ambos plásmidos y mediante microscopía confocal se pudo comprobar que las tres proteínas Mpc fusionadas a DsRed co-localizaban con la mitocondria marcada con GFP (Figura 17).

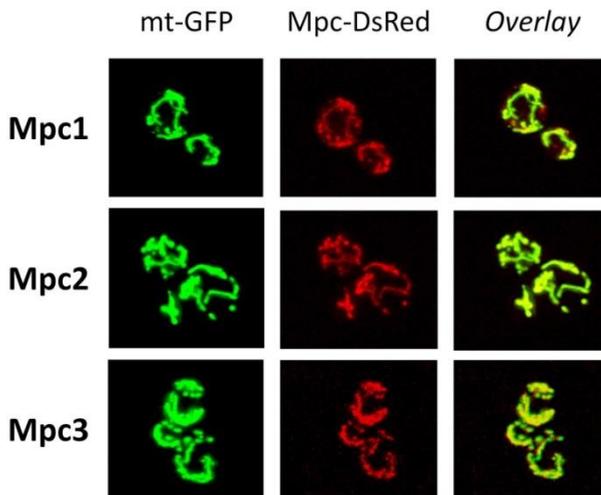


Figura 17. Localización de las proteínas Mpc fusionadas a DsRed en las cepas de levadura de sobreexpresión. Las tres fusiones Mpc-DsRed se localizan exclusivamente en la mitocondria. Las células de levadura BY4741 se co-transformaron con las construcciones de sobreexpresión de Mpc-DsRed y con el plásmido pVT100U-mtGFP. Se muestran las imágenes representativas de lo obtenido para GFP (mitocondria), DsRed (*MPC*) y la superposición (*Overlay*) de las dos capas mediante microscopía confocal. La representación constituye una superposición de todos los planos de la célula de levadura. Los cultivos se crecieron en medio mínimo con glucosa (SD-His-Ura) durante toda la noche a 28° C.

En segundo lugar, se analizó en estas cepas de sobreexpresión la eficiencia de crecimiento en presencia de diferentes fuentes de carbono

(glucosa y glicerol) en medio mínimo sólido (Figura 18). El primer dato evidente fue que la ganancia de función de Mpc2 y, en menor medida, de Mpc1 provocaba directamente una inhibición del crecimiento en un medio con glucosa como fuente de carbono. Y, de un modo más drástico, las cepas de sobreexpresión de Mpc1 y Mpc2 eran incapaces de crecer en medios no fermentativos. La sobreexpresión de Mpc3 no provocaba ningún cambio evidente en la eficiencia de crecimiento respecto a la cepa control.

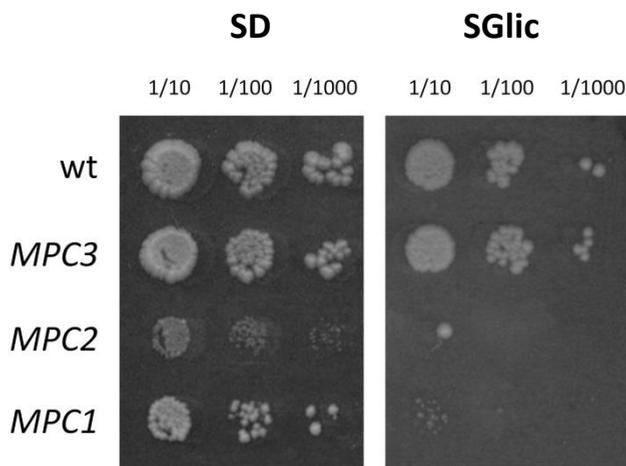


Figura 18. Efecto de la sobreexpresión de los genes MPC en el crecimiento respiratorio. La ganancia de función de Mpc1 y Mpc2 inhibe el crecimiento en condiciones respiratorias. El crecimiento de las cepas de sobreexpresión se realizó en medio mínimo con glucosa (SD) o con glicerol (SGlic) en ausencia de histidina (para seleccionar el plásmido), y se comparó con la cepa transformada con el vector vacío (wt). Los ensayos de crecimiento se realizaron por triplicado, creciendo los cultivos hasta la saturación y haciendo tres diluciones seriadas de cada uno de ellos. Se tomaron imágenes a las 24-48 horas de incubación a 28° C en el caso del medio SD, y a las 72-96 horas en el medio SGlic.

Por último, se monitorizó el crecimiento de las cepas de sobreexpresión de MPC en medio mínimo líquido, durante 72 horas, con glucosa y ante estrés oxidativo, bien en presencia de 2 mM de H₂O₂ o bien de 75 μM de menadiona.

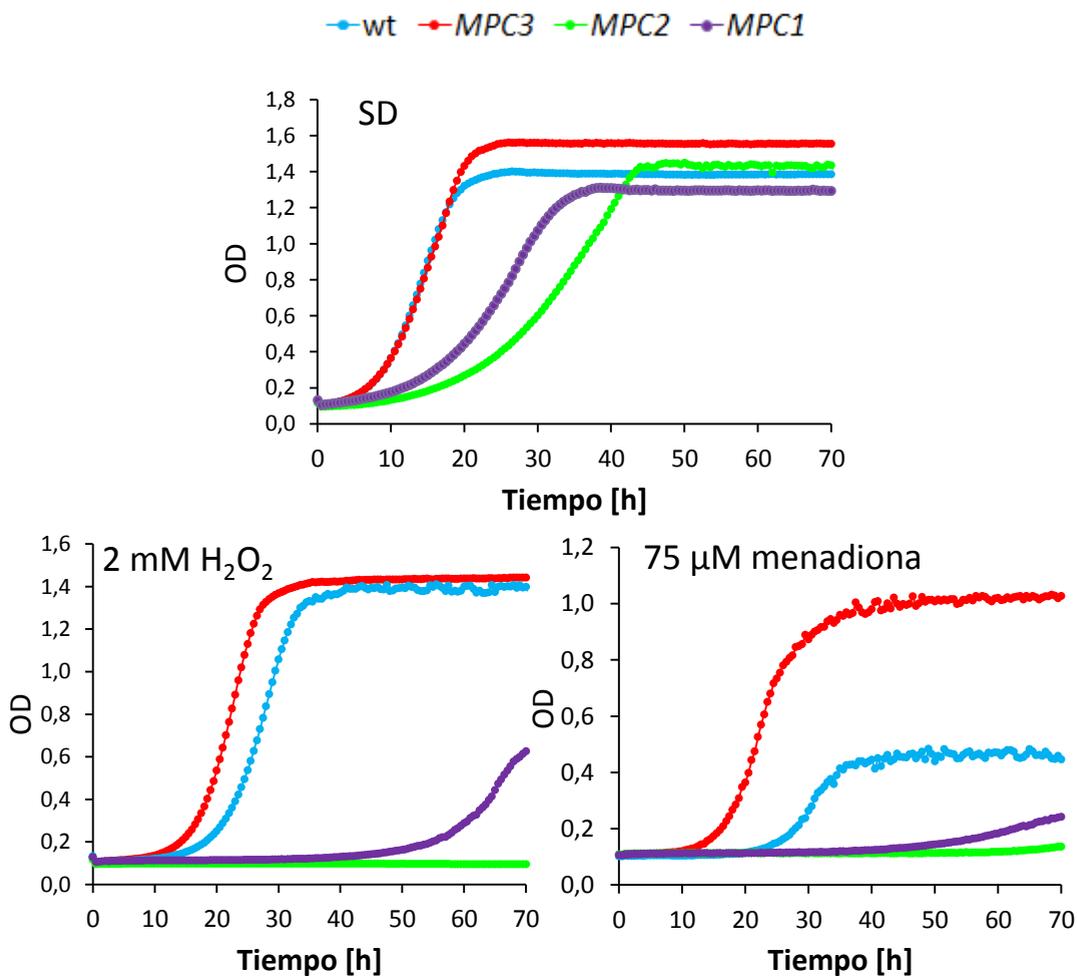


Figura 19. Efecto de la sobreexpresión de los genes *MPC* en la tolerancia a estrés oxidativo. Ensayos de crecimiento en medio mínimo (SD) con los aminoácidos necesarios (Met, Leu, Ura) y en presencia de 2 mM H₂O₂ o de 75 μM menadiona. El crecimiento se monitorizó en medio líquido durante 72 horas. Los datos presentados son la media de los valores procesados de tres réplicas biológicas. La desviación estándar es de 1-3% en SD, 1-2% en peróxido de hidrógeno y 2-10% en crecimiento con menadiona.

De nuevo, como se observa en la Figura 19, las cepas de sobreexpresión de *Mpc1* y de *Mpc2* mostraban una gran sensibilidad al crecimiento en estrés oxidativo, ya fuera causado por peróxido de hidrógeno o por lipooxidación mediante menadiona. De hecho, la ganancia de función de *Mpc2* paralizaba prácticamente por completo el crecimiento

ante dichos agentes oxidantes. En cambio, llamaba la atención que la ganancia de función de Mpc3 provocaba que la levadura fuese más tolerante al estrés oxidativo, incluso que la cepa silvestre. De esta forma, los datos indican que un aumento en las cantidades de Mpc2 y de Mpc3 afecta al crecimiento respiratorio y a la resistencia a estrés oxidativo, de forma antagonista.

6. Análisis del efecto de la pérdida y ganancia de función de los genes *MPC* en la tasa respiratoria

Las células de levadura son organismos aerobios facultativos que en determinadas condiciones son capaces de utilizar el oxígeno y obtener mayor rendimiento energético que durante la fermentación. Dado que el crecimiento en condiciones respiratorias parecía asociado a algunas de las proteínas Mpc, se decidió analizar directamente el efecto que tenía la pérdida o ganancia de función de estas proteínas en la tasa respiratoria. Para ello, se cuantificó el consumo de oxígeno de las cepas mutantes de delección y sobreexpresión de los genes *MPC*, utilizando células intactas.

En los mutantes de sobreexpresión (Figura 20A) se observó que la ganancia de función de Mpc1 y Mpc2 causaba un descenso importante en el consumo de oxígeno en las células intactas de levadura ($p = 0,008$ en ambos). Este resultado se correlaciona con el fenotipo observado anteriormente, donde estas cepas presentaban dificultades para crecer en condiciones respiratorias (Figura 18).

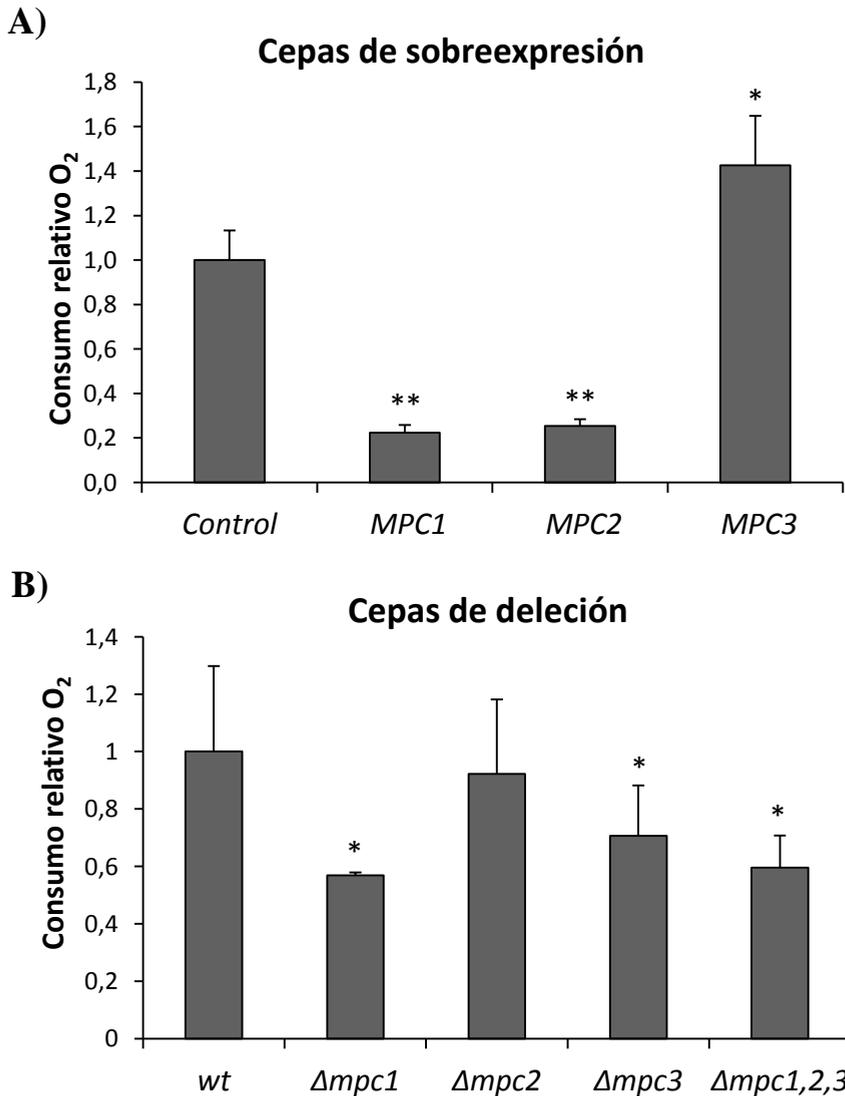


Figura 20. Efecto de la ganancia y pérdida de función de las proteínas Mpc en la tasa de consumo de oxígeno en levadura. El consumo de oxígeno se midió en células intactas de levadura en las cepas de sobreexpresión (A) y de delección (B), en un electrodo de oxígeno. Las células se crecieron en medio mínimo SD y se cambiaron a un crecimiento con glicerol como fuente de carbono durante 18 horas. La cepa control en el gráfico A es la cepa silvestre con el vector de sobreexpresión vacío y, en el gráfico B, es la cepa silvestre sin transformar. Los datos mostrados son la media y el error típico de al menos dos medidas independientes de tres réplicas biológicas. El valor para las cepas control se estableció arbitrariamente como 1. El tratamiento estadístico de datos se realizó por medio de la prueba ANOVA, comparando el consumo de oxígeno de todas las cepas, donde el asterisco (*) significa un p-valor < 0,05 y el doble asterisco (**) significa un p-valor < 0,01.

Además, la sobreexpresión de la proteína Mpc3 aumentaba la tasa respiratoria ($p = 0,048$), coincidiendo, de nuevo, con la fuerte inducción de este gen durante un cambio diáuxico y el fenotipo de resistencia a estrés oxidativo obtenido en ensayos previos.

El consumo de oxígeno también se cuantificó en las cepas de delección de los genes *MPC* individuales y en el triple mutante. Los datos de la Figura 20B indicaban que la ausencia de *MPC1* o *MPC3* disminuía la tasa respiratoria en levadura ($p = 0,034$ y $p = 0,041$, respectivamente), lo que a su vez se traducía en una menor eficiencia de crecimiento en condiciones respiratorias de ambos mutantes. De hecho, los datos de consumo de oxígeno obtenidos en estas dos cepas de delección eran comparables a los obtenidos para la cepa triple mutante. En cambio, no se percibió ninguna reducción significativa de la tasa respiratoria para el mutante $\Delta mpc2$ con respecto a la cepa silvestre. Tomando en conjunto todos estos datos, se podría destacar una función positiva de la proteína Mpc3 en la estimulación de la respiración.

7. Cuantificación de los niveles de oxidación intracelular

Como se ha visto, la sobreexpresión de las proteínas Mpc tiene efectos en la tasa respiratoria en levadura. La respiración aeróbica tiene como consecuencia la generación de ROS, que son formas parcialmente reducidas del oxígeno muy nocivas para la célula por su reactividad y su gran poder oxidante. Entre ellas, se incluyen el superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^\cdot). Dada la asociación de las proteínas Mpc con la respiración, se quiso estudiar si también influían en el

balance de ROS. Para ello, se cuantificó los niveles de oxidación intracelular en condiciones normales y tras un tratamiento con estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno y menadiona, en las cepas de sobreexpresión y de delección de los genes *MPC*.

Como se muestra en la Figura 21, la ganancia de función de *Mpc1* y *Mpc2* producía un aumento significativo en los niveles basales de ROS intracelular respecto a la cepa silvestre ($p = 0,034$ y $p = 0,04$ en la prueba ANOVA, respectivamente en H_2O_2 y menadiona). Tras el estrés oxidativo, tanto en el caso del peróxido de hidrógeno como en el caso de la menadiona, los niveles de ROS también se incrementaban de forma significativa en estas cepas de sobreexpresión ($p = 0,02$ y $p = 0,023$, respectivamente en los gráficos A y B). En cambio, la cepa de sobreexpresión de *MPC3* mostraba unos niveles de ROS similares a los de la cepa silvestre en ambas condiciones y ante ambos estreses (menadiona y H_2O_2). Comparando con los resultados anteriores, parece que la sobreexpresión de *Mpc1* y *Mpc2* produce una reducción en la tasa respiratoria de la célula y un incremento significativo en la producción de ROS.

La delección de los genes individuales *MPC*, en cambio, no parecía afectar de un modo significativo a la producción de ROS de las cepas, ni en condiciones normales ni tras el tratamiento con estrés osmótico (1 M NaCl) u oxidativo (2 mM H_2O_2) (Figura suplementaria S3). A pesar de que los niveles de ROS sí que aumentan significativamente en todos los casos tras la aplicación de dichos tratamientos.

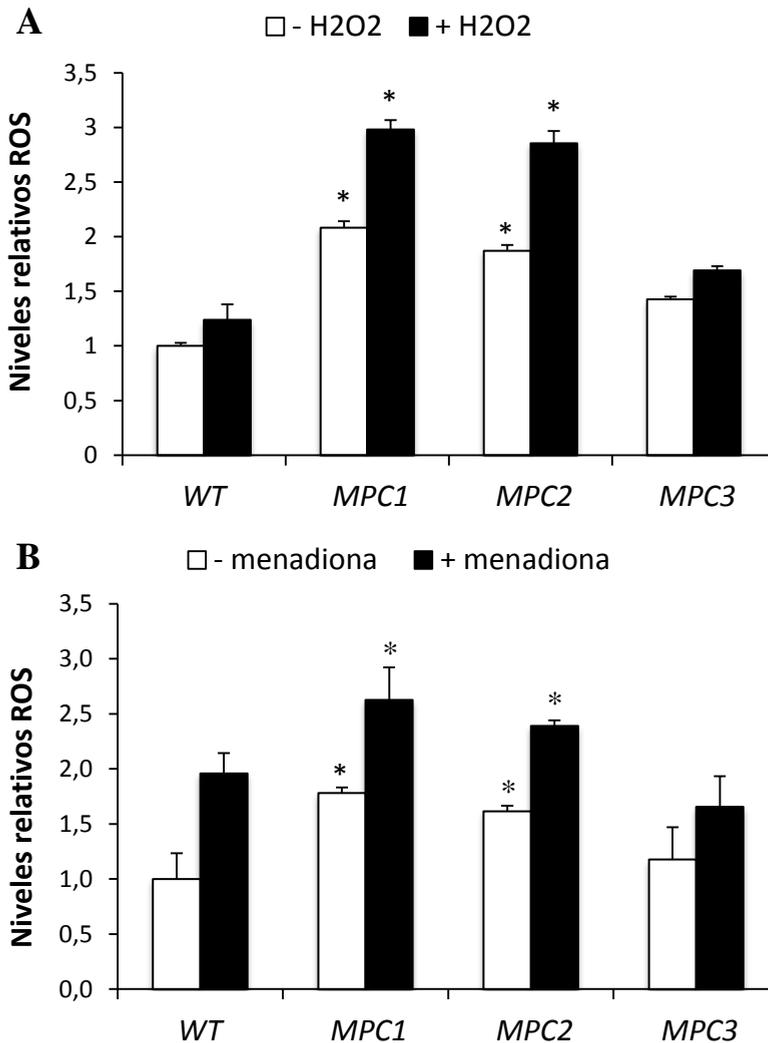


Figura 21. Efecto de la ganancia de función de Mpc en la acumulación de ROS intracelular. Las cepas de sobreexpresión de Mpc se crecieron en medio mínimo SD y se sometieron a un breve estrés oxidativo (30 min) mediante **(A)** peróxido de hidrógeno (2 mM) o **(B)** menadiona (75 μ M). Los niveles de ROS se midieron mediante la oxidación de la diclorodihidrofluoresceína, tal y como se describe en el Apartado 7 de Materiales y Métodos. La fluorescencia de la cepa silvestre en condiciones normales arbitrariamente se estableció con el valor 1. Los niveles de ROS se determinaron por duplicado en tres cultivos independientes. Los datos presentados son la media y el error típico y la estadística se realizó mediante la prueba ANOVA, donde el asterisco (*) muestra un p-valor < 0,05, con respecto al valor basal de la cepa silvestre.

Como el balance de ROS está íntimamente ligado a la longevidad cronológica y replicativa de la célula de levadura (Unlu and Koc, 2007), se analizó la capacidad de supervivencia en fase estacionaria de las cepas mutantes Δmpc , para ver si se veía algún efecto no detectado durante la cuantificación de ROS intracelular. De esta manera, se comprobó que el mutante $\Delta mpc3$ perdía viabilidad a los 48 días, mucho antes que los mutantes $\Delta mpc1$ y $\Delta mpc2$ y la cepa silvestre, tal y como se observa en la Figura 22. No se puede relacionar directamente estos resultados con el nivel de oxidación intracelular, pero el mutante $\Delta mpc3$ no alcanza la longevidad cronológica de otras cepas, por lo que debe presentar algún daño intracelular. Del mismo modo, el triple mutante $\Delta mpc1,2,3$ perdía viabilidad, aunque de forma más lenta que la cepa $\Delta mpc3$.

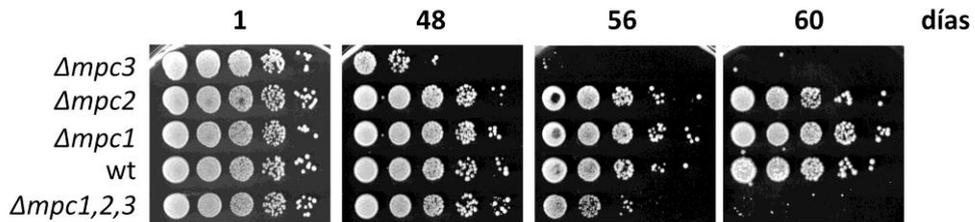


Figura 22. Supervivencia en fase estacionaria de los mutantes Δmpc y de la cepa silvestre. Los ensayos de crecimiento en medio sólido se realizaron a partir de precultivos crecidos durante el tiempo indicado en medio rico YPD, en rotación a 28° C durante el tiempo indicado en días. Las imágenes se tomaron a las 24-48 horas de crecimiento.

8. Caracterización de las interacciones de Mpc3 con otras proteínas de la familia MPC

En estudios anteriores (Bricker *et al.*, 2012; Herzig *et al.*, 2012), se había comprobado, a través de ensayos de co-purificación de proteínas, que

Mpc1 y Mpc2 interactúan entre sí, formando un complejo multimérico en la membrana mitocondrial interna, en el que Mpc2 es la subunidad estructural principal. Mpc2 es capaz de interactuar con Mpc1 y consigo misma, formando homodímeros en el mutante $\Delta mpc1$; mientras que no se ha detectado ningún homodímero de Mpc1. En nuestro caso, el interés se centró en la proteína Mpc3, por su papel de componente inducible del transportador de piruvato mitocondrial en ciertas condiciones. Por lo que se quiso caracterizar sus interacciones con el resto de proteínas Mpc.

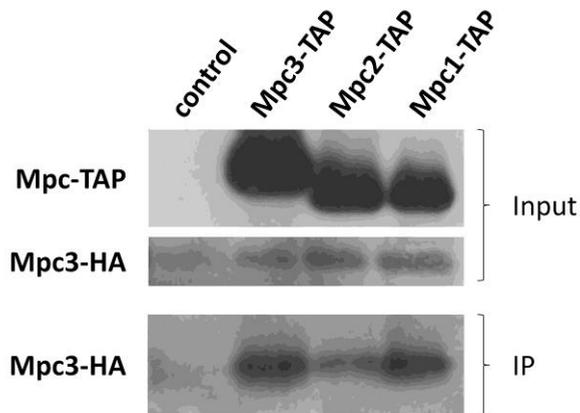


Figura 23. Co-inmunoprecipitación de la proteína Mpc3-HA con la familia de proteínas Mpc marcadas con el epítipo TAP en el genoma. Mpc3 interactúa preferentemente con las subunidades Mpc1 y Mpc3. Los experimentos de co-precipitación se realizaron a partir de extractos mitocondriales de células de levadura que expresaban la construcción Mpc3-HA en presencia de la proteína Mpc-TAP indicada. Como control se utilizó la cepa silvestre expresando Mpc3-HA. Se muestra las membranas del *Western Blot* para las proteínas Mpc-TAP (detectadas con el anticuerpo α -PAP) y Mpc3-HA (α -HA) en la muestra inicial (*Input*). La IP se llevó a cabo precipitando las proteínas Mpc-TAP con las bolas magnéticas *Dynabeads® Pan Mouse IgG*, seguida por una inmunodetección con el anticuerpo α -HA de la proteína Mpc3-HA en las muestras por *Western Blot*; para ver en con qué proteínas Mpc interactuaba.

Para ello, se utilizaron cepas de levadura que tenían marcados de forma individual los genes *MPC* con el epítipo TAP en el genoma y transformadas con un plásmido que expresaba la construcción Mpc3-HA con

un promotor inducible por galactosa. Se llevaron a cabo estudios de co-purificación de proteínas a partir de extractos mitocondriales de células crecidas en galactosa, y como cepa control se utilizó la cepa silvestre en ausencia de la proteína Mpc-TAP, transformada con el plásmido Mpc3-HA. En la Figura 23 se muestra que Mpc3-HA principalmente interaccionaba con Mpc1-TAP y Mpc3-TAP, y de forma menos eficiente con Mpc2-TAP. Por lo que estos datos sugieren que Mpc3, en condiciones de inducción parcial de la respiración, puede interaccionar preferiblemente consigo misma y con Mpc1; de una forma similar al comportamiento de Mpc2 en condiciones normales.

9. Relación funcional entre las proteínas Mpc y el transportador de carnitina mitocondrial

Uno de los resultados obtenidos que llamaba más la atención es que, ante la ausencia de una fuente de carbono fermentable, los mutantes $\Delta mpc1$ y $\Delta mpc3$ mostraban una disminución tanto de la tasa respiratoria como del crecimiento, pero no dejaban por completo de realizar estas actividades. Esto sugería que en la célula existían formas alternativas de introducir o bien piruvato o bien acetil-CoA en la mitocondria ante una ausencia de la actividad del transportador de piruvato mitocondrial. En levadura, el importe de piruvato y la actividad piruvato deshidrogenasa se pueden evitar mediante una vía secundaria a través de un transportador tipo lanzadera de carnitina situado en la membrana mitocondrial interna (Boubekour *et al.*, 1999).

En levadura, el transportador de carnitina mitocondrial está codificado por el gen *CRC1* (*CaRnitine Carrier*) y es responsable del transporte de acetil-CoA dependiente de carnitina a la matriz mitocondrial. Este acetil-CoA puede provenir bien de la degradación oxidativa del piruvato citosólico o bien de la β -oxidación de los ácidos grasos en los peroxisomas. De esta forma, a pesar de la ausencia del transporte de piruvato, como muestra la Figura 24, a partir de este acetil-CoA la célula puede activar el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la posterior fosforilación oxidativa para generar energía mediante respiración aeróbica.

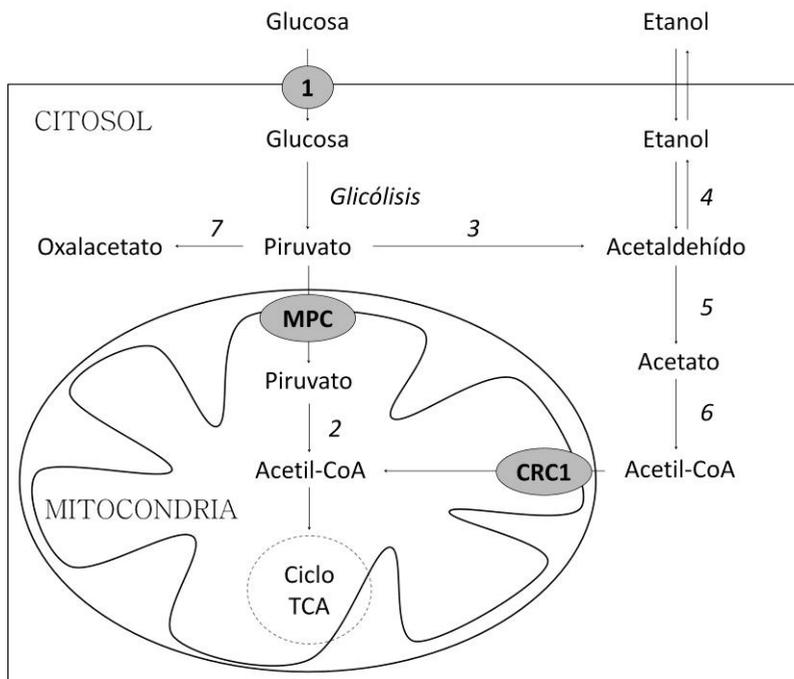


Figura 24. Esquema de las reacciones enzimáticas en *S. cerevisiae* para la entrada de piruvato en la mitocondria y vías alternativas. Las reacciones enzimáticas numeradas corresponden a (1) transportador de glucosa, (2) piruvato deshidrogenasa, (3) piruvato descarboxilasa, (4) alcohol deshidrogenasa citosólica, (5) acetil-CoA sintetasa, (6) acetil-CoA sintetasa, (7) piruvato carboxilasa. Ciclo TCA: ciclo de los ácidos tricarboxílicos; MPC: mitochondrial pyruvate carrier. CRC1: CaRnitine Carrier.

Resultados

Para estudiar la relación entre el transportador de piruvato mitocondrial y el transportador de carnitina, se generó cepas que combinaban la ausencia del gen *CRC1* con la delección de uno de los genes *MPC*. En primer lugar, se analizó el crecimiento de estas cepas en medio sintético con glucosa y con glicerol, comparándolo con el de los mutantes simples de los genes *MPC*. En este caso, se suplementó los medios con valina y leucina para excluir efectos en el crecimiento debidos a la ausencia de estos aminoácidos.

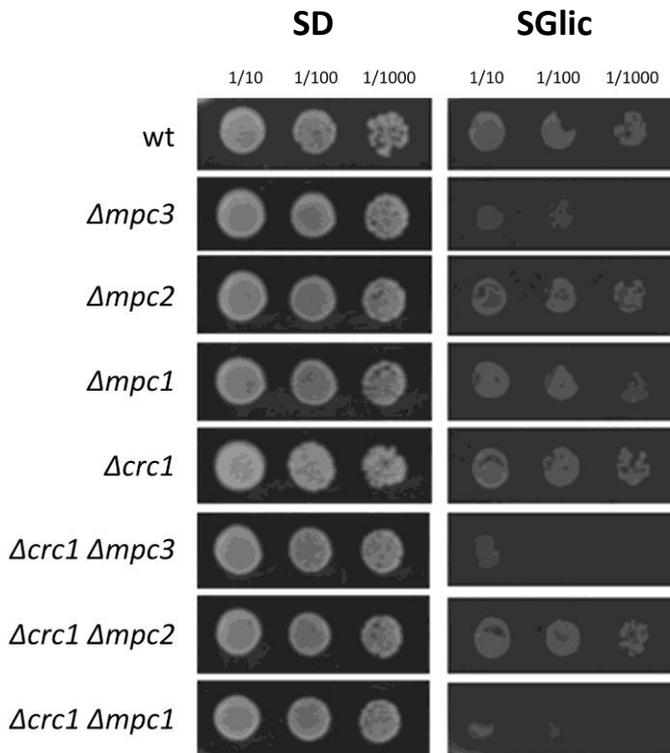


Figura 25. Ensayo de crecimiento de los mutantes Δmpc y $\Delta crc1$, y sus respectivos dobles mutantes. Crecimiento de las cepas mutantes indicadas en medio sólido sintético con glucosa (SD) o glicerol (SGlic) como fuente de carbono. Las placas se suplementaron con valina y leucina para excluir efectos en el crecimiento relacionados con la biosíntesis de aminoácidos mitocondriales. La función de *CRC1* junto con la de *MPC3* y *MPC1* es necesaria en el crecimiento respiratorio.

En la Figura 25, se muestra de nuevo como hay una reducción en el crecimiento de las cepas $\Delta mpc1$ y $\Delta mpc3$ en medio en ausencia de azúcares fermentables (como ya se había comentado), que se ve incrementada ante la ausencia adicional de *CRC1*. De hecho, los dobles mutantes $\Delta mpc1\Delta crc1$ y $\Delta mpc3\Delta crc1$ son prácticamente incapaces de crecer en condiciones en las que es necesaria la respiración. Por lo que parece indicar que la proteína Crc1 junto con Mpc1 y Mpc3 son las responsables de mantener la elevada capacidad respiratoria en levadura.

En segundo lugar, la expresión del gen *CRC1* se estudió en condiciones de estrés osmótico y ante cambio diáuxico, para saber si la actividad de este gen estaba sometida a una regulación positiva en dichas condiciones. Se llevó a cabo ensayos de retrotranscripción, utilizando de nuevo la cepa silvestre BY4741 y el mutante $\Delta hog1$, tras un tratamiento de 20 minutos con 0,4 M NaCl y tras el cambio de un medio fermentativo a un medio con glicerol durante 30 minutos. Los niveles de expresión génica se cuantificaron por RT-PCR, tal y como se había realizado anteriormente.

Los resultados mostraron que *CRC1* presentaba un patrón de expresión similar a *MPC3*, ya que también sufría una fuerte inducción en condiciones de crecimiento respiratorio y ante estrés osmótico con respecto a la cepa silvestre (Figura 26). Además, estos niveles de mRNA de *CRC1* disminuían de forma significativa en el mutante $\Delta hog1$ en presencia de NaCl ($p = 0,003$) y ante un cambio diáuxico ($p = 0,048$). Por lo que de nuevo, la expresión de *CRC1*, como ocurría con el gen *MPC3*, estaba regulada por la MAPK Hog1.

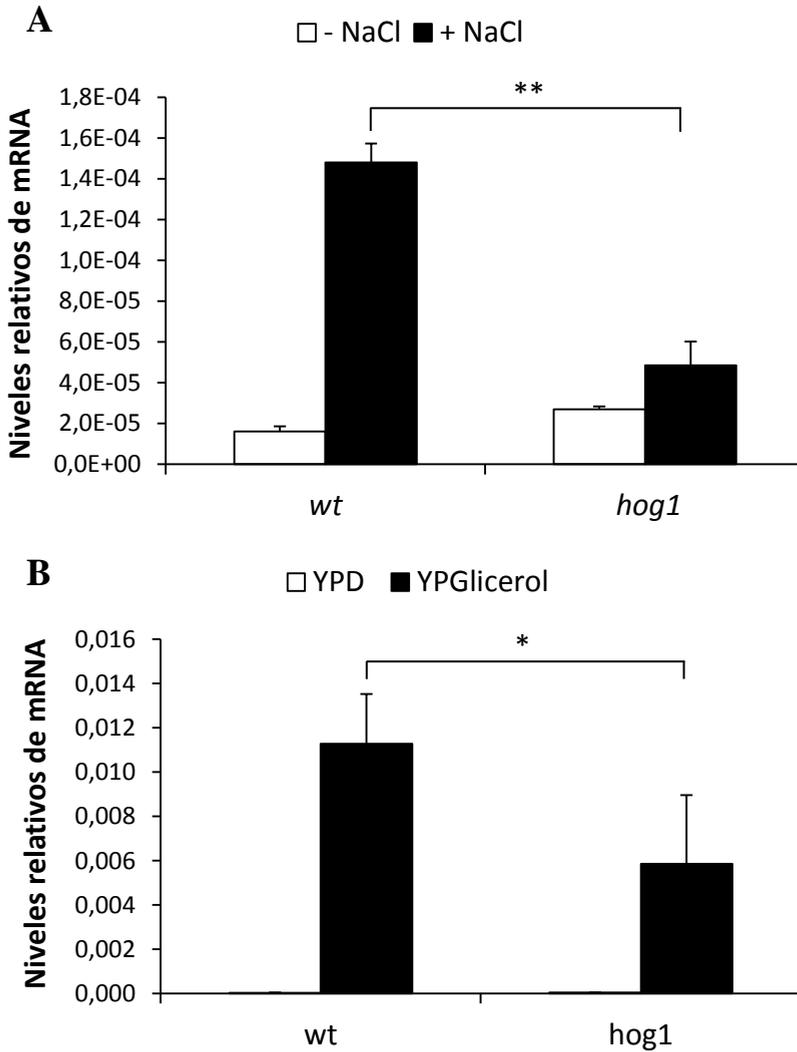


Figura 26. Niveles relativos de mRNA del gen *CRC1* en respuesta a estrés salino y cambio diáuxico. La cepa salvaje (wt) de levadura y el mutante $\Delta hog1$ se trataron con (A) 0,4M NaCl 20 minutos o (B) se cambió el medio de fermentativo a respiratorio durante 30 minutos. Los niveles de expresión se calcularon mediante RT-PCR y se normalizaron frente a los niveles de expresión del gen *ACT1*. Los datos mostrados son la media y el error típico de dos experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con el test *t de Student* y el doble asterisco (**) indica que existe una significación estadística con un valor $p < 0,01$ y el asterisco (*) indica un $p < 0,05$, con respecto al valor de la cepa silvestre.

10. Análisis del efecto de los genes *MPC* en la morfología mitocondrial

Visto el papel de algunos de los genes *MPC* en el metabolismo respiratorio, se quiso comprobar si su delección causaba algún cambio en la morfología mitocondrial. Estas variaciones de morfología se han descrito previamente en otros mutantes de genes de levadura, como *Δfzo1* (*FuZzy Onions homolog*), mutante del gen de fusión mitocondrial que provoca una inhibición de la formación de la estructura ramificada de la mitocondria. En este caso, se utilizó cepas mutantes de los genes *MPC* con el plásmido pVT100U-mtGFP, que mostraban la mitocondria en verde; y se compararon con la cepa silvestre BY4741 y con la cepa mutante *Δfzo1*. En la Figura suplementaria S4, se puede observar el mutante *Δfzo1* presenta una mitocondria fragmentada en comparación a la cepa silvestre, que muestra una estructura ramificada. La delección de los genes *MPC* no tiene ningún efecto en la estructura mitocondrial, por lo que no parecen estar implicados en la función de la dinámica de este orgánulo. Del mismo modo, como se aprecia en la Figura 17, la sobreexpresión de estos genes tampoco provocaba ningún cambio en la morfología mitocondrial.



Capítulo 2

**Caracterización de una mitofagia
específica para complejos
individuales de la cadena
electrónica mitocondrial**

1. Análisis de los complejos mitocondriales de la cadena de transporte de electrones en condiciones de elevada tasa respiratoria

1.1. Análisis de las proteínas de los complejos respiratorios mediante *Western Blot*

A lo largo del Capítulo 1 de Resultados se ha descrito la modificación de la composición del complejo transportador de piruvato mitocondrial en la célula de levadura para poder hacer frente a cambios ante una elevada tasa respiratoria y ante estrés osmótico. De esta forma, un cambio en esta composición provocaba un mayor transporte de piruvato dirigido hacia el ciclo de TCA y hacia la fosforilación oxidativa. El siguiente paso, por tanto, fue comprobar qué ocurría en las proteínas de los complejos OXPHOS para adaptarse a estas condiciones de elevada tasa respiratoria.

Para ello, se analizaron una serie de cepas de levadura que presentaban proteínas de los complejos de la cadena de transporte electrónico marcadas de forma individual con el epítipo TAP. En total, se analizaron 6 proteínas: Nde1 (*NADH Dehydrogenase External*) y Ndi1 (*NADH Dehydrogenase Internal*) del complejo I; Sdh2 (*Succinate DeHydrogenase*) del complejo II; Qcr2 (*QH2:cytochrome-C oxidoReductase*) del complejo III; Cox6 (*Cytochrome c Oxidase*) del complejo IV; y Atp5 (*ATP synthase*) del complejo F₁F₀-ATP sintasa. Se realizó una extracción de proteína total de las cepas con estas proteínas marcadas con el epítipo TAP en condiciones fermentativas (medio SD) y respiratorias (medio SGlic); y se analizó por *Western Blot* para estudiar su regulación. Como se observa en la Figura 27A, en condiciones en las que la tasa de respiración es elevada, aumenta la degradación de las proteínas de los complejos respiratorios, manteniéndose

los niveles de proteína funcional. En concreto, las proteínas de los complejos I y III muestran una mayor degradación en condiciones respiratorias.

Para observar si esta degradación dependía de la tasa respiratoria, se sometió a las cepas con las proteínas Ndi1-TAP y Qcr2-TAP (CI y CIII, respectivamente) a condiciones fermentativas (SD) y condiciones en las que se inducía la respiración de forma parcial y total (SGal y SGlic, respectivamente). Se escogieron estas proteínas porque su degradación era más fuerte y evidente. En la Figura 27B, se aprecia que la degradación de estas proteínas de los complejos I y III aumenta de forma proporcional a la tasa respiratoria, por lo que parece que este proceso es progresivo y se incrementa a medida que se necesita su función.

Por último, para analizar si esta degradación era específica de los complejos respiratorios o afectaba a otros complejos mitocondriales, se analizó otras proteínas de este orgánulo. En concreto, se utilizó las proteínas Mpc, puesto que ya se habían empleado anteriormente y se observó que la degradación también ocurría en éstas (Figura suplementaria S5). En concreto, se vio que las proteínas Mpc1 y Mpc3, relacionadas con la función mitocondrial ante elevadas tasas respiratorias y estrés osmótico, sufrían una mayor degradación que la proteína Mpc2, la cual mantenía una regulación similar en medio fermentativo y respiratorio. Por tanto, parece que esta degradación no es específica de los complejos de la OXPHOS, sino que ocurre principalmente en aquellas proteínas que se activan o tienen algún papel en condiciones en las que se activa la respiración mitocondrial. Estos datos podrían estar mostrando un proceso de reciclaje específico de la maquinaria mitocondrial cuando este orgánulo necesita activarse.

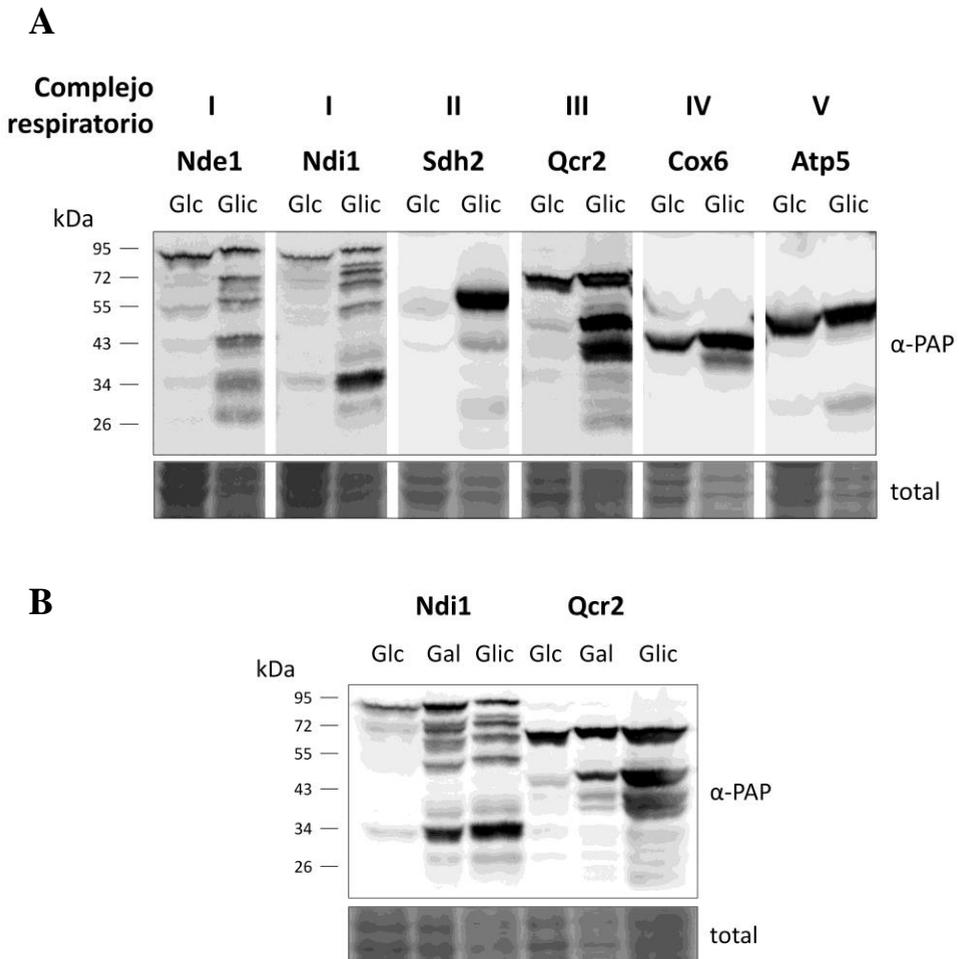


Figura 27. Inmunodetección de las proteínas de los complejos respiratorios en extractos totales de levadura en condiciones fermentativas y respiratorias. (A) Las proteínas de los complejos respiratorios sufren una degradación al activarse la respiración. Las cepas de levadura con las proteínas de los diferentes complejos de la cadena de transporte electrónico marcadas con el epítipo TAP en el genoma se analizaron por *Western Blot* tras haber sido sometidas a crecimiento fermentativo y respiratorio en medio mínimo (SD y SGlicerol, respectivamente). **(B)** La degradación es progresiva a medida que aumenta la tasa respiratoria. Las proteínas del complejo I (Ndi1) y III (Qcr2) se analizaron de la misma manera, añadiendo un medio de inducción parcial de la respiración (SGalactosa). Las proteínas en todos los casos se detectaron con el anticuerpo α-PAP y como control de carga se utilizó la tinción de membrana mediante DB71 (total).

1.2. Análisis de los genes responsables de la degradación de los complejos de la cadena de transporte electrónico ante una elevada tasa respiratoria

Para estudiar los genes implicados en este mecanismo, se evaluó diferentes mutantes con el fondo genético Ndi1-TAP y Qcr2-TAP, para observar en cuáles de ellos no se producía la degradación de estas proteínas ante un cambio de metabolismo fermentativo a respiratorio. Nuestra hipótesis fue que este mecanismo de degradación/reciclaje estaba relacionado con la mitofagia, puesto que parecía que cumplía la función de control de calidad mitocondrial. Por tanto, se escogieron 10 genes que se creía candidatos para el proceso o que habían sido descritos previamente en levadura como relacionados con él. En primer lugar, se eligió dos genes directamente relacionados con mitofagia y autofagia: *ATG32* y *ATG11* (*AuTophagy*). Otro de los genes, *HOG1*, ya se había analizado previamente en otros experimentos, como gen implicado en la respuesta a estrés osmótico y que a su vez podría estar relacionado con la mitofagia (Mao *et al.*, 2011; Aoki *et al.*, 2011). También se analizaron genes de la dinámica mitocondrial, como *FZO1* (*FuZzy Onion homolog*) y *FIS1* (*mitochondrial FISsion*); y de la maquinaria detoxificadora de ROS de la mitocondria, como *SOD2* (*SuperOxide Dismutase*). Además, recientemente se había descrito la regulación de Atg32 por medio de la proteasa Yme1 (Wang *et al.*, 2013), por lo que se eligieron 3 proteasas mitocondriales: *YME1* (*Yeast Mitochondrial Escape*) y *AFG3* (*ATPase Family Gene*) de la membrana mitocondrial interna; y *PIM1* (*Proteolysis In Mitochondria*) localizada en la matriz mitocondrial. Por último, se escogió una proteína de función desconocida de la mitocondria, denominada *FMP48* (*Found in Mitochondrial Proteome*), de la

cual lo único que se conocía era que se inducía ante estrés osmótico y que se localizaba en la mitocondria.

Se analizaron 10 mutantes de delección en ambos fondos genéticos (desarrollados por el sistema del *cassette KANMX*, a partir de los oligonucleótidos de la Tabla suplementaria TS2). Además de comprobar por PCR que la delección se había producido, en el caso de los mutantes de las proteasas, para saber si eran correctos, se realizó un ensayo de crecimiento en medio fermentativo y respiratorio (ver Figura suplementaria S6); ya que se ha descrito que los mutantes de estas proteasas presentan defectos en la respiración (Arnold *et al.*, 2006; Van Dyck *et al.*, 1994; Suzuki *et al.*, 1994; Thorness *et al.*, 1993; Arlt *et al.*, 1998). Como control de dicho ensayo, se utilizó la cepa $\Delta fis1$ y los resultados mostraron que efectivamente había un retraso del crecimiento de estos mutantes en ambos fondos genéticos. Paralelamente, también se realizaron diversos ensayos de crecimiento en medio sólido para el mutante $\Delta fmp48$, del que no se disponía ningún dato y se quería averiguar si presentaba algún fenotipo en alguna condición ambiental. Pero en la Figura suplementaria S7 se observa que no presenta ningún retraso en el crecimiento respiratorio, ante estrés salino o tras un tratamiento con valinomicina. Esto no quiere decir que su función no esté relacionada con estas condiciones, sino simplemente que su crecimiento no se ve afectado.

Una vez se obtuvieron todos los mutantes para las cepas Ndi1-TAP y Qcr2-TAP, se sometieron a un crecimiento fermentativo (SD) y respiratorio (SGlic) durante toda la noche, y se extrajo proteína total para su análisis posterior por *Western Blot* para estudiar en qué mutantes no se producía dicha degradación.

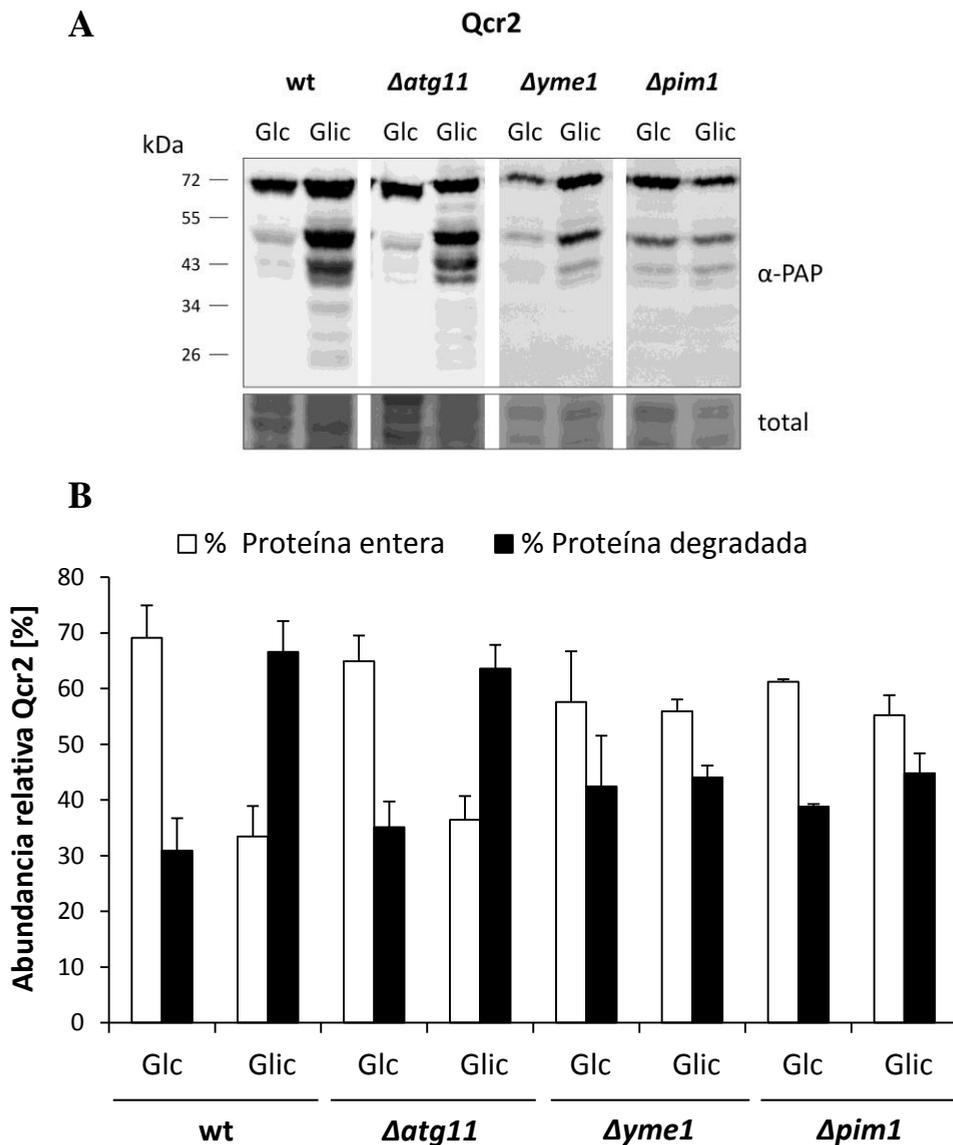


Figura 28. Inmunodetección de la proteína Qcr2 del complejo III en mutantes de levadura en condiciones fermentativas y respiratorias. La ausencia de *YME1* y *PIM1* reduce la degradación del complejo III en cuanto se activa la respiración. **(A)** Las cepas de levadura silvestre BY4741 y los mutantes $\Delta atg11$, $\Delta yme1$ y $\Delta pim1$ con la proteína Qcr2 marcada con el epítipo TAP en el genoma se analizaron por *Western Blot* tras haber sido sometidas a crecimiento fermentativo y respiratorio en medio mínimo (SD y SGlicerol, respectivamente). La proteína se detectó con el anticuerpo α -PAP y se utilizó la tinción de membrana con DB71 como control de carga. **(B)** Cuantificación del porcentaje de proteína Qcr2 total correspondiente a proteína entera y a proteína degradada para cada mutante y en cada condición. Los datos que se muestran son la media con el error típico para dos réplicas biológicas.

La mayor parte de los mutantes analizados no mostraron ningún cambio en la degradación de los complejos I y III, con respecto a la cepa silvestre (ver Figura suplementaria S8). Sin embargo, llamó la atención que los mutantes $\Delta yme1$ y $\Delta pim1$ presentaban una menor degradación del complejo III (representado por la proteína Qcr2) en medio respiratorio con respecto a la cepa silvestre (Figura 28A). De hecho, al cuantificar el porcentaje de degradación de la proteína (en relación a la proteína total) de estos mutantes en cada condición, se observa que el porcentaje de degradación en un medio respiratorio disminuye y es equivalente a los niveles que presenta en un medio fermentativo (Figura 28B). Es decir, estas proteasas podrían estar implicadas en el reciclaje de complejos respiratorios para mantener el correcto funcionamiento de la cadena de transporte de electrones en condiciones de elevadas tasas respiratorias.

2. Análisis del crecimiento de cepas de levadura mutantes para genes de autofagia

En la bibliografía previa, se relacionaba la autofagia con la función mitocondrial. De hecho, se ha descrito que en condiciones de ayuno, los mutantes de genes de autofagia (*ATG*) pierden el mtDNA y aumentan la concentración de ROS mitocondrial. Pero lo más interesante es que estos mutantes muestran cantidades alteradas e insuficientes de las proteínas de los complejos respiratorios (Suzuki *et al.*, 2011). Por tanto, es posible que la degradación observada en estos complejos en condiciones respiratorias estuviese relacionada con la autofagia o, en su defecto, con la mitofagia,

que se había visto que ocurría en crecimiento respiratorio estacionario (Kanki and Klionski, 2008).

Para analizar esta hipótesis, en primer lugar se analizó el crecimiento de cepas de delección de genes de autofagia en medio fermentativo y respiratorio. Entre todos los mutantes con implicación en procesos de autofagia, se seleccionaron sólo aquellos que no estaban relacionados con la macroautofagia no selectiva, pero sí con el proceso de la mitofagia específica (Kanki and Klionsky, 2010).

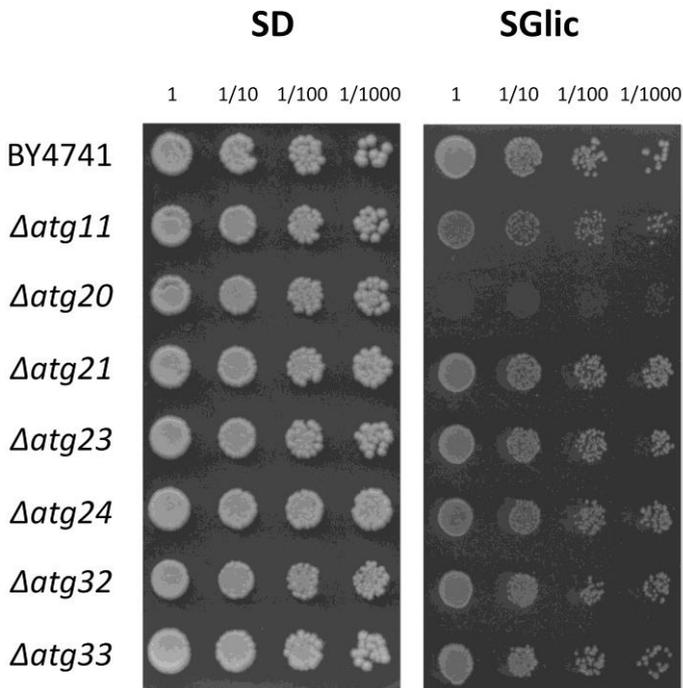


Figura 29. Ensayo de crecimiento en medio sólido (*Droptest*) para los mutantes de autofagia. Los mutantes *Δatg11* y *Δatg20* presentan dificultades para crecer en medio respiratorio. Crecimiento fermentativo (SD) y respiratorio (SGlic) de las cepas mutantes de los genes *ATG*, comparado con el de la cepa silvestre BY4741. Las placas se suplementaron con todos los aminoácidos necesarios para el crecimiento (Leu, His, Met, Ura). El ensayo de goteos se realizó por triplicado, creciendo los cultivos hasta la misma OD = 1, y generando tres diluciones seriadas para cada uno de ellos (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}). Las imágenes se tomaron a las 48h de incubación a 28° C en el caso del medio SD, y a las 72-96h en el medio SGlic.

Se analizaron $\Delta atg11$, $\Delta atg20$, $\Delta atg21$, $\Delta atg23$, $\Delta atg24$, $\Delta atg32$ y $\Delta atg33$, comparándolos con la cepa silvestre BY4741. Como se observa en la Figura 29, el mutante $\Delta atg20$ era prácticamente incapaz de crecer en medio respiratorio y existía una inhibición en el crecimiento en presencia de azúcares no fermentables en el caso del mutante $\Delta atg11$.

De nuevo, estos resultados muestran una relación entre respiración y autofagia, aunque parece que no todos los genes *ATG* estén implicados en ésta. Precisamente, el gen *ATG11* es uno de los genes descritos en levadura en el proceso de mitofagia, por lo que sería interesante conocer su función en la degradación controlada de complejos específicos de la mitocondria durante la respiración activada y también en respuesta al daño mitocondrial.

3. Generación de un modelo de estudio de daño mitocondrial específico para levadura

Para estudiar la posible relación entre mitofagia, respiración celular y la respuesta adaptativa a la disfunción mitocondrial fue necesario generar un modelo en levadura que nos permitiese generar un daño mitocondrial específico, que activara la degradación específica de este orgánulo. Como se ha comentado en el apartado de Introducción de este trabajo, para inducir la mitofagia en levadura se utilizaban, hasta el momento, diversos procesos basados en provocar un ayuno o en llevar a fase estacionaria a la célula. Sin embargo, en nuestro caso, queríamos observar qué ocurría en el caso de que la célula detectara un daño en la función mitocondrial y activara la mitofagia para eliminar dicho orgánulo no funcional. Para ello,

nos basamos en un método similar al que se usa en mamíferos (explicado en el Apartado 3.3.2. de la Introducción), en el cual se induce una pérdida de potencial de membrana en la mitocondria.

En nuestros estudios, dicha disrupción del potencial se provocó utilizando la valinomicina, un antibiótico obtenido a partir de diversas cepas de *Streptomyces*. La valinomicina es un ionóforo neutro que forma una estructura macrocíclica mediante enlaces éster y amida, con un interior hidrofóbico altamente selectivo por el ion potasio (K^+). De hecho, su afinidad por este ion es 10^4 veces más elevada que por el ion Na^+ (la constante de estabilidad por el potasio es de $K = 10^6$, mientras que la del sodio es únicamente $K = 10$). Por tanto, funciona como un transportador específico de potasio y facilita el movimiento de este ion a través de las membranas lipídicas. Normalmente, la membrana mitocondrial interna es impermeable al K^+ , pero la valinomicina puede transportarlo cuando el potencial eléctrico es diferente a ambos lados. Como la matriz tiene un potencial negativo, el K^+ entra en el interior, igualando el gradiente electroquímico de esta membrana y dañando la función mitocondrial que depende de este gradiente, por ejemplo, el proceso de fosforilación oxidativa. Por ello, es un buen método para provocar una disrupción del potencial de membrana, un fallo en la función mitocondrial y estudiar cómo responde la célula ante este daño (Lodish *et al.*, 2000; Safiulina *et al.*, 2006).

Anteriormente, se había utilizado en células de mamífero para provocar cambios en el potencial de la membrana mitocondrial, pero se quiso comprobar si en levadura el efecto de la valinomicina era específico de este orgánulo y no alteraba a la célula de forma general.

En primer lugar, se estudió el crecimiento de una cepa silvestre con fondo genético BY4741 en presencia de valinomicina, en medio fermentativo y respiratorio. Para ello, se analizó el crecimiento continuo de esta cepa ante diversas concentraciones de valinomicina (entre 0 y 6 μM) en un medio rico con glucosa (YPD) o con glicerol (YPGlic), durante 72 horas. Con estos datos, se calculó la eficiencia de crecimiento a las 40 horas para cada condición y se vio que, tal y como se muestra en la Figura 30, la valinomicina afecta más al crecimiento de la levadura en un medio respiratorio, es decir, cuando es necesaria la función mitocondrial.

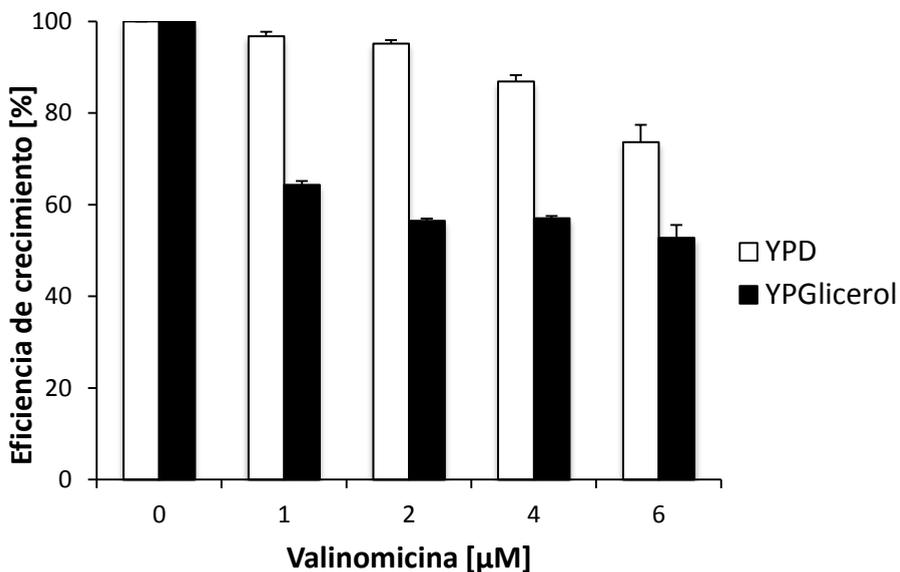


Figura 30. Eficiencia de crecimiento de la cepa silvestre en presencia de diferentes concentraciones de valinomicina. La valinomicina provoca una disminución del crecimiento respiratorio de la cepa wt, pero no del fermentativo. El crecimiento continuo en medio líquido se monitorizó durante 72 horas en medio rico fermentativo (YPD) y respiratorio (YPGlicerol), con valinomicina (de 0 a 6 μM). Se representa la eficiencia de crecimiento relativa de la cepa a 40 horas para cada condición. Se estableció arbitrariamente que la eficiencia a 0 μM de valinomicina era del 100%. Los datos se obtuvieron a partir de la media de tres réplicas biológicas y con el error típico.

De hecho, a niveles bajos de valinomicina (1 μM), la eficiencia de crecimiento de la cepa silvestre ya se reduce aproximadamente a un 60% en presencia de glicerol, mientras que el crecimiento fermentativo apenas se ve afectado hasta concentraciones más elevadas (6 μM).

En segundo lugar, se midió el consumo de oxígeno de la cepa silvestre a diferentes concentraciones de valinomicina (entre 0 y 8 μM) en medio mínimo con glucosa (SD). En la Figura 31, se aprecia que este consumo se ve afectado de forma pronunciada en presencia de valinomicina, llegando a ser menor de la mitad a concentraciones de 1 μM . Por tanto, parece que la valinomicina afecta de forma específica al potencial de membrana de la mitocondria, inhibiendo su función; pero sin provocar graves consecuencias en la célula cuando la mitocondria no es necesaria.

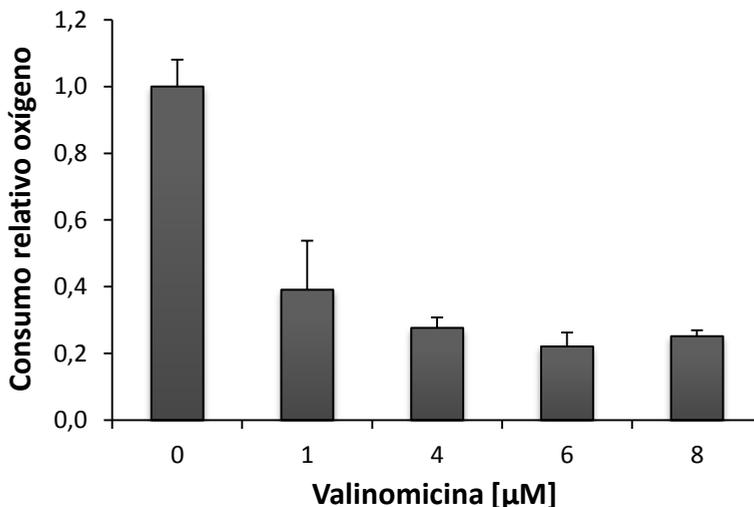


Figura 31. Consumo de oxígeno de la cepa BY4741 ante diferentes concentraciones de valinomicina. El tratamiento con valinomicina disminuye el consumo de oxígeno en la cepa silvestre incluso a bajas concentraciones. El consumo de oxígeno se midió en células intactas de levadura en medio mínimo SD y en presencia de 0 a 8 μM de valinomicina. El valor a 0 μM se estableció de forma arbitraria como 1. Se muestra la media y el error típico de tres muestras biológicas independientes.

4. Efecto de la valinomicina en las proteínas de los complejos respiratorios mitocondriales

4.1. Análisis de las proteínas de los complejos mitocondriales por el ensayo de *Western Blot*

Una vez comprobado que la valinomicina tenía un efecto específico sobre la actividad mitocondrial, se quiso observar qué ocurría, tal y como se había hecho anteriormente, en los complejos de la cadena de transporte de electrones. Como en el caso anterior, se analizaron cepas de levadura con proteínas de los complejos respiratorios marcadas de forma individual con el epítipo TAP: Ndi1, Sdh2, Qcr2, Cyc1 (*CYtochrome C*), Cox6 y Atp5. Como control, se utilizó la proteína Fba1 (*Fructose 1,6-Biphosphate aldolase*), que es una proteína citosólica que interviene en la glicólisis y cuyos niveles se mantienen estables en la célula. Se crecieron estas cepas en medio en el que se inducía parcialmente la respiración (SGalactosa) durante toda la noche, y, una vez las células alcanzaron una OD = 1, se trataron con 4 μ M de valinomicina durante 8 horas. La elección de la concentración de valinomicina se basó en las Figuras 30 y 31, donde se observa que es una cantidad de reactivo efectiva para generar daño mitocondrial. Se extrajo proteína total de estas cepas cada 2 horas y se analizó y cuantificó estas proteínas por *Western Blot* para estudiar cómo variaban en presencia de valinomicina. La cantidad de proteína se normalizó en función de la cantidad de proteína Pgk1 (*3-PhosphoGlycerate Kinase*), detectada con un anticuerpo específico (α -Pgk1). Ésta está implicada en la glicólisis, por lo que sus niveles son abundantes y relativamente estables, y sirve como control interno en diferentes estudios.

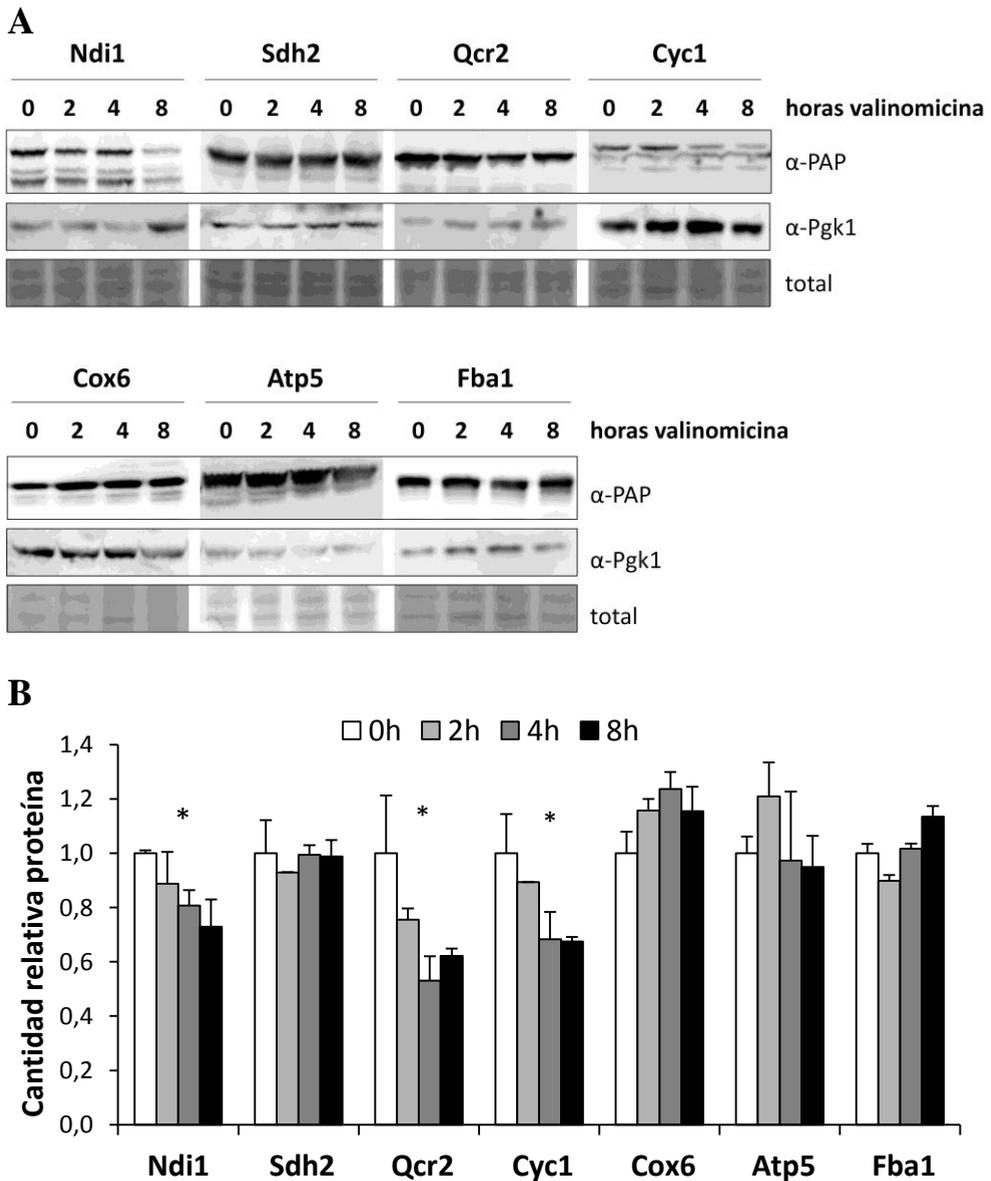


Figura 32. Inmunodetección de las proteínas de los complejos respiratorios de extractos totales de levadura tras el tratamiento con valinomicina. Las proteínas Ndi1, Qcr2 y Cyc1 disminuyen su cantidad en presencia de valinomicina. Las cepas de levadura con las proteínas de los complejos respiratorios marcadas con el epítipo TAP en el genoma se analizaron por *Western Blot* tras haber sido tratadas con 4 μ M de valinomicina en medio respiratorio SGal. Se recogió muestra cada 2h hasta las 8h de tratamiento. **(A)** Detección de las proteínas con el anticuerpo α -PAP, utilizando como control de carga la tinción con DB71 y como control endógeno la proteína Pgk1. **(B)** Cuantificación de dichas proteínas, normalizando en base a la cantidad de proteína Pgk1. Los datos son la media y el error típico de dos muestras biológicas. El asterisco (*) indica que existe diferencias significativas entre los valores de 0h y 8h de tratamiento (p -valor < 0,05), según el test *t de Student*.

Se esperaba que, tras la adición de valinomicina al medio, el potencial de membrana de la mitocondria disminuyera y provocara un fallo en la función de este orgánulo. Ante una mitocondria dañada, la célula la degradaría mediante el proceso de mitofagia, por lo que se vería una disminución de las proteínas de los complejos respiratorios. Sin embargo, tal y como se muestra en la Figura 32, únicamente se pudo cuantificar una disminución significativa de las proteínas Ndi1, Qcr2 y Cyc1 ($p = 0,034$; $p = 0,041$ y $p = 0,044$, respectivamente), que forman parte de los complejos I y III. Los niveles del resto de proteínas variaban a lo largo de las 8 horas de tratamiento con valinomicina, pero no disminuían de forma significativa y se comportaban de un modo similar a la proteína control Fba1.

4.2. Comprobación de la degradación de los complejos I y III mediante microscopía confocal

Dado que hasta el momento nunca se había descrito una degradación selectiva de ciertos complejos de la cadena de transporte de electrones en condiciones de daño mitocondrial, se quiso comprobar este fenómeno a nivel celular. Se empleó la microscopía confocal para detectar tanto los niveles de mitocondria como de las proteínas Ndi1 (CI) y Qcr2 (CIII) en diferentes condiciones. A la hora de detectar la mitocondria, se utilizó de nuevo la cepa silvestre BY4741 con el plásmido pVT100U-mtGFP, con el que se detectaba la mitocondria en verde. Para cuantificar los niveles de las proteínas Ndi1 y Qcr2, se usó cepas de levadura con estas proteínas fusionadas con la proteína GFP, bajo el control de los respectivos promotores naturales.

En primer lugar, se analizó la densidad mitocondrial de una cepa silvestre en diferentes condiciones. Para ello, se crecieron cultivos en medio fermentativo (SD) y respiratorio (SGal) durante toda la noche, y se analizaron mediante microscopía confocal. Además, las cepas crecidas en medio respiratorio, se sometieron a un ayuno de nitrógeno (SD-N) o a un tratamiento de valinomicina (4 μ M) durante 2 horas. En estas condiciones, se cuantificó la densidad mitocondrial integrada de al menos 50 células diferentes, y se normalizó en función del área celular. En la Figura 33, se representa la media de esta densidad mitocondrial integrada para cada condición y se observa que hay una disminución significativa ($p = 0,013$) de la densidad mitocondrial en presencia de valinomicina, con respecto a las mismas células sin tratar (SGal).

En segundo lugar, se pasó a analizar qué ocurría en las proteínas Ndi1 y Qcr2. Para ello, se comprobó que la proteína GFP no alteraba la funcionalidad de Ndi1 ni de Qcr2. Esto se realizó debido a que esta proteína es lo suficientemente grande como para poder afectar al plegamiento y/o función de estas proteínas al fusionarse. Se sabe que ante la delección de cualquier proteína de los complejos respiratorios, la célula presenta serias dificultades para crecer en un medio sin azúcares fermentables. Por ello, se comparó el crecimiento en condiciones fermentativas y respiratorias de la cepa silvestre, los mutantes de delección $\Delta qcr2$ y $\Delta ndi1$, y las cepas con el fondo genético Qcr2-GFP y Ndi1-GFP. Los resultados se muestran en la Figura suplementaria S9 y únicamente se observa una inhibición en el crecimiento respiratorio en los mutantes para los genes *QCR2* y *NDI1*. El fenotipo de crecimiento de Qcr2-GFP y Ndi1-GFP no se ve afectado, por lo que parece que la fusión con GFP no afecta a su estructura o función.

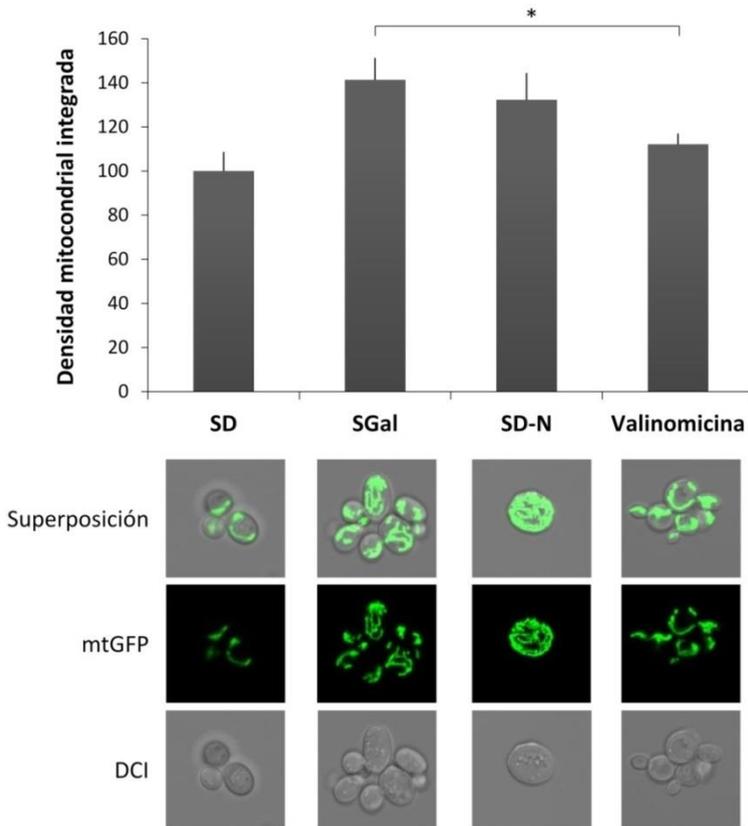


Figura 33. Cuantificación de la masa mitocondrial de levadura en diferentes condiciones. La densidad mitocondrial disminuye significativamente en presencia de valinomicina. La cepa silvestre BY4741 transformada con el plásmido pVT100U-mtGFP se creció en medio fermentativo (SD) y respiratorio (SGal) durante toda la noche, y tras el crecimiento respiratorio, se sometió a un ayuno de nitrógeno (SD-N) y a un tratamiento con 4 μ M de valinomicina durante 2 horas. Los datos mostrados son la media y el error típico de la densidad mitocondrial integrada (normalizada en función del área celular) de 50 células para cada tratamiento. El valor para el tratamiento en medio fermentativo se estableció arbitrariamente como 100. Las imágenes mostradas son una muestra representativa de lo observado en cada condición. Se muestra el GFP mitocondrial (mtGFP), la luz transmitida a través de un espejo dicróico (DCI, *DiChroic mirror*) y la superposición de ambas. La estadística se llevó a cabo mediante la prueba ANOVA, donde el asterisco indica que existen diferencias significativas (p -valor < 0,05) entre una muestra tratada con valinomicina y la misma muestra sin tratar.

Finalmente, una vez se demostró que las proteínas Ndi1-GFP y Qcr2-GFP eran funcionales, se estudiaron y cuantificaron por microscopía

confocal en las mismas condiciones que en el caso anterior. De nuevo, en la Figura 34A se observa cómo la densidad del complejo respiratorio I (representado por Ndi1) disminuye de forma significativa ($p = 0,009$) ante un tratamiento con valinomicina. Del mismo modo, en el caso de Qcr2 (Figura 34B), la degradación de esta proteína en presencia de valinomicina era significativa ($p = 0,031$). De hecho, los niveles de ambas proteínas con valinomicina eran incluso inferiores a los observados en condiciones fermentativas; un resultado que parece confirmar la degradación preferencial de los complejos I y III en respuesta a daño mitocondrial.

Durante la cuantificación de ambas proteínas llamó la atención que mientras que Ndi1 se encontraba a lo largo de toda la mitocondria, no parecía que Qcr2 se distribuyera de forma homogénea, sino que parecía localizarse en regiones específicas del orgánulo. Sin embargo, habría que comprobarlo de otras maneras antes de poder verificarlo, ya que no existen estudios previos.

Todo esto indica que, en presencia de valinomicina, se activa la degradación de la mitocondria (mitofagia) en levadura de forma muy selectiva, actuando únicamente sobre ciertos complejos de la cadena respiratoria. Hasta el momento, no se ha descrito ningún fenómeno parecido. La posible razón de esta selectividad es que para la célula resultaría muy costoso regenerar todo un orgánulo entero, con complejos proteicos tan complejos como los que intervienen en la fosforilación oxidativa. Por ello, ante un daño mitocondrial, degrada exclusivamente aquellas proteínas que le pueden causar un mayor daño a la célula, como son el complejo I y el III, conocidos como los principales productores de ROS mitocondrial (Selivanov *et al.*, 2011). Podría considerarse un mecanismo de

defensa, para evitar una acumulación de ROS que diera lugar a mayores defectos.

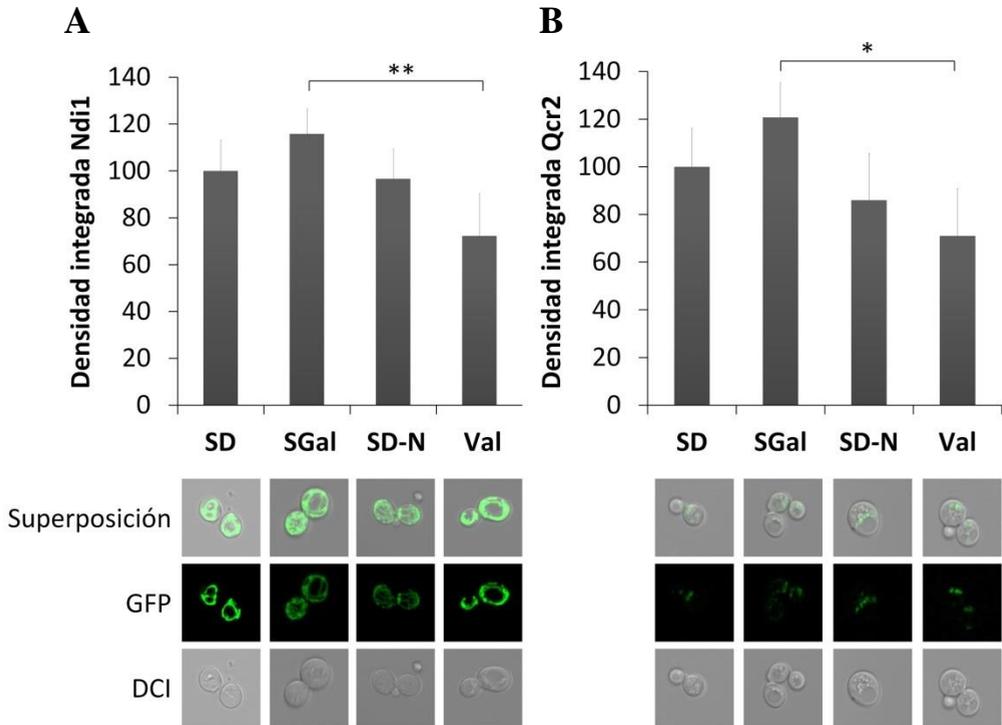


Figura 34. Cuantificación de la densidad integrada de las proteínas Ndi1 y Qcr2 mediante microscopía confocal. La cantidad de Ndi1 y Qcr2 disminuye significativamente ante un tratamiento con valinomicina. Detección de las proteínas Ndi1 (A) y Qcr2 (B) por microscopía confocal en las cepas marcadas en dichos genes con el epítipo GFP en el genoma. Las cepas se crecieron en medio fermentativo (SD) y respiratorio (SGal), y tras el crecimiento respiratorio se sometieron 2 horas a ayuno de nitrógeno (SD-N) y a un tratamiento con 4 μ M de valinomicina (Val). Los datos mostrados en el gráfico son la media y el error típico de la densidad proteica integrada de al menos 50 células por tratamiento. Se estableció arbitrariamente el valor de 100 para el crecimiento fermentativo. Las imágenes mostradas son representativas, y muestran el GFP (Ndi1-GFP o Qcr2-GFP), la luz transmitida (DCI) y la superposición de ambas capas. El tratamiento estadístico de los datos se llevó a cabo mediante la prueba ANOVA, donde el asterisco (*) indica que el p-valor < 0,05 y el doble asterisco (**) significa que el p-valor < 0,01.

5. Comprobación de que la degradación controlada de la mitocondria en presencia de valinomicina ocurre en la vacuola en levadura: Sistema mtRosella

Todos los resultados obtenidos hasta el momento indican que la valinomicina induce un daño mitocondrial específico, debido a una pérdida del potencial de membrana, y se activa una degradación selectiva en estas condiciones de los complejos respiratorios I y III. Sin embargo, la metodología empleada no permite discernir si este fenómeno ocurre en la vacuola (y, por tanto, se trataría de una degradación mediante mitofagia) o por otro mecanismo diferente.

Para detectar la mitofagia en levadura, Mijaljica y colaboradores diseñaron un método simple utilizando microscopía de fluorescencia que permitía evaluar este proceso. Este ensayo utiliza un reportero fluorescente, denominado Rosella, que es un biosensor de emisión dual que contiene una proteína roja fluorescente relativamente estable a pH (DsRed.T3) y una proteína verde fluorescente sensible a pH (pHluorin). El sistema se basa en las diferencias de pH entre la mitocondria (pH ~ 8,2) y la vacuola (pH ~ 5-5,5) en células vivas de levadura (Mijaljica *et al.*, 2011). Este reportero, además, está unido a un péptido de localización mitocondrial (mt). En condiciones normales, una cepa silvestre transformada con el plásmido pVT100U-mtRosella muestra ambas fluorescencias, roja y verde, distribuidas a lo largo de toda la mitocondria. Sin embargo, ante una inducción de mitofagia, este orgánulo se dirige a la vacuola para su degradación, por lo que además de la mitocondria en verde y rojo, se puede observar la acumulación de fluorescencia roja (pero no verde) en el lumen vacuolar ácido (ver Figura suplementaria S10 para ver una representación

esquemática del sistema). La actividad mitofágica de las células se puede determinar cuantificando el número de células con vacuolas en las que se observa la fluorescencia roja.

5.1. Análisis de la degradación mitocondrial en diferentes condiciones

En nuestros estudios, el sistema mtRosella se utilizó para determinar, en primer lugar, en qué condiciones ocurría una degradación mitocondrial a través de la vacuola en levadura. Previamente, ya se había descrito en este mismo sistema que, ante un crecimiento respiratorio y un posterior ayuno de nitrógeno durante toda la noche, se observaba la mitofagia (Mijaljica *et al.*, 2011). Se utilizó esta condición (SD-N o/n) como control positivo. Además, se analizaron las células en crecimiento fermentativo (SD) y respiratorio (SGal) durante toda la noche. También se estudiaron las células crecidas hasta fase exponencial en medio respiratorio (SGal) y sometiéndolas a un ayuno de nitrógeno durante 2 horas (SD-N 2h) y a un tratamiento con valinomicina (4 μ M) de 2 horas o durante toda la noche (Val 2h y Val o/n, respectivamente). En este ensayo, se utilizó la cepa silvestre BY4741 transformada con el plásmido pVT100U-mtRosella y se cuantificó el porcentaje de, al menos, 50 células en las que aparecía el fenómeno de mitofagia.

Además, aunque la vacuola en levadura es un orgánulo muy grande y cuya localización normalmente puede ser fácilmente determinada por las referencias de la luz transmitida (DCI), en algunas cepas y condiciones puede encontrarse más fragmentada y puede ser difícil de localizar. Por ello, se utilizó una tinción basada en cumarina denominada CMAC-Arg (7-amino-4-clorometilcumarina, L-arginina amida), tal y como se explica en el

apartado 11 de Materiales y Métodos. Este compuesto se convierte en un fluorescente azul por acción de las proteasas vacuolares, por lo que la emisión azul de la vacuola puede distinguirse fácilmente del rojo y verde del sistema mtRosella.

En la Figura 35, se muestra que efectivamente, una levadura crecida en medio respiratorio SGal, tras una noche de ayuno de nitrógeno, induce la mitofagia y este orgánulo se traslada a la vacuola, observándose perfectamente la co-localización de ambos (en rojo y azul). En condiciones fermentativas y respiratorias, este fenómeno no ocurre, ya que en principio no se espera un daño mitocondrial generalizado ni detectable. También se comprueba que durante las primeras horas de ayuno por nitrógeno (2h) todavía no se detecta la inducción de mitofagia en levadura, por lo que este proceso es más lento. Sin embargo, llama la atención que tras únicamente 2 horas de tratamiento con valinomicina, sí que es posible observar este fenómeno.

Por tanto, se puede concluir que la valinomicina induce una disfunción mitocondrial que activa su degradación en un proceso relacionado con la vacuola y, además, este mecanismo actúa de una forma más inmediata que en el caso del ayuno de nitrógeno. De hecho, tras un tratamiento con valinomicina durante toda la noche, la mitocondria aparece fragmentada y ya no es detectable el proceso, por lo que parece que responde ante las primeras horas del estímulo. Es cierto que el porcentaje de células en el que se detecta es menor (el 31,8% frente al 58,5%) y de una forma más tenue. Esto podría ser debido a que en presencia de valinomicina, no se degrada de forma general la mitocondria

sino que, como se ha observado previamente, es un mecanismo más selectivo y que responde con mayor rapidez.

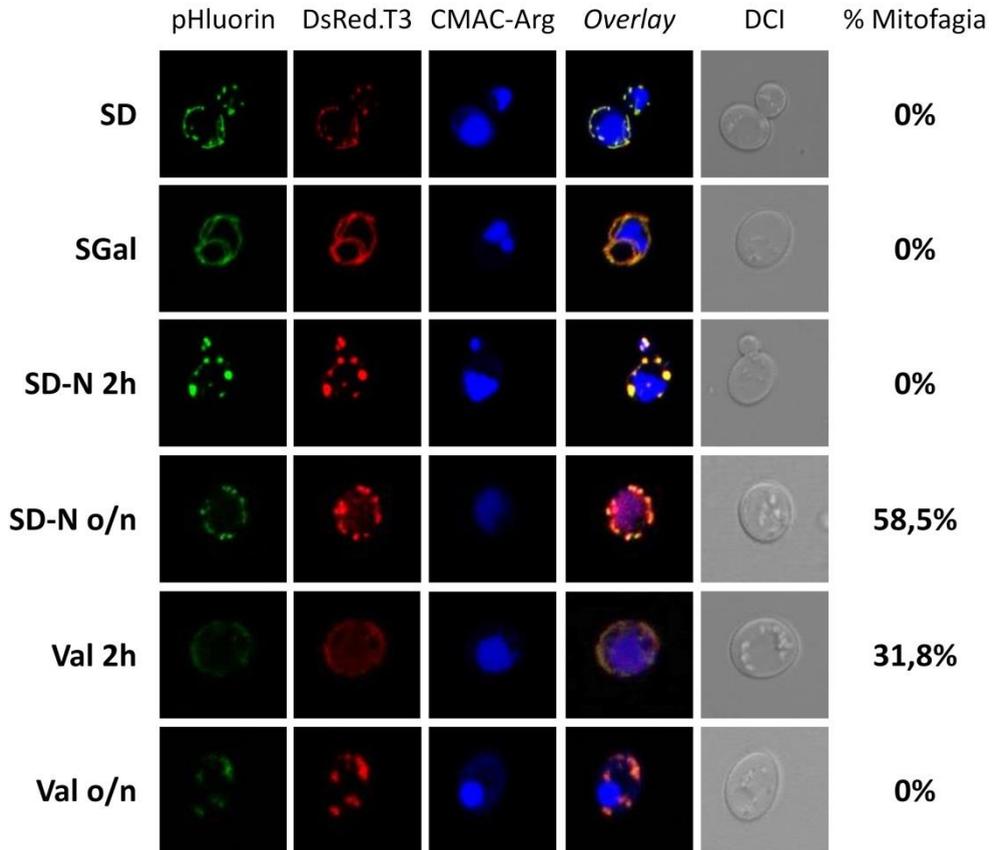


Figura 35. Detección de mitofagia en levadura mediante el sistema mtRosella por microscopía confocal. La valinomicina induce la mitofagia de forma más inmediata que las condiciones de ayuno. Las células de levadura BY4741 transformadas con el plásmido pVT100U-mtRosella fueron sometidas a diversas condiciones: crecimiento fermentativo (SD) y respiratorio (SGal), y, a partir de este último, se sometieron a ayuno de nitrógeno durante 2 horas (SD-N 2h) o toda la noche (SD-N o/n) y a 4 μ M de valinomicina durante 2 horas (Val 2h) o toda la noche (Val o/n). Antes del ensayo, se tiñó las vacuolas de las células con CMAC-Arg (100 μ M) durante 30 minutos (en azul). Todas las células se crecieron en 3mL de medio a 28° C en agitación. La mitocondria está marcada con dos fluoróforos: pHluorin (verde, sensible a pH) y DsRed.T3 (rojo, resistente a pH); y al ser trasladada a la vacuola, únicamente emite en rojo. En la figura se muestran imágenes representativas para cada condición y el porcentaje de células en el que se detectó mitofagia (de al menos 50 células diferentes) para cada una de ellas.

5.2. Análisis de la mitofagia mediante microscopía confocal en los mutantes *Δatg11* y *Δatg32*

El sistema mtRosella también se utilizó para estudiar algunos mutantes de delección de levadura y saber cuáles eran imprescindibles en la mitofagia inducida por valinomicina. Hasta el momento, en levadura, se había descrito al gen *ATG32* como imprescindible para el proceso de mitofagia inducida por ayuno de nitrógeno o ante fase estacionaria de crecimiento. La interacción entre *Atg11* y *Atg32* ha sido muy estudiada (tal y como se explica en la Introducción), y se ha visto que lleva a la mitocondria al sitio de formación del fagóforo, para la formación del autofagosoma. *ATG32* parece ser específico de mitofagia, y no actúa en procesos de autofagia general. Ante los datos obtenidos por autores previos en ayuno de nitrógeno, se estudió qué ocurría en los mutantes *Δatg11* y *Δatg32* de levadura a las 2 horas de tratamiento con 4 μ M de valinomicina. En la Figura 36, tal y como se había realizado anteriormente, se muestran los porcentajes de mitofagia detectados para estos dos mutantes, en comparación con la cepa silvestre en estas condiciones (ver Figura suplementaria S11 para observar las imágenes de microscopía).

Como se puede observar, por una parte, la presencia de *ATG11* es esencial para la inducción de la mitofagia, ya que el mutante no es capaz de degradar la mitocondria (al menos, de una forma detectable mediante este sistema). Por otra parte, el gen *ATG32*, hasta el momento considerado imprescindible para el proceso, es necesario en el proceso de mitofagia, pero no esencial. La pérdida de función de *ATG32* lleva a una reducción significativa ($p = 0,035$) en el porcentaje de células en el que se detecta mitofagia, pero no a una detención total del proceso.

Por tanto, a partir de estos datos obtenidos por microscopía, parece que la valinomicina induce la mitofagia en levadura de una manera más inmediata que el ayuno de nitrógeno. Y, además, este proceso es dependiente de *ATG11*, pero independiente de *ATG32*.

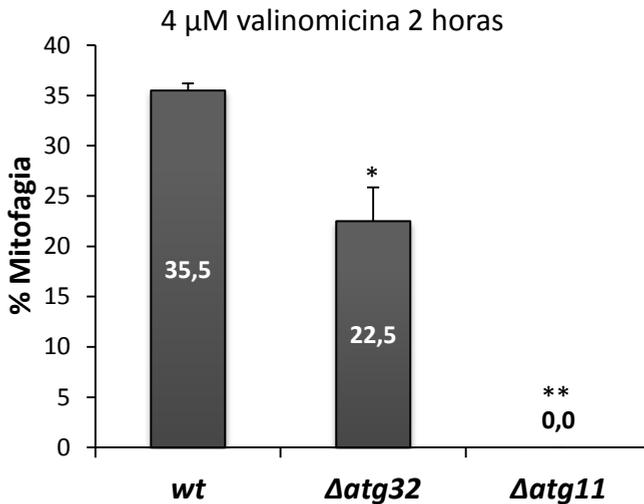


Figura 36. Porcentaje de mitofagia detectado mediante el sistema mtRosella en los mutantes Δ atg11 y Δ atg32. *ATG11* es esencial en el proceso de mitofagia inducida por valinomicina, mientras que *ATG32* es prescindible. La cepa silvestre (wt) y las dos mutantes Δ atg11 y Δ atg32 transformadas con el plásmido pVT100U-mtRosella se crecieron en medio mínimo respiratorio (SGal) durante toda la noche y se trataron con 4 μ M de valinomicina durante 2 horas, para luego analizarlas por microscopía. Se cuantificó el porcentaje de mitofagia en, al menos, 50 células de cada cepa, mediante el sistema mtRosella, del mismo modo que en la Figura 34. El tratamiento estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el test *t de Student*, donde un asterisco (*) significa que el p-valor < 0,05 y (**) indica que el p-valor < 0,01, con respecto a la cepa silvestre.

6. Análisis del crecimiento de mutantes de levadura en presencia de valinomicina

La valinomicina parece inducir mitofagia en levadura de forma específica y dependiente de *ATG11*. En ausencia de los genes necesarios para inducir la mitofagia en presencia de valinomicina, la célula acumularía daños en la población mitocondrial, que podría llevar a un aumento de ROS y a la muerte celular. Por tanto, para ver qué genes podrían estar relacionados con el mecanismo y comprobar lo obtenido por microscopía, se estudió el crecimiento de diferentes mutantes en presencia de valinomicina.

Se estudió la cepa silvestre BY4741 y 4 mutantes estudiados previamente por su relación con la mitofagia: *Δatg11*, *Δatg32* y *Δatg33*, implicados específicamente en este proceso, y no en macroautofagia (Kanki *et al.*, 2010); y *Δhog1*, que fosforila a Atg32 para que se una a Atg11 y se forme el fagóforo en la mitofagia inducida por ayuno (Aoki *et al.*, 2011; Mao *et al.*, 2011). Estas cepas se crecieron en medio rico YPD durante toda la noche y se realizó un ensayo de crecimiento en medio sólido (*Droptest*) fermentativo y respiratorio (YPGlic) en presencia de diferentes concentraciones de valinomicina (0,1 y 0,25 μ M).

Los resultados obtenidos muestran que el mutante *Δatg11* tiene una inhibición en el crecimiento con respecto a la cepa silvestre (wt) en presencia de valinomicina, que se incrementa a medida que aumenta la concentración de este antibiótico (ver Figura 37). El resto de mutantes no se ven afectados y, de hecho, el mutante *Δhog1* parece que crece con mayor facilidad incluso que la cepa wt. Por tanto, de nuevo parece que la

inducción de mitofagia a partir de valinomicina es un proceso diferente al que ocurre ante un ayuno de nitrógeno e implica genes diferentes (y, por tanto, mecanismos diferentes). De hecho, se corroboran los resultados obtenidos por microscopía, donde *ATG11* es imprescindible en el proceso, mientras que *ATG32* de nuevo no parece esencial.

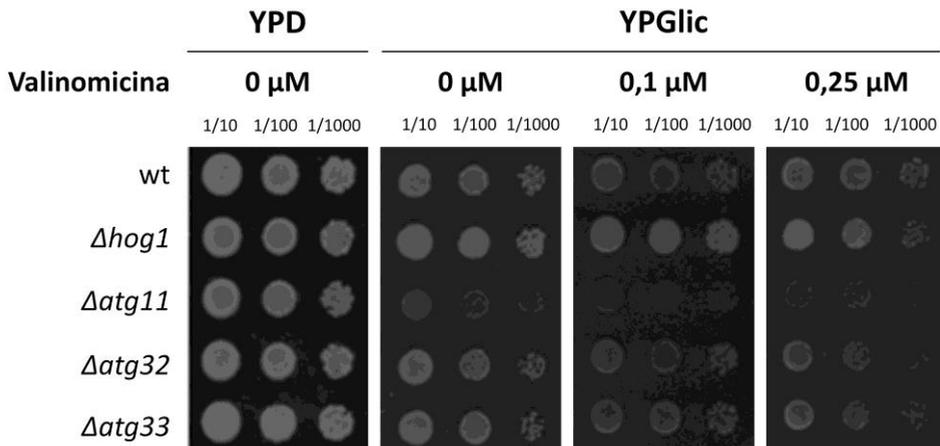


Figura 37. Ensayo de crecimiento de mutantes de levadura en presencia de valinomicina.

El mutante *Δatg11* presenta una inhibición en el crecimiento respiratorio en presencia de valinomicina. Las cepas se crecieron en medio rico YPD y en YPGlic, con diferentes concentraciones de valinomicina (0, 0,1 y 0,25 μ M); y se comparó su crecimiento con el de la cepa wt (BY4741). El ensayo se realizó por triplicado, creciendo los cultivos hasta una OD = 1, y preparando 3 diluciones seriadas para cada uno de ellos. Las imágenes se tomaron a las 24h de incubación a 28 $^{\circ}$ C en YPD, y a las 48h en YPGlicerol.

7. Análisis de los genes implicados en la degradación de los complejos de la cadena de transporte de electrones en presencia de valinomicina

Los resultados mostrados a lo largo de este capítulo parecen indicar que la célula degrada las proteínas de los complejos respiratorios en ciertas condiciones. En concreto, se ha visto que ante una activación de la OXPHOS

y del metabolismo respiratorio, estos complejos se degradan, manteniendo la cantidad total de proteína en una especie de reciclaje molecular. Además, ante una pérdida en la función mitocondrial (provocado por una disminución del potencial de la membrana), existe un proceso mitofágico muy selectivo, principalmente de los complejos I y III. Estos procesos de degradación, pese a tener ciertas características comunes, no parecen estar regulados de la misma forma que la degradación mitocondrial ante un ayuno de nutrientes. Del mismo modo que se ha realizado en el apartado 1.2 de este capítulo, se analizó qué genes estaban implicados en la degradación ante un tratamiento con valinomicina. Para ello, se estudiaron los mutantes candidatos a intervenir en este proceso de mitofagia y generados anteriormente de las cepas Ndi1-TAP y Qcr2-TAP (*Δhog1*, *Δatg11*, *Δatg32*, *Δfis1*, *Δfzo1*, *Δsod2*, *Δfmp48*, *Δafg3*, *Δyme1*, *Δpim1*) crecidos en medio mínimo respiratorio (SGalactosa) con un tratamiento de 4 μM de valinomicina durante 8 horas. Se cuantificó la cantidad de las proteínas Ndi1 y Qcr2 cada 2 horas a lo largo del tratamiento.

Por una parte, los resultados muestran de nuevo que este proceso mitofágico inducido por valinomicina es dependiente de Atg11 e independiente de Atg32 (ver Figura 38). Tanto en el caso del complejo I como del III, la ausencia de Atg11 detiene el proceso de degradación. Además, se vio una conexión con la maquinaria de dinámica mitocondrial. Previamente, ya se había descrito una relación entre la dinámica mitocondrial y la mitofagia inducida por ayuno, principalmente con los componentes de fisión (Mao *et al.*, 2013). En los resultados mostrados en la Figura 38, se puede observar que tanto la maquinaria de fisión (Fis1) como la de fusión (Fzo1) parecen tener una función en la degradación de los

complejos de la cadena de transporte de electrones. Por tanto, estos procesos de fusión y fisión están implicados con la mitofagia, ante cualquier tipo de inducción (ayuno o daño mitocondrial).

Por otra parte, las proteasas mitocondriales también parecen estar implicadas en el proceso de mitofagia, principalmente en el caso del complejo III (ver Figura 39), del mismo modo que aparecían relacionadas en la degradación de estas proteínas ante una elevada tasa respiratoria (resultado mostrado en la Figura 28). Yme1 y Pim1 participan en la degradación del CI y del CIII, pero Afg3 parece ser específica para el CIII. Fmp48, por su parte, mostraba un perfil similar al de las proteasas mitocondriales, y su ausencia causaba una inhibición de la degradación de la proteína Qcr2. Por último, las proteínas relacionadas con la respuesta a estrés osmótico (Hog1) u oxidativo (Sod2) no parecían ser esenciales en este proceso (ver Figura suplementaria S12), aunque Hog1 podría tener cierto papel en la degradación del complejo I. Esto parece indicar que, pese al papel de Hog1 en la mitofagia inducida por ayuno (Mao *et al.*, 2011; Aoki *et al.*, 2011), no parece ser esencial en la degradación ante un daño específico. Del mismo modo, un fallo en la eliminación del ROS mitocondrial mediante la enzima detoxificadora Sod2 no parece estimular este tipo de mitofagia.

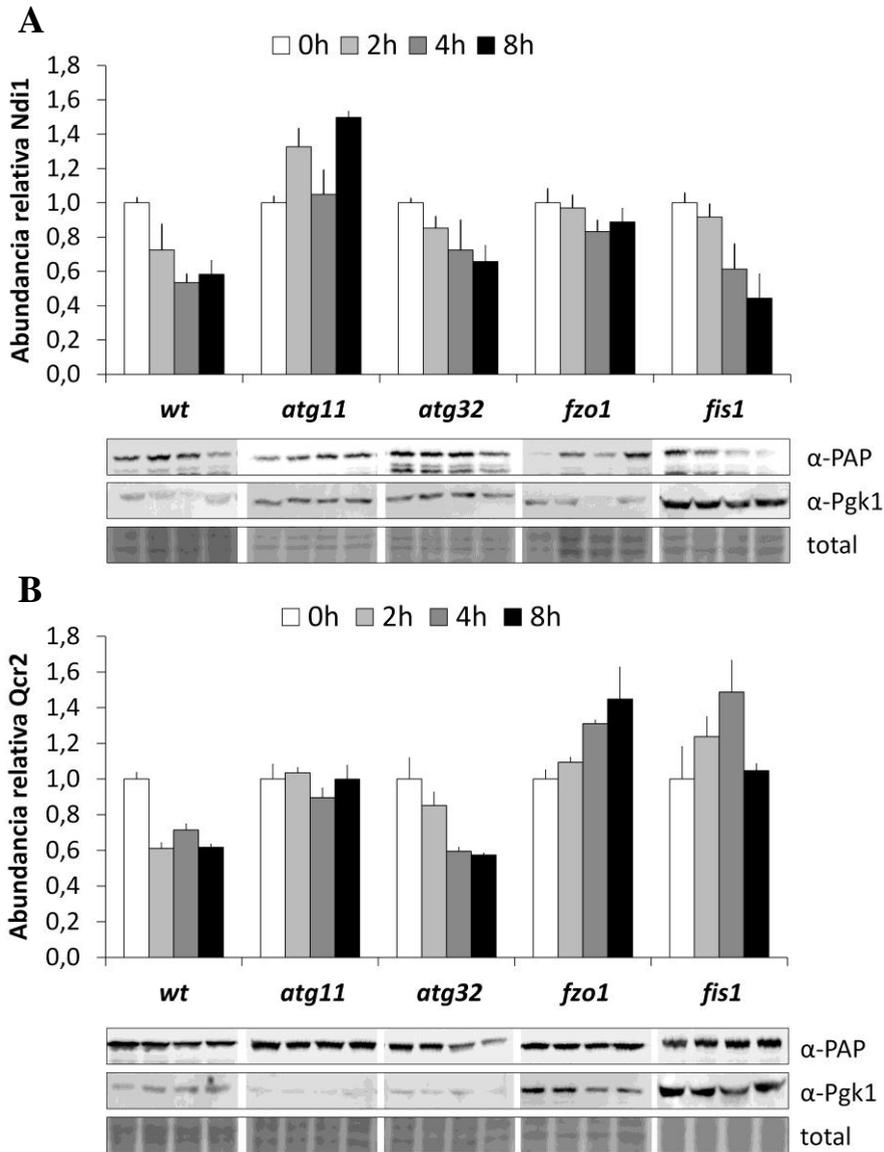


Figura 38. Inmunodetección de las proteínas de los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones en diferentes mutantes, tras el tratamiento con valinomicina. Las proteínas Atg11, Fzo1 y Fis1 están implicadas en la mitofagia inducida por valinomicina. Se realizaron extractos totales de proteína de las cepas de levadura con las proteínas **(A)** Ndi1 y **(B)** Qcr2 marcadas con TAP. Se analizaron por *Western Blot*, tras haber sido tratadas con valinomicina en medio respiratorio SGal. Se recogió muestras cada 2 horas hasta las 8 horas de tratamiento. La detección de proteínas se realizó con el anticuerpo α-PAP, con el control endógeno Pgk1 y el control de carga de la tinción de membrana con DB71. Los gráficos muestran la cantidad de proteína, normalizada en base a la cantidad de proteína Pgk1 de la muestra. Los datos son la media y el error típico de dos muestras biológicas.

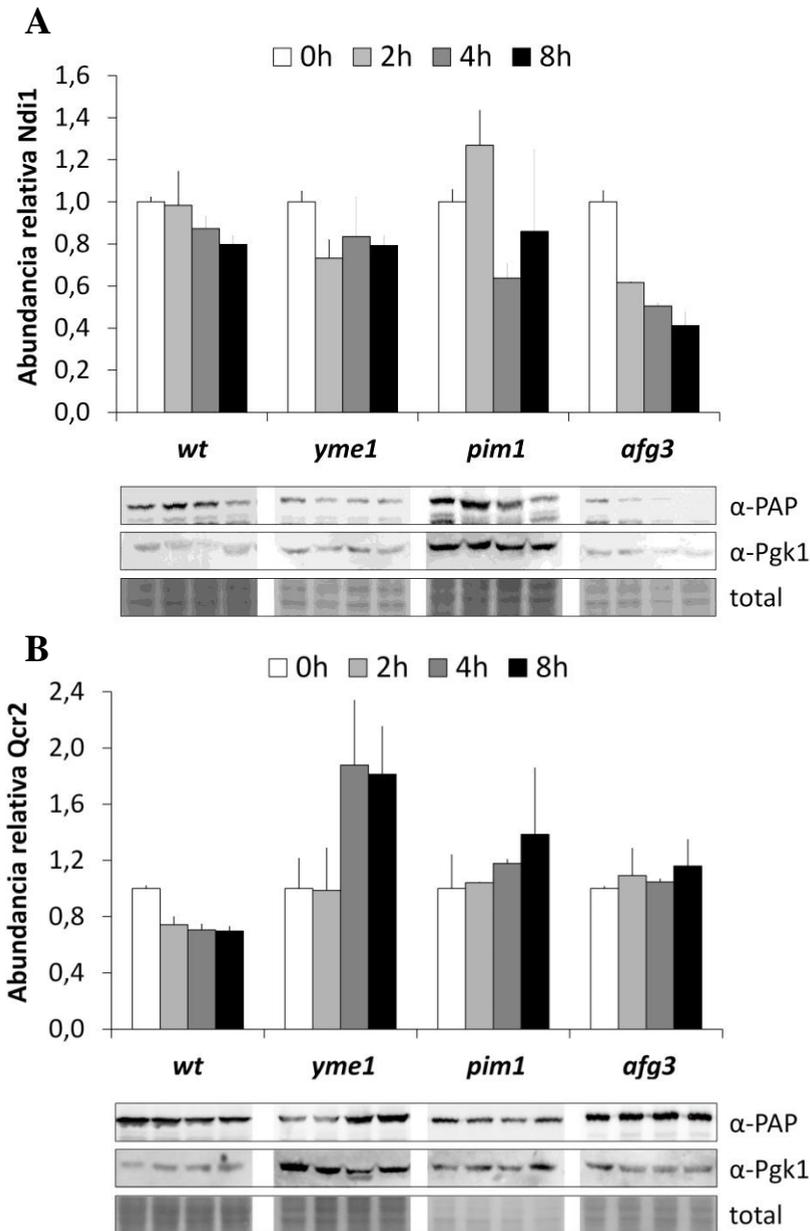


Figura 39. Inmunodetección de las proteínas Ndi1 y Qcr2 en los mutantes de proteasas tras el tratamiento con valinomicina. Las proteasas mitocondriales son necesarias en la mitofagia inducida por valinomicina. Extractos totales de proteína de los mutantes de proteasas de levadura con las proteínas **(A)** Ndi1-TAP y **(B)** Qcr2-TAP, del mismo modo que en la Figura 38. La detección se realizó con el anticuerpo α-PAP, con el control endógeno Pgk1 y el control de carga con la tinción con DB71. Los datos muestran la media y el error típico de dos muestras biológicas, de la cantidad de proteína normalizada frente a Pgk1.

8. Análisis de condiciones alternativas en las que se activa la mitofagia en levadura

La valinomicina es capaz de disminuir la función mitocondrial, provocando la activación de la mitofagia. Pero este mecanismo celular se puede inducir en diferentes condiciones ambientales. Dado que la MAPK Hog1, importante ante la adaptación a estrés salino, se había identificado como inductor de la mitofagia en condiciones de ayuno (Mao *et al.*, 2011), se quiso estudiar si existía una relación entre mitofagia y estrés osmótico. Se analizaron dos cationes diferentes, Na⁺ y Li⁺. Por una parte, un tratamiento con NaCl se sabe que se produce un cambio en el proteoma mitocondrial de levadura para adaptarse al estrés (Martinez-Pastor *et al.*, 2010), por lo que esta degradación de ciertas proteínas (y la consecuente activación de otras) podría estar relacionada íntimamente con la mitofagia específica que se ha observado en apartados anteriores. Por otra parte, aunque no se sabe exactamente el mecanismo, el LiCl se está empezando a estudiar como neuroprotector en enfermedades neurodegenerativas (como la de Parkinson), ya que parece reducir daños parcialmente a través de la ruta autofágica (Hou *et al.*, 2015). Por tanto, ambos fueron buenos candidatos para su análisis.

Se utilizó las mismas condiciones en las que se inducía la mitofagia con valinomicina. Se crecieron las cepas de levadura con las proteínas Ndi1 y Qcr2 marcadas con TAP en el genoma en medio parcialmente respiratorio (YPGalactosa) y se sometió durante 8 horas a un tratamiento con NaCl (1 M) o con LiCl (10 y 50 mM). En estas condiciones, se analizó la abundancia de las proteínas Ndi1 y Qcr2.

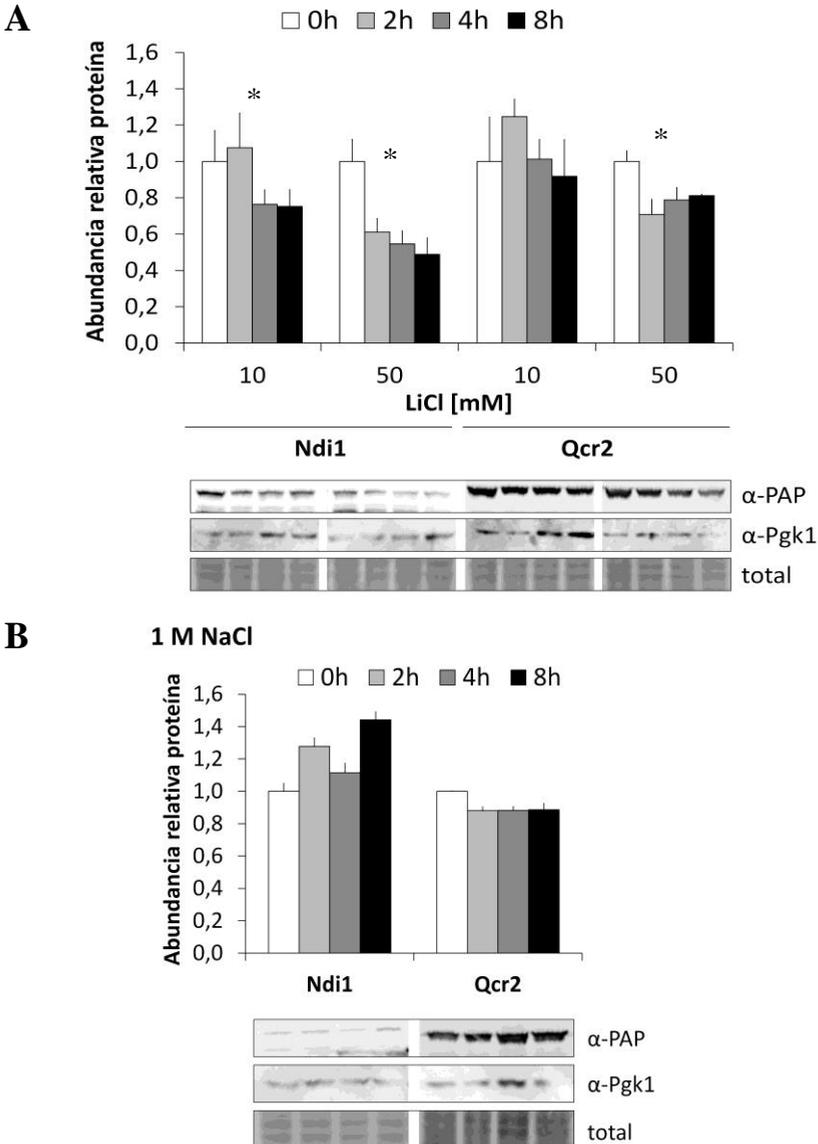


Figura 40. Inmunodetección de las proteínas Ndi1 y Qcr2 ante un tratamiento con NaCl y LiCl. Extractos totales de proteínas de las cepas de levadura con las proteínas Ndi1 y Qcr2 marcadas con TAP, ante tratamientos con **(A)** LiCl (10 mM y 50 mM) y **(B)** NaCl (1 M) durante 8 horas. La detección se realizó con el anticuerpo α -PAP, con el control endógeno α -Pgk1 y el control de carga de tinción de membrana con DB71. Los datos muestran la media y el error típico de dos muestras biológicas. La abundancia de proteína se normalizó en función de la proteína control, Pgk1. La estadística se realizó mediante el test *t de Student*, donde el asterisco (*) indica que existen diferencias significativas entre los valores a 0h y 8h de tratamiento (p -valor < 0,05).

La Figura 40A muestra que el LiCl (50 mM) en estas condiciones sí que parece provocar una degradación tanto del complejo respiratorio I ($p = 0,033$) como del complejo III ($p = 0,039$), por lo que podría tratarse de un inductor de la mitofagia, además de la autofagia. Sin embargo, serían necesarios más estudios para comprobar este fenómeno.

En cambio, el estrés por NaCl no provoca una disminución significativa de estas proteínas (Figura 40B). Se ha demostrado previamente que el NaCl tiene un efecto sobre la mitocondria y su composición proteica, pero no es debido a la activación de la mitofagia. De hecho, experimentos adicionales parecen indicar que ocurre el fenómeno contrario. Por una parte, se comprobó qué ocurría en la mitocondria en presencia de NaCl (1 M) en una cepa con la proteína de membrana externa, Om45, marcada con GFP, mediante *Western Blot*. Este ensayo se utilizaba previamente para determinar que ante un ayuno de nitrógeno, los niveles de Om45 disminuían y la proteína se degradaba, y se relacionaba con una degradación mitocondrial. Ante un tratamiento con NaCl, se demostró de nuevo que esta proteína mitocondrial no se degradaba (Figura suplementaria S13A); y por tanto, no se activaba la mitofagia general ni la específica. Además, en la Figura suplementaria S13B se observa que una cepa wt en presencia de NaCl aumenta su consumo de oxígeno; por lo que parece que no existe ningún fallo en la respiración mitocondrial y que la mitocondria y su función son totalmente necesarias en presencia de NaCl. Aun así, no queda determinado el mecanismo por el que la función mitocondrial es necesaria en respuesta a estrés osmótico.



Capítulo 3

**Caracterización de la proteína
Atg11 en el proceso de mitofagia
inducida por daño mitocondrial**

1. Estudio de la regulación génica y proteica de Atg11

Dado que *ATG11* parecía ser esencial en el proceso de mitofagia inducida por valinomicina, se procedió a su caracterización funcional más detallada. En primer lugar, se llevó a cabo un estudio de su expresión génica en diferentes condiciones para analizar su regulación transcripcional. Para ello, se cuantificó los niveles de mRNA de *ATG11* mediante RT-PCR en una cepa silvestre con el fondo genético BY4741. La cepa se creció en medio mínimo fermentativo durante toda la noche, y se sometió a tres tratamientos durante 2 horas: medio respiratorio (SGal), valinomicina (4 μ M) y LiCl (50 μ M). Como gen de referencia se utilizó *ACT1*. Sin embargo, los niveles de expresión de *ATG11* en estas condiciones no eran lo suficientemente elevados como para ser detectables y obtener resultados fiables y reproducibles (ver Figura suplementaria S14A).

De modo que, en segundo lugar, se analizó la abundancia proteica de Atg11 en una cepa silvestre con el gen *ATG11* etiquetado con el epítipo TAP en el genoma bajo la regulación de su promotor natural. Esta cepa se estudió en diferentes condiciones: en medio fermentativo (SD) o en medio respiratorio (SGlic) durante toda la noche; o se creció en medio SGal durante toda la noche y se sometió a un ayuno de nitrógeno (SD-N), a un tratamiento de 4 μ M de valinomicina y a un tratamiento de 50 μ M de LiCl durante 2 y 6 horas. Los extractos totales de proteínas se analizaron por *Western Blot* con el anticuerpo α -PAP y, como control endógeno, se utilizó la detección mediante el anticuerpo α -Pgc1 para poder normalizar los datos. Sin embargo, tal y como se observa en la Figura suplementaria S14B,

la proteína no era detectable en ninguna de estas condiciones, por lo que no se pudo estudiar su regulación transcripcional ni traduccional.

2. Estudio del efecto de la sobreexpresión de Atg11

Durante el Capítulo 2 se ha descrito que la ausencia de *ATG11* provocaba un retraso en el crecimiento respiratorio de las cepas de levadura y un defecto en la degradación de los complejos I y III de la cadena de transporte electrónico tras un tratamiento con valinomicina. Dado que no se podía analizar su regulación transcripcional ni traduccional sin manipular los niveles de expresión, se decidió estudiar el efecto de la sobreexpresión de Atg11 en levadura. Se generó un plásmido mediante el sistema Gateway® con un promotor constitutivo y con el gen *ATG11* fusionado a la proteína roja fluorescente DsRed (pAG415GPD-*ATG11*-DsRed).

Para comprobar que esta fusión de *ATG11* a DsRed mantenía la función del gen, se transformó en una cepa mutante $\Delta atg11$ con dicha construcción. En la Figura 41, se muestra que el crecimiento del mutante $\Delta atg11$ transformado con la fusión *ATG11*-DsRed se ve restituido en medio respiratorio (SGal), frente al de la misma cepa transformada con el plásmido vacío (para comprobar que el plásmido por sí mismo no interfería en el crecimiento de la cepa). Por tanto, se demostró que la fusión a DsRed del gen *ATG11* era funcional y podía utilizarse como sistema para analizar el efecto de la sobreexpresión de este gen.

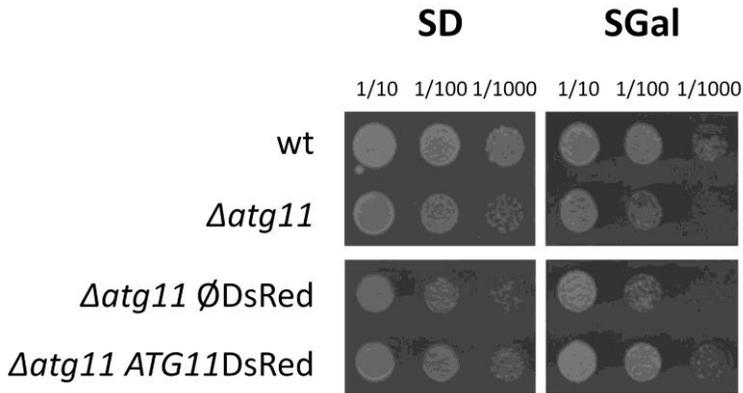


Figura 41. Recuperación del crecimiento respiratorio del mutante *Δatg11* en presencia de la construcción exógena con *ATG11*. Ensayo de crecimiento en medio sólido de la cepa wt frente al mutante *Δatg11* en condiciones fermentativas (SD) y respiratorias (SGal), en medio mínimo suplementado con todos los aminoácidos necesarios para el fondo genético BY4741 (Leu, Ura, His, Met). Comparación del crecimiento del mutante *Δatg11* con el plásmido vacío (ØDsRed) y con la fusión *ATG11*DsRed, en medio mínimo en ausencia de leucina. Se tomaron imágenes de dos experimentos independientes a las 48 y 72 horas de incubación a 28° C.

2.1. Análisis de la localización celular de Atg11 tras su sobreexpresión

El primer ensayo consistió en estudiar, utilizando la fusión de Atg11 a la proteína DsRed, la localización celular de Atg11 en una cepa silvestre y en un mutante *Δatg32*. Para ello, se co-transformó ambas cepas con el plásmido que sobreexpresaba Atg11 y con el vector pVT100U-mtGFP, utilizado en ocasiones anteriores para marcar la mitocondria con fluorescencia verde. Las cepas con ambos plásmidos se crecieron en medio fermentativo (SD) o respiratorio (SGal) durante toda la noche, y se sometieron a un ayuno de nitrógeno (SD-N) o a un tratamiento con valinomicina (4 μM) durante 2 horas. En todas las condiciones, como se muestra en la Figura 42, la sobreexpresión de Atg11 provoca su asociación con la mitocondria, ya que ambas co-localizaban; y dicha asociación era independiente *ATG32*.

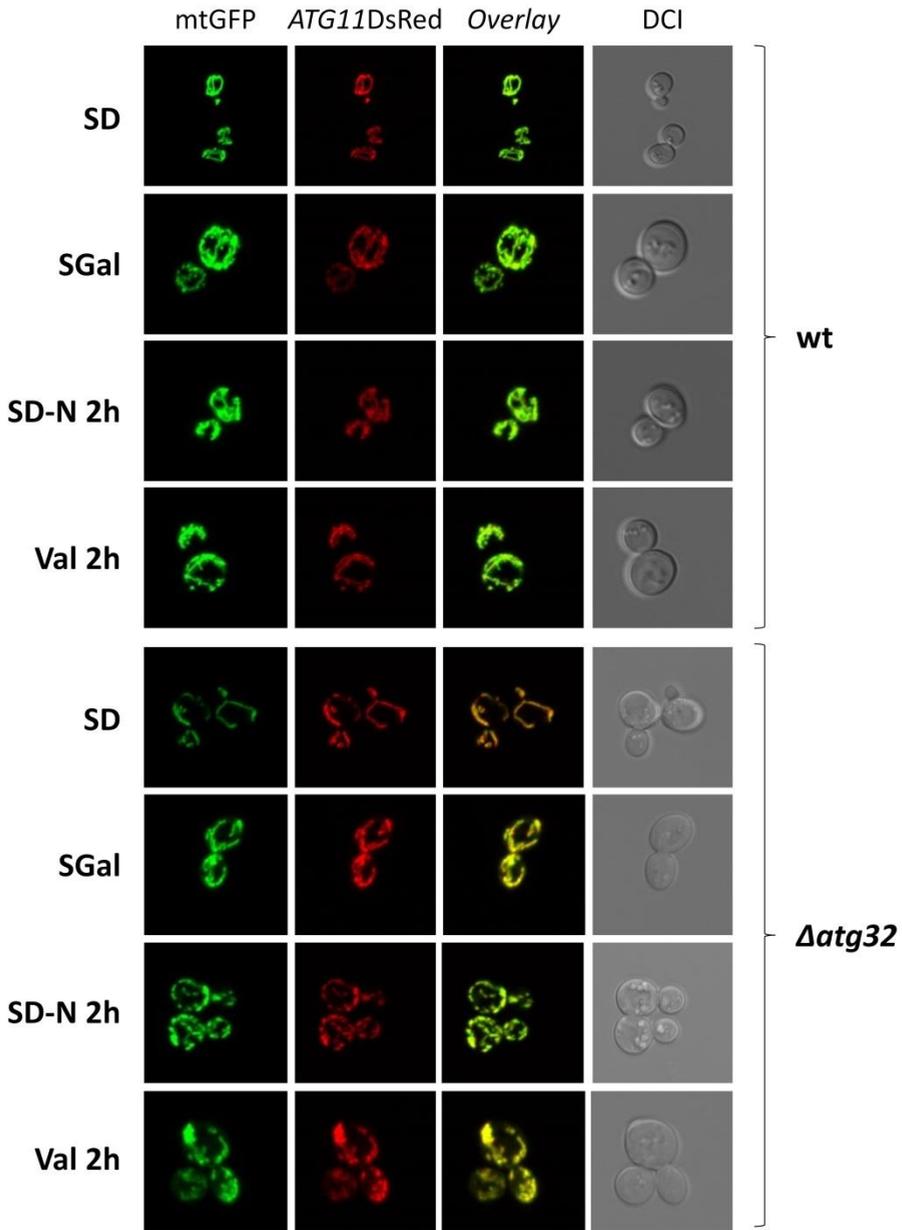


Figura 42. Localización de Atg11 tras su sobreexpresión en levadura. La sobreexpresión de la proteína Atg11 lleva a su localización en la mitocondria en levadura. La cepa silvestre y el mutante $\Delta atg32$ se co-transformaron con los plásmidos pVT100-mtGFP y pAG415GPD-ATG11-DsRed y se crecieron en medio mínimo con glucosa (SD) y con galactosa (SGal) sin leucina y sin uracilo, y se sometieron a un ayuno de nitrógeno (SD-N) y a 4 μM de valinomicina durante 2 horas. Se analizaron por microscopía confocal, donde se observa la mitocondria (verde), Atg11 (rojo), la superposición (*Overlay*) de ambas y la luz transmitida (DCI). Se muestran imágenes representativas para cada condición y mutante.

2.2. Efecto de la sobreexpresión de Atg11 en los complejos I y III de la cadena de transporte electrónico analizado por *Western Blot*

A continuación, se estudió si un aumento en la cantidad de Atg11 intracelular tenía algún efecto sobre la degradación de los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones. Se analizó estas cepas con las proteínas Ndi1-TAP y Qcr2-TAP transformadas con el plásmido de sobreexpresión de Atg11 y, como control, con el plásmido vacío. Como en experimentos anteriores, se extrajo proteína total de estas cepas en medio fermentativo (SD) y respiratorio (SGlic) y se detectó las proteínas de los complejos I y III ante un aumento de Atg11.

Tanto en la detección de proteínas como en la cuantificación de éstas, queda patente que un aumento de la concentración de Atg11 produce un aumento de la degradación de las proteínas Ndi1 y Qcr2 en condiciones fermentativas. De hecho, en ambos casos, los niveles de degradación de proteína en presencia de glucosa llegan a alcanzar los niveles mostrados en un medio sin azúcares fermentables (ver Figura 43). Por lo que parece que la presencia de elevadas cantidades de Atg11 en la célula induce la degradación de los complejos I y III, sin necesidad de que aumente la tasa respiratoria.

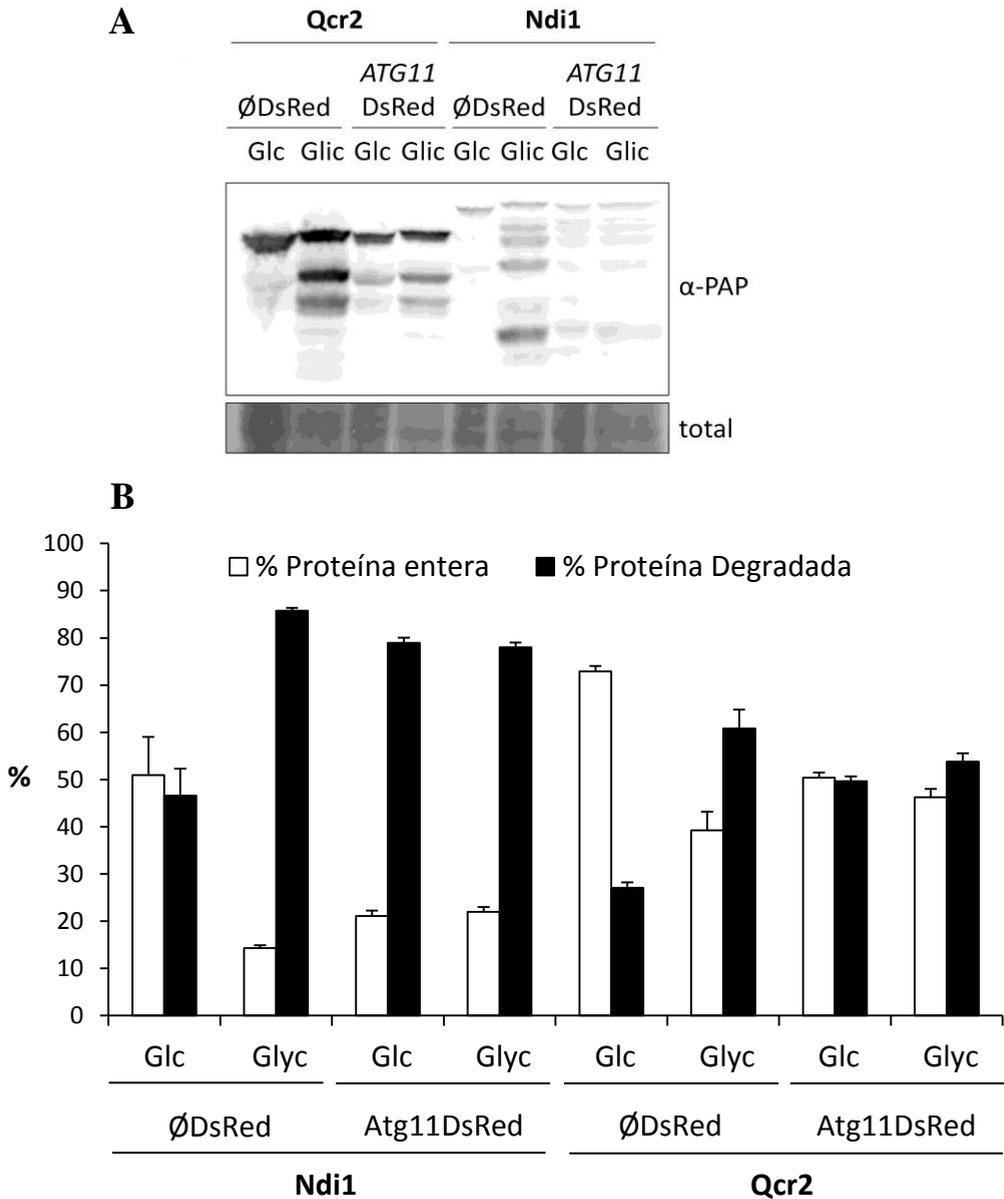


Figura 43. Inmunodetección de las proteínas Ndi1 y Qcr2 ante una sobreexpresión de ATG11. La degradación de los complejos I y III aumenta ante un incremento en los niveles de Atg11 en la célula. **(A)** Las cepas Ndi1-TAP y Qcr2-TAP con el plásmido vacío y con la sobreexpresión de Atg11 se analizaron por *Western Blot* en crecimiento fermentativo y respiratorio (Glc y Glic, respectivamente). La proteína se detectó con el anticuerpo α -PAP y como control de carga se tiñó con DB71 la membrana (total). **(B)** Cuantificación del porcentaje de proteína total correspondiente a proteína entera y degradada para cada cepa y condición. Los datos que se muestran son la media y el error típico de dos muestras biológicas.

2.3. Efecto de la sobreexpresión de Atg11 en los complejos I y III de la cadena de transporte electrónico analizado por microscopía confocal

Por último, se analizó el efecto de ganancia de función de Atg11 mediante el sistema mtRosella y microscopía confocal, para determinar si se podía visualizar una alteración en la degradación de la mitocondria en el interior de la vacuola en estas condiciones. Las cepas silvestre y mutante *Δatg32* se co-transformaron con el plásmido pVT100-mtRosella y con el plásmido con la fusión Atg11-DsRed. Se crecieron durante toda la noche en medio SGal en ausencia de uracilo y leucina, y se sometieron a un tratamiento con 4 μM de valinomicina durante 2 horas; analizándose el porcentaje de células que presentaba mitofagia. Como se observa en la Figura 44, en ausencia de valinomicina, la célula no activa la mitofagia a pesar del aumento de los niveles proteicos de Atg11. En cambio, ante un tratamiento con valinomicina, el porcentaje en la cepa silvestre de células con mitofagia incrementa ligeramente con respecto a los valores que se obtuvieron con niveles fisiológicos de Atg11 (40,8% versus 31,8% [Figura 35]).

Además, en ausencia de *ATG32* ocurre exactamente el mismo incremento de la degradación en presencia de valinomicina, incluso llegando a porcentajes más elevados (44,7%). Por tanto, parece que el aumento de Atg11 produce un incremento en la activación de mitofagia dependiente de valinomicina, pero independiente de *ATG32*. Sin embargo, hay que destacar que el mutante *Δatg32* sí que muestra un pequeño porcentaje de células con mitofagia en ausencia de valinomicina, por lo que una posible función de *ATG32* sería modular o regular este proceso, pero no intervenir directamente en él.

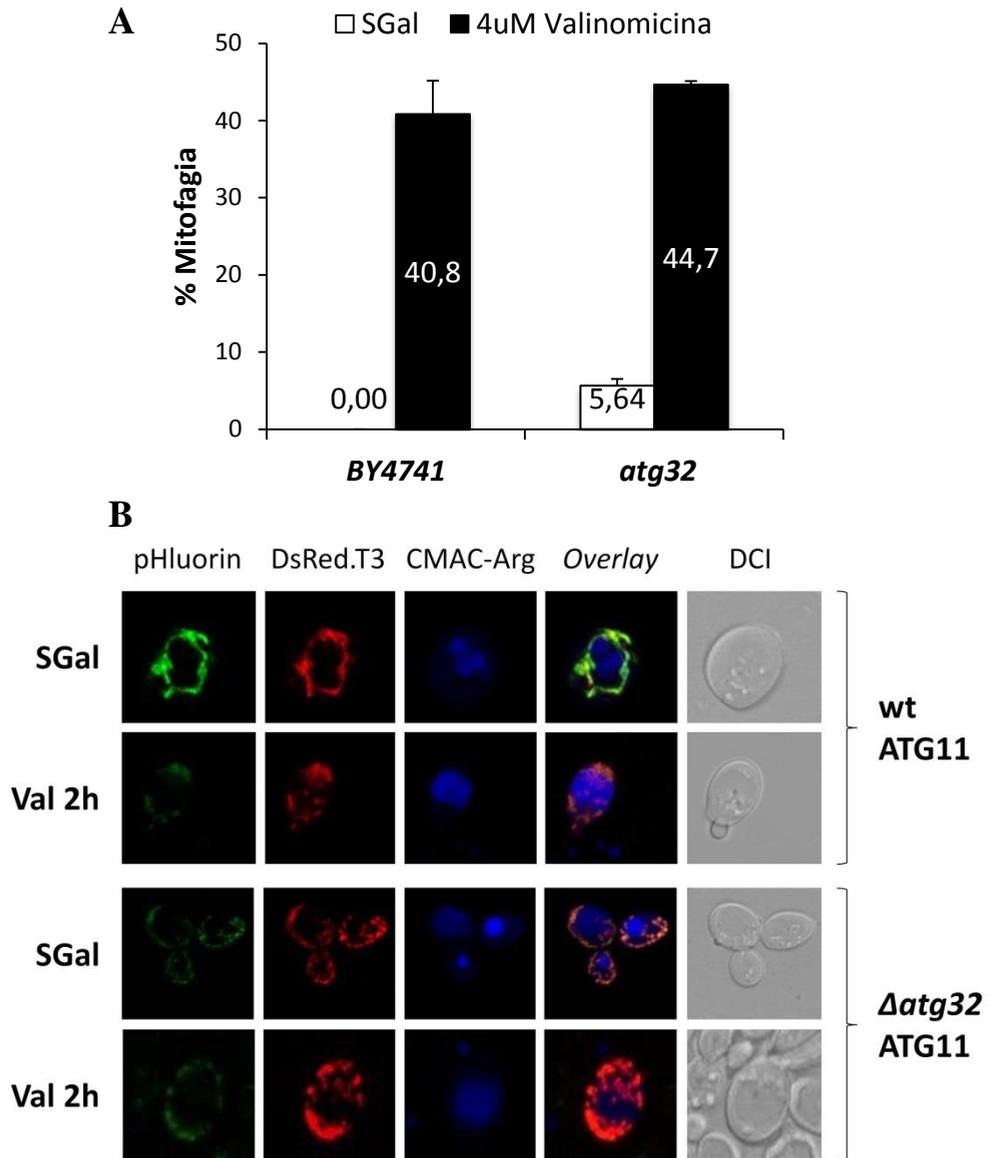


Figura 44. Detección de mitofagia mediante el sistema mtRosella ante la sobreexpresión de *ATG11* en la cepa silvestre y en un mutante *Δatg32*. La sobreexpresión de *ATG11* produce un aumento en el % de mitofagia en una cepa silvestre y en ausencia de *ATG32*. Ambas cepas de levadura (wt y *Δatg32*) co-transformadas con los plásmidos pVT100U-mtRosella y *ATG11*-DsRed se crecieron en SGal durante toda la noche y se sometieron a un tratamiento de 4 μ M de valinomicina durante 2 horas. Antes del ensayo, se tiñó las vacuolas con CMAC-Arg (100 μ M) durante 30 minutos (azul). **(A)** Cuantificación del porcentaje de células que presentaban mitofagia ante la sobreexpresión de *ATG11*, de un total de 50 células, para cada cepa y condición. **(B)** Imágenes representativas de la mitocondria en verde (pHluorin) y rojo (DsRed.T3), de la vacuola (CMAC-Arg) y de la luz transmitida (DCI).

3. Localización de Atg11 en niveles endógenos

ATG11 es un gen implicado en la mitofagia inducida por valinomicina y parece que su sobreexpresión produce su asociación a la mitocondria (Figura 42). Sin embargo, es importante determinar su localización celular durante la inducción de mitofagia cuando se expresa a niveles fisiológicos. Se analizó una cepa silvestre con el gen *ATG11* etiquetado con el epítipo GFP en el locus genómico por microscopía confocal. En este caso, se quiso analizar también la mitocondria debido a su relación con este gen. Para teñirla con otro tipo de fluorescencia, se utilizó una construcción de una proteína mitocondrial de la membrana externa, Om14 (*Outer Membrane*), fusionada a la proteína roja fluorescente DsRed, expresada de forma constitutiva (pAG415GPD-OM14-DsRed). Las cepas Atg11-GFP con fondo genético silvestre y en un mutante $\Delta atg32$ se transformaron con este plásmido para observar la mitocondria en rojo y la proteína Atg11 en verde.

Las células se crecieron en diversas condiciones para observar cambios en su localización: condiciones fermentativas (SD) y respiratorias (SGal) durante toda la noche. Las células crecidas en un medio con glucosa, se sometieron a un cambio diáuxico, transfiriéndose a un medio con galactosa durante 2 horas. Las células con metabolismo respiratorio, por su parte, se sometieron a un tratamiento con 4 μ M de valinomicina o a un ayuno de nitrógeno (SD-N) durante 2 horas.

En general, en la cepa silvestre en condiciones fermentativas o respiratorias, no se detectaba la proteína Atg11 en la célula. Esto es debido a que su abundancia es relativamente baja y es difícil detectarla mediante microscopía confocal.

Resultados

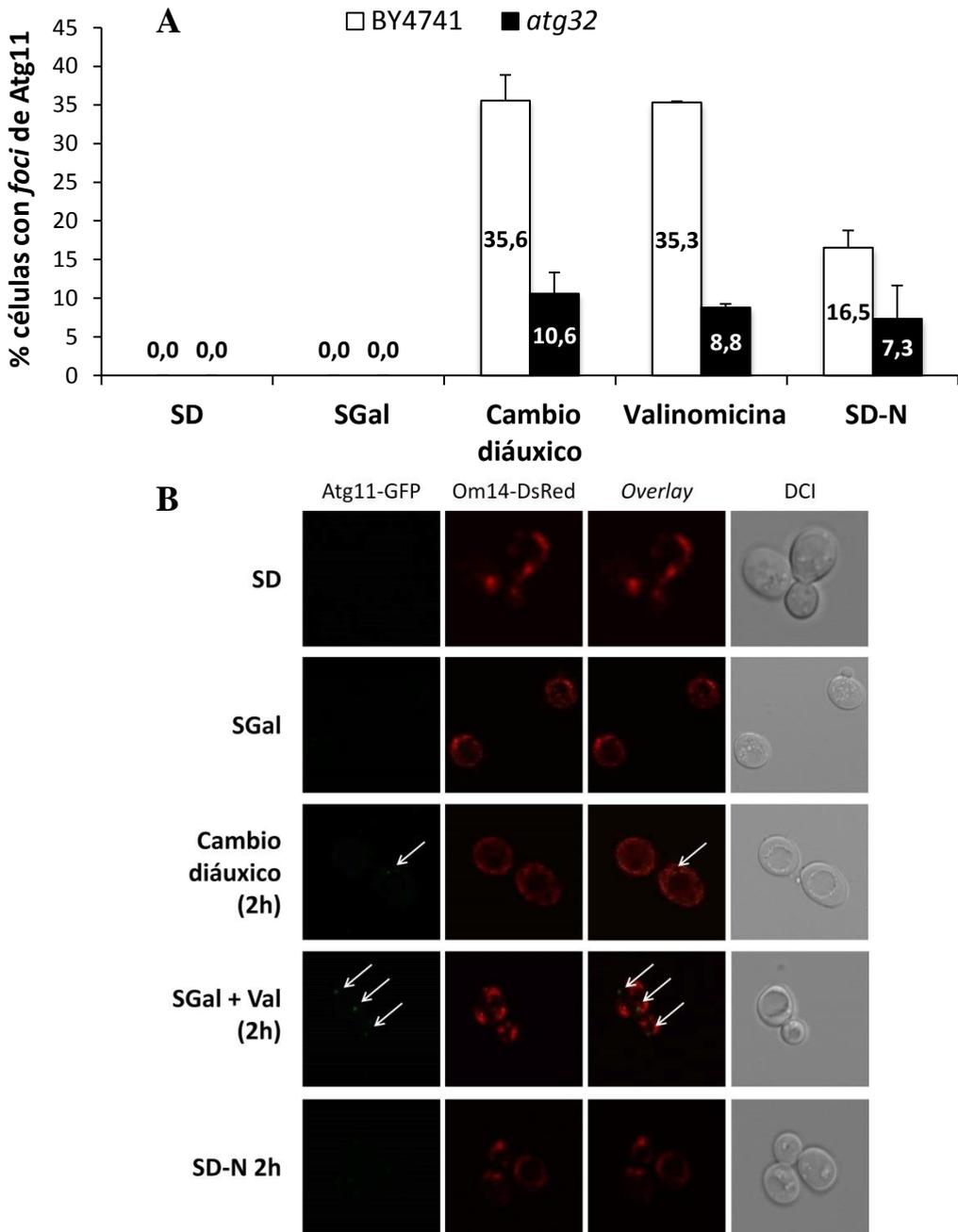


Figura 45. Detección de Atg11 en niveles endógenos por microscopía confocal. Se observan *foci* de Atg11 próximos a la mitocondria ante cambio diáuxico y valinomicina, dependientes de *ATG32*. La cepa *Atg11-GFP* (silvestre y $\Delta atg32$) transformada con pAG415GPD-*OM14*-DsRed se estudió por microscopía en condiciones fermentativas (SD), respiratorias (SGal), cambio diáuxico, valinomicina y ayuno de nitrógeno. **(A)** Porcentaje de células que presentan los *clusters* en cada condición, de al menos 50 células. **(B)** Imágenes del wt representativas para cada condición de *Atg11-GFP* (verde), *Om14-DsRed* (rojo), la superposición y la luz transmitida (DCI). Ver Figura suplementaria S14 para $\Delta atg32$.

En cambio, en la fase diáuxica y ante un tratamiento con valinomicina se observaba en un alto porcentaje de células (36,8% y 36,3%, respectivamente) unos *clusters* de Atg11 cercanos a la mitocondria (Figura 45) que demuestran la aparición de cuerpos autofágicos (*autophagic bodies*) en estas condiciones. En menor medida, también se detectaban estos *clusters* ante un ayuno de nitrógeno (18,6%). En todos los casos, esta serie de *foci* de Atg11 se localizaba cercanos a la mitocondria.

En el caso de la cepa $\Delta atg32$, estos *clusters* se observaban en las mismas condiciones que en la cepa silvestre (cambio diáuxico, tratamiento con valinomicina y ayuno de nitrógeno), pero en un porcentaje menor de células (ver Figura 45A y Figura suplementaria S15). En ninguno de los dos casos, aparecían estos cuerpos autofágicos en condiciones normales de crecimiento. Por tanto, a pesar de que *ATG32* no parece un gen esencial en el proceso de mitofagia inducida por valinomicina, sí que parece tener un papel importante en la formación o en la determinación de la localización cercana a la mitocondria de estos *foci* de Atg11.

4. Estudio de las interacciones proteicas de Atg11

Una de las formas de estudiar la función de una proteína es analizar con qué proteínas interacciona. En la literatura previa, se describen múltiples interacciones de Atg11, principalmente relacionadas con su actividad autofágica (He *et al.*, 2006; Cheong *et al.*, 2008; Mao *et al.*, 2013), y su interacción con Atg8 y Atg32 en la mitofagia en condiciones de ayuno (Aoki *et al.*, 2011; Farré *et al.*, 2013). Sin embargo, en este estudio nos interesaba conocer con qué proteínas interaccionaba Atg11 ante un

tratamiento con valinomicina y si se producían cambios en las interacciones con respecto a condiciones normales de crecimiento. Para ello, se utilizó el sistema de doble híbrido que permite detectar *in vivo* interacciones proteína-proteína (explicado en el apartado 10 de Materiales y Métodos). El ensayo doble híbrido se realizó mediante la co-transformación de la cepa THY.AP4 con el plásmido pBTM116, donde se clonó el gen *ATG11* con el dominio de unión al DNA LexA; y una librería de fragmentos genómicos clonados en el vector pACT, que posee el dominio de activación de la transcripción, Gal4AD.

4.1. Comprobación del sistema de doble híbrido: interacción Atg11-Atg32

Antes de realizar el rastreo de proteínas que interaccionan con Atg11, se quiso comprobar que el sistema utilizado de doble híbrido funcionaba. Se utilizó una interacción conocida: Atg11-Atg32 (descrita previamente por Aoki *et al.*, 2011 y Mao *et al.*, 2011). Por lo que en este caso se clonó el plásmido pACT2 con el gen *ATG32* y se co-transformó junto con el vector pBTM116-*ATG11*. Como control negativo, se utilizó la cepa THY.AP4 co-transformada con ambos plásmidos vacíos; y, para descartar el fenómeno de transactivación, se utilizó como control negativo las cepas co-transformadas con un plásmido vacío y el otro vector con el gen correspondiente. Las cepas co-transformadas, para seleccionar ambos plásmidos, se crecieron en medio mínimo en todos los casos en ausencia de leucina y triptófano. Para evaluar la interacción, se realizó ensayos de crecimiento en ausencia, además, de histidina, de adenina o de ambas (que son dos de los genes reporteros de la interacción); y se evaluó en presencia

o en ausencia de valinomicina (4 μ M), para observar posibles reajustes ante un daño mitocondrial.

Como se observa en la Figura 46, únicamente la cepa que contenía ambos genes *ATG11* y *ATG32* (unidos a los dominios de unión y activación, respectivamente) era capaz de crecer en un medio sin His y Ade. La interacción ocurre tanto en presencia como en ausencia de valinomicina. La histidina es el reportero menos restrictivo y permite cierto crecimiento de las cepas control. En cambio, la adenina es un reportero fuerte, que sólo permite el crecimiento si hay interacción.

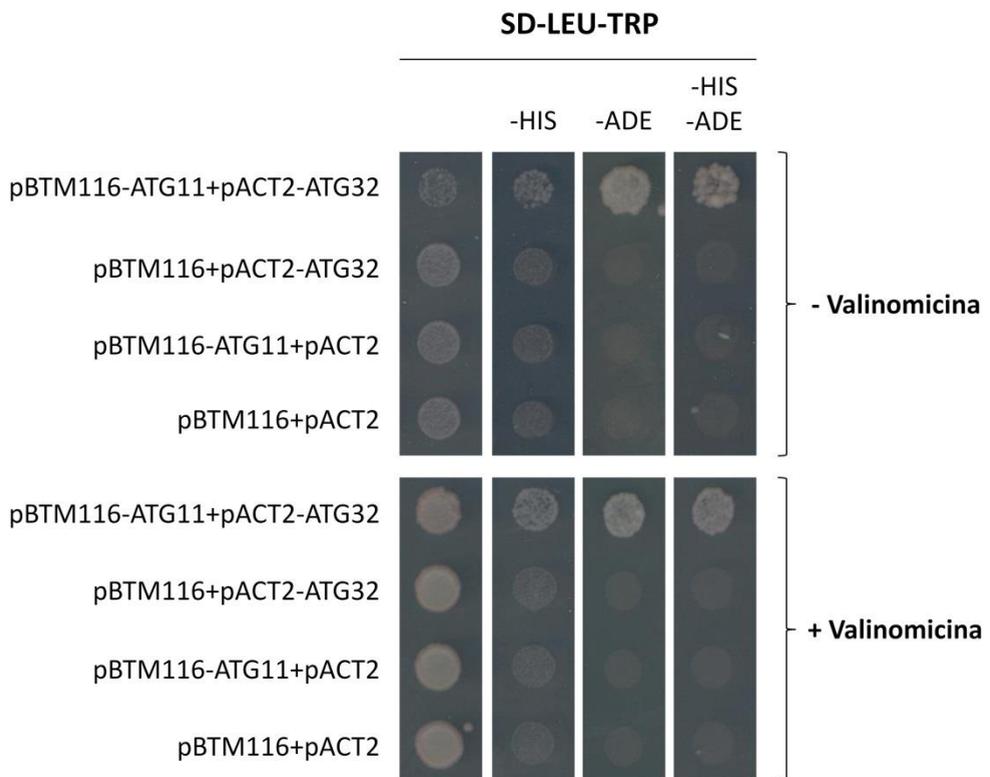


Figura 46. Ensayo de doble híbrido de las proteínas Atg11 y Atg32. Existe una fuerte interacción entre Atg11 y Atg32 con y sin valinomicina. Como controles negativos se utilizaron las cepas con uno o ambos vectores vacíos. Las células se crecieron en medio mínimo SD suplementado con His, Ura y Ade; y luego se depositaron en placas de los medios indicados, en presencia o ausencia de valinomicina (4 μ M), y en ausencia de los aminoácidos indicados. Se tomaron imágenes a las 48-72 horas de incubación a 28 $^{\circ}$ C.

Por tanto, parece que el sistema funciona y que sirve para detectar interacciones con la proteína Atg11. Además, los controles nos indican que no existe activación de los genes reporteros en ausencia de uno de los dos dominios (unión o activación), lo que ayuda a evitar falsos positivos.

Además, se quiso analizar cuantitativamente esta interacción por medio de la actividad β -galactosidasa del tercer reportero, *LacZ*; para estudiar de forma más precisa las posibles diferencias en la interacción Atg11-Atg32 según las condiciones ambientales. Las células se evaluaron en condiciones respiratorias (SGal) y tras un ayuno de nitrógeno o un tratamiento con valinomicina (4 μ M), durante 2 horas y durante toda la noche. Como control negativo, se utilizó la cepa con el vector pBTM116-*ATG11* y el pACT2 vacío.

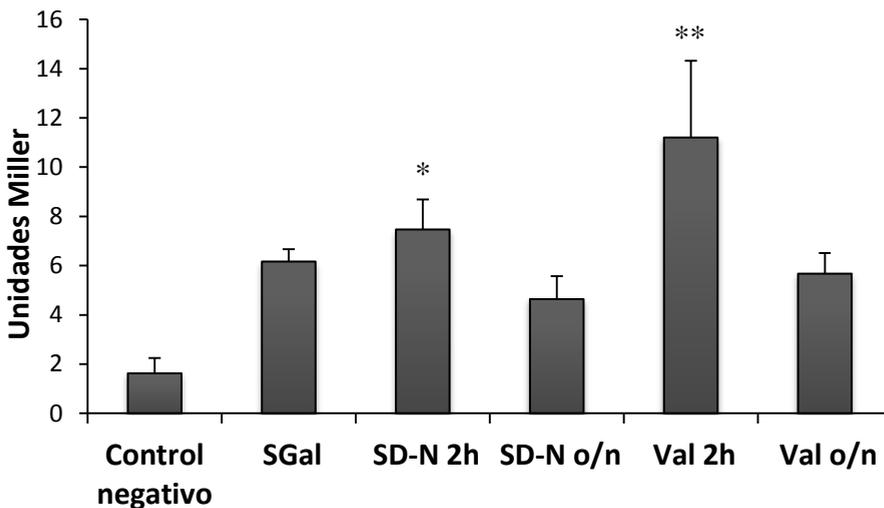


Figura 47. Actividad β -galactosidasa obtenida a partir de la interacción Atg11-Atg32 en diferentes condiciones. Las células co-transformadas con pBTM116-*ATG11* y pACT2-*ATG32* se crecieron en medio respiratorio, y se sometieron a un ayuno de nitrógeno o a un tratamiento con valinomicina (4 μ M) durante 2 horas o toda la noche. Como control, se utilizó la cepa con los vectores pBTM116-*ATG11* y pACT2 en medio respiratorio. Las células se crecieron a una OD = 0,5-0,6 y se calculó las unidades Miller del ensayo por triplicado y en tres clones independientes. En el gráfico se muestra la media con el error típico para cada condición. El tratamiento estadístico de datos se realizó por medio del test *t de Student*, comparando con la actividad en medio SGal, donde el asterisco (*) significa un p-valor < 0,05 y el doble asterisco (**) indica un p-valor < 0,01.

La actividad β -galactosidasa aumentaba significativamente en las células tras dos horas de ayuno de nitrógeno (p -valor = 0,011) y de tratamiento con valinomicina (p -valor = 0,001); con respecto al crecimiento en medio respiratorio. Esto representa que la interacción entre Atg11 y Atg32 parece ser más fuerte en estas dos condiciones (ver Figura 47). Sin embargo, tras una noche de ambos tratamientos, los niveles de actividad β -galactosidasa vuelven a disminuir a niveles similares a los iniciales.

4.2. Rastreo de proteínas que interaccionan con Atg11 en presencia y ausencia de valinomicina

El rastreo (*screening*) de interacciones permite situar a una proteína en un proceso biológico determinado. Bajo esta premisa, se realizó un análisis de doble híbrido enfrentando Atg11 contra una librería de fragmentos genómicos de levadura. Para ello, se co-transformó la cepa THY.AP4 con el plásmido pBTM116-ATG11 con la librería de fragmentos en el vector pACT, y se seleccionaron todas las células en un medio con His, Ade y Ura, para obtener todos los clones posibles.

A continuación, se inoculó dichos clones en placas de restricción media (sin His) o fuerte (sin His y Ade). Además, una parte de las células se creció en las mismas condiciones pero en presencia de valinomicina (4 μ M). Las colonias positivas se replicaron para realizar un ensayo colorimétrico en placa de su actividad β -galactosidasa (apartado 10.4 de Materiales y Métodos) y se seleccionaron los clones que presentaban una coloración azul, tanto para el crecimiento normal como en presencia de valinomicina. En este punto, se seleccionaron 99 clones, 48 positivos en SD y 51 positivos en valinomicina.

Para evitar falsos positivos, se extrajeron los plásmidos de dichos clones y se transformó en bacterias KC8, para seleccionar únicamente los plásmidos pACT. Estos plásmidos pACT positivos se re-transformaron en levadura y se comprobó que mantenían el fenotipo positivo para crecimiento en ausencia de His y Ade. El número de clones positivos en este punto se redujo a 19 en condiciones normales y 22 en un tratamiento con valinomicina, y se enviaron a secuenciar para saber qué ORF contenían y si se encontraba en pauta de lectura.

Los clones más interesantes obtenidos se encuentran recogidos en las Tablas 4 y 5, en presencia y ausencia de valinomicina, respectivamente. Además, se encontraron algunos ORFs o fragmentos genómicos que, a día de hoy, se desconoce qué codifican o la función de su proteína. No existen grandes diferencias entre las interacciones de la proteína Atg11 en presencia o ausencia de valinomicina, y en ambas aparecen proteínas similares.

Una de las limitaciones de este ensayo es la detección de interacciones entre proteínas que no pueden ocurrir en el núcleo, entre ellas, las proteínas de membrana, que podrían ayudar a saber qué es lo que dirige a Atg11 a la mitocondria en ciertas condiciones para activar la mitofagia. Sin embargo, se han encontrado interacciones interesantes.

De entre las proteínas encontradas destacan las proteínas relacionadas con la regulación de la transcripción y la traducción, con el proceso de glicólisis y gluconeogénesis, como Gpm1, Fba1, Hxk2, Tpi1 o Adh1; y la propia proteína Atg11, que ya se había descrito anteriormente que formaba dímeros u oligómeros (Yorimitsu and Klionski, 2005).

<i>Proteína</i>	<i>Función</i>	<i>Nº clones</i>	<i>a.a. interacción</i>	<i>a.a. totales</i>
Rrp43	Componente no catalítico del complejo exosoma. Actividad endonucleasa 3'-5' y procesamiento y maduración del RNA en el núcleo y el citoplasma	1	14-259*	395
Atg11	Proteína adaptadora en autofagia específica. Mitofagia y pexofagia	2	969-1179 (2)	1179
Slx4	Endonucleasa. Procesamiento de DNA	4	387-662* 387-648* 387-646* 387-469*	749
Gpm1	Enzima que participa en la glicólisis y gluconeogénesis. Conversión de 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato	5	8-244* 11-248 (2) 16-248 8-221*	248
Hxk2	Enzima glicolítica. Fosforilación de la glucosa en el citosol	2	213-406* 213-487	487
Tpi1	Enzima glicolítica. Conversión reversible de gliceraldehido 3-fosfato a dihidroxiacetona fosfato	1	103-249	249
Ntr2	Desensamblaje del espliceosoma	1	16-263*	323
Fur1	Ruta de la pirimidina. Síntesis de UMP a partir de uracilo	1	117-217	217
Adh1	Enzima glicolítica. Reducción de acetaldehído a etanol. Activa en forma de homo- y heterotetrámeros	1	323-332*	349

Tabla 4. Relación de las proteínas más características obtenidas en el ensayo de doble híbrido en condiciones fermentativas. Se enfrentó la proteína Atg11 frente a una colección de fragmentos genómicos en medio SD. Se muestra las proteínas a las que correspondían los fragmentos que interactuaban con Atg11, con su función y el número de clones que se obtuvo en este ensayo. También el fragmento secuenciado para cada clon (a.a. interacción), y el tamaño de la proteína (a.a. totales). Entre paréntesis se indica si existe más de un clon con la misma secuencia de interacción con Atg11. El asterisco (*) indica que el último aminoácido corresponde al último aminoácido que se pudo secuenciar, aunque el clon pudiese contener un fragmento más largo.

Proteína	Función	Nº clones	a.a. interacción	a.a. totales
Asn2	Ruta biosintética de la asparagina. Síntesis de L-asparagina a partir de L-aspartato	1	347-553	573
Gpm1	Enzima que participa en la glicólisis y gluconeogénesis. Conversión de 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato	8	5-248 9-248 (3) 11-248 (3) 11-244*	248
Fba1	Enzima de la glicólisis y gluconeogénesis. Conversión de fructosa 1,6-bisfosfato a gliceraldehido 3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato. Se localiza en la membrana externa mitocondrial ante estrés oxidativo	2	87-233* 87-238*	360
Hxk2	Enzima glicolítica. Fosforilación de la glucosa en el citosol	3	213-487 247-487 213-408*	487
Tpi1	Enzima glicolítica. Conversión reversible de gliceraldehido 3-fosfato a dihidroxiacetona fosfato	1	103-249	249
Caf120	Parte del complejo de regulación transcripcional CCR4-NOT	1	701-979*	1061
Atg11	Proteína adaptadora en autofagia específica. Mitofagia y pexofagia	3	969-1179 (3)	1179
Ntr2	Desensamblaje del espliceosoma	1	16-292*	323
Ifh1	Regulación de la transcripción de proteínas ribosomales	1	620-878	1089

Tabla 5. Relación de las proteínas más características obtenidas en el ensayo de doble híbrido en presencia de valinomicina. Se enfrentó la proteína Atg11 frente a una colección de fragmentos genómicos en medio SGal con 4 μ M de valinomicina. Se muestra las proteínas a las que correspondían los fragmentos que interactuaban con Atg11, con su función y el número de clones que se obtuvo en este ensayo. También el fragmento secuenciado para cada clon (a.a. interacción), y el tamaño de la proteína (a.a. totales). Entre paréntesis se indica si existe más de un clon con la misma secuencia de interacción con Atg11. El asterisco (*) indica que el último aminoácido corresponde al último aminoácido que se pudo secuenciar, aunque el clon pudiese contener un fragmento más largo.

Gpm1 (*Glycerate PhosphoMutase*) convierte el 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato durante la glicólisis, y media la acción reversa durante la gluconeogénesis. Fba1 (*Fructose 1,6-Bisphosphate Aldolase*) cataliza la conversión de fructosa 1,6-bisfosfato a gliceraldehido 3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato, y se localiza en la membrana externa mitocondrial ante estrés oxidativo. Hxk2 (*HeXoKinase*) se encarga de fosforilar la glucosa en el citosol y está regulada, entre otras proteínas, por la quinasa Snf1. Y Tpi1 (*Triose-Phosphate Isomerase*) lleva a cabo la interconversión reversible de gliceraldehido 3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato, por lo que su represión induce el metabolismo respiratorio.

Todas estas proteínas están implicadas en diferentes pasos de las rutas de glicólisis y gluconeogénesis (ver Figura suplementaria S16 para ver un esquema del proceso y sus enzimas implicadas). Hasta ahora, en levadura, no se había relacionado estas enzimas con el proceso de mitofagia. En cambio, en humano, recientemente se ha publicado ciertos estudios en los que se muestra una conexión entre las proteínas glicolíticas, principalmente las hexoquinasas, con la mitofagia en presencia de PINK1 (revisado por Roberts and Miyamoto, 2015). Esta función de las hexoquinasas se activa tras su translocación a la mitocondria. Por tanto, no parece tan inverosímil el hecho de que en levadura pueda existir un mecanismo similar, que explicaría la interacción de estas proteínas con Atg11.

4.3. Verificación de los principales genes obtenidos por doble híbrido

Para verificar que no se trataba de falsos positivos, en primer lugar, se descartó el efecto de transactivación. Se realizó un ensayo de

Resultados

crecimiento en condiciones restrictivas de los clones obtenidos por doble híbrido, y como control se utilizó la cepa con el plásmido pBTM116 vacío. En la Figura 48 se comprueba que el crecimiento de las cepas en ausencia de *ATG11* era nulo en un medio sin His y Ade, aunque podían crecer con cierto retraso en ausencia únicamente de His.

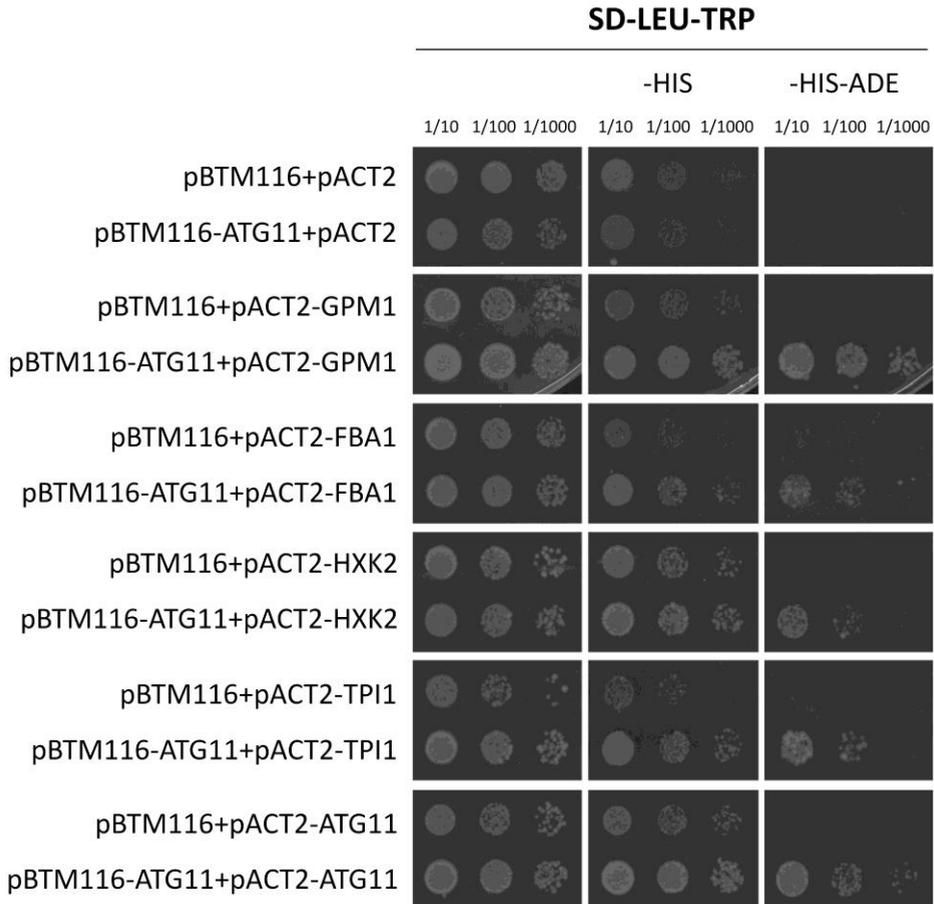


Figura 48. Verificación de los genes obtenidos en el ensayo de doble híbrido. Las proteínas Gpm1, Fba1, Hxk2, Tpi1 y Atg11 demuestran una interacción específica con Atg11 en el sistema doble híbrido. Se realizó un ensayo de crecimiento en medio sólido para los clones positivos para el ensayo de doble híbrido y para las cepas con el plásmido pBTM116 vacío. Se llevó a cabo 3 diluciones seriadas (1/10, 1/100, 1/1000), en medio SD en ausencia de los aminoácidos indicados. Se tomaron imágenes a las 48 y 72h de crecimiento a 28° C.

En cambio, las cepas con ambos genes clonados en sus respectivos vectores, no presentaban dificultades para crecer en dichos medios. Por lo que la presencia de los vectores no activaba por sí misma la transcripción de los genes reporteros en este ensayo.

Dado que el sistema de doble híbrido no representa un método completamente fiable para la búsqueda de interacciones proteicas, en segundo lugar, se utilizó otro método para confirmar las interacciones encontradas. Se procedió, entonces, a realizar experimentos de co-inmunoprecipitación de estas proteínas con Atg11. Para ello, se clonó el gen *ATG11* en un plásmido con el epítipo HA, expresado de forma constitutiva (*pAG416GPD-ATG11-HA*). Éste se transformó en las cepas BY4741 con las proteínas glicolíticas (Gpm1, Fba1, Hxk2 y Tpi1) y Atg11 etiquetadas con el epítipo TAP bajo el control de promotores endógenos.

En el caso de los genes glicolíticos, las cepas se crecieron en medio mínimo fermentativo (SD) y respiratorio parcial y total (SGal y SGlic, respectivamente), y se extrajo proteína para la inmunoprecipitación. Como control negativo se utilizó la cepa con el fondo genético BY4741 sin ningún gen marcado con TAP, pero transformada con la construcción Atg11-HA. Tras la inmunoprecipitación, todos ellos, excepto el control negativo y Gpm1, presentaban la banda de Atg11-HA en todas las condiciones; por lo que se confirma su interacción (ver Figura 49). En el caso de Gpm1, pese a ser una de las proteínas con un mayor número de clones obtenidos, no se pudo ratificar dicha unión a Atg11.

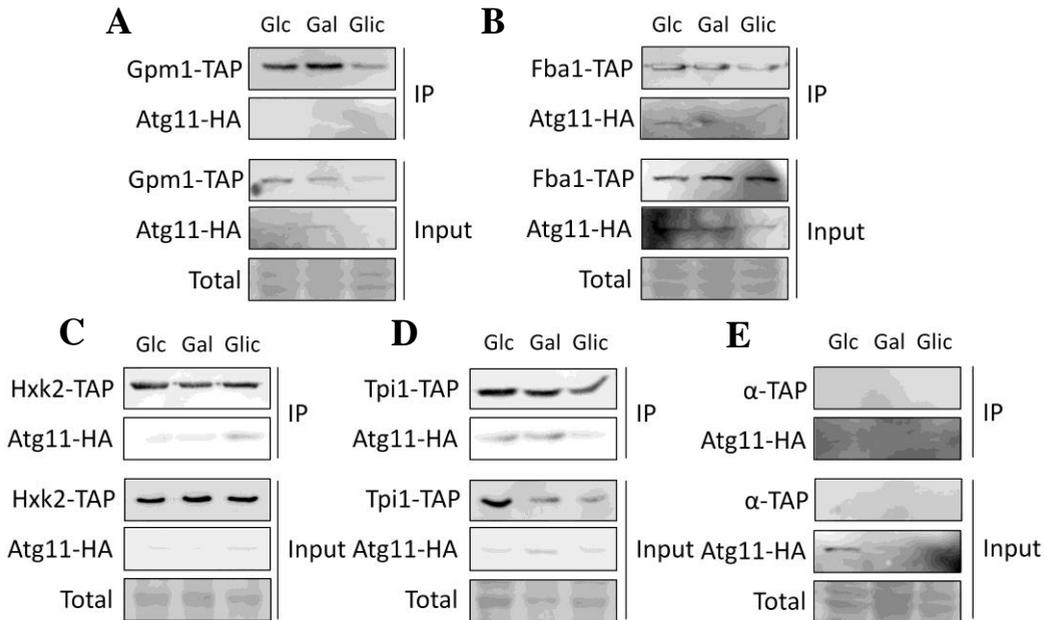


Figura 49. Co-inmunoprecipitación de la proteína Atg11 con las proteínas glicolíticas obtenidas en el ensayo de doble híbrido. Verificación de la interacción de Fba1, Hxk2 y Tpi1 con Atg11. Los experimentos de co-inmunoprecipitación se realizaron a partir de extractos totales de proteína de las células de levadura con la construcción Atg11-HA en presencia de la proteína glicolítica determinada etiquetada con TAP. Se llevaron a cabo en medio fermentativo (Glc) y respiratorio (Gal, Glic). Como control se utilizó la cepa silvestre que expresaba Atg11-HA. Se muestran las membranas del *Western Blot* incubadas con α -PAP y α -HA, tanto de la muestra inicial (*Input*) como de la muestra tras la co-purificación con las bolas magnéticas (IP). El control de carga se realizó con la tinción de la membrana con DB71 (Total). **(A)** Gpm1-TAP; **(B)** Fba1-TAP; **(C)** Hxk2-TAP; **(D)** Tpi1-TAP; **(E)** Control negativo BY4741.

5. Estudio de la interacción Atg11-Atg11

Atg11 es imprescindible para el proceso de mitofagia inducido por valinomicina. Además, existe una interacción Atg11-Atg11 que podría llevar a la formación de *clusters* cerca de la mitocondria durante la respuesta al daño mitocondrial. Por lo tanto, se estudió si existía una interacción regulada entre proteínas Atg11 en diversas condiciones ambientales por co-

inmunoprecipitación. Por una parte, una cepa que coexpresaba Atg11-TAP y Atg11-HA se sometió a crecimiento fermentativo (SD), y luego a un cambio diáuxico a un medio con galactosa durante 2 horas. Además, por otra parte, se creció en medio respiratorio (SGal) y se sometió a un ayuno de nitrógeno y a un tratamiento con valinomicina (4 μ M) durante 2 horas. Como controles, se utilizó la cepa con el fondo genético BY4741 con la construcción Atg11-HA y la cepa con el gen *ATG11* etiquetado con TAP en el genoma sin transformar con el plásmido con Atg11-HA.

Ambos controles muestran que las construcciones funcionan y que tras la co-inmunoprecipitación, Atg11 tiene afinidad para unirse consigo mismo levemente en condiciones de crecimiento respiratorio (SGal) y más intensamente ante un tratamiento con valinomicina (Figura 50A). Para saber de un modo más preciso cuándo se inducía la interacción Atg11-Atg11 ante un tratamiento con valinomicina, se sometió a las mismas cepas al mismo tratamiento durante 10 minutos, 30 minutos y 2 horas; y se analizó las muestras del mismo modo.

La Figura 50B muestra que la banda más intensa de interacción aparece a las 2 horas de tratamiento, por lo que es una respuesta relativamente inmediata y podría estar relacionada con los *clusters* de Atg11 que se observaban en estas condiciones por microscopía confocal al mismo tiempo.

La proteína Atg11 es capaz de asociarse consigo misma, formando homo-dímeros u homo-oligómeros, de una forma regulada negativamente por la quinasa Atg1 (Yorimitsu and Klionski, 2005). En este estudio, se ha demostrado esta interacción mediante el ensayo de doble híbrido y mediante la co-inmunoprecipitación de proteínas. El ensayo de doble

híbrido, además, nos aportó información sobre esta unión, ya que todos los clones obtenidos de Atg11 en este ensayo (un total de 4) presentaban una secuencia aminoacídica común: del aminoácido 969 al 1179 (ver Tablas 4 y 5). Por tanto, en esa zona tienen que encontrarse los motivos de interacción que le permiten dimerizar/oligomerizar.

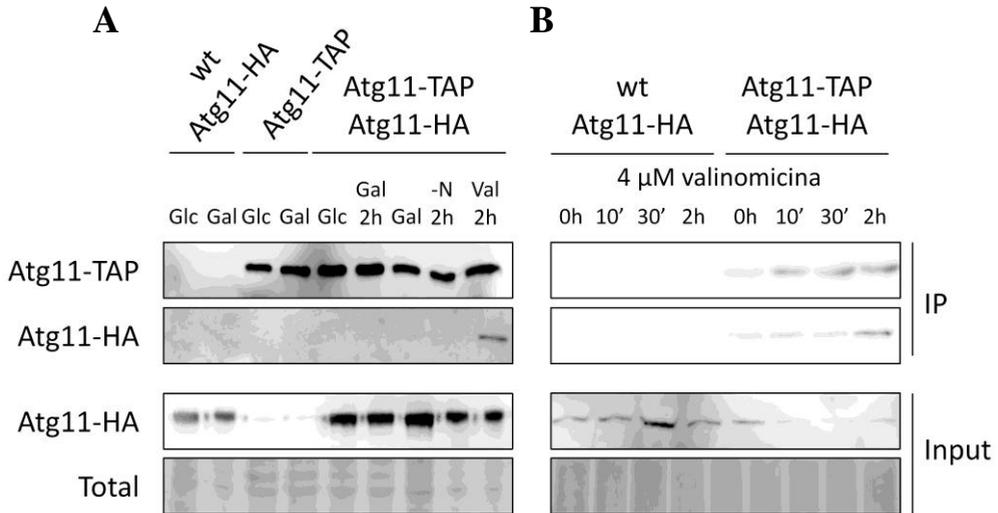


Figura 50. Estudio de la dimerización de Atg11. Verificación de la interacción Atg11-Atg11 en diferentes condiciones por co-inmunoprecipitación. Se obtuvieron extractos totales de proteína de las células con *ATG11* etiquetado con TAP en el genoma y con la construcción Atg11-HA, y de los controles sin la construcción Atg11-HA o sin el marcaje TAP. **(A)** Análisis de la interacción Atg11-Atg11 en medio fermentativo (Glc), cambio diáuxico (Gal 2h), respiratorio (Gal), ayuno de nitrógeno (-N 2h) y valinomicina (Val 2h); junto con dos controles. **(B)** Análisis del tiempo (0h, 10min, 30min y 2h) en el que la interacción Atg11-Atg11 se induce en presencia de valinomicina (4 μ M). Se muestran las membranas α -TAP y α -HA tras la inmunoprecipitación (IP), y la membrana α -HA y el control de carga con DB71 para la muestra inicial (*Input*).

Para buscar dominios funcionales específicos en esta secuencia de aminoácidos, se utilizó el programa ELM: *Eukaryotic Linear Motif resource* (EMBL) que sirve para investigar motivos lineales en la secuencia de proteínas (Dinkel *et al.*, 2012). El servidor proporciona información de cualquier motivo encontrado en la secuencia, pero, en particular, destacaba

una serie de dominios *coiled-coil* (o hélice superenrollada) situados en los aminoácidos: 696-731, 738-773, 781-841 y 1006-1027. Estas estructuras tienen múltiples funciones, pero entre otras, destaca su papel en la dimerización de proteínas; por lo que posiblemente Atg11 interactúe consigo misma a través de esta serie de motivos.

6. Análisis de la conservación de Atg11 en organismos superiores: *Arabidopsis thaliana*

Los genes *ATG* codifican para proteínas relacionadas con la autofagia, la mitofagia y la pexofagia. Meijer y colaboradores demostraron que las proteínas Atg relacionadas con la autofagia no selectiva estaban conservadas de levadura a organismos superiores como *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) y *Homo sapiens* (*H. sapiens*). Sin embargo, las proteínas de levadura relacionadas con la autofagia selectiva, no estaban presentes en la mayoría de los casos en estos organismos superiores. De hecho, en el caso concreto de Atg11, esta proteína sólo la encontraron en especies de levadura y de hongos filamentosos, por lo que estos autores se cuestionaron si se trataba de una forma de autofagia específica de dichos organismos, para la cual habían evolucionado proteínas Atg especializadas (Meijer *et al.*, 2007). Sin embargo, estudios posteriores en *A. thaliana* y mamíferos mostraron que sí que existía un mecanismo de autofagia selectiva en estos organismos, mediado por proteínas Atg, en el que se formaba el fagóforo. En mamífero y *Drosophila*, se han encontrado ortólogos, por ejemplo, de *ATG17*, como los genes RB1CC1/FIP200 (*RB1*

inducible Coiled-Coil 1) o *ATG101* (Gan and Guan, 2008; Morselli *et al.*, 2011).

Li y colaboradores, utilizando el DELTA-BLAST en la base de datos de *Arabidopsis* Columbia-0, encontraron una proteína similar a Atg11 en *A. thaliana*, con una longitud equivalente (1148 aminoácidos) (Li *et al.*, 2014). La proteína, denominada At4g30790, únicamente presenta un 15-18% de identidad con respecto a la de levadura, pero incluye repeticiones del motivo *coiled-coil*, el cual es característico de la familia de *ATG11* y está implicado en su homodimerización e interacción con otros componentes *ATG* (Yorimitsu and Klionski, 2005). Pese a la diferencia de secuencia, Li y su grupo demostraron que *ATG11* es capaz de interaccionar consigo misma y que actúa como proteína adaptadora en *Arabidopsis* regulando la señalización de la quinasa *ATG1/13*, que es necesaria para la correcta formación de las vesículas autofágicas y que está relacionada en la degradación selectiva de la mitocondria (Li *et al.*, 2014; Li and Vierstra, 2014).

Por tanto, nos planteamos si la proteína At4g30790 podría complementar la función de Atg11 en un mutante $\Delta atg11$ de levadura, ya que a pesar de la baja similitud de secuencia, parecía estar relacionada con el mismo proceso. Para ello, se clonó el gen de *A. thaliana* a partir de cDNA de Columbia 0 en un plásmido del sistema Gateway, con un promotor constitutivo, eliminando la secuencia de Stop para fusionarla a la proteína DsRed. Se utilizó el mismo vector utilizado en la sobreexpresión de *ATG11* de levadura en los experimentos anteriores (pAG415GPD-At4g30790-DsRed) y se transformó en un mutante $\Delta atg11$ en levadura.

Como sabemos, la ausencia de *ATG11* provoca en levadura una deficiencia en el crecimiento respiratorio, por lo que comprobamos si la sobreexpresión del gen de *Arabidopsis* restauraba el fenotipo normal. La Figura 51 muestra que, tanto la sobreexpresión de *ATG11* de *S. cerevisiae* como la de *A. thaliana*, complementaba la ausencia de este gen en el mutante y que el crecimiento en condiciones respiratorias (SGal y SGlic) era similar al de la cepa silvestre. Por lo que parece que en cierta manera sí que se complementa la función.

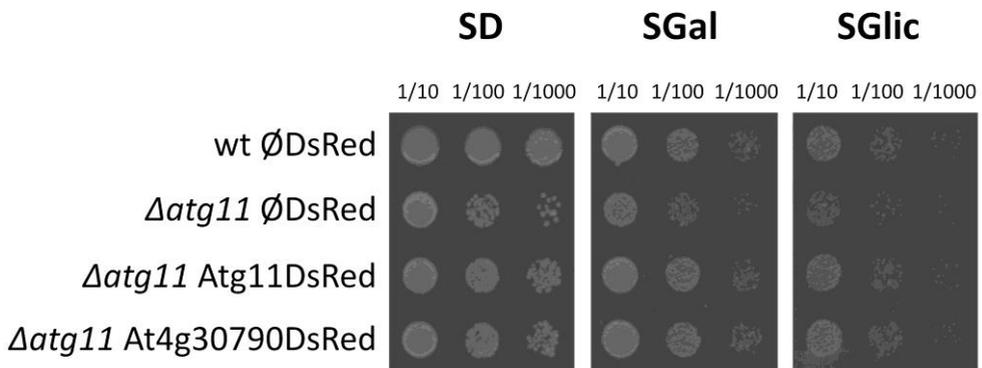


Figura 51. Ensayo de crecimiento para comprobar la complementación de función de At4g30790 de *Arabidopsis* en levadura. La presencia de la proteína At4g30790 en levadura restaura el fenotipo de crecimiento en ausencia de *ATG11*. Se crecieron precultivos saturados en medio SD con los aminoácidos necesarios (His, Ura, Met) de la cepa silvestre con el plásmido vacío (wt \emptyset DsRed), del mutante $\Delta atg11$ con el plásmido vacío ($\Delta atg11$ \emptyset DsRed), con el vector que contenía *ATG11* de levadura (Atg11DsRed) o con el que contenía At4g30790 de *Arabidopsis*. Se llevó a cabo un ensayo de crecimiento en medio fermentativo (Glc) y respiratorio (Gal y Glic), con tres diluciones seriadas. Se tomaron imágenes representativas de tres réplicas biológicas a las 48h en SD y SGal y a las 72h en SGlic.

Además, se utilizó la fusión At4g30790-DsRed para estudiar la localización de este gen al sobreexpresarlo en levadura. Y, como se observa en la Figura 52, se produce la misma asociación a la mitocondria que ocurría ante la sobreexpresión de *ATG11* de levadura (Figura 42). Por lo que parece

que el gen ortólogo de *ATG11* en *A. thaliana* es capaz de sustituir al gen de levadura y comportarse de una manera similar ante su sobreexpresión (en cuanto a su localización), a pesar de la baja similitud de secuencia entre ambos.

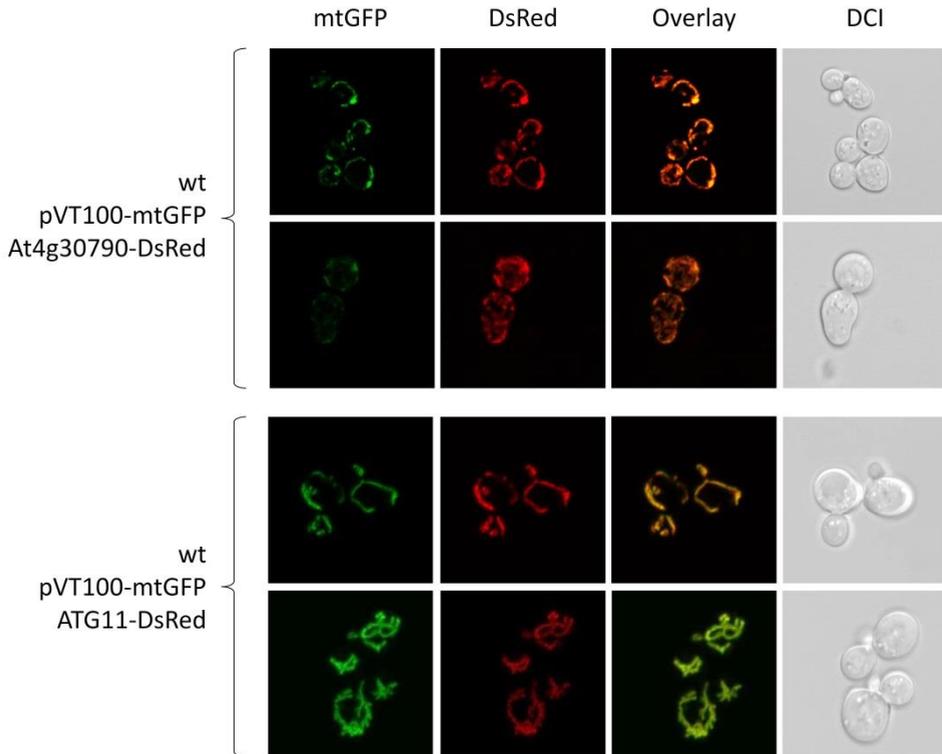


Figura 52. Localización de la proteína At4g30790 de *A. thaliana* tras su sobreexpresión en levadura. La sobreexpresión de At4g30790 en levadura provoca su asociación a la mitocondria. La cepa silvestre se co-transformó con el vector pVT100U-mtGFP (para ver la mitocondria en verde) y con el vector pAG415GPD-DsRed que contenía o bien Atg11 de levadura o de *Arabidopsis* (At4g30790), y se comparó la localización de estas dos proteínas homólogas. Las células se crecieron en medio mínimo fermentativo toda la noche y se analizaron por microscopía confocal. mtGFP: mitocondria en verde. DsRed: proteína fusionada a dicho fluoróforo rojo. *Overlay*: superposición de ambas. DCI: luz transmitida. Se muestran imágenes representativas para cada cepa.



Discusión

La mitocondria es capaz de regular su actividad, morfología y biomasa en función de las condiciones ambientales externas de la célula, para permitir su adaptación y supervivencia. En condiciones de estrés salino, por ejemplo, se producen numerosos cambios en el proteoma mitocondrial (Martínez-Pastor *et al.*, 2010) con el fin de adaptar la actividad del orgánulo a las nuevas condiciones ambientales. En este trabajo, se ha investigado diferentes mecanismos de adaptación de la mitocondria a condiciones de elevada tasa respiratoria y ante estrés en levadura.

Nuestros datos muestran que en levadura uno de los mecanismos para ajustar las necesidades de la célula al cambio de metabolismo fermentativo a oxidativo es la regulación del importe de piruvato a la mitocondria. Concretamente, se ha demostrado que existe una activación regulada de la subunidad Mpc3 del transportador mitocondrial de piruvato, que induce el uso de este sustrato en la respiración y en condiciones de estrés osmótico (Timón-Gómez *et al.*, 2013).

El piruvato es un metabolito celular clave, ya que es el producto final de la glicólisis y tiene dos destinos metabólicos principales. Por una parte, puede ser reducido a lactato en el citosol en células de mamífero, o fermentado a etanol en levadura; restaurando la concentración de NAD^+ celular necesaria para la glicólisis. Esta ruta permite la obtención de dos moléculas de ATP y una rápida proliferación celular. De forma alternativa, el piruvato puede ser importado a la mitocondria, donde es oxidado a acetil-CoA por el complejo piruvato deshidrogenasa (PDH), para entrar en el ciclo de TCA y generar mediante la fosforilación oxidativa el máximo posible de moléculas de ATP. Este proceso alternativo ocurre tanto en células de mamífero diferenciadas como en células de levadura en ausencia de una

fuelle de carbono fermentable. Por tanto, la forma de procesar el piruvato tiene una gran influencia en el metabolismo general de la célula (Gray *et al.*, 2014). Aunque se sabía de la existencia de un transportador mitocondrial de piruvato (MPC) desde hace tiempo, su identidad molecular se identificó recientemente (Herzig *et al.*, 2012; Bricker *et al.*, 2012). Está compuesto por un complejo heterodimérico por las subunidades MPC1 y MPC2 en humanos y *Drosophila*, o por las proteínas Mpc1, Mpc2 y Mpc3 en levadura.

En levadura, el piruvato mitocondrial, además, es el precursor para la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada, leucina y valina (Kohlhaw, 2003). De esta manera, en presencia de una fuente de carbono fermentable, las células de levadura reprimen la oxidación del piruvato a través del ciclo de TCA y la fosforilación oxidativa, y el piruvato principalmente se utiliza en procesos biosintéticos, como la síntesis de aminoácidos. En este caso, el complejo transportador de piruvato mitocondrial está conformado mayoritariamente por las subunidades Mpc1 y Mpc2 (Figura 13 y Bricker *et al.*, 2012; Herzig *et al.*, 2012). La proteína Mpc3 no es esencial en estas condiciones de crecimiento fermentativo, ya que su función no está relacionada con la biosíntesis de aminoácidos.

En cambio, la expresión de Mpc3 se activa en condiciones en las que es necesaria la activación de la respiración oxidativa y ante estrés salino (Figura 13). De hecho, la ausencia de Mpc3 en estas condiciones provoca defectos severos en el crecimiento celular (Figura 16). Esta activación de Mpc3 es debida a una fuerte regulación génica de *MPC3*, el cual está reprimido en condiciones fermentativas, pero es activado ante estrés osmótico o ante la falta de fuentes de carbono fermentables. Esta regulación génica se lleva a cabo especialmente a través de la ruta de MAP

quinasas HOG, ya que en ausencia de Hog1 la célula no es capaz de activar la transcripción de *MPC3* (Figura 14). En concreto, es el factor de transcripción Sko1, relacionado con la respuesta a estrés osmótico mediada por la ruta HOG (Martinez-Montanes *et al.*, 2010), el que se une al promotor del gen *MPC3* (Proft *et al.*, 2005). Esta activación tan regulada de Mpc3 podría ser un mecanismo desarrollado por las células de levadura que les permite controlar el uso posterior del piruvato mitocondrial según las condiciones ambientales y las necesidades de la célula. Además, esta regulación de la subunidad Mpc3 se da junto con la de otros sistemas de transporte alternativo, como el transportador de carnitina mitocondrial Crc1 (Figuras 25 y 26). Crc1, que introduce directamente acetil-CoA en la mitocondria, presenta la misma activación ante estrés osmótico y ante un cambio diáuxico que Mpc3, y también está regulado por Hog1.

Además, dado que la función de Mpc2 era específica para la síntesis de aminoácidos, se analizó si los niveles de esta proteína se alteraban ante un ayuno de aminoácidos. Sin embargo, no se pudo observar ningún cambio en la regulación de Mpc2 cuando se comparaba con células en crecimiento fermentativo (Figura suplementaria S2). Por lo que parece que la regulación de Mpc3 es un rasgo específico de las proteínas Mpc en levadura.

De hecho, al variar la composición relativa de estas proteínas en la célula se provocan grandes cambios en la tolerancia a estrés y en la capacidad respiratoria. Por una parte, la pérdida de Mpc2 generaba un retraso en el crecimiento ante la ausencia de valina y leucina, mientras que la mutación de Mpc3 impedía el crecimiento respiratorio (Figura 15). Mpc1 era necesaria tanto para la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada

como para el metabolismo en ausencia de azúcares fermentables. Por otra parte, un aumento en la abundancia de Mpc1 y Mpc2 provocaba un menor consumo de oxígeno, que impedía a la célula crecer en ausencia de azúcares fermentables (Figuras 18 y 20). Además, estas células exhibían un incremento en la producción de ROS, tanto en condiciones normales como tras un tratamiento con estrés oxidativo, y presentaban una mayor sensibilidad ante este tipo de estrés (Figuras 19 y 21). En cambio, un incremento de la proteína Mpc3 tenía el efecto antagonista, aumentando la capacidad respiratoria de la célula, permitiendo su crecimiento en condiciones no fermentativas y aumentando su tolerancia a estrés oxidativo.

Por tanto, parece que las proteínas Mpc2 y Mpc3 presentan funciones altamente especializadas y diferenciadas entre sí, a pesar de su elevada similitud de secuencia. Esto tiene una gran importancia si se tiene en cuenta el descubrimiento de un complejo de 150 kDa en la membrana mitocondrial, compuesto por Mpc1 y Mpc2 (Bricker *et al.*, 2012), y nuestros resultados que demuestran que Mpc3 co-precipita preferentemente con las subunidades Mpc1 y Mpc3. Todo esto sugiere la existencia de complejos transportadores de piruvato especializados para importar y dirigir este sustrato hacia diferentes funciones fisiológicas, donde Mpc1 sería la subunidad principal y formaría complejo con Mpc2 o con Mpc3 según las condiciones ambientales (ver Figura 53). Este control en levadura permite la adaptación ante condiciones de elevada tasa respiratoria y de estrés salino.

Estudios posteriores en este ámbito, han conseguido demostrar la existencia de estos complejos MPC diferenciados en la membrana mitocondrial interna. Concretamente, se denominaron MPC_{FERM} o MPC_{COX},

según su formación en condiciones de crecimiento fermentativas o respiratorias, respectivamente.

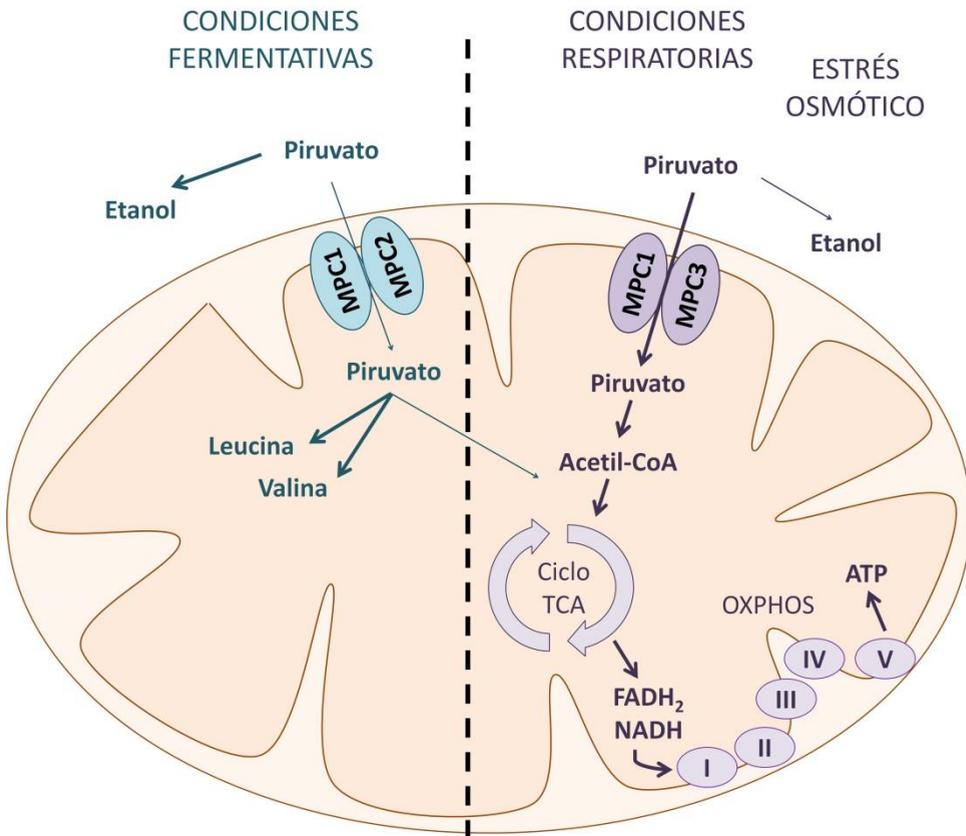


Figura 53. Modelo de los complejos del transportador de piruvato mitocondrial según las condiciones ambientales. En condiciones fermentativas, el MPC está formado por las proteínas Mpc1 y Mpc2, y el piruvato se dirige a la biosíntesis de aminoácidos; mientras que ante estrés osmótico o en condiciones respiratorias, Mpc1 y Mpc3 conforman el complejo y el piruvato se destina hacia la respiración mitocondrial.

MPC_{FERM} está compuesto por las subunidades Mpc1 y Mpc2, mientras que Mpc1 y Mpc3 constituyen MPC_{OX} (Bender *et al.*, 2015). Los autores también muestran que MPC_{OX} presenta una mayor actividad transportadora de piruvato a la mitocondria, debida a la región C-terminal de la subunidad Mpc3. Aun así, creemos que todavía está por elucidar el

mecanismo por el cual el piruvato que se importa a la mitocondria se dirige bien a la biosíntesis de aminoácidos o bien hacia la respiración. Por otra parte, se ha esclarecido en cierta manera la estructura de estos complejos MPC, gracias a que comparten zonas de la estructura secundaria de los transportadores de glucosa bacterianos semiSWEET (familia SLC50) (Jezegou *et al.*, 2012). Estos transportadores tienen una unidad funcional compuesta por dímeros simétricos, con dos sitios de acceso y una cavidad central de residuos aromáticos e hidrofóbicos donde se une el sustrato (Xu *et al.*, 2014). Los residuos aromáticos están conservados en las proteínas Mpc, pero se ha sugerido que la zona de unión al sustrato sería asimétrica en el complejo MPC para permitir la unión de una molécula de piruvato y de un protón (Vanderperre *et al.*, 2014).

Estos resultados muestran un precedente donde la regulación del importe de piruvato (gracias a la formación de complejos proteicos diferenciados) provoca un cambio a diferentes estados metabólicos. Esto tiene una gran importancia en humanos ya que las proteínas Mpc están muy conservadas a lo largo de la evolución, por lo que podrían utilizarse como dianas terapéuticas en patologías humanas.

El genoma humano contiene tres genes *MPC*, denominados MPC1, MPC2 y MPC1L. MPC1 y MPC1L son ortólogos del gen *MPC1* de levadura y son idénticos en un 60%, excepto por su región C-terminal; mientras que MPC2 es el ortólogo de los genes *MPC2* y *MPC3* de levadura. Sin embargo, en humanos no se sabe si la actividad del transportador se regula modificando la composición de sus subunidades. Hasta el momento se ha estudiado dos formas alternativas para regular su actividad. La primera sería a través de la degradación de las proteínas que dirigen a las proteínas

Mpc a la mitocondria (complejo TOM), reduciendo así la cantidad de transportador en la mitocondria (Harbauer *et al.*, 2014; Rampelt and van der Laan, 2015). La segunda alternativa podría tratarse de una regulación post-transcripcional, ya que se ha visto que MPC2 de ratón puede ser acetilado por Sirt3 (Hebert *et al.*, 2013) e hidroxilado (Deng *et al.*, 2010). De hecho, la deacetilasa Sirt3, reguladora del metabolismo mitocondrial, se une y deacetila también a MPC1 de humanos, reduciendo su actividad (Liang *et al.*, 2015). Sin embargo, hacen falta más estudios en mamíferos para determinar el mecanismo y ver si se forman complejos diferentes como en levadura.

Es necesario conocer la regulación de este transportador debido a su importancia en el metabolismo. Mutaciones en el gen MPC1 en familias humanas dan lugar a defectos en la oxidación del piruvato, hiperpiruvatemia y acidosis láctica (Bricker *et al.*, 2012); y defectos en el importe del piruvato han mostrado su importancia clínica en la homeostasis de la glucosa (Gray *et al.*, 2014; Brivet *et al.*, 2003). De hecho, dependiendo del órgano, la inhibición de MPC puede tener efectos adversos o beneficiosos en la homeostasis de la glucosa. Por ejemplo, se ha demostrado que en las células del páncreas la función de MPC es necesaria para la secreción de insulina estimulada por glucosa, tanto en humano como en ratón (Patterson *et al.*, 2014; Vigueira *et al.*, 2014); mientras que la inhibición de MPC es beneficiosa en el músculo y en el hígado, ya que aumenta la tolerancia a la glucosa (Gray *et al.*, 2015; McCommis *et al.*, 2015). Estos estudios muestran los efectos duales de la inhibición de este transportador en enfermedades metabólicas como la diabetes, y es necesario su estudio *in vivo* para determinar si puede ser utilizado en el

tratamiento. Además, en humanos, según las necesidades de cada órgano, se podría dar una distribución regulada y específica de complejos MPC diferentes para regular la capacidad respiratoria.

Esta noción también se está aplicando al estudio del metabolismo de las células cancerosas, para entender y manipular la dependencia de estas células a la utilización de glucosa durante el efecto Warburg (Soga, 2013; Poteet *et al.*, 2013). Schell y su grupo observaron que era frecuente la pérdida del locus MPC1 en diferentes tipos de cánceres y se asociaba con una baja supervivencia (Schell *et al.*, 2014). Cuando la función de MPC1 estaba comprometida, las células dependían de la oxidación de glutamina para mantener el ciclo de TCA funcional (Yang *et al.*, 2014; Vacanti *et al.*, 2014). En cambio, un aumento en la expresión de las proteínas MPC provocaba una pérdida de los marcadores de pluripotencialidad y un bajo potencial oncogénico de las células cancerosas (Schell *et al.*, 2014). Por tanto, parece ser que, además de influir en el metabolismo celular y en diversas enfermedades humanas, la actividad del transportador de piruvato mitocondrial también influye en la diferenciación celular y en la oncogenicidad de la célula (Ito and Suda, 2014).

La adaptación metabólica ante una elevada tasa respiratoria no ocurre únicamente a partir del cambio en la composición del transportador de piruvato mitocondrial, sino que también existen cambios en diversas proteínas implicadas en el metabolismo oxidativo. En condiciones en las que la célula de levadura no puede utilizar el metabolismo fermentativo, aumenta la degradación de aquellas proteínas mitocondriales que intervienen en la respiración, pero manteniéndose intactos los niveles

totales de proteína. Concretamente, este proceso es muy evidente en las proteínas de los complejos de transporte de electrones mitocondriales I y III (Figura 27). Esto no se había observado previamente en levadura. El significado de este proceso se desconoce, pero dado que la cantidad de proteína funcional de los complejos I y III se tiene que mantener para una respiración eficiente, parece una degradación con el fin de reciclar aquellos componentes mitocondriales activos durante la respiración. Es decir, podría tratarse de un proceso de mantenimiento de estas proteínas, para evitar fallos en estos complejos de la respiración que causen defectos en la homeostasis a nivel celular. En este proceso, que es independiente de Atg11 y Atg32, están implicadas las proteasas mitocondriales Yme1 y Pim1 (Figura 28), situadas en la membrana mitocondrial interna y en la matriz, respectivamente. Ambas están relacionadas con el ensamblaje y el mantenimiento de las proteínas de los complejos respiratorios. Concretamente, las células deficientes en Yme1 presentan una disrupción en el potencial de membrana interna mitocondrial y una reducción de la actividad de los complejos respiratorios y de la F_1F_0 -ATPasa (Thorsness and Fox, 1993; Kominsky *et al.*, 2002). Por lo que esta reducción observada en la degradación (reciclaje) de la proteína Qcr2 podría ser la causa de esta disminución de la actividad de la fosforilación oxidativa hasta niveles similares a los de la célula con metabolismo fermentativo. Por otra parte, otra hipótesis posible es que estas dos proteasas no estén relacionadas únicamente con el mantenimiento, sino que estén directamente implicadas en la degradación de estas proteínas de una forma muy selectiva, ya que no ocurre en todos los complejos respiratorios por igual. Sin embargo, todavía se desconoce su relación con este mecanismo.

Ante una pérdida del potencial de la membrana mitocondrial inducida por valinomicina, se observa un proceso similar de degradación específica de los complejos respiratorios I y III (Figuras 32 y 34). Se ha comprobado que este proceso se lleva a cabo mediante el mecanismo de mitofagia, produciéndose la degradación en la vacuola de la levadura (Figura 35). Hasta el momento, el estudio de la mitofagia en levadura se había llevado a cabo mediante un ayuno de nitrógeno en la célula, que inducía la degradación mitocondrial (Mao *et al.*, 2011). Nuestros resultados demuestran, en cambio, que ante un daño específico de la función mitocondrial por valinomicina, se activa la mitofagia de una forma más específica e inmediata que ante un ayuno de nutrientes. Por primera vez en levadura, en este trabajo se describe un mecanismo de degradación de la mitocondria ante un daño específico en el potencial de membrana mitocondrial.

Es importante destacar que nuestros estudios demuestran que existen vías específicas de mitofagia para la eliminación de complejos concretos del orgánulo, que contrasta con el concepto de degradación generalizada de la mitocondria durante la mitofagia. El hecho de que la degradación ocurra específicamente en los complejos I y III podría explicarse como un ahorro energético de la célula. Estos dos complejos son los principales productores de ROS mitocondrial (Selivanov *et al.*, 2011), por lo que un defecto en alguno de ellos puede provocar un aumento de estas especies oxidativas y graves consecuencias a nivel celular. Por tanto, ante la detección de una pérdida del potencial de membrana, la célula no degrada el orgánulo entero sino que únicamente prescinde y elimina aquellos componentes que pueden provocar un mayor daño a la homeostasis

celular. Se trataría tanto de un mecanismo inmediato de defensa como de ahorro para evitar volver a generar todos los componentes mitocondriales.

Ante estos resultados, se presenta el problema de reconocimiento de complejos tan específicos por parte del fagóforo, pero el hecho de que exista una asociación de ambos complejos (teoría de los supercomplejos) facilitaría este proceso. De hecho, se podría sugerir incluso que una de las funciones de los supercomplejos fuese facilitar la degradación conjunta de los complejos I y III de forma más inmediata ante un daño mitocondrial específico. El hecho de que en ausencia de los supercomplejos se observe un aumento de ROS (Ghelli *et al.*, 2013; Maranzana *et al.*, 2013), también podría ser debido a una mayor dificultad para degradar estos complejos ante un daño, lo que lleva a dicho incremento en las especies reactivas.

Es la primera vez que se describe una mitofagia específica de ciertos complejos, y no existe bibliografía sobre el tema. Aunque sí que se había descrito que una mutación del gen PINK1 en *Drosophila*, relacionado con la mitofagia, provocaba una reducción de la actividad del CI (Vilain *et al.*, 2012), que podía restaurarse con la expresión de la proteína Ndi1 de levadura. Por lo que un defecto en el mecanismo de la mitofagia produce daños en la actividad de complejos respiratorios individuales. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para comprobar si esta relación entre mitofagia y complejos respiratorios es específica en otros organismos, tal y como sucede en levadura.

El estudio de las proteínas implicadas en la mitofagia inducida por valinomicina determina que Atg32, a pesar de ser una proteína esencial durante la mitofagia inducida por ayuno (Okamoto *et al.*, 2009; Kanki *et al.*, 2009) y por rapamicina (Welter *et al.*, 2013) en levadura, es dispensable en

este proceso. De hecho, su mutación no produce un defecto en el crecimiento de las células en presencia de valinomicina (Figura 37) ni evita que se active la mitofagia, aunque sí que reduce el porcentaje de células en las que se observa esta degradación de la mitocondria (Figuras 36 y 38). En cambio, la proteína adaptadora Atg11, que interviene en diferentes tipos de autofagia selectiva, es totalmente necesaria para que se produzca la degradación mitocondrial en estas condiciones. Su delección inhibe completamente la mitofagia inducida por valinomicina y los niveles de CI y CIII no varían de forma significativa. También se descartó la implicación de otra proteína relacionada con la mitofagia en condiciones de ayuno, Hog1, la cual no parece estimular la degradación ante un daño mitocondrial. La enzima detoxificadora de ROS mitocondrial, Sod2, tampoco tiene un papel en el proceso, por lo que se descarta que un incremento de dichas especies en la matriz mitocondrial desencadene este tipo de mitofagia.

Los sistemas implicados en el control de calidad mitocondrial, como son la dinámica mitocondrial y las proteasas mitocondriales (Figuras 38 y 39), en cambio, sí que actúan en la mitofagia inducida por valinomicina. Anteriormente, ya se había descrito que una disrupción en estos sistemas de control promovía la mitofagia (Heo *et al.*, 2010), lo que sugiere una comunicación entre los diversos sistemas de control de calidad.

De este modo, diversos estudios establecieron una conexión entre la mitofagia y la maquinaria de fusión y fisión mitocondrial en levadura (Mao and Klionsky, 2013; Bernhardt *et al.*, 2015; Müller *et al.*, 2015; Teixeira *et al.*, 2015), debido a que la fragmentación mitocondrial es necesaria para iniciar la mitofagia. Incluso se ha descrito la interacción entre la maquinaria de fisión (Dnm1) con Atg11 (Mao *et al.*, 2013). Pero todos estos estudios se

basaban en una mitofagia inducida por ayuno de nitrógeno. En este estudio, se demuestra que las proteínas de dinámica mitocondrial (Fzo1/Fis1) también tienen un papel muy importante en la degradación de la mitocondria inducida por una disrupción en el potencial de membrana. Esto mismo ya se había reportado previamente en mamífero, donde en un rastreo se vio que Drp1 era esencial para la mitofagia inducida por valinomicina (Kanki *et al.*, 2010); y se había relacionado con diversas patologías cardiovasculares, metabólicas y neurodegenerativas (Lo *et al.*, 2015; Liang and Kobayashi, 2015; Von Stockum *et al.*, 2015; Vasquez-Trincado *et al.*, 2015). También se ha sugerido en mamíferos que la maquinaria de fusión puede ser objeto de poliubiquitinación durante la mitofagia mediada por PINK1/Parkin, para facilitar la fragmentación mitocondrial (Tanaka *et al.*, 2010).

Las proteasas mitocondriales Pim1, Afg3 y Yme1 también operan durante el proceso de mitofagia inducida por valinomicina. Se trata de tres proteasas AAA⁺, dependientes de ATP. Yme1 y Afg3 tienen la función de procesar y degradar los complejos respiratorios en la membrana mitocondrial interna (Nakai *et al.*, 1995). Pim1, por su parte, se encuentra en la matriz mitocondrial para degradar proteínas no plegadas y agregados que se forman a altas temperaturas (Suzuki *et al.*, 1994), y para dirigir el ensamblaje de los complejos proteicos que forman la cadena de transporte de electrones (Rep *et al.*, 1996). Por tanto, todas ellas están relacionadas con el mantenimiento de la cadena de transporte de electrones.

Concretamente, en levadura, se ha establecido que Yme1 era necesaria en la degradación mitocondrial provocada por ayuno de nitrógeno (Gaspard and McMaster, 2015), debido a que tiene un papel en el

procesamiento proteolítico del extremo C-terminal de Atg32 para aumentar su afinidad por Atg11 (Wang *et al.*, 2013) e iniciar la mitofagia. Sin embargo, los autores especularon que Yme1 tenía dianas y funciones adicionales durante la mitofagia, además de este procesamiento. En mamíferos, la pérdida de YME1L provoca graves alteraciones en la mitocondria, entre las que destaca una alteración de la dinámica mitocondrial (Rugarli and Langer, 2012), ya que su actividad es necesaria en los eventos de fusión mitocondrial porque regula el procesamiento y la estabilidad de OPA1 (Ruan *et al.*, 2013; Mishra *et al.*, 2014). Además, su delección sensibiliza a la célula frente a estrés oxidativo y puede dar lugar a un mecanismo para secuestrar aquellas mitocondrias dañadas mediante mitofagia (Rainbolt *et al.*, 2015). Por tanto, la función de Yme1 en la mitofagia inducida por valinomicina no parece estar relacionada con el procesamiento de Atg32, ya que la función de esta proteína es dispensable en este proceso; pero se podría sugerir una función debida a su conexión con la dinámica mitocondrial (tal y como ocurre en mamíferos) o incluso a un reconocimiento directo hacia otras dianas proteicas.

La proteasa Pim1 (Lon) se expresa ante condiciones de estrés oxidativo (Bender *et al.*, 2010; Ngo *et al.*, 2013), y su función es degradar las proteínas dañadas por las especies ROS (Hamon *et al.*, 2014); pero no se ha relacionado con la mitofagia previamente en levadura. En cambio, en mamíferos, defectos en esta proteasa Lon lleva a la acumulación de PINK1 en diferentes compartimentos mitocondriales de forma muy específica. De hecho, parece que Lon tiene un papel esencial en la ruta PINK1/Parkin, encargándose de la degradación de PINK1 en la matriz de las mitocondrias sanas (Thomas *et al.*, 2014).

Por último, aunque no existe una bibliografía previa concreta sobre la función de Afg3 en procesos mitofágicos, sí que se ha relacionado a miembros de su familia con la homeostasis mitocondrial. Así, LACE1 de humanos, homólogo de Afg1, tiene un papel en la degradación de las proteínas del CIV mitocondrial, como Cox4, Cox5 y Cox6 (Cesnekova *et al.*, 2016); y es necesario para la actividad de los complejos III y IV. Afg3 ha mostrado participar en la degradación del complejo mitocondrial III (Figura 39), por lo que esta familia de proteínas (y no sólo Afg3) podría tener una función específica en este proceso.

Todos estos datos muestran que las proteasas mitocondriales tienen un efecto en la mitofagia inducida por valinomicina, incluso podría existir una especificidad de proteasas a la hora de degradar los diferentes complejos respiratorios. Sin embargo, hacen falta más experimentos para saber de qué modo están relacionadas. El hecho de que esta mitofagia no esté mediada por el receptor Atg32 y que intervengan la dinámica y las proteasas mitocondriales como en mamíferos, hace pensar que un daño específico de este orgánulo parece dar lugar a una degradación de la mitocondria a través de un mecanismo diferente al de la mitofagia inducida por ayuno. Además, se observa una interconexión entre los diferentes sistemas de control de calidad mitocondrial, tanto moleculares como organulares; por lo que una fuerte regulación y el balance de todos ellos son necesarios para el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial.

Pero, además de los sistemas de control de calidad, el punto clave para la mitofagia inducida por valinomicina parece ser el gen *ATG11*, que codifica para una fosfoproteína adaptadora implicada en pexofagia (autofagia de los peroxisomas) y en mitofagia en levadura (por la ruta Cvt,

cytoplasm-to-vacuole targeting) (revisado por Yorimitsu and Klionsky, 2005). La proteína Atg11 se une a Atg19 para generar el sitio de formación del fagóforo (PAS), a partir del cual se crea la vesícula que se fusiona a la vacuola, para degradar la carga (revisado en Kim and Klionsky, 2000). En la mitofagia inducida por ayuno de nitrógeno, Atg32 y Atg11 forman un trímero con Atg8 para iniciar la formación del fagóforo.

Sin embargo, en la degradación de la mitocondria inducida por valinomicina, la proteína Atg11 parece ser indispensable para el proceso, mientras que Atg32 no es necesaria. De hecho, ante un aumento de la expresión de Atg11, se observa su co-localización con la mitocondria (Figura 42), independientemente de Atg32. Este incremento en las cantidades de proteína Atg11 también produce un mayor grado de degradación de los complejos respiratorios I y III en condiciones fermentativas (Figura 43) y ante un tratamiento con valinomicina (Figura 44). Además, llama la atención el hecho de que este incremento de Atg11 no produce un aumento de mitofagia en condiciones respiratorias en las que no existe un daño en la función mitocondrial, sino que únicamente se activa ante una pérdida del potencial de membrana provocada por valinomicina. De nuevo, esta activación es independiente de *ATG32* (Figura 45).

Todos estos resultados tienen cierta similitud con la ruta PINK1/Parkin de eucariotas superiores. PINK1, ante un daño en el potencial de membrana, se trasloca a la membrana mitocondrial externa y atrae a Parkin para iniciar la mitofagia (revisado por Ashrafi and Schwarz, 2012). La maquinaria en mamíferos también tiene una conexión con la dinámica mitocondrial, ya que las mitofusinas son un sustrato de PINK1 y Parkin, que son poliubiquitinadas para promover la fisión mitocondrial (Poole *et al.*,

2010; Tanaka *et al.*, 2010). Pero además, en mosca, se ha comprobado que la sobreexpresión de Parkin produce su acumulación en la mitocondria e induce la mitofagia, incluso en ausencia de PINK1 (Park *et al.*, 2006; Poole *et al.*, 2008). Por lo que los autores se plantean si Parkin podría ser activado por rutas independientes a PINK1.

Ante estos datos, en nuestro estudio se sugiere si en levadura, además de la mitofagia mediada por el receptor Atg32, existe otro tipo de mitofagia, similar a la ruta PINK1/Parkin. En ésta última, simplemente con la sobreexpresión de Atg11 también se induciría su localización mitocondrial y se activaría la degradación específica de este orgánulo (siempre que exista un estímulo). Esto concuerda con los resultados recientes de Liu y su grupo que muestran que los receptores de mitofagia Atg32 de levadura y FUNDC1 de mamífero tienen características compartidas, tanto en su mecanismo de activación (fosforilación/defosforilación) como en las condiciones que actúan (ayuno/hipoxia) (Liu *et al.*, 2012, revisado por Wei *et al.*, 2015). Por tanto, existe la posibilidad de que se produzca otro mecanismo de mitofagia en levadura, con características similares a lo que ocurre en otros organismos aunque no existan proteínas ortólogas (ver Figura 54).

El inicio de esta mitofagia inducida por daño mitocondrial podría estar marcado por la generación de agregados cercanos a la mitocondria de la proteína Atg11 (Figura 46). Estos *foci* observados por microscopía confocal son agrupaciones de Atg11, aunque no se pudo demostrar si era en forma de dímeros u oligómeros. Esta interacción de Atg11 consigo misma se demostró mediante los ensayos de doble híbrido y de co-inmunoprecipitación de proteínas (Figuras 49 y 51), y parece ocurrir entre los aminoácidos 969 y 1179, donde existen varios dominios *coiled-coil*.

Además, esta interacción no se detectó ante un metabolismo fermentativo o ante un ayuno de nitrógeno, sino cuando la célula activaba el metabolismo respiratorio o ante la presencia de valinomicina en el medio (mostrando un aumento de la interacción a las dos horas de tratamiento). Lo que ratifica que pueda tratarse del momento clave para el inicio de la mitofagia.

Atg32 tiene cierto papel en la formación de estos agregados, pero se desconoce el mecanismo. Una hipótesis es que la proteína Atg32 sea la encargada de marcar la zona dañada o de inicio de la degradación, ya que ambas proteínas son capaces de interactuar también en presencia de valinomicina (Figuras 47 y 48). Sin embargo, el hecho de que este tipo de mitofagia ocurra en ausencia de Atg32 demuestra que deben existir otros componentes implicados.

Durante la búsqueda de nuevas proteínas implicadas en la mitofagia inducida por valinomicina, se detectó la interacción de la proteína Atg11 con diversas enzimas glicolíticas mediante el ensayo de doble híbrido y por co-inmunoprecipitación de proteínas (Figuras 47 y 48): Hxk2, Gpm1, Fba1, Adh1 y Tpi1. Se desconoce la posible función de esta interacción en levadura, ya que no se observaron cambios en la concentración de estas enzimas glicolíticas ante la delección ni la sobreexpresión de la proteína Atg11 (Figuras suplementarias S17 y S18, respectivamente), ni se observó un fenómeno de degradación similar al de los complejos mitocondriales. Tampoco existe literatura previa en este organismo que nos indique una relación entre Atg11 y la glicólisis.

Sin embargo, se ha demostrado que la hexoquinasa HK2 de humano, homóloga de Hxk2, es necesaria para el reclutamiento de Parkin a la

mitocondria. Concretamente, esta proteína citosólica es translocada a la membrana externa de la mitocondria tras su fosforilación en T473 por Akt. Esta HK2 mitocondrial protege frente a estímulos apoptóticos, asegura el acoplamiento entre la fosforilación de la glucosa y la generación de ATP mitocondrial, y reduce la emisión de ROS (revisado por Roberts and Miyamoto, 2015). En cambio, la HK2 citosólica estimula la autofagia en ausencia de glucosa inhibiendo mTOR (Roberts *et al.*, 2014) y su actividad es necesaria para la activación de la mitofagia en presencia de PINK1 (McCoy *et al.*, 2014).

También se ha visto que PGAM5, un miembro de la familia fosfoglicerato mutasa en mamíferos (homólogo de Gpm1) interviene en la mitofagia inducida por hipoxia. En estas condiciones, PGAM5 defosforila la serina 13 del receptor de mitofagia FUNDC1, promoviendo su interacción con LC3 para la formación del fagóforo (Chen *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014). Además, la proteína PGAM5 estabiliza a PINK1 en la mitocondria ante una reducción del potencial de membrana, activando de este modo la mitofagia inducida por daño (Lu *et al.*, 2014).

Por tanto, en mamífero existe una relación entre algunas enzimas glicolíticas con la mitofagia; pero todavía es necesario realizar más ensayos para entender la función de la interacción de Atg11 con estas proteínas en levadura. Estos estudios en mamífero hacen que nos planteemos el posible papel de estos genes de levadura en la estabilización o en el reclutamiento de Atg11 a la mitocondria. También habría que estudiar en qué condiciones actúa cada uno de ellos, tanto en la mitofagia inducida por ayuno como en la inducida ante daño mitocondrial. Una implicación muy importante de esta relación entre mitofagia y glicólisis es que estos datos serían

consistentes con la propuesta de que la ruta mitofágica sea dependiente del estado bioenergético de la célula (Van Laar *et al.*, 2011). De esta forma, mediante una señalización celular muy regulada, la célula detectaría el estado metabólico para activar de forma inmediata las respuestas adaptativas para asegurar la homeostasis celular. En este punto, cabe destacar el papel de las hexoquinas humanas, que funcionan como un nexo de unión entre la producción de energía en la glicólisis, y la preservación de la integridad mitocondrial y de la viabilidad celular (Roberts and Miyamoto, 2015). Esto podría llevarnos a la hipótesis de que este nexo también existe en levadura y parece mediado por Atg11.

Además de estas proteínas glicolíticas, en el ensayo de doble híbrido de nuestro estudio, se detectó interacción con otras proteínas relacionadas con diferentes procesos celulares: transcripción, metabolismo, splicing, etc (Tablas 4 y 5). Es difícil entender la relación de muchas de ellas con la mitofagia, pero hay que remarcar una de ellas, la proteína Ifh1, implicada en la regulación de la transcripción de proteínas ribosomales. Recientemente, se ha relacionado con un miembro de la familia de proteínas fosfatasa 2C de levadura, Ptc6 (González *et al.*, 2013), la cual es similar a las proteínas PP1Ks (proteínas fosfatasa tipo 1, isoforma K) de mamíferos, relacionadas con mitofagia. Por tanto, el ensayo de doble híbrido, pese a no informar del tipo de relación o del mecanismo de acción, nos proporciona candidatos muy interesantes a la hora de estudiar el proceso de mitofagia tanto en levadura y mamífero, ya que la mayoría de proteínas de las Tablas 4 y 5 tiene su respectivo homólogo en humanos y podrían darnos información sobre nuevas vías de regulación de este proceso de degradación mitocondrial.

Aun así, pese a ser una técnica interesante, es necesario realizar más estudios de interacción de proteínas con Atg11, porque el ensayo de doble híbrido presenta la gran desventaja de que únicamente muestra aquellas interacciones proteicas que pueden ocurrir en el núcleo celular. Esto hace que se pierdan, entre otras, las interacciones con proteínas de la membrana externa mitocondrial, que podrían indicarnos los componentes o receptores que atraen a Atg11 a la mitocondria y confieren selectividad a esta degradación inducida por daño, marcando la zona de inicio de la mitofagia.

Otro aspecto importante a discutir es el hecho de que ante un tratamiento con LiCl en levadura, también se da un mecanismo similar de degradación específica de los complejos I y III. Hasta el momento, el tratamiento con litio se había utilizado para estimular la autofagia en enfermedades neurodegenerativas (Hou *et al.*, 2015), pero tras nuestros resultados (Figura 40A), sería recomendable realizar más estudios sobre la posible inducción de mitofagia por el litio en células neuronales y su posible efecto protector. En cambio, el tratamiento con otro catión, el Na⁺, no tiene el mismo efecto en la célula de levadura. De hecho, ante la presencia de una concentración de 1 M de NaCl parece aumentar tanto la biomasa como la actividad mitocondrial (Figura suplementaria S13); a pesar de que se estudió este catión precisamente por la implicación de Hog1 en la mitofagia inducida por ayuno (Mao *et al.*, 2011). Una posible hipótesis ante este efecto del NaCl es que, ante un estrés osmótico, la célula destina principalmente el flujo de carbono hacia la producción de glicerol, entre otros osmolitos, en lugar de hacia la producción de biomasa (Petelenz-Kurdziel *et al.*, 2013) y produce un arresto en el ciclo celular (Clotet *et al.*, 2006; Escote *et al.*, 2004). De modo que, para generar energía y facilitar la

supervivencia celular en estas condiciones, es posible que la levadura active la respiración mitocondrial. Esta activación, en este trabajo, se ha visto que se puede llevar a cabo (entre otras posibilidades) bien por la activación transcripcional de la proteína Mpc3, para dirigir las moléculas de piruvato hacia el ciclo de TCA; o bien mediante la activación del transportador de carnitina mitocondrial, Crc1, para introducir en la mitocondrial el acetil-CoA directamente (proveniente normalmente de la β -oxidación peroxisomal). Esto se correlacionaría con el aumento observado de biomasa mitocondrial y de consumo de oxígeno ante un estrés osmótico.

Por último, a pesar de que hasta el momento no se conocía ninguna proteína homóloga a Atg11 en eucariotas superiores, se ha demostrado la existencia de una proteína que comparte ciertas regiones de su estructura secundaria en *A. thaliana* y que complementa la función en una cepa mutante *Δatg11* en *S. cerevisiae* (Figura 49). Incluso presenta un comportamiento similar ante su sobreexpresión en levadura. Por tanto, el hecho de que todavía no se haya relacionado Atg11 con ninguna proteína humana no significa que en un futuro no pueda encontrarse una con una estructura y función similares, aunque con una secuencia proteica diferente.

En resumen, a lo largo de este trabajo, se ha podido vislumbrar diferentes mecanismos que presenta la mitocondria para adaptarse a condiciones de elevada capacidad respiratoria y ante estrés. Se sabía que el proteoma mitocondrial cambiaba de composición en estas condiciones; pero además, se ha demostrado que los mecanismos de adaptación son muy finos y complejos e incluyen desde cambios en la composición de los complejos proteicos mitocondriales hasta la degradación o reciclaje de

aquellas proteínas que pueden provocar algún daño en la homeostasis celular para mantener su buen funcionamiento. El análisis de estos y de nuevos mecanismos de adaptación puede tener un gran impacto a la hora de estudiar dianas terapéuticas y de generar posibles formas de tratamiento para diferentes patologías humanas.

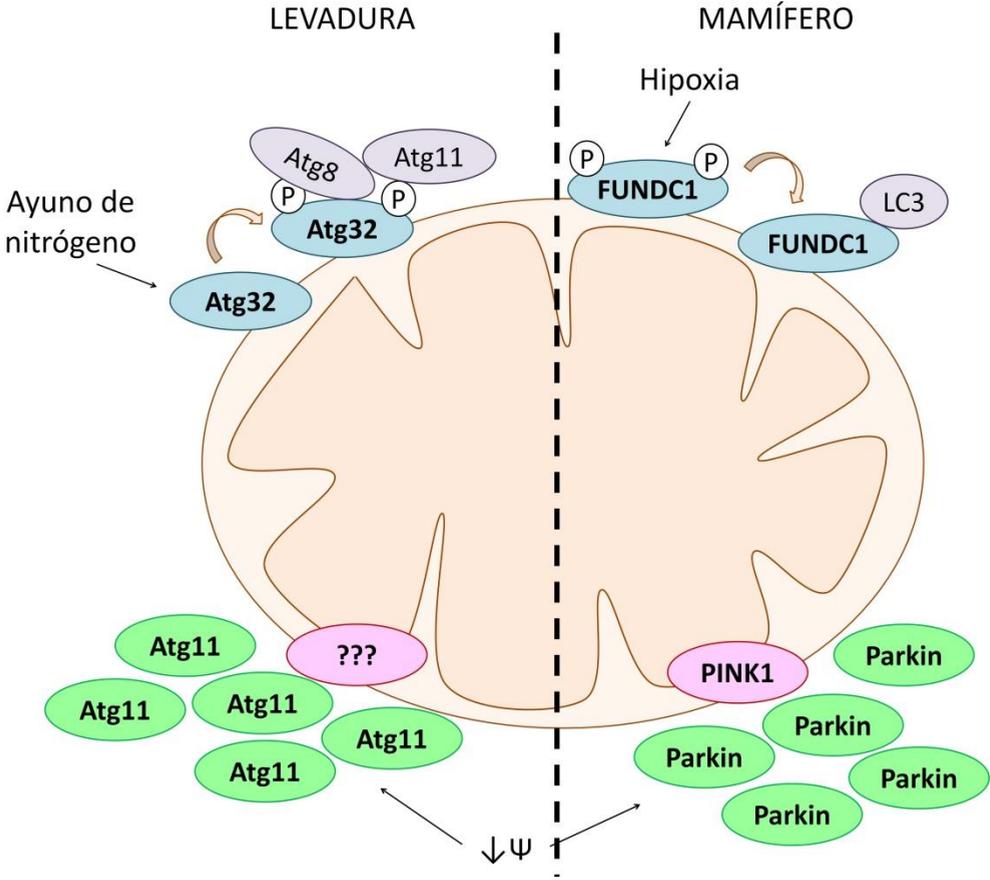


Figura 54. Modelo simplificado de los diferentes mecanismos de mitofagia en levadura y mamífero. La mitofagia mediada por receptores, se llevaría a cabo por Atg32 o por FUNDC1 (entre otros receptores) ante condiciones de ayuno en levadura o ante hipoxia, respectivamente. Los receptores se activan por procesos de fosforilación/desfosforilación. En la mitofagia inducida ante una disrupción del potencial de membrana, la acumulación de la proteína Atg11 en levadura o Parkin (atraída por PINK1) en mamífero provoca el inicio del proceso. En levadura se desconoce la proteína o el mecanismo que atrae a Atg11 a la mitocondria. Ψ : potencial de membrana. P: fosfato.



Conclusiones

1. La adaptación de la mitocondria a condiciones de elevada tasa respiratoria y de estrés osmótico incluye el cambio inducido del transportador de piruvato mitocondrial de Mpc1/2 a Mpc1/3. Esta activación de la subunidad Mpc3 está mediada por la MAP quinasa Hog1.

2. Una elevada tasa respiratoria estimula la degradación selectiva de los complejos de transporte de electrones mitocondriales CI y CIII. Este proceso es proporcional al grado de respiración celular. Las proteasas mitocondriales Yme1 y Pim1 tienen un papel en este mecanismo adaptativo.

3. El tratamiento con valinomicina provoca una degradación de la mitocondria de una forma más inmediata y selectiva que el ayuno de nitrógeno en levadura. Específicamente, los complejos respiratorios I y III muestran elevadas tasas de degradación ante un daño inducido por valinomicina.

4. Atg32 es indispensable en el proceso de mitofagia inducida por ayuno, pero no es necesario en la degradación de la mitocondria inducida por valinomicina. En cambio, en este último proceso Atg11 parece tener una función esencial. Los componentes de los procesos de dinámica mitocondrial, fusión y fisión (Fzo1/Fis1), así como las proteasas mitocondriales Afg3, Yme1 y Pim1 también influyen en esta degradación ante daño mitocondrial.

5. La sobreexpresión de Atg11 induce por sí misma la degradación de CI y CIII dependiente de la presencia de un daño mitocondrial específico, pero independiente de *ATG32*.

6. Atg11 interacciona consigo mismo formando dímeros u oligómeros a partir de su extremo C-terminal. Ante un cambio diáuxico y un tratamiento

con valinomicina se inducen agregados de Atg11 próximos a la mitocondria que podrían ser el punto de inicio de la mitofagia inducida por valinomicina en levadura. La dimerización/oligomerización de Atg11 no es detectable en condiciones fermentativas o ante un ayuno de nitrógeno.

7. La proteína Atg11 es capaz de interactuar con proteínas glicolíticas, como Fba1, Tpi1 y Hxk2, aunque se desconoce la función fisiológica de esta conexión.

8. Los mecanismos mitocondriales de adaptación a condiciones de elevada tasa respiratoria y a estrés son diversos y complejos, e incluyen cambios tanto a nivel molecular como organular y celular.



Referencias

- Abeliovich, H. (2011). Stationary-Phase Mitophagy in Respiring *Saccharomyces cerevisiae*. *Antioxidants & Redox Signaling*, *14*(10), 2003–2011. <http://doi.org/10.1089/ars.2010.3807>
- Abraira, V. (2015). Desviación estándar y error estándar. *Notas estadísticas*, *28*(11), 621–623.
- Acin-Perez, R., & Enriquez, J. a. (2014). The function of the respiratory supercomplexes: The plasticity model. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1837*(4), 444–450. <http://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.12.009>
- Alberti, S., Gitler, A.D., V., Lindquist, S. (2007). A suite of Gateway cloning vectors for high-throughput genetic analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, *24*, 913-919. <http://doi.org/10.1002/yea>
- Aoki, Y., Kanki, T., Hirota, Y., Kurihara, Y., Saigusa, T., Uchiumi, T., Kang, D. (2011). Phosphorylation of serine 114 on atg32 mediates mitophagy. *Molecular Biology of Cell*, *22*(17), 3206-17. doi: 10.1091/mbc.E11-02-0145
- Arlt, H., Steglich, G., Perryman, R., Guiard, B., Neupert, W., Langer, T. (1998). The formation of respiratory chain complexes in mitochondria is under the proteolytic control of the m-AAA protease. *EMBO Journal*, *17*(16), 4837-47.
- Arnold, I., Wagner-Ecker, M., Ansorge, W., Langer, T. (2006). Evidence for a novel mitochondria-to-nucleus signaling pathway in respiring cells lacking i-AAA proteases and the ABC-transporter Mdl1. *Gene*, *367*, 74-88.
- Ashrafi, G., and Schwarz, T.L. (2012). The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death and Differentiation*, *20*(1), 31-42. doi: 10.1038/cdd.2012.81
- 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. <http://doi.org/10.2741/4098>
- Bailey, T. L., Bodén, M., Whittington, T., & Machanick, P. (2010). The value of position-specific priors in motif discovery using MEME. *BMC Bioinformatics*, *11*, 179. <http://doi.org/10.1186/1471-2105-11-179>
- Baker, T.A. & Sauer, R.T. (2012). ClpXP, an ATP-powered unfolding and protein degradation machine. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1823*, 15–28.
- Barrientos, A. & Ugalde, C. (2013). I function, therefore I am: Overcoming skepticism about mitochondrial supercomplexes. *Cell Metabolism*, *18*(2), 147-149. doi: 10.1016/j.cmet.2013.07.010
- Barros, M.H., Netto, L.E., Kowaltowski, A.J. (2003). H₂O₂ generation in *Saccharomyces cerevisiae* respiratory pet mutants: effects of cytochrome c. *Free Radicals in Biological Medicine*, *35*(2), 179-88.
- Barros, M. H., da Cunha, F. M., Oliveira, G. a, Tahara, E. B., & Kowaltowski, A. J. (2010). Yeast as a model to study mitochondrial mechanisms in ageing.

- Mechanisms of Ageing and Development*, 131(7-8), 494–502. <http://doi.org/10.1016/j.mad.2010.04.008>
- Bender, T., Leidhold, C., Ruppert, T., Franken, S., *et al.* (2010). The role of protein quality control in mitochondrial protein homeostasis under oxidative stress. *Proteomics*, 10(7), 1426-1443.
- Bender, T., Pena, G., Martinou, J.C. (2015). Regulation of mitochondrial pyruvate uptake by alternative pyruvate carrier complexes. *EMBO Journals*, 34(7), 911-24. <http://doi.org/10.15252/embj.201490197>
- Bernhardt, D., Müller, M., Reichert, A.S., Osiewacz, H.D. (2015). Simultaneous impairment of mitochondrial fission and fusion reduces mitophagy and shortens replicative lifespan. *Science Reports*, 5: 7885. doi: 10.1038/srep07885
- Berry, D.B., Gasch, A.P. (2008). Stress-activated genomic expression changes serve a preparative role for impending stress in yeast. *Molecular Biology of Cell*, 19, 4580–4587.
- Berry, D. B., Guan, Q., Hose, J., Haroon, S., Gebbia, M., Heisler, L. E., ... Gasch, A. P. (2011). Multiple Means to the Same End: The Genetic Basis of Acquired Stress Resistance in Yeast. *PLoS Genetics*, 7(11), e1002353. <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002353>
- Berthet, A., Margolis, E. B., Zhang, J., Hsieh, I., Zhang, J., Hnasko, T. S., ... Nakamura, K. (2014). Loss of Mitochondrial Fission Depletes Axonal Mitochondria in Midbrain Dopamine Neurons. *Journal of Neuroscience*, 34(43), 14304–14317. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0930-14.2014>
- Béve, J., Hu, G. Z., Myers, L. C., Balciunas, D., Werngren, O., Hultenby, K., ... Gustafsson, C. M. (2005). The structural and functional role of Med5 in the yeast mediator tail module. *Journal of Biological Chemistry*, 280(50), 41366–41372. <http://doi.org/10.1074/jbc.M511181200>
- 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. *Biomedical Pharmacother*, 74(8), 101-10. doi: 10.1016/j.biopha.2015.07.025
- Bianchi, C., Fato, R., Genova, M.L., ParentiCastelli, G., Lenaz, G. (2003). Structural and functional organization of Complex I in the mitochondrial respiratory chain. *Biofactors*, 18, 3-9.
- 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>
- Bohovych, I., Chan, S. S. L., & Khalimonchuk, O. (2015). Mitochondrial Protein Quality Control: The Mechanisms Guarding Mitochondrial Health.

- Antioxidants & Redox Signaling*, 22(12), 977–994.
<http://doi.org/10.1089/ars.2014.6199>
- Boore, J. L. (1999). Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, 27(8), 1767-80.
- Boubekeur, S., Bunoust, O., Camougrand, N., Castroviejo, M., Rigoulet, M., & Guérin, B. (1999). A Mitochondrial Pyruvate Dehydrogenase Bypass in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 274(30), 21044–21048. <http://doi.org/10.1074/jbc.274.30.21044>
- Bragoszewski, P., Gornicka, A., Sztolsztener, M., and Chacinska, A. (2013). The ubiquitin-proteasome system regulates mitochondrial intermembrane space proteins. *Molecular and Cell Biology*, 33, 2136–2148.
- Bricker, D.K., Taylor, E.B., Schell, J.C., Orsak, T., Boutron, A., Chen, Y.C., Cox, J.E., Cardon, C.M., Van Vranken, J.G., Dephoure, N., Redin, C., Boudina, S., Gygi, S.P., Brivet, M., Thummel, C.S., Rutter, J. (2012). A mitochondrial pyruvate carrier required for pyruvate uptake in yeast, *Drosophila* and humans. *Science*, 337(6090), 96-100. doi: 10.1126/science.1218099
- Brivet, M., Garcia-Cazorla, A., Lyonnet, S., Dumez, Y., Nassogne, M.C., Slama, A., Boutron, A., Touati, G., Legrand, A., Saudubray, J.M. (2003). Impaired mitochondrial pyruvate importation in a patient and a fetus at risk. *Molecular Genetics Metabolism*, 78, 186-92.
- Buhlman, L., Damiano, M., Bertolin, G., Ferrando-Miguel, R., Lombès, A., Brice, A., et al. (2014). Functional interplay between Parkin and Drp1 in mitochondrial fission and clearance. *Biochimica et Biophysica Acta* 1843, 2012–2026. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.05.012
- Burke, D., Dawson, D., and T.S. (2000). Methods in yeast genetics (A Cold Spring Harbor course manual). *Cold Spring Harbor Laboratory Press* 2000.
- Burte, F., Carelli, V., Chirenyy, P., Yu-Wai-Man, P. (2015). Disturbed mitochondrial dynamics and neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neurology*, 11, 11-24. <http://doi:10.1038/nrneurol.2014.228>
- Caino, M.C., Altieri, D.C. (2015). Cancer cells exploit adaptive mitochondrial dynamics to increase tumor cell invasion. *Cell Cycle*, 28, 0.
- Cassereau, J., Codron, P., Funalot, B. (2014). Inherited peripheral neuropathies due to mitochondrial disorders. *Reviews in Neurology*, 170 (5), 366–374.
- Cesnekova, J., Rodinova, M., Hansikova, H., Houstek, J., Zeman, J., Stiburek, L. (2016). The mammalian homologue of yeast AFG1 ATPase (Lactation elevated 1) mediates degradation of nuclear-encoded complex IV subunits. *Biochemical Journal*. pii: BJ20151029.
- Chaban, Y., Boekema, E. J., & Dudkina, N. V. (2014). Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their

- stabilisation. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1837(4), 418–426. <http://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.10.004>
- Chazotte, B., & Hackenbrock, C. R. (1991). Lateral diffusion of redox components in the mitochondrial inner membrane is unaffected by inner membrane folding and matrix density. *Journal of Biological Chemistry*, 266(9), 5973–5979.
- Cheong, H., Nair, U., Geng, J., Klionsky, D.J. (2008). The Atg1 kinase complex is involved in the regulation of protein recruitment to initiate sequestering vesicle formation for nonspecific autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology Cell*, 19(2), 668–81.
- Chen, G., Han, Z., Feng, D., *et al.* (2014). A regulatory signaling loop comprising the PGAM5 phosphatase and CK2 controls receptor-mediated mitophagy. *Molecular Cell*, 54, 362–377.
- Choi, J.-S., Choi, K.-M., & Lee, C.-K. (2011). Caloric restriction improves efficiency and capacity of the mitochondrial electron transport chain in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 409(2), 308–314. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.05.008>
- Choi, J.-S., & Lee, C.-K. (2013). Maintenance of cellular ATP level by caloric restriction correlates chronological survival of budding yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 439(1), 126–131. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.08.014>
- Choi, K.-M., Kwon, Y.-Y., & Lee, C.-K. (2015). Disruption of Snf3/Rgt2 glucose sensors decreases lifespan and caloric restriction effectiveness through Mth1/Std1 by adjusting mitochondrial efficiency in yeast. *FEBS Letters*, 589(3), 349–357. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.12.020>
- Chung, Y.W., & Kang, S.M. (2015). Experimental approach to study the function of mitochondria in cardiomyopathy. *BMB Reports*, 07, 3303.
- Claypool, S. M. (2009). Cardiolipin, a critical determinant of mitochondrial carrier protein assembly and function. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788, 2059–2068.
- Clotet, J., Escote, X., Adrover, M.A., Yaakov, G., Gari, E., *et al.* (2006). Phosphorylation of Hsl1 by Hog1 leads to a G2 arrest essential for cell survival at high osmolarity. *EMBO Journals*, 25: 2338–2346.
- Conrad, M., Schothorst, J., Kankipati, H. N., Van Zeebroeck, G., Rubio-Texeira, M., & Thevelein, J. M. (2014). Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(2), 254–299. <http://doi.org/10.1111/1574-6976.12065>
- Cosentino, K., & García-Sáez, A. J. (2014). Mitochondrial alterations in apoptosis. *Chemistry and Physics of Lipids*, 181, 62–75. <http://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2014.04.001>

- Davies, V.J., Hollins, A.J., Piechota, M.J., Yip, W., Davies, J.R., White, K.E., Nicols, P.P., Boulton, M.E., Votruba, M. (2007). Opa1 deficiency in a mouse model of autosomal dominant optic atrophy impairs mitochondrial morphology, optic nerve structure and visual function. *Human Molecular Genetics*, 16 (11), 1307–1318.
- De Lucena, R. M., Elsztein, C., de Barros Pita, W., de Souza, R. B., de Sá Leitão Paiva Júnior, S., & de Moraes Junior, M. A. (2015). Transcriptomic response of *Saccharomyces cerevisiae* for its adaptation to sulphuric acid-induced stress. *Antonie van Leeuwenhoek*. <http://doi.org/10.1007/s10482-015-0568-2>
- Deng, W.J., Nie, S., Dai, J., Wu, J.R., Zeng, R. (2010). Proteome, phosphoproteome and hydroxyproteome of liver mitochondria in diabetic rats at early pathogenic stages. *Molecular Cell Proteomics*, 9, 100-116.
- Dhar, R., Sagesser, R., Weikert, C., & Wagner, a. (2013). Yeast Adapts to a Changing Stressful Environment by Evolving Cross-Protection and Anticipatory Gene Regulation. *Molecular Biology and Evolution*, 30(3), 573–588. <http://doi.org/10.1093/molbev/mss253>
- Dhingra, R., & Kirshenbaum, L. a. (2014). Regulation of Mitochondrial Dynamics and Cell Fate. *Circulation Journal*, 78(4), 803–810. <http://doi.org/10.1253/circj.CJ-14-0240>
- Di Fonzo, A., Ronchi, D., Lodi, T., Fassone, E., Tigano, M., Lamperti, C., Corti, S., Bordoni, A., Fortunato, F., Nizzardo, M. et al. (2009). The mitochondrial disulfide relay system protein GFER is mutated in autosomal-recessive myopathy with cataract and combined respiratory-chain deficiency. *American Journal of Human Genetics*, 84, 594-604.
- Diaz-Ruiz, R., Rigoulet, M., Devin, A. (2010). The Warburg and Crabtree effects: on the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1807(6), 568–576.
- Dilova, I., Aronova, S., Chen, J.C., Powers, T. (2004). Tor signaling and nutrient-based signals converge on Mks1p phosphorylation to regulate expression of Rtg1.Rtg3p-dependent target genes. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 46527–46535. doi: 10.1074/jbc.M409012200
- Dinkel, H., Michael, S., Weatheritt, R.J., Davey, N.E., Van Roey, K., Altenberg, B., Toedt, G., Uyar, B., Seiler, M., Budd, A., Jödicke, L., Dammert, M.A., Schroeter, C., Hammer, M., Schmidt, T., Jehl, P., McGuigan, C., Dymecka, M., Chica, C., Luck, K., Via, A., Chatr-Aryamontri, A., Haslam, N., Grebney, G., Edwards, R.J., Steinmetz, M.O., Meiselbach, H., Diella, F., Gibson, T.J. (2012). ELM-the database of eukaryotic linear motifs. *Nucleic Acids Research*, 40(D1), D242-251. doi: 10.1093/nar/gkr1064
- Dolz-Edo, L., Rienzo, a., Poveda-Huertes, D., Pascual-Ahuir, a., & Proft, M. (2013). Deciphering Dynamic Dose Responses of Natural Promoters and Single cis

- Elements upon Osmotic and Oxidative Stress in Yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 33(11), 2228–2240. <http://doi.org/10.1128/MCB.00240-13>
- Dorn, G.W. (2015). Mitochondrial dynamism and heart disease : changing shape and shaping change. *EMBO Molecular Medicine*, 7(7), 865–877.
- Dower, W.J., Miller, J.F., Ragsdale, C.W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research*, 16(13), 6127-45.
- 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.
- Eisenberg, T., Büttner, S., Kroemer, G., & Madeo, F. (2007). The mitochondrial pathway in yeast apoptosis. *Apoptosis*, 12(5), 1011–1023. <http://doi.org/10.1007/s10495-007-0758-0>
- 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. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.04.030>
- Ephrussi, B. and Slonimski, P. P. (1955). Subcellular units involved in the synthesis of respiratory enzymes in yeast. *Nature*, 176, 1207-1208.
- Epstein, C.B, *et al.* (2001). Genome-wide responses to mitochondrial dysfunction. *Molecular Biology of Cell*; 12, 297–308.
- Ersoy Tunali, N., Marobbio, C. M. T., Tiryakioğlu, N. O., Punzi, G., Saygili, S. K., Önal, H. and Palmieri, F. (2014). A novel mutation in the SLC25A15 gene in a Turkish patient with HHH syndrome: functional analysis of the mutant protein. *Molecular Genetics Metabolism*, 112, 25-29.
- Escote, X., Zapater, M., Clotet, J., Posas, F. (2004). Hog1 mediates cell-cycle arrest in G1 phase by the dual targeting of Sic1. *Nature Cell Biology*, 6: 997-1002.
- Farre, J.C., Burkenroad, A., Burnett, S.F., Subramani, S. (2013). Phosphorylation of mitophagy and pexophagy receptors coordinates their interaction with Atg8 and Atg11. *EMBO reports*, 14(5), 441-9. doi: 10.1038/embor.2013.40
- Fields, S., Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340(6230), 245-6.
- Flick, K.M., Spielewoy, N., Kalashnikova, T.I., Guaderrama, M., Zhu, Q., Chang, H.C. and Wittenberg, C. (2003) Grr1-dependent inactivation of Mth1 mediates glucose-induced dissociation of Rgt1 from HXT gene promoters. *Molecular Biology of Cell*, 14, 3230–3241.
- Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N., & Purnelle, B. (1998). The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 440(3), 325–331. [http://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01467-7](http://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01467-7)

- Frey, T. G., Renken, C. W., & Perkins, G. a. (2002). Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1555(1-3), 196–203. [http://doi.org/10.1016/S0005-2728\(02\)00278-5](http://doi.org/10.1016/S0005-2728(02)00278-5)
- Galloway, C. a., & Yoon, Y. (2015). Mitochondrial Dynamics in Diabetic Cardiomyopathy. *Antioxidants & Redox Signaling*, 22(17), 150413134904009. <http://doi.org/10.1089/ars.2015.6293>
- Gan, B., Guan, J.L. (2008). FIP200, a key signaling node to coordinately regulate various celular processes. *Cell Signaling*, 20(5), 787-94.
- Gao, Q., Ren, Q., Liou, L.-C., Bao, X., & Zhang, Z. (2011). Mitochondrial DNA protects against salt stress-induced cytochrome c-mediated apoptosis in yeast. *FEBS Letters*, 585(15), 2507–2512. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.06.034>
- García-Ruiz, C., Kaplowitz, N., Fernandez-Checa, J.C. (2013). Role of mitochondria in alcoholic liver disease. *Current Pathobiology Reports*, 1(3), 159-168.
- Gasmi, N., Jacques, P.-E., Klimova, N., Guo, X., Ricciardi, a., Robert, F., & Turcotte, B. (2014). The Switch from Fermentation to Respiration in *Saccharomyces cerevisiae* Is Regulated by the Ert1 Transcriptional Activator/Repressor. *Genetics*, 198(2), 547–560. <http://doi.org/10.1534/genetics.114.168609>
- Gaspard, G.J., McMaster, C.R. (2015). The mitochondrial quality control protein Yme1 is necessary to prevent defective mitophagy in a yeast model of Barth syndrome. *Journal of Biological Chemistry*, 290(14), 9284-98. doi: 10.1074/jbc.M115.641878
- Genova, M.L., Bianchi, C., Lenaz, G. (2003). Structural organization of the mitochondrial respiratory chain. *Italian Journal of Biochemistry*, 52(1), 58-61.
- Ghaemmaghami, S., Huh, W.K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O’Shea, E.K., Weissman, J.S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*, 425(6959), 737-41.
- 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. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddt067>
- Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R., and Woods, R. A. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, 11, 355-360.
- Gietz, R. D., & Schiestl, R. H. (2007). Large-scale high-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nature Protocols*, 2(1), 38–41. <http://doi.org/10.1038/nprot.2007.16>

- Gomar-Alba, M., Morcillo-Parra, M. Á., & Olmo, M. Del. (2015). Response of yeast cells to high glucose involves molecular and physiological differences when compared to other osmopressure conditions. *FEMS Yeast Research*, *15*(5), fov039. <http://doi.org/10.1093/femsyr/fov039>
- Gomes, L.C., et al. (2011). During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nature cell biology*, *13*, 589–598.
- Gomez-Valades, A.G., Gonzalez-Franquesa, A., Perez, P.G., Claret, M. (2015). Emerging concepts in diabetes: mitochondrial dynamics and glucose homeostasis. *Current Diabetes Review*. Epub ahead of print.
- González, A., Casado, C., Ariño, J., Casamayor, A. (2013). Ptc6 is required for proper rapamycin-induced down-regulation of the genes coding for ribosomal and rRNA processing proteins in *S. cerevisiae*. *PLoS One*, *8*(5), e64470. doi: 10.1371/journal.pone.0064470
- Goujon, M., McWilliam, H., Li, W., Valentin, F., Squizzato, S., Paern, J., & Lopez, R. (2010). A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research*, *38*(SUPPL. 2), 695–699. <http://doi.org/10.1093/nar/gkq313>
- Goyal, G., Fell, B., Sarin, A., Youle, R.J., et al. (2007). Role of mitochondrial remodeling in programmed cell death in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Cell*, *12*, 807–16.
- Gray, L.R., Tompkins, S.C., Taylor, E.B. (2014). Regulation of pyruvate metabolism and human disease. *Cell Molecular Life Sciences*, *71*, 2577-2604.
- Gray, L.R., Sultana, M.R., Rauckhorst, A.J., Oonthonpan, L., Tompkins, S.C., Sharma, A., Fu, X., Miao, R., Pawa, A.D., Brown, K.S., Lane, E.E., Dohlman, A., Zepeda-Orozco, D., Xie, J., Rutter, J., Norris, A.W., Cox, J.E., Burgess, S.C., Potthoff, M.J., Taylor, E.B. (2015). Hepatic mitochondrial pyruvate carrier 1 is required for efficient regulation of gluconeogenesis and whole-body glucose homeostasis. *Cell Metabolism*, *22*(4), 669-81. doi: 10.1016/j.cmet.2015.07.027.
- Guedes-Dias, P., Pinho, B. R., Soares, T. R., de Proença, J., Duchon, M. R., & Oliveira, J. M. a. (2015). Mitochondrial dynamics and quality control in Huntington's disease. *Neurobiology of Disease*. <http://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.09.008>
- Güldener, U., Heck, S., Fiedler, T., Beinbauer, J., & Hegemann, J. H. (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Research*, *24*(13), 2519–2524. <http://doi.org/10.1093/nar/24.13.2519>
- Hamon, M.P., Bayot, A., Gareil, M., Chavatte, L., Lombès, A., Friguet, B., Bulteau, A.L. (2014). Effects of Lon protease down-regulation on the mitochondrial function and proteome. *Free Radical Biological Medicine*, *75* Suppl 1, S32-3. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.767.

- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557–580. [http://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](http://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8)
- Harbauer, A.B., Zahedi, R.P., Sickmann, A., Pfanner, N., Meisinger, C. (2014). The protein import machinery of mitochondria – a regulatory hub in metabolism, stress and disease. *Cell Metabolism*, 19, 357-372.
- He, C., Song, H., Yorimitsu, T., Monastyrska, I., Yen, W.L., Legakis, J.E., Klionsky, D.J. (2006). Recruitment of Atg9 to the preautophagosomal structure by Atg11 is essential for selective autophagy in budding yeast. *Journal of Cell Biology*, 175(6), 925-35.
- Hebert, A.S., Dittenhafer-Reed, K.E., Yu, W., Bailey, D.J., Selen, E.S., Boersma, M.D., Carson, J.J., Tonelli, M., Balloon, A.J., Higbee, A.J., Westphall, M.S., Pagliarini, D.J., Prolla, T.A., Assadi-Porter, F., Roy, S., Denu, J.M., Coon, J.J. (2013). Calorie restriction and SIRT3 trigger global reprogramming of the mitochondrial acetylome. *Molecular Cell*, 49, 186-199.
- Hedbacker, K., Carlson, M. (2008). SNF1/AMPK pathways in yeast. *Frontiers in Bioscience*, 13, 2408-20.
- Heo, J.M., Livnat-Levanon, N., Taylor, E.B., Jones, K.T., Dephoure, N., Ring, J., Xie, J., Brodsky, J.L., Madeo, F., Gygi, S.P., Ashrafi, K., Glickman, M.H., Rutter, J. (2010). A stress-responsive system for mitochondrial protein degradation. *Molecular Cell*, 40(3), 465-80. doi: 10.1016/j.molcel.2010.10.021.
- Herzig, S., Raemy, E., Montessuit, S., Veuthey, J., Zamboni, N., Westermann, B., Kungi, E.R., Martinou, J. (2012). Identification and functional expression of the mitochondrial pyruvate carrier. *Science*, 337(6090), 93-6. doi: 10.1126/science.1218530.
- Holz, C., Prinz, B., Bolotina, N., Sievert, V., Büsow, K., Simon, B., ... Lang, C. (2003). Establishing the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a system for expression of human proteins on a proteome-scale. *Journal of Structural and Functional Genomics*, 4(2-3), 97–108. <http://doi.org/10.1023/A:1026226429429>
- Hoppins, S., Horner, J., Song, C., McCaffery, J. M., & Nunnari, J. (2009). Mitochondrial outer and inner membrane fusion requires a modified carrier protein. *The Journal of Cell Biology*, 184(4), 569–581. <http://doi.org/10.1083/jcb.200809099>
- Hoppins, S. (2014). The regulation of mitochondrial dynamics. *Current Opinion in Cell Biology*, 29C, 46–52. <http://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.03.005>
- Horn, S.R., Thomenius, M.J., Johnson, E.S., Freel, C.D., et al. (2011). Regulation of mitochondrial morphology by APC/CCdh1-mediated control of Drp1 stability. *Molecular Biology of Cell*, 22, 1207–16.
- Hou, L., Xiong, N., Liu, L., Huang, J., Han, C., Zhang, G., Li, J., Xu, X., Lin, Z., Wang, T. (2015). Lithium protects dopaminergic cells from rotenone toxicity via

- autophagy enhancement. *BioMed Central Neuroscience*, 16(1), 82. doi: 10.1186/s12868-015-0222-y
- Huh, W. K., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S., and O'Shea, E. K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature*, 425, 686-691.
- Ikeda, Y., Shirakabe, A., Brady, C., Zablocki, D., Ohishi, M., & Sadoshima, J. (2015). Molecular mechanisms mediating mitochondrial dynamics and mitophagy and their functional roles in the cardiovascular system. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 78, 116–122. <http://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.09.019>
- Ito, K., Suda, T. (2014). Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. *Nature Reviews Molecular and Cell Biology*, 15: 243-56.
- Itoh, K., Nakamura, K., Iijima, M., & Sesaki, H. (2013). Mitochondrial dynamics in neurodegeneration. *Trends in Cell Biology*, 23(2), 64–71. <http://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.10.006>
- Jazwinski, S.M. (2013). The retrograde response: when mitochondrial quality control is not enough. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833(2): 400-9. Doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.02.010
- Jazwinski, S. M. (2014). The retrograde response: a conserved compensatory reaction to damage from within and from without. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 127, 133–54. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-394625-6.00005-2>
- Jazwinski, S. M. (2015). The Retrograde Response. The Mitochondrion in Aging and Disease *Prog Mol Biol Transl Sci*, 127, 133-154. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-394625-6.00005-2>
- Jezegou, A., Llinares, E., Anne, C., Kieffer-Jaquinod, S., O'Regan, S., Aupetit, J., Chabli, A., Sagne, C., Debacker, C., Chadefaux-Vekemans, B. *et al.* (2012). Heptahelical protein PQLC2 is a lysosomal cationic amino acid exporter underlying the action of cysteamine in cystinosis therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 109, E3434-E3443.
- Jiang, Z., Wang, W., Perry, G., Zhu, X., & Wang, X. (2015). Mitochondrial dynamic abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis. *Translational Neurodegeneration*, 4(1), 14. <http://doi.org/10.1186/s40035-015-0037-x>
- Jouandot 2nd, D., Roy, A. and Kim, J.H. (2011) Functional dissection of the glucose signaling pathways that regulate the yeast glucose transporter gene (HXT) repressor Rgt1. *Journal of Cell Biochemistry*, 112, 3268–3275.
- Jouaville, L. S., Pinton, P., Bastianutto, C., Rutter, G. a, & Rizzuto, R. (1999). Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of*

- the United States of America*, 96(24), 13807–13812. <http://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13807>
- Kabala, A. M., Lasserre, J.-P., Ackerman, S. H., di Rago, J.-P. and Kucharczyk, R. (2014). Defining the impact on yeast ATP synthase of two pathogenic human mitochondrial DNA mutations, T9185C and T9191C. *Biochimie* 100, 200-206.
- Kanki, T., & Klionsky, D. J. (2008). Mitophagy in yeast occurs through a selective mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 283(47), 32386–32393. <http://doi.org/10.1074/jbc.M802403200>
- Kanki, T., Wang, K., Baba, M., Bartholomew, C.R., Lynch-Day, M.A., Du, Z., Geng, J., Mao, K., Yang, Z., Yen, W.L., Klionsky, D.J. (2009). A genomic screen for yeast mutants defective in selective mitochondria autophagy. *Molecular Biology of Cell*, 20(22), 4730-8. doi: 10.1091/mbc
- Kanki, T., Klionsky, D.J. (2010). The molecular mechanism of mitochondria autophagy in yeast. *Molecular Microbiology*, 75(4), 795-800. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.07035
- Kanki, T., Wang, K., Klionsky, D.J. (2010). A genomic screen for yeast mutants defective in mitophagy. *Autophagy*, 6(2), 278-80.
- Kanki, T., Kurihara, Y., Jin, X., Goda, T., Ono, Y., Aihara, M., Hirota, Y., Saigusa, T., Aoki, Y., Uchiumi, T., Kang, D. (2013). Casein kinase 2 is essential for mitophagy. *EMBO Reports*, 14(9): 788-794. doi: 10.1038/embor.2013.114
- Kanki, T., Furukawa, K., & Yamashita, S. (2015). Mitophagy in yeast: Molecular mechanisms and physiological role. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.01.005>
- Kathiresan, M., Martins, D., English, A.M. (2014). Respiration triggers heme transfer from cytochrome c peroxidase to catalase in yeast mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 111(49), 17468-73. doi: 10.1073/pnas.1409692111.
- Katzen, F. (2007). Gateway (®) recombinational cloning: a biological operating system. *Expert Opinion Drug Discovery*, 2(4), 571-89. <http://doi.org/10.1517/17460441.2.4.571>
- Kaya, A., Lee, B. C., & Gladyshev, V. N. (2015). Regulation of Protein Function by Reversible Methionine Oxidation and the Role of Selenoprotein MsrB1. *Antioxidants & Redox Signaling*, 23(10), 814–822. <http://doi.org/10.1089/ars.2015.6385>
- Kim, J. and Klionsky, D.J. (2000). Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annual Reviews in Biochemistry*, 69, 303-42.
- Kitagaki, H., Takagi, H. (2014). Mitochondrial metabolism and stress response of yeast: Applications in fermentation technologies. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117(4), 383-393.

- Klecker, T., Scholz, D., Förtsch, J., & Westermann, B. (2013). The yeast cell cortical protein Num1 integrates mitochondrial dynamics into cellular architecture. *Journal of Cell Science*, 126(Pt 13), 2924–30. <http://doi.org/10.1242/jcs.126045>
- Knorre, D. a., Popadin, K. Y., Sokolov, S. S., & Severin, F. F. (2013). Roles of mitochondrial dynamics under stressful and normal conditions in yeast cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013. <http://doi.org/10.1155/2013/139491>
- Kohlhaw, G.B. (2003). Leucine biosynthesis in fungi: entering metabolism through the black door. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67, 1-15.
- Kominsky, D.J., Brownson, M.P., Updike, D.L., Thorsness, P.E. (2002). Genetic and biochemical basis for viability of yeast lacking mitochondrial genomes. *Genetics*, 162, 1595-1604.
- Kondapalli, C., A. Kazlauskaitė, 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.
- Kondo-Okamoto, N., Noda, N. N., Suzuki, S. W., Nakatogawa, H., Takahashi, I., Matsunami, M., ... Okamoto, K. (2012). Autophagy-related protein 32 acts as autophagic degron and directly initiates mitophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 287(13), 10631–10638. <http://doi.org/10.1074/jbc.M111.299917>
- Kong, B., Tsuyoshi, H., Orisaka, M., Shieh, D.-B., Yoshida, Y., & Tsang, B. K. (2015). Mitochondrial dynamics regulating chemoresistance in gynecological cancers. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1350(1), 1–16. <http://doi.org/10.1111/nyas.12883>
- Kraakman, L.S., Winderickx, J., Thevelein, J.M., Winder, J.H. De. (1999). Structure-function analysis of yeast hexokinase: structural requirements for triggering cAMP signaling and catabolite repression. *Biochemical journal*, 343(1), 159-168.
- Kurihara, Y., Kanki, T., Aoki, Y., Hirota, Y., Saigusa, T., Uchiumi, T., & Kang, D. (2012). Mitophagy plays an essential role in reducing mitochondrial production of reactive oxygen species and mutation of mitochondrial DNA by maintaining mitochondrial quantity and quality in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 287(5), 3265–3272. <http://doi.org/10.1074/jbc.M111.280156>
- Lapuente-Brun, E., Moreno-Loshuertos, R., Acín-Pérez, R., Latorre-Pellicer, A., Colás, C., Balsa, E., ... Enríquez, J. A. (2013). Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science (New York, N.Y.)*, 340(6140), 1567–70. <http://doi.org/10.1126/science.1230381>

- Larsson, N.G. (2010) Somatic mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. *Annual Reviews in Biochemistry*, 79, 683–706.
- Lasserre, J.-P., Dautant, a., Aiyar, R. S., Kucharczyk, R., Glatigny, a., Tribouillard-Tanvier, D., di Rago, J.-P. (2015). Yeast as a system for modeling mitochondrial disease mechanisms and discovering therapies. *Disease Models & Mechanisms*, 8(6), 509–526. <http://doi.org/10.1242/dmm.020438>
- Li, X., & Gehring, K. (2015). Structural studies of parkin and salsin: Mitochondrial dynamics in neurodegenerative diseases. *Movement Disorders*, 00(00), n/a–n/a. <http://doi.org/10.1002/mds.26357>
- Li, F., Taijooon, C., Vierstra, R.D. (2014). Autophagy-related11 plays a critical role in general autophagy- and senescence-induced mitophagy in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 26788-807.
- Li, F., Vierstra, R.D. (2014). Arabidopsis ATG11, a scaffold that links the ATG1-ATG13 kinase complex to general autophagy and selective mitophagy. *Autophagy*, 10(8), 1466-7. doi: 10.4161/auto.29320
- Liang, Q., Kobayashi, S. (2015). Mitochondrial quality control in the diabetic heart. *Journal of Molecular and Cell Cardiology*. pij: S0022-2828(15)30163-2. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.12.025
- Liang, L., Li, Q., Huang, L., Li, D., Li, X. (2015). Sirt3 binds to and deacetylates mitochondrial pyruvate carrier 1 to enhance its activity. *Biochemical and biophysics Research Community*, 468(4), 807-12. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.11.036
- Liao, X., & Butow, R.A. (1993). RTG1 and RTG2: two yeast genes required for a novel path of communication from mitochondria to the nucleus. *Cell*, 72, 61–71.
- Lill, R., Hoffmann, B., Molik, S., Pierik, A. J., Rietzschel, N., Stehling, O., ... Mühlhoff, U. (2012). The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1823(9), 1491–1508. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.05.009>
- Lionaki, E., Markaki, M., Palikaras, K., & Tavernarakis, N. (2015). Mitochondria, autophagy and age-associated neurodegenerative diseases: New insights into a complex interplay. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1847(11), 1412–1423. <http://doi.org/10.1016/j.bbambio.2015.04.010>
- Liu, L., Feng, D., Chen, G., Chen, M., Zheng, Q., Song, P., Ma, Q., Zhu, C., Wang, R., Qi, W., Huang, L., Xue, P. *et al.* (2012). Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nature Cell Biology*, 14(2), 177-85.
- Liu, T., Yu, R., Jin, S. B., Han, L., Lendahl, U., Zhao, J., & Nistér, M. (2013). The mitochondrial elongation factors MIEF1 and MIEF2 exert partially distinct

- functions in mitochondrial dynamics. *Experimental Cell Research*, 319(18), 2893–2904. <http://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.07.010>
- Liu, L., Sakakibara, K., Chen, Q., & Okamoto, K. (2014). Receptor-mediated mitophagy in yeast and mammalian systems. *Cell Research*, 24(7), 787–795. <http://doi.org/10.1038/cr.2014.75>
- Lo, M.C., Chen, M.H., Lee, W.S., Lu, C.I., Chang, C.R., Kao, S.H., Lee, H.M. (2015). Ne-(carboxymethyl) lysine-induced mitochondrial fission and mitophagy cause decreased insulin secretion from beta-cells. *American Journal of Endocrinology Metabolism*, 309 (10), E829-39. doi: 10.1152/ajpendo.00151.2015
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L. *et al.* (2000). Molecular Cell Biology (4th edition). Section 16.2. Electron transport and oxidative phosphorylation. *New York*: W.H. Freeman.
- Lu, W., Karuppagounder, S.S., Springer, D.A., Allen, M.D., Zheng, L., Chao, B., Zhang, Y., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Lenardo, M. (2014). Genetic deficiency of the mitochondrial protein GPAM5 causes a Parkinson's-like movement disorder. *Nature Community*, 5, 4930. doi: 10.1038/ncomms5930
- Luo, Y., Hoffer, A., Hoffer, B., & Qi, X. (2015). Mitochondria: A Therapeutic Target for Parkinson's Disease? *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 20704–20730. <http://doi.org/10.3390/ijms160920704>
- Mao, K., Wang, K., Zhao, M., Xu, T., & Klionsky, D. J. (2011). Two MAPK-signaling pathways are required for mitophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*, 193(4), 755–67. <http://doi.org/10.1083/jcb.201102092>
- Mao, K., Klionsky, D.J. (2013). Mitochondrial fission facilitates mitophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Autophagy*, 9(11), 1900-1. doi: 10.4161/auto.25804
- Mao, K., Wang, K., Liu, X., Klionski, D.J. (2013). The scaffold protein Atg11 recruits fission machinery to drive selective mitochondria degradation by autophagy. *Developmental Cell*, 26(1), 9-18. doi: 10.1016/j.devcel.2013.05.024
- 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>
- Martínez-Montañés, F., Pascual-Ahuir, A., & Proft, M. (2010). Toward a Genomic View of the Gene Expression Program Regulated by Osmostress in Yeast. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 14(6), 619–627. <http://doi.org/10.1089/omi.2010.0046>

- Martínez-Pastor, M., Proft, M., Pascual-Ahuir, A. (2010). Adaptive changes of the yeast mitochondrial proteome in response to salt stress. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, 14(5), 541-552.
- McCommis, K.S., Chen, Z., Fu, X., McDonald, W.G., Colca, J.R., Kletzien, R.F., Burgess, S.C., Finck, B.N. (2015). Loss of mitochondrial pyruvate carrier 2 in the liver leads to defects in gluconeogenesis and compensation via pyruvate-alanine cycling. *Cell Metabolism*, 22(4), 682-94. doi: 10.1016/j.cmet.2015.07.028
- McCoy, M.K., Kaganovich, A., Rudenko, I.N., Ding, J., Cookson, M.R. (2014). Hexokinase activity is required for recruitment of parkin to depolarized mitochondria. *Human Molecular Genetics*, 23(1), 145-56. doi: 10.1093/hmg/ddt407
- McQuibban, G.A., Saurya, S., Freeman, M. (2003). Mitochondrial membrane remodeling regulated by a conserved rhomboid protease. *Nature*, 423(6939), 537-41.
- McKenzie, M., Lazarou, M., Thorburn, D. R., & Ryan, M. T. (2006). Mitochondrial Respiratory Chain Supercomplexes Are Destabilized in Barth Syndrome Patients. *Journal of Molecular Biology*, 361(3), 462–469. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.06.057>
- McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y. M., Buso, N., ... Lopez, R. (2013). Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research*, 41(Web Server issue), 597–600. <http://doi.org/10.1093/nar/gkt376>
- Meijer, W.H., van der Klei, I.J., Veenhuis, M., Kiel, J.A. (2007). ATG genes involved in non-selective autophagy are conserved from yeast to man, but the selective Cvt and pexophagy pathways are also require organism-specific genes. *Autophagy*, 3(2), 106-16.
- Melser, S., Chatelain, E.H., Lavie, J., et al. (2013). Rheb regulates mitophagy induced by mitochondrial energetic status. *Cell Metabolism*, 17, 719-730.
- Melser, S., Lavie, J., & Bénard, G. (2015). Mitochondrial degradation and energy metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.05.010>
- Meunier, B., Fisher, N., Ransac, S., Mazat, J.-P. and Brasseur, G. (2013). Respiratory complex III dysfunction in humans and the use of yeast as a model organism to study mitochondrial myopathy and associated diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1827, 1346-1361.
- Mijaljica, D; Prescott, M, Devenish, R.J. (2011). A fluorescence microscopy assay for monitoring mitophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Visualized Experiments*, (53), 2779. doi: 10.3791/2779

- Mishra, P., Carelli, V., Manfredi, G., Chan, D.C. (2014). Proteolytic cleavage of Opa1 stimulates mitochondrial inner membrane fusion and couples fusion to oxidative phosphorylation. *Cell Metabolism*, 19(4), 630-41.
- Mitchell, A., Romano, G.H., Groisman, B., Yona, A., Dekel, E., Kupiec, M., Dahan, O., Pilpel, Y. (2009). Adaptive prediction of environmental changes by microorganisms. *Nature*, 460, 220–224.
- Mitra, K. (2013). Mitochondrial fission-fusion as an emerging key regulator of cell proliferation and differentiation. *BioEssays*, 35(11), 955–964. <http://doi.org/10.1002/bies.201300011>
- Mitra, K., Wunder, C., Roysam, B., Lin, G., *et al.* (2009). A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 106, 11960–5.
- Morselli, E., Shen, S., Ruckenstuhl, C., Bauer, M.A., Mariño, G., Galluzzi, L., Criollo, A., Michaud, M., Maiuri, M.C., Chano, T., Madeo, F., Kroemer, G. (2011). p53 inhibits autophagy by interacting with the human ortholog of yeast Atg17, RB1CC1/FIP200. *Cell Cycle*, 10(16), 2763-9.
- Müller, M., Lu, K., & Reichert, A. S. (2015). Mitophagy and mitochondrial dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.02.024>
- Nakai, T., Yasuhara, T., Fujiki, Y., Ohashi, A. (1995). Multiple genes, including a member of the AAA family, are essential for degradation of unassembled subunit 2 of cytochrome c oxidase in yeast mitochondria. *Molecular and Cell Biology*, 15 (8), 4441-4452.
- Nasrallah, C.M., Horvath, T.L. (2014). Mitochondrial dynamics in the central regulation of metabolism. *Nature Reviews Endocrinology*, 10, 650-658. <http://doi:10.1038/nrendo.2014.160>
- Ngo, J.K., Pomatto, L.C., Davies, K.J. (2013). Upregulation of the mitochondrial Lon protease allows adaptation to acute oxidative stress but dysregulation is associated with chronic stress, disease and aging. *Redox Biology*, 1, 258-64.
- Nicastro, R., Tripodi, F., Guzzi, C., Reghellin, V., Khoomrung, S., Capusoni, C., ... Coccetti, P. (2015). Enhanced amino acid utilization sustains growth of cells lacking Snf1/AMPK. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1853(7), 1615–1625. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.03.014>
- Norris, K. L., Hao, R., Chen, L.-F., Lai, C.-H., Kapur, M., Shaughnessy, P. J., ... Yao, T.-P. (2015). Convergence of parkin, PINK1 and α -synuclein on stress-induced mitochondrial morphological remodelling. *Journal of Biological Chemistry*, 290(22), jbc.M114.634063. <http://doi.org/10.1074/jbc.M114.634063>
- Nugroho, R. H., Yoshikawa, K., & Shimizu, H. (2015). Metabolomic analysis of acid stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, xx(xx), 396–404. <http://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.02.011>

- Okamoto, K., Kondo-Okamoto, N., & Ohsumi, Y. (2009). Mitochondria-Anchored Receptor Atg32 Mediates Degradation of Mitochondria via Selective Autophagy. *Developmental Cell*, 17(1), 87–97. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.013>
- Ong, S.-B., Kalkhoran, S. B., Cabrera-Fuentes, H. a., & Hausenloy, D. J. (2015). Mitochondrial fusion and fission proteins as novel therapeutic targets for treating cardiovascular disease. *European Journal of Pharmacology*, 763, 104–114. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.04.056>
- Osiewacz, H. D., & Bernhardt, D. (2013). Mitochondrial Quality Control: Impact on Aging and Life Span - A Mini-Review. *Gerontology*, 59(5), 413–420. <http://doi.org/10.1159/000348662>
- Ostojic, J., Panozzo, C., Lasserre, J.-P., Nouet, C., Courtin, F., Blancard, C., di Rago, J.-P. and Dujardin, G. (2013). The energetic state of mitochondria modulates complex III biogenesis through the ATP-dependent activity of Bcs1. *Cell Metabolism*, 18, 567-577.
- Otero, J. M., Papadakis, M. a., Gupta Udatha, D. B. R. K., Nielsen, J., & Panagiotou, G. (2010). Yeast biological networks unfold the interplay of antioxidants, genome and phenotype, and reveal a novel regulator of the oxidative stress response. *PLoS ONE*, 5(10). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0013606>
- Palmer, C. S., Elgass, K. D., Parton, R. G., Osellame, L. D., Stojanovski, D., & Ryan, M. T. (2013). Adaptor proteins MiD49 and MiD51 can act independently of Mff and Fis1 in Drp1 recruitment and are specific for mitochondrial fission. *Journal of Biological Chemistry*, 288(38), 27584–27593. <http://doi.org/10.1074/jbc.M113.479873>
- Papamichos-Chronakis, M., Gligoris, T., Tzamarias, D. (2004). The Snf1 kinase controls glucose repression in yeast by modulating interactions between the Mig1 repressor and Cyc8-Tup1 co-repressor. *EMBO reports*, 5(4), 368-372.
- Pareyson, D., Saveri, P., Sagnelli, A., & Piscoquito, G. (2015). Mitochondrial dynamics and inherited peripheral nerve diseases. *Neuroscience Letters*, 596, 66–77. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.04.001>
- Park, J., Lee, S.B., Lee, S., Kim, Y., Song, S., Kim, S., Bae, E., Kim, J., Shong, M., Kim, J.M., Chung, J. (2006). Mitochondrial dysfunction in Drosophila PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature*, 441(7097), 1157-61.
- Park, J., Choi, H., Min, J.-S., Kim, B., Lee, S.-R., Yun, J. W., ... Lee, D.-S. (2015). Loss of mitofusin 2 links beta-amyloid-mediated mitochondrial fragmentation and Cdk5-induced oxidative stress in neuron cells. *Journal of Neurochemistry*, (9), n/a–n/a. <http://doi.org/10.1111/jnc.129844>
- Pastor, M.M., Proft, M. and Pascual-Ahuir, A. (2009) Mitochondrial function is an inducible determinant of osmotic stress adaptation in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 30307–30317.

- Patterson, J.N., Cousteils, K., Lou, J.W., Manning Fox, J.E., MacDonald, P.E., Joseph, J.W. (2014). Mitochondrial metabolism of pyruvate is essential for regulating glucose-stimulated insulin secretion. *Journal of Biological Chemistry*, *289*, 13335-13346.
- Paumi, C.M., Menendez, A.J., Arnoldo, K., Engels, K.R., Iyer, S., Thaminy, O., Georgiev, Y., Barral, S., Michaelis, S., Stagljar, I. (2007). Mapping protein-protein interactions for the yeast ABC transporter Ycf1p by integrated split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid analysis. *Molecular Cell*, *26*, 15-25.
- Pereira, C., Costa, V., Martins, L. M., & Saraiva, L. (2015). A yeast model of the Parkinson's disease-associated protein Parkin. *Experimental Cell Research*, *333*(1), 73–79. <http://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.02.018>
- Petelenz-Kurdziel, E., Clemens, K., Nordlander, B., Klein, D., Hong, K., Jacobson, T., Dahl, P., Schaber, J., Nielsen, J., Hohmann, S., Klipp, E. (2013). Quantitative analysis of glycerol accumulation, glycolysis and growth under hyper osmotic stress. *Plos Computational Biology*, *9*(6): e1003084. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003084
- Pir, P., Ulgen, K. O., Hayes, A., Ilsen Onsan, Z., Kirdar, B., & Oliver, S. G. (2006). Annotation of unknown yeast ORFs by correlation analysis of microarray data and extensive literature searches. *Yeast (Chichester, England)*, *23*(7), 553–71. <http://doi.org/10.1002/yea.1375>
- Poole, A.C., Thomas, R.E., Andrews, L.A., McBride, H.M., Whitworth, A.J., Pallanck, L.J. (2008). The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, *105*(5), 1638-43.
- Poole, A.C., Thomas, R.E., Yu, S., Vincow, E.S., Pallanck, L. (2010). The mitochondrial fusion-promoting factor mitofusin is a substrate of the PINK1/parkin pathway. *PLoS One*, *5*(4), e10054.
- Poteet, E., Choudhury, G.R., Winters, A., Li, W., Ryou, M.G., *et al.* (2013). Reversing the Warburg effect as a treatment for glioblastoma. *Journal of Biological Chemistry*, *288*, 9153-64.
- Pressman, B. C. (1965). Induced active transport of ions in mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *53*(5), 1076–1083. <http://doi.org/10.1073/pnas.53.5.1076>
- Proft, M., Gibbons, F. D., Copeland, M., Roth, F. P., & Struhl, K. (2005). Genomewide identification of Sko1 target promoters reveals a regulatory network that operates in response to osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, *4*(8), 1343–1352. <http://doi.org/10.1128/EC.4.8.1343-1352.2005>
- Rainbolt, T.K., Saunders, J.M., Wiseman, R.L. (2015). YME1L degradation reduces mitochondrial proteolytic capacity during oxidative stress. *EMBO Reports*, *16*(1), 97-106. doi: 10.15252/embr.201438976

- Rambold, A.S., Kostecky, B., Elia, N., Lippincott-Schwartz, J. (2011). Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 108, 10190–5.
- Rampelt, H., van der Laan, M. (2015) Metabolic remodeling: a pyruvate transport affair. *The EMBO Journal*, 34(7), 835–37.
- Rep, M., van Dijl, J.M., Suda, K., Schatz, G. *et al.* (1996). Promotion of mitochondrial membrane complex assembly by a proteolytically inactive yeast Lon. *Science*, 274 (5284), 103–106.
- Reinders, J., Zahedi, R. P., Pfanner, N., Meisinger, C., and Sickmann, A. (2006). Toward the complete yeast mitochondrial proteome: multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics. *Journal of Proteome Research*, 5, 1543–1554.
- Rienzo, A., Poveda-huertes, D., Aydin, S., Buchler, N. E., & Pascual-ahuir, A. (2015). Different Mechanisms Confer Gradual Control and Memory at Nutrient- and Stress-Regulated Genes in Yeast. *Molecular and Cell Biology*, 35(21), 3669–3683. <http://doi.org/10.1128/MCB.00729-15>
- Ristow, M., Schmeisser, S. (2011). Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Radicals in Biological Medicine*, 51(2), 327–36. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.010
- Ristow, M., Zarse, K. (2010). How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: The concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis). *Experimental Gerontology*, 45(6), 410–8. doi: 10.1016/j.exger.2010.03.014
- Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., & Mammucari, C. (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(9), 566–578. <http://doi.org/10.1038/nrm3412>
- Roberts, D.J., Miyamoto, S. (2015). Hexokinase II integrates energy metabolism and cellular protection: Acting on mitochondria and TORCing to autophagy. *Cell Death and Differentiation*, 22, 248–57.
- Roberts, D.J., Tan-Sah, V.P., Ding, E.Y., Smith, J.M., Miyamoto, S. (2014). Hexokinase-II positively regulates glucose starvation induced autophagy through TORC1 inhibition. *Molecular Cell*, 53, 521–533.
- Romanello, V., Guadagnin, E., Gomes, L., Roder, I., Sandri, C., *et al* (2010) Mitochondrial fission and remodelling contributes to muscle atrophy. *EMBO Journals*, 29, 1774–1785.
- 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), 205–103.

- Ruan, Y., Li, H., Zhang, K., Jian, F., Tang, J., Song, Z. (2013). Loss of Yme1L perturbrates mitochondrial dynamics. *Cell Death and Disease*, 4, e896. doi: 10.1038/cddis.2013.414
- Rugarli, E.I., Langer, T. (2012). Mitochondrial quality control: a matter of life and death for neurons. *EMBO Journals*, 31(6), 1336-49.
- Ruiz-Roig, C., Noriega, N., Duch, A., Posas, F., de Nadal, E. (2012). The Hog1 SAPK controls the Rtg1/Rtg3 transcriptional complex activity by multiple regulatory mechanisms. *Molecular and Biology of Cell*, 23, 4286–4296. doi: 10.1091/mbc.E12-04-0289
- Rutter, J., & Hughes, A. L. (2015). Power2: The power of yeast genetics applied to the powerhouse of the cell. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 26(2), 59–68. <http://doi.org/10.1016/j.tem.2014.12.002>
- Safiulina, D., Veksler, V., Zharkovsky, A. and Kaasik, A. (2006). Loss of mitochondrial membrane potential is associated with increase in mitochondrial volume: physiological role in neurons. *Journal of Cell Physiology*, 206(2), 347-353. doi: 10.1002/jcp.20476
- Salin, K., Auer, S. K., Rudolf, A. M., Anderson, G. J., Cairns, A. G., Mullen, W., ... Rc, H. (2015). Individuals with higher metabolic rates have lower levels of reactive oxygen species in vivo. *Biological Letters*, 11(9), 4–7. doi: 10.1098/rsbl.2015.0538
- Sambrook, J., and Russell, D. W. (2006). Preparation and Transformation of Competent E. coli Using Calcium Chloride. *Cold Spring Harbor Protocols* 2006. <http://doi.org/10.1101/pdb.prot3932>
- Sandoval, H., Thiagarajan, P., Dasgupta, S.K., et al. (2008). Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. *Nature*, 454, 232-235.
- Santangelo, G.M. (2006). Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological and Molecular Biology Reviews*, 70, 253-282.
- Santo-Domingo, J., & Demarex, N. (2010). Calcium uptake mechanisms of mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1797(6-7), 907–12. <http://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.01.005>
- Sauer, R.T. and Baker, T.A. (2011). AAA+ proteases: ATP-fueled machines of protein destruction. *Annual Reviews in Biochemistry*, 80, 587–612.
- Schell, J.C., Olson, K.A., Jiang, L., Hawkins, A.J., Van Vranken, J.G., Xie, J., Egnatchik, R.A., Earl, E.G., DeBerardinis, R.J., Rutter, J. (2014). A role for the mitochondrial pyruvate carrier as a repressor of the Warburg effect and colon cancer cell growth. *Molecular Cell*, 56(3), 400-13. doi: 10.1016/j.molcel.2014.09.026
- Schlame, M., Rua, D., & Greenberg, M. L. (2000). The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Progress in Lipid Research*, 39(3), 257–288. [http://doi.org/10.1016/S0163-7827\(00\)00005-9](http://doi.org/10.1016/S0163-7827(00)00005-9)

- Schmidt, O., Pfanner, N., & Meisinger, C. (2010). Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *11*(9), 655–667. <http://doi.org/10.1038/nrm2959>
- Schug, Z. T., Frezza, C., Galbraith, L. C. a., & Gottlieb, E. (2012). The music of lipids: how lipid composition orchestrates cellular behaviour, (September). <http://doi.org/10.3109/0284186X.2011.643823>
- Schüller, H.-J. (2003). Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, *43*(3), 139–160. <http://doi.org/10.1007/s00294-003-0381-8>
- Scott, D.A., Richardson, A.D., Filipp, F.V., Knutzen, C.A., Chiang, G.G., Ronai, Z.A., Osterman, A.L., Smith, J.W. (2011) Comparative metabolic flux profiling of melanoma cell lines: beyond the Warburg effect. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(49), 42626–42634.
- 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>
- Seo, B.B., Marella, M., Yagi, T., Matsuno-Yagi, A. (2006). The single subunit NADH dehydrogenase reduces generation of reactive oxygen species from complex I. *FEBS letters*, *580*(26), 6105-8.
- Seo, A.Y., Joseph, A., Dutta, D., Hwang, J.C., Aris, J.P., Leeuwenburgh, C. (2010). New insights into the role of mitochondria in aging: mitochondrial dynamics and more. *Journal of Cell Science*, *123*: 2533-2542. doi: 10.1242/jcs.070490
- Sheng, Z.H., Cai, Q. (2012) Mitochondrial transport in neurons: impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration. *Nature reviews Neuroscience*, *13*, 77–93.
- Singh, M. V., & Weil, P. A. (2002). A method for plasmid purification directly from yeast. *Analytical Biochemistry*, *307*(1), 13–17. [http://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00018-0](http://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00018-0)
- Singh, K.K., Rasmussen, A.K., Rasmussen, L.J. (2004). Genome-wide analysis of signal transducers and regulators of mitochondrial dysfunction in *Saccharomyces cerevisiae*, *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1011*, 284–298.
- Skulachev, V.P. (2001) Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends in Biochemical Sciences*, *26*, 23–29.
- Soga, T. (2013). Cancer metabolism: key players in metabolic reprogramming. *Cancer Science*, *104*, 275-281.

- St Onge, R., Schlecht, U., Scharfe, C. and Evangelista, M. (2012). Forward chemical genetics in yeast for discovery of chemical probes targeting metabolism. *Molecules* 17, 13098-13115.
- Stehling, O., Wilbrecht, C., & Lill, R. (2014). Mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis and human disease. *Biochimie*, 100(1), 61–77. <http://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.01.010>
- Strich, R. (2015). Programmed Cell Death Initiation and Execution in Budding Yeast. *Genetics*, 200(4), 1003-1014.
- Stuart, R. a. (2008). Supercomplex organization of the oxidative phosphorylation enzymes in yeast mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 40(5), 411–417. <http://doi.org/10.1007/s10863-008-9168-4>
- Suzuki, C.K., Suda, K., Wang, N., Schatz, G. (1994). Requirement for the yeast gene LON in intramitochondrial proteolysis and maintenance of respiration. *Science*, 264 (5156), 273-6.
- Suzuki, S.W., Onodera, J., Ohsumi, Y. (2011). Starvation induced cell death in autophagy-defective yeast mutants is caused by mitochondria dysfunction. *PLoS One*, 6(2), e17412.
- Szczepanowska, K. and Foury, F. (2010). A cluster of pathogenic mutations in the 3'-5' exonuclease domain of DNA polymerase gamma defines a novel module coupling DNA synthesis and degradation. *Human Molecular Genetics*, 19, 3516-3529.
- Taguchi, N., Ishihara, N., Jofuku, A., Oka, T., et al. (2007). Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 11521–9.
- Tanaka, A., Cleland, M.M., Xu, S., Narendra, D.P., Suen, D.F., Karbowski, M., Youle, R.J. (2010). Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *Journal of Cell Biology*, 191(7), 1367-80.
- Tal, R., Winter, G., Ecker, N., Klionski, D.J., Abeliovich, H. (2007). Aup1p, a yeast mitochondrial protein phosphatase homolog, is required for efficient stationary phase mitophagy and cell survival. *Journal of Biological Chemistry*, 282(8), 5617-24.
- Tanaka, A., Cleland, M.M., Xu, S., Narendra, D.P., Suen, D.F., Karbowski, M., Youle, R.J. (2010). Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *Journal of Cell Biology*, 191(7), 1397-80. doi: 10.1083/jcb.201007013
- Taylor, E. B., & Rutter, J. (2011). Mitochondrial quality control by the ubiquitin–proteasome system: Figure 1. *Biochemical Society Transactions*, 39(5), 1509–1513. <http://doi.org/10.1042/BST0391509>

- Taylor, R. G., Walker, D. C., and McInnes, R. R. (1993). E. coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Research*, *21*, 1677-1678.
- Teixeira, V., Medeiros, T.C., Vilaca, R., Pereira, A.T., Chaves, S.R., Corte-Real, M., Moradas-Ferreira, P., Costa, V. (2015). Ceramide signalling impinges on Sit4p and Hog1p to promote mitochondrial fission and mitophagy in Isc1p-deficient cells. *Cell Signalling*, *27* (9), 1840-9. doi: 10.1016/j.cellsig.2015.06.001
- Thomas, R.E., Andrews, L.A., Burman, J.L., Lin, W.Y., Pallanck, L.J. (2014). PINK1-Parkin pathway activity is regulated by degradation of PINK1 in the mitochondrial matrix. *PLoS Genetics*, *10*(5), e1004279. doi: 10.1371/journal.pgen.1004279
- Thorsness, P.E., Fox, T.D. (1993). Nuclear mutations in *Saccharomyces cerevisiae* that affect the escape of DNA from mitochondria to the nucleus. *Genetics*, *134*, 21-28.
- Thorpe, G.W., Fong, C.S., Alic, N., Higgins, V.J., Dawes, I.W. (2004). Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: oxidative-stress-response genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, *101*(17), 6564-9.
- Thorpe, G. W., Reodica, M., Davies, M. J., Heeren, G., Jarolim, S., Pillay, B., ... Dawes, I. W. (2013). Superoxide radicals have a protective role during H₂O₂ stress. *Molecular Biology of the Cell*, *24*(18), 2876–2884. <http://doi.org/10.1091/mbc.E13-01-0052>
- Timón-Gómez, A., Proft, M., Pascual-Ahuir, A. (2013). Differential regulation of mitochondrial pyruvate carrier genes modulates respiratory capacity and stress tolerance in yeast. *Plos one*, *8*(11), e79405.
- Tondera, D., Grandemange, S., Jourdain, A., Karbowski, M., et al. (2009). SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J* *28*: 1589–600
- Torre-ruiz, M. A. De, Pujol, N., & Sundaran, V. (2015). Coping With Oxidative Stress . The Yeast Model. *Current Drug Targets*, *16*(5), 2–12.
- Tran, J.R., Tomsic, L.R. and Brodsky, J.L. (2011). A Cdc48p-associated factor modulates endoplasmic reticulum-associated degradation, cell stress, and ubiquitinated protein homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*, *286*, 5744–5755.
- Tripodi, F., Nicastro, R., Reghellin, V., & Coccetti, P. (2015). Post-translational modifications on yeast carbon metabolism: Regulatory mechanisms beyond transcriptional control. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1850*(4), 620–627. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.12.010>
- Turcotte, B., Liang, X. B., Robert, F., & Soontorngun, N. (2010). Transcriptional regulation of nonfermentable carbon utilization in budding yeast. *FEMS Yeast Research*, *10*(1), 2–13. <http://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00555.x>

- Unlu, E. S., & Koc, a. (2007). Effects of Deleting Mitochondrial Antioxidant Genes on Life Span. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1100(1), 505–509. <http://doi.org/10.1196/annals.1395.055>
- Vacanti, N.M., Divakaruni, A.S., Green, C.R., Parker, S.J., Henry, R.R., Ciaraldy, T.P., Murphy, A.N., Metallo, C.M. (2014). Regulation of substrate utilization by the mitochondrial pyruvate carrier. *Molecular Cell*, 56, 425-35.
- Van der Linden, A.M., Beverly, M., Kadener, S., Rodriguez, J., Wasserman, S., Rosbash, M., Sengupta, P. (2010). Genome-wide analysis of light and temperature-entrained circadian transcripts in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biology*, 8, e1000503.
- Van Dyck, L., Pearce, D.A., Sherman, F. (1994). PIM1 encodes a mitochondrial ATP-dependent protease that is required for mitochondrial function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 269 (1):238-42.
- Van Laar, V.S., Arnold, B., Cassady, S.J., Chu, C.T., Burton, E.A., Berman, S.B. (2011). Bioenergetics of neurons inhibit the translocation response of Parkin following rapid mitochondrial depolarization. *Human Molecular Genetics*, 20(5), 927-40.
- 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*, 60(9), 1838–1851. <http://doi.org/10.1007/s00018-003-3076-x>
- Van Urk, H., Voll, W.S., Scheffers, W.A., Van Dijken, J.P. (1990). Transient-state analysis of metabolic fluxes in Crabtree-positive and Crabtree-negative yeasts. *Applied Environmental Microbiology*, 56, 281-289.
- Vanacloig-Pedros, E., Bets-Plasencia, C., Pascual-Ahuir, A., & Proft, M. (2015). Coordinated Gene Regulation in the Initial Phase of Salt Stress Adaptation. *Journal of Biological Chemistry*, 290(16), 10163–10175. <http://doi.org/10.1074/jbc.M115.637264>
- Vanderperre, B., Bender, T., Kunji, E.R.S., Martinou, J. (2015). Mitochondrial pyruvate carrier import and its effect on homeostasis. *Current Opinion in Cell Biology*, 33, 35-41. doi: 10.1016/j.ceb.2014.10.008
- Vasquez-Trincado, C., García-Carvajal, I., Pennanen, C., Parra, V., Hill, J.A., Rothermel, B.A., Lavandro, S. (2015). Mitochondrial dynamics, mitophagy and cardiovascular disease. *Journal of Physiology*. doi: 10.1113/JP271301.
- Venkatesh, S., Lee, J., Singh, K., Lee, I., and Suzuki, C.K. (2012). Multitasking in the mitochondrion by the ATP-dependent Lon protease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1823, 56–66.
- Vigueira, P.A., McCommis, K.S., Schweitzer, G.G., Remedi, M.S., Chambers, K.T., Fu, X., McDonald, W.G., Cole, S.L., Colca, J.R., Kletzien, R.F. *et al.* (2014). Mitochondrial pyruvate carrier 2 hypomorphism in mice leads to defects in glucose-stimulated insulin secretion. *Cell Reproduction*, 7, 2042-53.

- Vilain, S., Esposito, G., Haddad, D., Schaap, O., Dobрева, M.P., Vos, M., Van Meensel, S., Morais, V.A., De Strooper, B., Verstreken, P. (2012). The yeast complex I equivalent NADH dehydrogenase rescues pink1 mutants. *PLoS Genetics*, 8(1), e1002456. doi: 10.1371/journal.pgen.1002456
- Viladevall, L., Serrano, R., Ruiz, A., Domenech, G., Giraldo, J., Barcelo, A., and Arino, J. (2004). Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 43614-43624.
- Vogel, F., Bornhövd, C., Neupert, W., & Reichert, A. S. (2006). Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *Journal of Cell Biology*, 175(2), 237–247. <http://doi.org/10.1083/jcb.200605138>
- Von Stockum, S., Nardin, A., Schrepfer, E., Ziviani, E. (2015). Mitochondrial dynamics and mitophagy in Parkinson's disease: a fly point of view. *Neurobiological disorders*. pij: S0969-9961(15)3008 1-4. doi: 10.1016/j.nbd.2015.11.002
- Voos, W. (2013). Chaperone-protease networks in mitochondrial protein homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833, 388–399.
- Wang, J., Jiang, J.C., Jazwinski, S.M. (2010). Gene regulatory changes in yeast during life extension by nutrient limitation. *Experimental Gerontology*, 45, 621–631.
- Wang, K., Jin, M., Liu, X., Klionski, D.J. (2013). Proteolytic processing of Atg32 by the mitochondrial i-AAA protease Yme1 regulates mitophagy. *Autophagy*, 9(11), 1828-36. doi: 10.4161/auto.26281
- Warringer, J., & Blomberg, A. (2003). Automated screening in environmental arrays allows analysis of quantitative phenotypic profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 20(1), 53–67. <http://doi.org/10.1002/yea.931>
- Wei, Y.H., Lu, C.Y., Wei, C.Y., Ma, Y.S., Lee, H.C. (2001). Oxidative stress in human aging and mitochondrial disease-consequences of defective mitochondrial respiration and impaired antioxidant enzyme system. *Chinese Journal of Physiology*, 44 (1), 1–12.
- Wei, H., Liu, L., & Chen, Q. (2015). Selective removal of mitochondria via mitophagy: distinct pathways for different mitochondrial stresses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1853(10), 2784–2790. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.03.013>
- Welter, E., Montino, M., Reinhold, R., Schlotterhose, P., Krick, R., Dudek, J., Rehling, P., Thumm, M. (2013). Uth1 is a mitochondrial inner membrane protein dispensable for post-log-phase and rapamycin-induced mitophagy. *FEBS Journal*, 280, 4970-4982. doi: 10.1111/febs.12468
- Westermann, B., & Neupert, W. (2000). Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: Convenient tools for the study of organelle biogenesis in

- Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 16(15), 1421–1427. [http://doi.org/10.1002/1097-0061\(200011\)16:15<1421::AID -YEA624> 3.0.CO;2-U](http://doi.org/10.1002/1097-0061(200011)16:15<1421::AID-YEA624>3.0.CO;2-U)
- Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(12), 872–884. <http://doi.org/10.1038/nrm3013>
- Westermann, B. (2014). Mitochondrial inheritance in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1837(7), 1039–1046. <http://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.10.005>
- Wijnen, H., Young, M.W. (2006). Interplay of circadian clocks and metabolic rhythms. *Annual Reviews in Genetics*, 40, 409–448.
- Willems, P. H. G. M., Rossignol, R., Dieteren, C. E. J., Murphy, M. P., & Koopman, W. J. H. (2015). Redox Homeostasis and Mitochondrial Dynamics. *Cell Metabolism*, 22(2), 207–218. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.06.006>
- Winzeler, E.A., Shoemaker, D.D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J.D., Bussey, H. *et al.* (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*, 285(5429), 901–6.
- Wolfgang, V., Linda, A.W., Kaye, N.T. (2013). Regulated proteolysis in microorganisms. Part III. Regulated proteolysis in yeast. The role of AAA+ proteases in mitochondrial protein biogenesis, homeostasis and activity control. Springer, subcellular biochemistry. Volume 66: 223-264. ISBN: 978-94-007-5939-8
- Wu, H., Xue, D., Chen, G., Han, Z., Huang, L., Zhu, C., Wang, X., Jin, H., Wang, J., Zhu, Y., Liu, L., Chen, Q. (2014). The BCL2L1 and PGAM5 axis defines hypoxia-induced receptor-mediated mitophagy. *Autophagy*, 10(10), 1712–25. doi: 10.4161/auto.29568
- Wurm, C. a., & Jakobs, S. (2006). Differential protein distributions define two sub-compartments of the mitochondrial inner membrane in yeast. *FEBS Letters*, 580(24), 5628–5634. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.09.012>
- Xu, Y., Tao, Y., Cheung, L.S., Fan, C., Chen, L.Q., Xu, S., Perry, K., Frommer, W.B., Feng, L. (2014). Structures of bacterial homologues of SWEET transporters in two distinct conformations. *Nature*, 515(7527), 448–52.
- Yang, C., Ko, B., Hensley, C.T., Jiang, L., Wasti, A.T., Kim, J., Sudderth, J., Calvaruso, M.A., Lumata, L., Mitsche, M., Rutter, J., Merritt, M.E., DeBerardinis, R.J. (2014). Glutamine oxidation maintains the TCA cycle and cell survival during impaired mitochondrial pyruvate transport. *Molecular Cell*, 56, 415–24.
- Yoon, Y., Galloway, C.A., Jhun, B.S., Yu, T. (2011). Mitochondrial dynamics in diabetes. *Antioxidant and Redox Signalling*, 14, 439–457.

- Yorimitsu, T., and Klionski, D.J. (2005). Atg11 links cargo to the vesicle-forming machinery in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *Molecular Biology Cell*, 16(4), 1593-605.
- Youle, R.J.; Narendra, D.P. (2011). Mechanisms of mitophagy. *Natural Reviews in Molecular and Cell Biology*, 12, 9–14.
- Youle, R.J., & van der Bliek, A.M. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*; 337, 1062–1065.
- Yu, T., Robotham, J.L., Yoon, Y. (2006). Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103, 2653–8.
- Zanellati, M. C., Monti, V., Barzaghi, C., Reale, C., Nardocci, N., Albanese, A., ... Garavaglia, B. (2015). Mitochondrial dysfunction in Parkinson disease: evidence in mutant PARK2 fibroblasts. *Frontiers in Genetics*, 6(March). <http://doi.org/10.3389/fgene.2015.00078>
- Zhang, X.N., Qi, M. (2008). Mitochondrion and its related disorders: making a comeback. *Journal of Zhejiang University of Sciences*, 9, 90-92.
- Zhang, A., Shen, Y., Gao, W., Dong, J. (2011). Role of Sch9 in regulating Ras-cAMP signal pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 585: 3026-3032. doi: 10.1016/j.febslet.2011.08.023
- Zhang, L., Alfano, J.R., Becker, D.F. (2015). Proline metabolism increases katG expression and oxidative stress resistance in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 197(3), 431-440.
- Zhao, J., Lendahl, U., & Nistér, M. (2013). Regulation of mitochondrial dynamics: Convergences and divergences between yeast and vertebrates. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(6), 951–976. <http://doi.org/10.1007/s00018-012-1066-6>
- Zhu, Y., Massen, S., Terenzio, M., et al. (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.



Figuras suplementarias

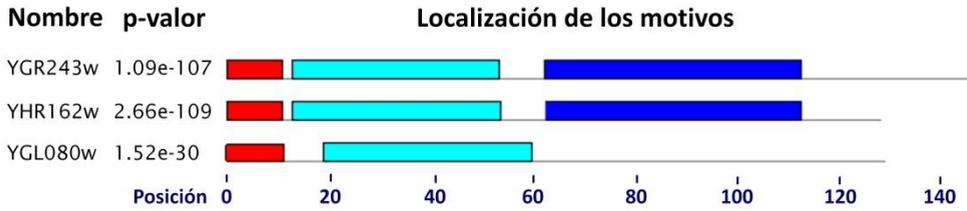


Figura suplementaria S1. Motivos compartidos entre las secuencias proteicas de la familia MPC por el programa MEME. Se analizaron las secuencias proteicas de Mpc3 (YGR243w), Mpc2 (YHR162w) y Mpc1 (YGL080w) de *S. cerevisiae* con el programa MEME (*Multiple Em for Motif Elicitation*) en busca de motivos (secuencias patrón que aparecen repetidamente en un grupo de proteínas). El p-valor mostrado es el valor combinado de los p-valor para cada uno de los motivos presentes en cada proteína y, en todos los casos, muestra que los motivos encontrados son significativos. El primer motivo (rojo) podría ser el péptido de localización mitocondrial de las tres proteínas y el tercer motivo (azul oscuro) es propio de Mpc2 y Mpc3.

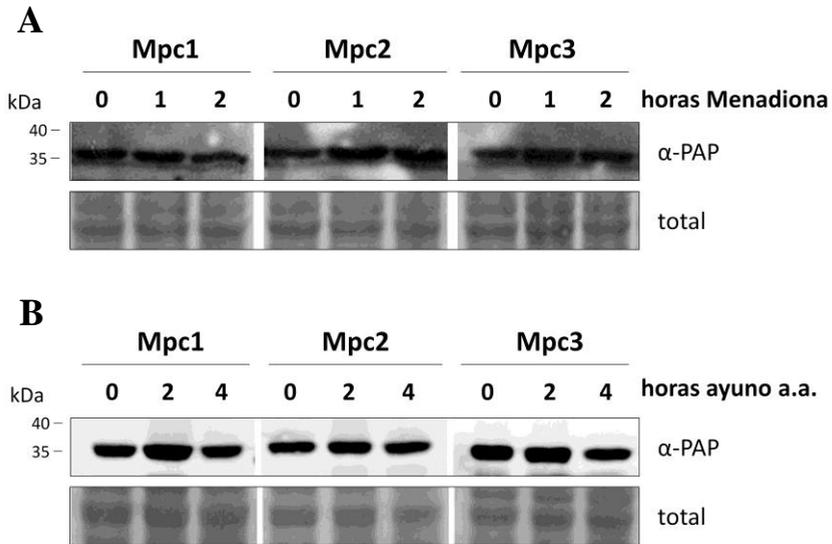


Figura suplementaria S2. Inmunodetección de las proteínas Mpc1, Mpc2 y Mpc3 ante estrés oxidativo y ante ayuno de aminoácidos. Los niveles de las proteínas Mpc no sufren cambios significativos en estas condiciones. Se parte de extractos totales de proteínas de las cepas de levadura con las proteínas Mpc etiquetadas con el epítipo TAP en el genoma, que se analizaron por *Western Blot*. Se sometieron las cepas a **(A)** estrés oxidativo durante 2 horas (50 μ M menadiona) y a **(B)** un ayuno de aminoácidos durante 4 horas. Las proteínas se detectaron con el anticuerpo anti-PAP y como control de carga se utilizó la tinción de membrana con DB71.

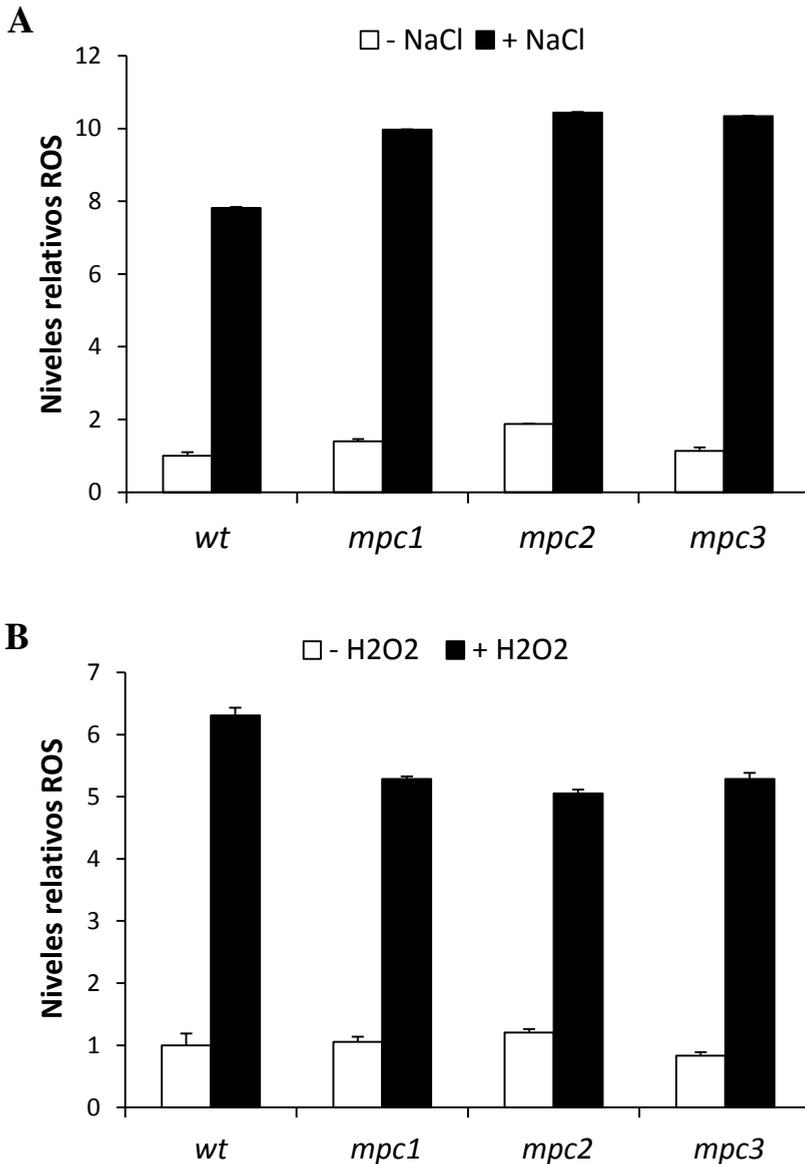


Figura suplementaria S3. Efecto de la delección de los genes *MPC* en la acumulación de ROS intracelular. Las cepas de delección de los genes *MPC* individuales se crecieron en medio YPD y se sometieron a **(A)** un estrés osmótico, durante 1 hora con NaCl (1 M); y a **(B)** un estrés oxidativo mediante peróxido de hidrógeno (2 mM) durante 30 minutos. Los niveles de ROS se midieron mediante la oxidación de la diclorodihidrofluoresceína, tal y como se describe en el Apartado 7 de Materiales y Métodos. La fluorescencia de la cepa silvestre en condiciones normales se estableció arbitrariamente con el valor de 1. Los niveles de ROS se determinaron por duplicado en tres cultivos independientes. Los datos presentados son la media y el error típico.

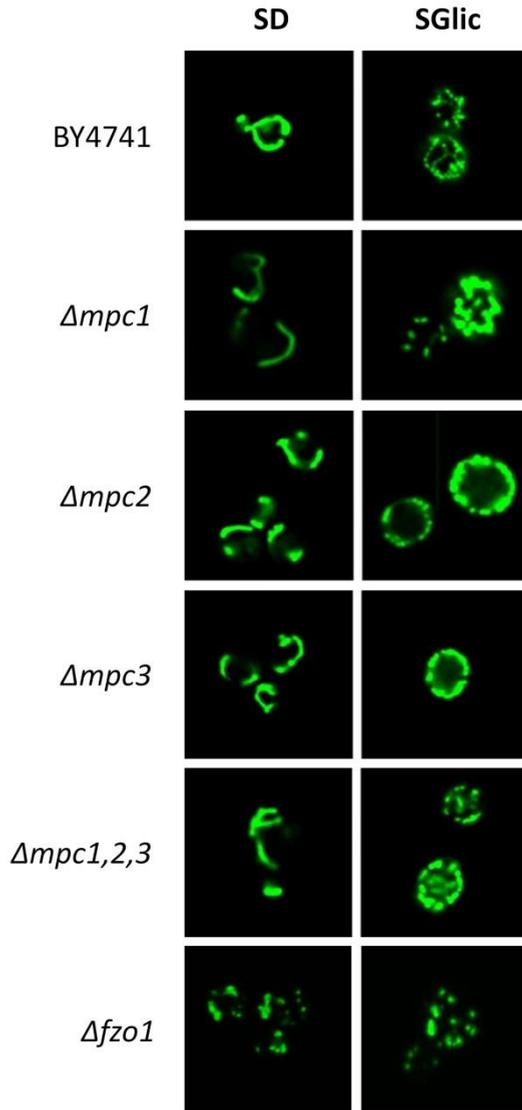


Figura suplementaria S4. Análisis de la morfología mitocondrial en los mutantes Δmpc mediante microscopía confocal.

La mitocondria aumenta su tamaño en presencia de azúcares no fermentables (glicerol), pero la ausencia de los genes *MPC* no afecta a su morfología. Se estudió la morfología de la mitocondria en medio fermentativo (SD) y respiratorio (SGlic) de las cepas mutantes para los genes *MPC* (individuales y triple mutante) y *FZO1*, respecto de la cepa silvestre, transformadas con el plásmido pVT100U-mtGFP. Las fotos muestran un único plano de la célula de levadura representativo de lo observado en la mayor parte de las células. Los cultivos se crecieron en medio mínimo SD o SGlic en ausencia de uracilo durante toda la noche a 28° C hasta fase exponencial de crecimiento.

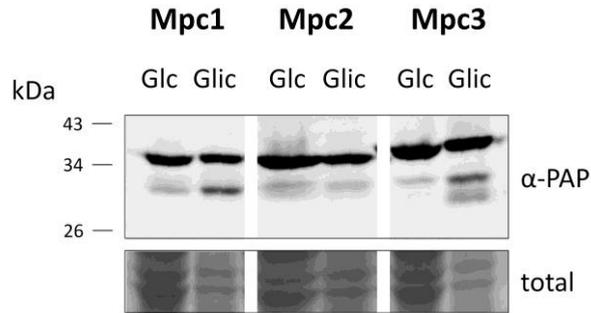


Figura suplementaria S5. Inmunodetección de las proteínas Mpc en extractos totales de levadura en crecimiento fermentativo y respiratorio. Las proteínas Mpc1 y Mpc3, activadas durante la respiración mitocondrial, muestran mayor degradación en medio respiratorio que la proteína Mpc2. Se analizaron por *Western Blot* extractos totales de proteínas de las cepas de levadura con las proteínas Mpc individuales etiquetadas con el epítipo TAP en el genoma. Las células se crecieron durante toda la noche en medio mínimo con glucosa (SD) o con glicerol (SGlic) y las proteínas se detectaron con el anticuerpo α -PAP. Como control de carga (total) se utilizó la tinción de membrana con DB71.

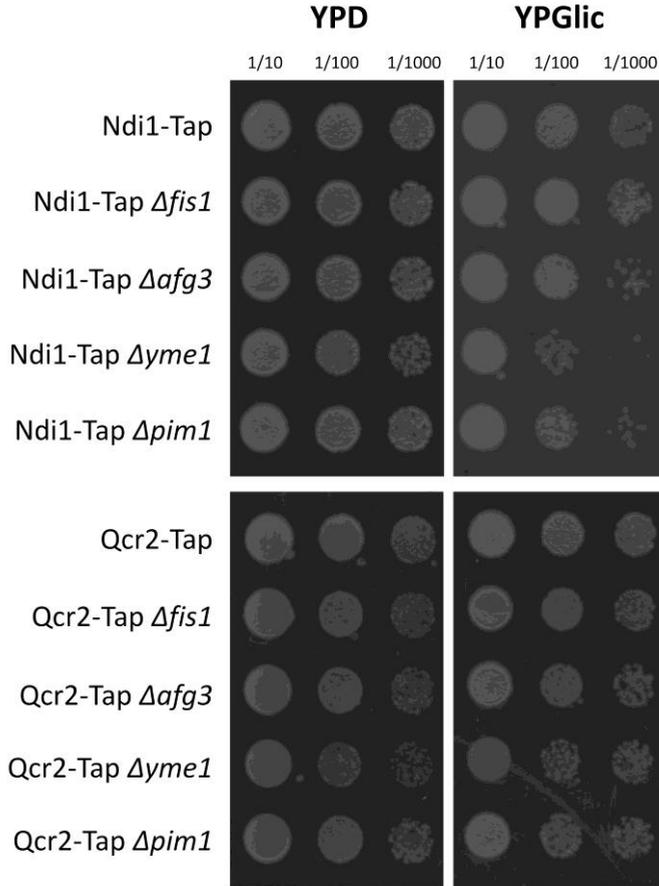


Figura suplementaria S6. Ensayo de crecimiento en medio fermentativo y respiratorio de los mutantes de proteasas mitocondriales. Los mutantes de proteasas muestran una inhibición del crecimiento respiratorio con respecto a la cepa silvestre BY4741. Análisis de los fenotipos de crecimiento en medio sólido de las cepas con el fondo genético BY4741 Ndi1-Tap o Qcr2-Tap y sus respectivos mutantes para los genes de las proteasas mitocondriales *AFG3*, *YME1* y *PIM1*. Como control se utilizó el mutante $\Delta fis1$ que no se ve afectado ante un medio respiratorio. Las cepas se crecieron en medio rico con azúcares fermentables (YPD) o no fermentables (YPGlic). A partir de cultivos de levadura saturados, se realizaron 3 diluciones seriadas para cada cepa y condición, por triplicado. Y se tomaron imágenes representativas a las 24h en YPD y a las 72h en YPGlicerol.

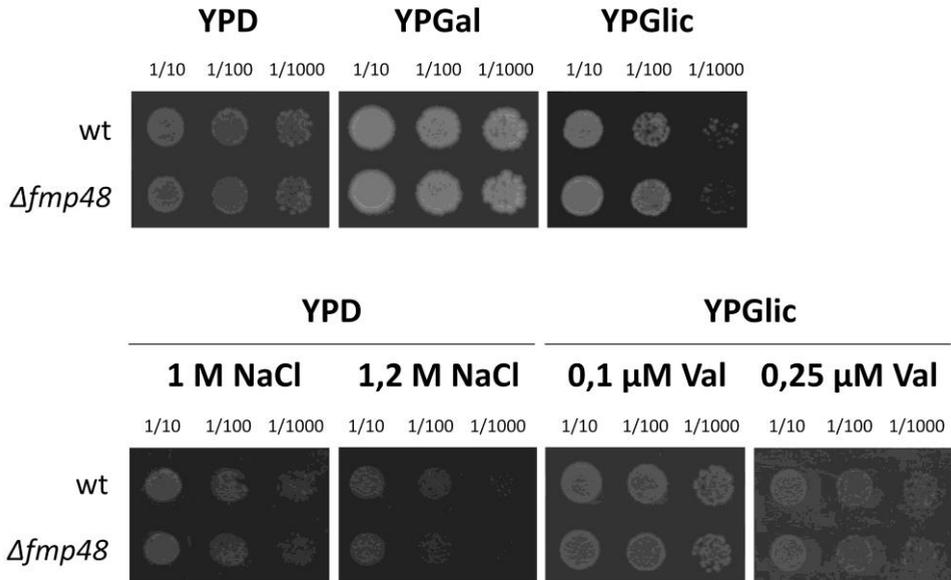


Figura suplementaria S7. Búsqueda de fenotipos de crecimiento en diferentes condiciones del mutante $\Delta fmp48$ con respecto a la cepa silvestre. Ensayos de crecimiento en medio sólido de la cepa silvestre y del mutante $\Delta fmp48$, a partir de cultivos de 3mL saturados, por duplicado. Se realizaron 3 diluciones seriadas para cada cepa (1/10, 1/100 y 1/1000) y se probaron diversas condiciones, en medio rico. Se analizó el crecimiento en medio fermentativo (YPD), en medios parcial o totalmente respiratorios (YPGal e YPGlic, respectivamente), ante estrés osmótico (1 M o 1,2 M de NaCl) o ante un tratamiento con valinomicina (0,1 μ M y 0,25 μ M de valinomicina). Todos estos tratamientos habían sido utilizados para analizar alguna cepa a lo largo de este trabajo. Se tomaron imágenes representativas para cada tratamiento. El mutante $\Delta fmp48$ no muestra ningún fenotipo de crecimiento en las anteriores condiciones con respecto a la cepa silvestre BY4741.

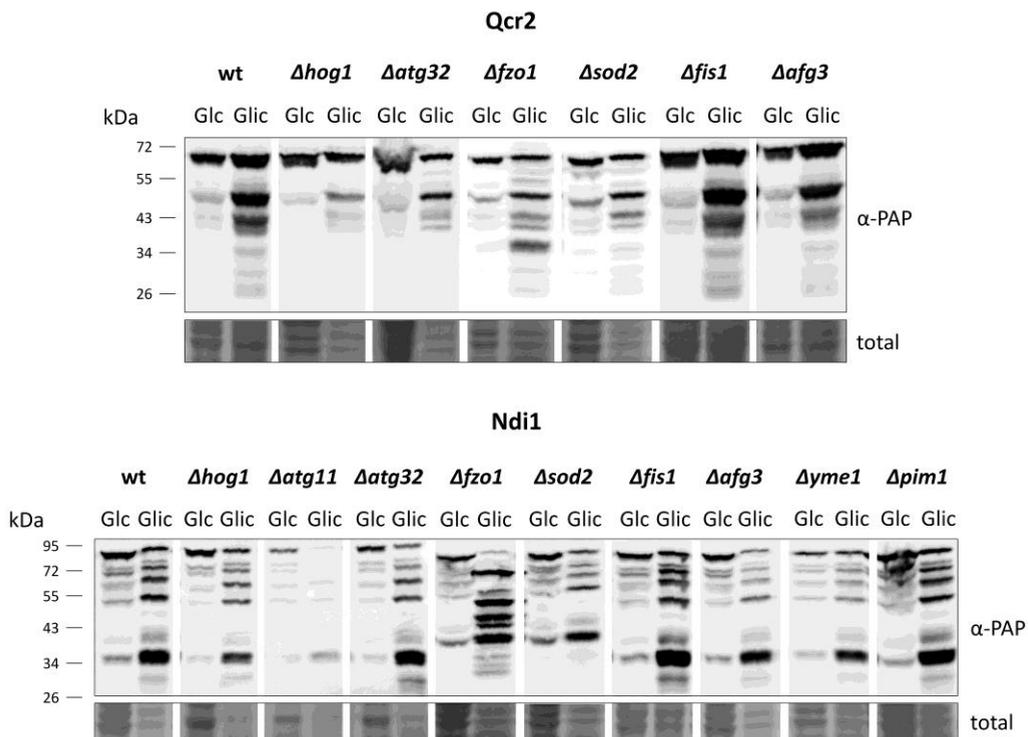


Figura suplementaria S8. Inmunodetección de las proteínas Qcr2 y Ndi1 en diferentes mutantes de levadura. Ampliación de la Figura 28, del Capítulo 2 de resultados. Las proteínas Ndi1 y Qcr2 sufren una degradación en cuanto se activa la respiración en todos los mutantes estudiados. Las cepas de levadura wt y mutantes con las proteínas Qcr2 y Ndi1 etiquetadas con TAP en el genoma se analizaron por *Western Blot* tras haber sido sometidas a crecimiento fermentativo y respiratorio. Las células se crecieron en medio mínimo (SD y SGlic) toda la noche a 28° C. Se muestran imágenes representativas de dos réplicas biológicas diferentes para cada mutante. Las proteínas Ndi1 y Qcr2 se detectaron con el anticuerpo α -PAP y como control de carga, se utilizó la tinción de membrana DB71.

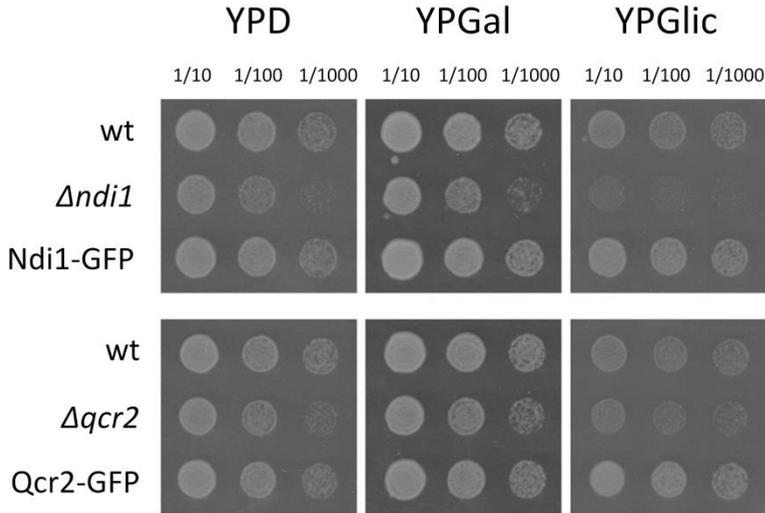


Figura suplementaria S9. Ensayo de crecimiento en medio sólido para evaluar la interferencia de función del epítipo GFP. No existe una reducción o retraso en el crecimiento de las cepas con el epítipo GFP en las proteínas Ndi1 y Qcr2, por lo que no parece alterar de forma significativa su función. Fenotipos de crecimiento de las cepas con el fondo genético BY4741 (wt), de los mutantes de los genes *NDI1* y *QCR2* y de las cepas marcadas en estos genes con el epítipo GFP en el genoma. Se evaluaron las cepas en medio rico con glucosa (YPD), galactosa (YPGal) y glicerol (YPGlic), y se realizaron 3 diluciones seriadas a partir de cultivos saturados, para cada una de las cepas y condición. El ensayo se realizó por triplicado y se tomaron imágenes representativas a las 24h de incubación en YPD, y a las 42-78h en YPGal y en YPGlic.

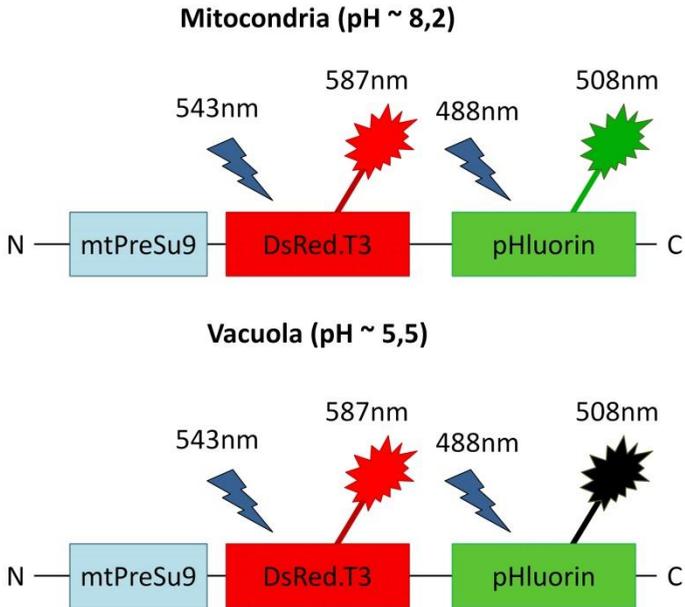
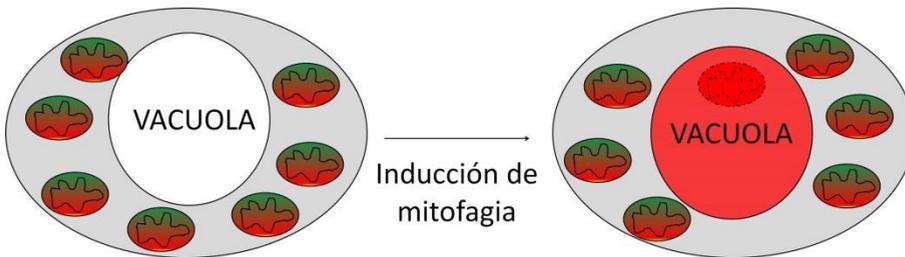
A**B**

Figura suplementaria S10. Representación esquemática del sistema mtRosella para la detección de mitofagia mediante microscopía confocal en levadura. (A) Reportero fluorescente mtRosella, con el péptido de localización mitocondrial de levadura (mtPreSu9) y los dos fluoróforos rojo DsRed.T3 (resistente a pH) y verde pHluorin (sensible a pH). Se indica la longitud de onda máxima de excitación y emisión para cada fluoróforo en condiciones de pH mitocondrial y vacuolar. El pHluorin no emite a pH ácido vacuolar. **(B)** Representación esquemática de los resultados esperados en una cepa salvaje (wt) antes y después de inducir mitofagia. Las mitocondrias se detectan en fluorescencia verde y roja, y, al inducir mitofagia, se dirigen a la vacuola, donde únicamente se detecta la fluorescencia roja. Figura modificada de Mijaljica *et al.*, 2011.

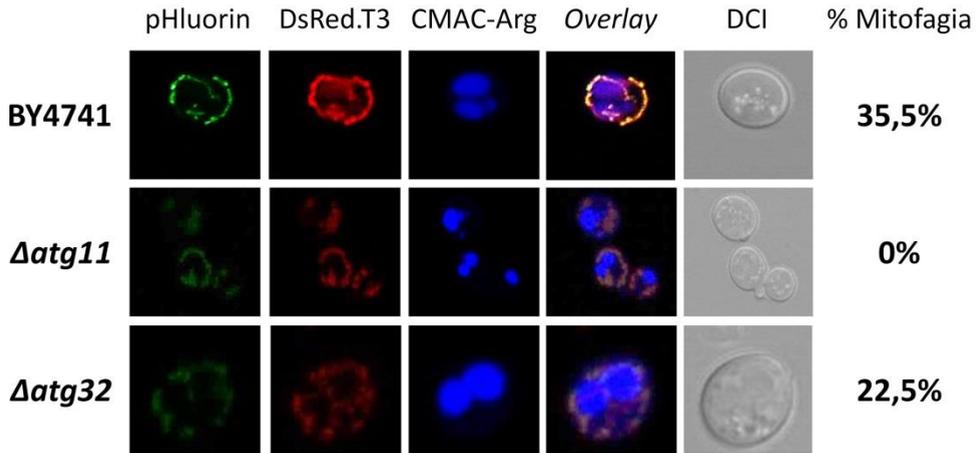


Figura suplementaria S11. Detección de mitofagia mediante el sistema mtRosella en los mutantes $\Delta atg11$ y $\Delta atg32$ de levadura. La ausencia del gen *ATG11* inhibe el proceso de mitofagia inducida por valinomicina en levadura. Las células de levadura de las cepas BY4741, $\Delta atg11$, y $\Delta atg32$ transformadas con el plásmido pVT100U-mtRosella se crecieron en medio respiratorio (SGal) toda la noche y se sometieron a un tratamiento de 4 μ M de valinomicina durante 2 horas. Los cultivos de células se realizaron en 3mL de medio a 28° C y, antes del ensayo, se tiñó las vacuolas con CMAC-Arg durante 30 minutos. En la figura se muestran imágenes representativas de cada una de las cepas, para los dos fluoróforos que marcan la mitocondria: pHluorin (verde) y DsRed.T3 (rojo, resistente al pH de la vacuola); el CMAC (azul) de la vacuola, la superposición (*Overlay*) de los tres fluoróforos y la luz transmitida (DCI). Además, se incluye el porcentaje (de un total de 50 células) en el que se detectó mitofagia para cada mutante en presencia de valinomicina. Estas imágenes son representativas de lo que se muestra en el gráfico de la Figura 35, del Capítulo 2 de resultados.

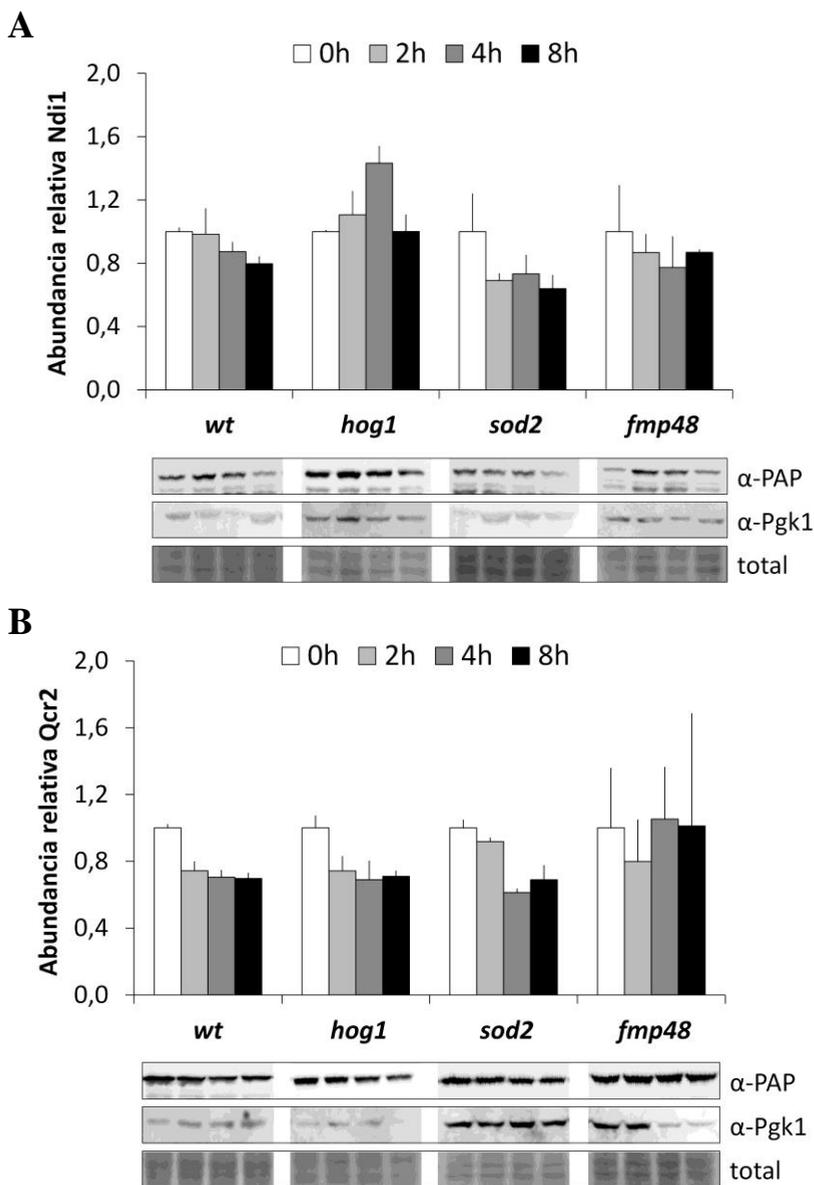


Figura suplementaria S12. Inmunodetección de las proteínas Ndi1 y Qcr2 en diferentes mutantes de levadura tras el tratamiento con valinomicina. Extractos totales de proteína de las cepas silvestre y mutantes de levadura ($\Delta hog1$, $\Delta sod2$ y $\Delta fmp48$) con las proteínas **(A)** Ndi1 y **(B)** Qcr2 marcadas con TAP en el genoma, analizados por *Western Blot*. Las muestras se recogieron cada 2 horas tras un tratamiento de 4 μ M de valinomicina, hasta las 8 horas. Las proteínas se detectaron con el anticuerpo α -PAP, con el control endógeno α -Pgk1 y con la tinción de membrana con DB71 como control de carga. Los datos mostrados son la media y el error típico de dos réplicas biológicas, cuantificadas y normalizadas en función de la proteína control Pgk1.

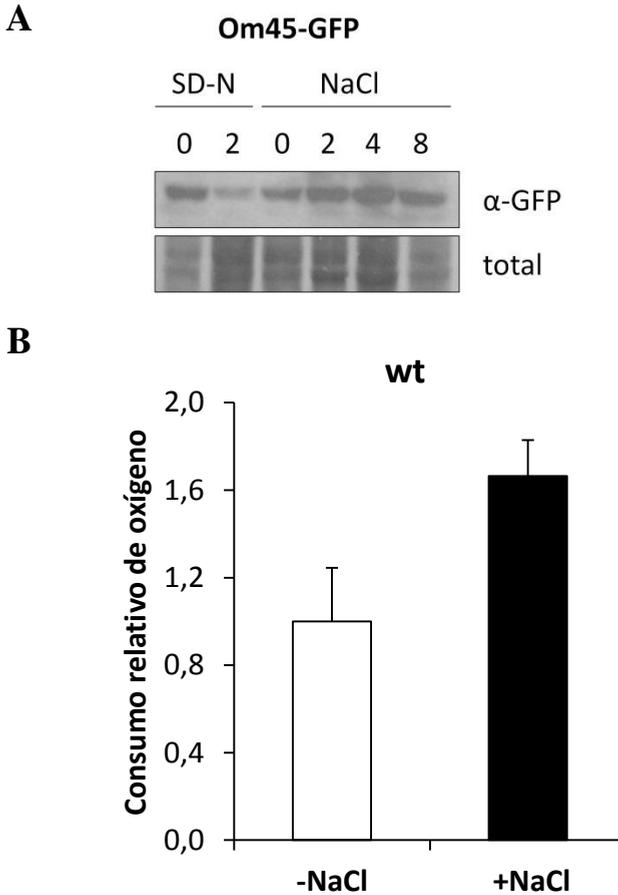


Figura suplementaria S13. Análisis del efecto del NaCl sobre la estructura y función mitocondrial. El tratamiento con sodio parece aumentar tanto la biomasa como la actividad mitocondrial en las primeras horas. **(A)** Inmunodetección en extractos totales de proteína de cepas de levadura con la proteína Om45 (de la membrana mitocondrial externa) marcada con el epítipo GFP en el genoma. Se analizaron por *Western Blot* después de haber sido crecidas en medio mínimo respiratorio (SGal) y sometidas a ayuno de nitrógeno 2 horas o a un tratamiento con NaCl (1 M) durante 8 horas. La proteína Om45 se detectó con el anticuerpo α-GFP y como control de carga se utilizó la tinción de membrana con DB71. **(B)** Consumo de oxígeno de la cepa silvestre (wt) de levadura en medio mínimo respiratorio (SGlicerol) en ausencia y presencia de tratamiento con NaCl (1 M). Los datos mostrados son la media con el error típico de tres réplicas biológicas medidas con un electrodo de oxígeno.

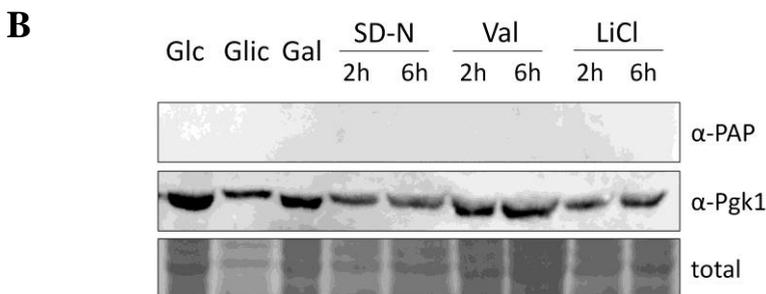
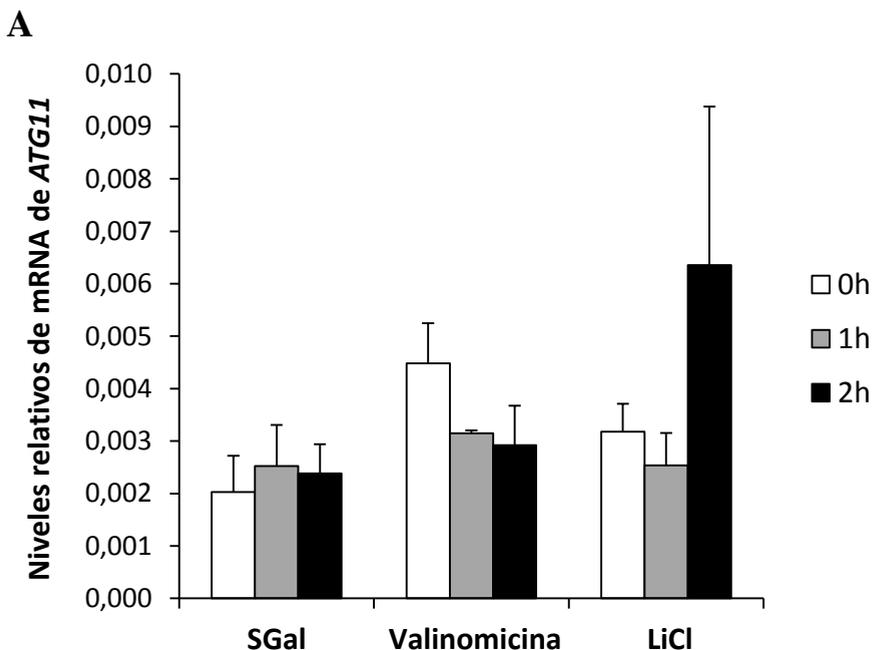


Figura suplementaria S14. Estudio de la regulación transcripcional y traduccional de ATG11 en diferentes condiciones. (A) Los niveles de expresión de ATG11 son demasiado bajos para aportar información relativa a la regulación transcripcional. Niveles relativos de mRNA del gen ATG11 en la cepa silvestre de levadura (wt) en crecimiento respiratorio y ante tratamientos de valinomicina (4 μ M) y LiCl (50 mM) durante 2 horas. Los niveles de expresión se calcularon mediante RT-PCR y se normalizaron frente a los niveles de mRNA de ACT1. Los datos mostrados son la media y el error típico de tres experimentos independientes. (B) La proteína Atg11 expresada con su promotor natural no es detectable por ensayos de Western Blot. Inmunodetección de la proteína Atg11 en extractos totales de levadura en la cepa con Atg11 etiquetada con el epítipo TAP con promotores naturales. Se sometieron a las células a crecimiento durante toda la noche en presencia de glucosa (SD), glicerol (SGlic) y galactosa (SGal), y las células crecidas en galactosa se sometieron a un ayuno de nitrógeno (SD-N), a 4 μ M de valinomicina y a 50 mM de LiCl, recogiendo muestra a las 2 y 6 horas. Se utilizó el anticuerpo α -PAP para la detección, y como control endógeno se utilizó α -Pgk1. La tinción de membrana con DB71 se usó como control de carga.

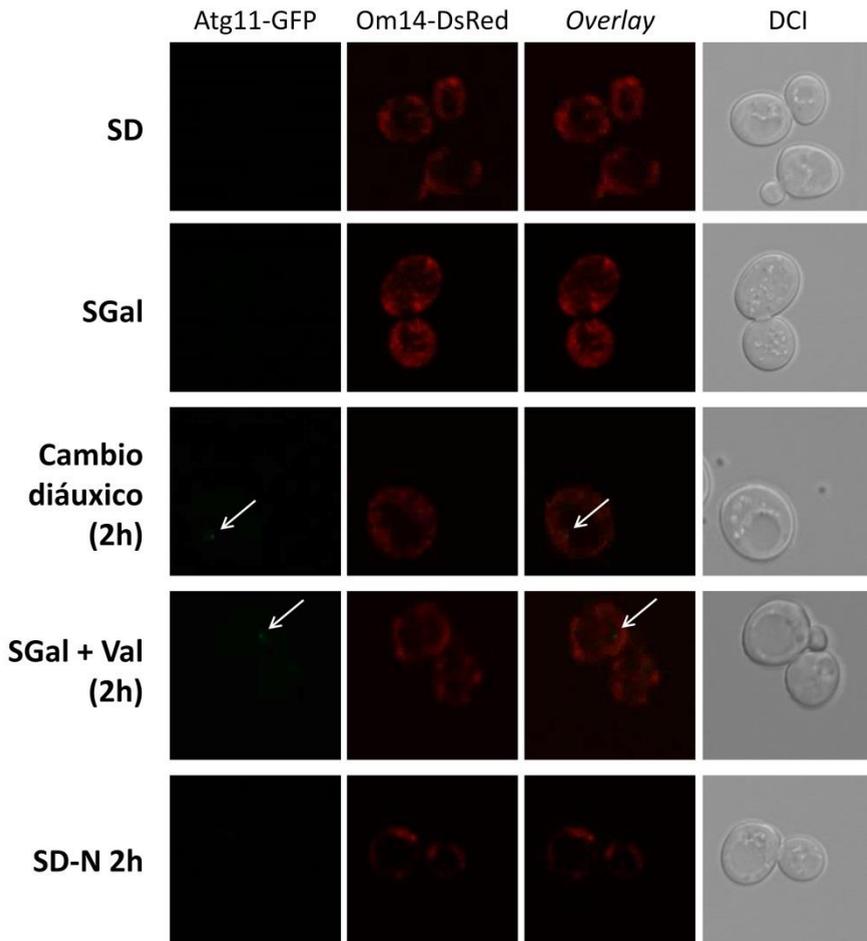


Figura suplementaria S15. Detección de Atg11 en niveles endógenos por microscopía confocal en el mutante $\Delta atg32$. Se observan *clusters* de Atg11 en la célula de levadura principalmente ante cambio diáuxico y tratamiento con valinomicina. La cepa Atg11-GFP $\Delta atg32$ transformada con la construcción Om14-DsRed expresada de forma constitutiva (para marcar la mitocondria en rojo) se analizó para detectar Atg11 por microscopía. Se estudió en condiciones fermentativas (SD), respiratorias (SGal), cambio diáuxico, tratamiento con valinomicina y ayuno de nitrógeno durante 2 horas. Se muestran imágenes representativas para Atg11-GFP, Om14-DsRed, su superposición (*Overlay*) y la luz transmitida (DCI), para cada condición.

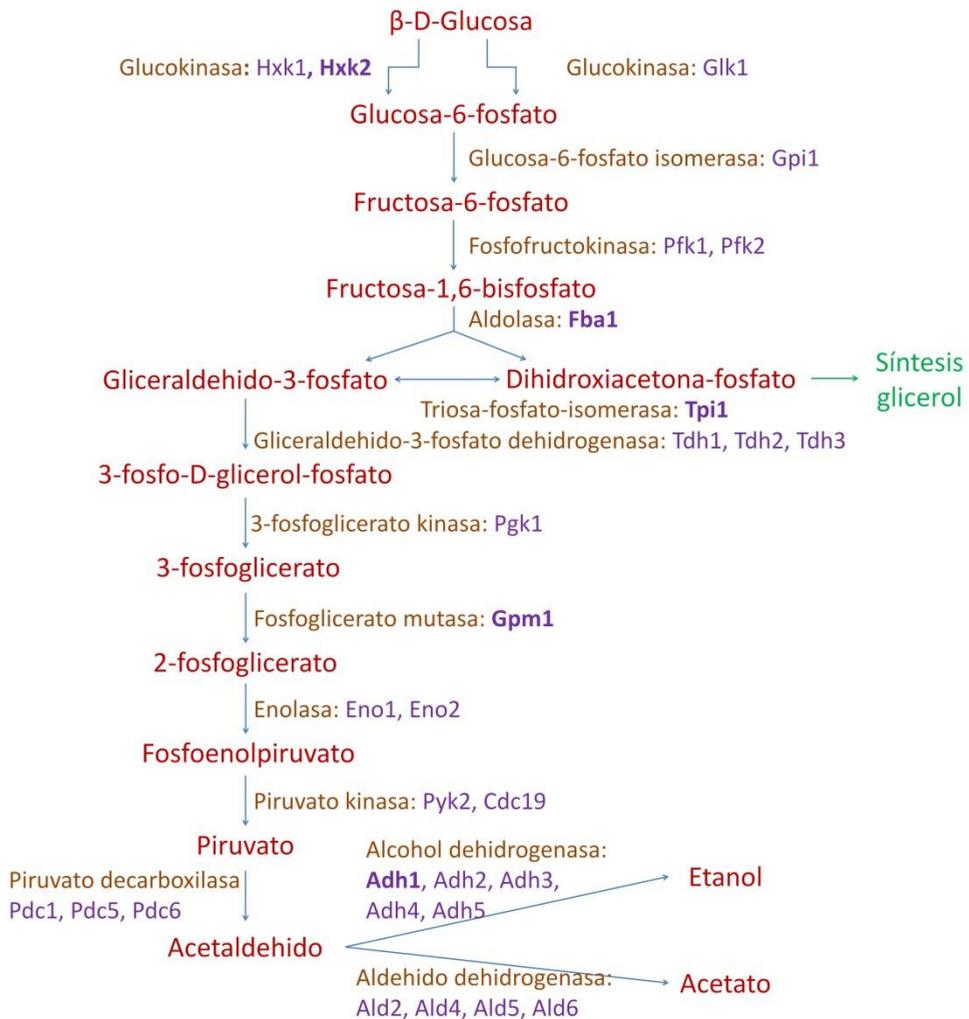


Figura suplementaria S16. Esquema del proceso de glicólisis en levadura. Representación de las reacciones del proceso de glicólisis en levadura, junto con las enzimas implicadas en cada paso. En **negrita**, se muestran aquellas enzimas que según el ensayo de doble híbrido interactúan con la proteína Atg11. En **rojo** se representan los sustratos para cada reacción y, en **naranja** y **morado**, el nombre de las enzimas.

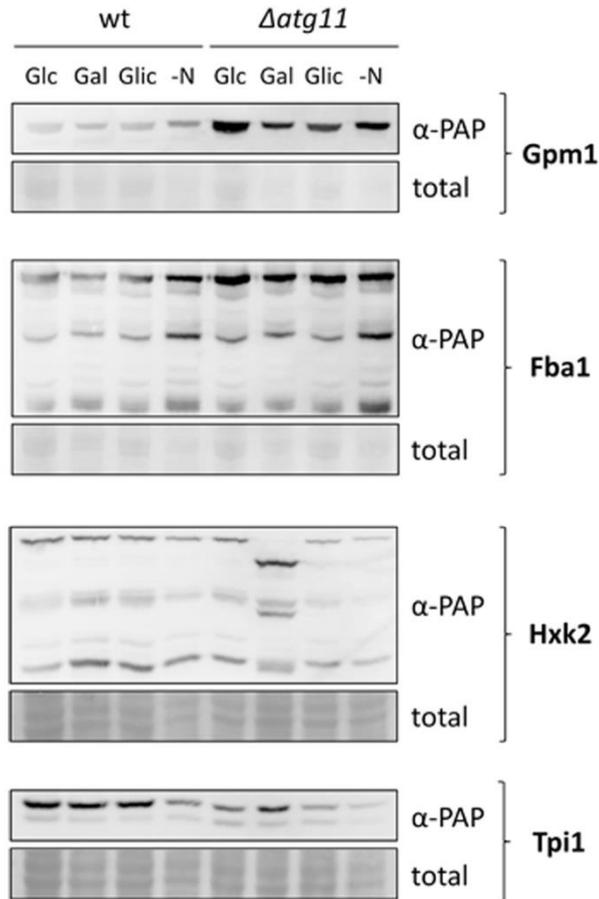


Figura suplementaria S17. Inmunodetección de las proteínas glicolíticas en extractos proteicos totales de levadura en presencia y ausencia de *ATG11*. No se observan cambios significativos en la concentración de proteínas glicolíticas ante la delección del gen *ATG11*. Se analizaron extractos totales de proteínas por *Western Blot* de las cepas de levadura con las proteínas glicolíticas individuales etiquetadas con el epítipo TAP en el genoma. Estas cepas se analizaron en un fondo genético silvestre y en un mutante $\Delta atg11$. Las células se crecieron en medio mínimo con glucosa (Glc), galactosa (Gal), glicerol (Glic) o en ayuno de nitrógeno (-N) durante toda la noche; y las proteínas se detectaron con el anticuerpo α -PAP. Como control de carga (total) se utilizó la tinción de membrana con DB71.

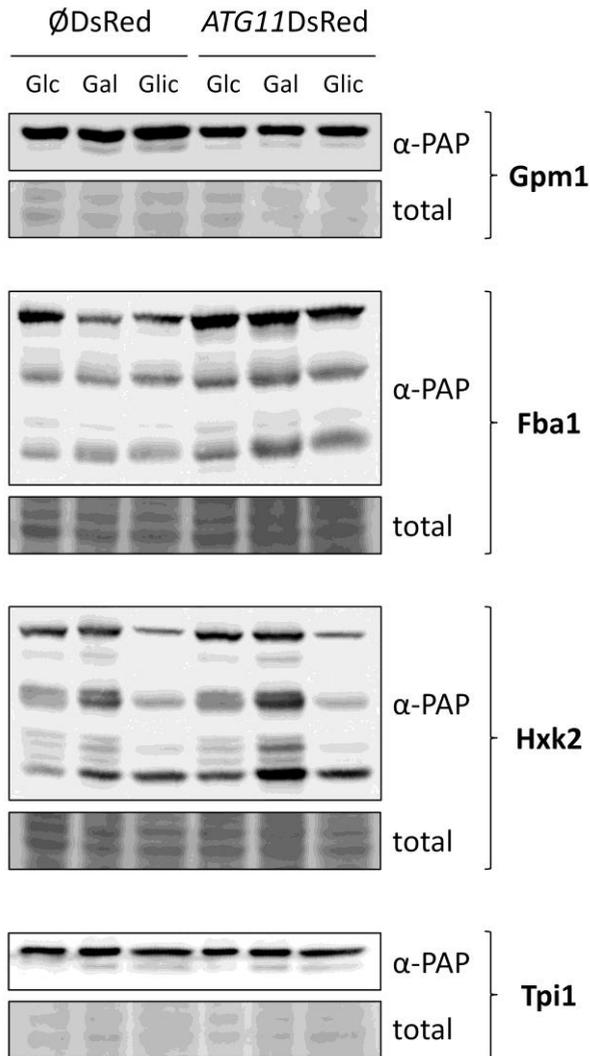


Figura suplementaria S18. Detección por *Western Blot* de las proteínas glicolíticas Gpm1, Fba1, Hxk2 y Tpi1 ante la sobreexpresión de ATG11. La concentración de proteínas glicolíticas ante una sobreexpresión de ATG11 se mantiene sin cambios con respecto a la cepa con niveles normales de Atg11. Se analizaron extractos proteicos totales de las cepas de levadura con las proteínas glicolíticas individuales etiquetadas con el epítipo TAP en el genoma, expresando el plásmido pAG415GPD-DsRed vacío o con el gen ATG11. Las células se crecieron toda la noche en medio mínimo (con His, Ura y Met) con glucosa (Glc), galactosa (Gal) o glicerol (Glic). Las proteínas se detectaron con el anticuerpo α-PAP y como control de carga se utilizó la tinción de la membrana con DB71.



Tablas suplementarias

Cepa	Genotipo	Procedencia
BY4741	<i>MATa</i> ,; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i>	Euroscarf
THY.AP4	<i>MATa</i> ; <i>ura3</i> ; <i>leu2::lexA</i> ; <i>lacZ::trp1</i> ; <i>lexA::HIS3</i> ; <i>lexA::ADE2</i>	Paumi <i>et al.</i> , 2007.
Mutantes de delección		
$\Delta mpc3$	BY4741 <i>mpc3::KANMX4</i>	Euroscarf
$\Delta mpc2$	BY4741 <i>mpc2::KANMX4</i>	Euroscarf
$\Delta mpc1$	BY4741 <i>mpc1::KANMX4</i>	Euroscarf
$\Delta mpc1,2,3$	BY4741 <i>ygr243w::his5 (MPC3)</i> , <i>yhr142w::LEU2 (MPC2)</i> , <i>ygl080w::KAN (MPC1)</i>	Colección del laboratorio Proft, M., Pascual-Ahuir, A.
$\Delta fzo1$	BY4741 <i>fzo1::KANMX4</i>	Euroscarf
$\Delta crc1$	BY4741 <i>crc1::KANMX4</i>	Winzeler <i>et al.</i> , 1999
$\Delta mpc1\Delta crc1$	BY4741 <i>mpc1::KANMX4 crc1::HIS3</i>	Este estudio
$\Delta mpc2\Delta crc1$	BY4741 <i>mpc2::KANMX4 crc1::HIS3</i>	Este estudio
$\Delta mpc3\Delta crc1$	BY4741 <i>mpc3::KANMX4 crc1::HIS3</i>	Este estudio
$\Delta hog1$	BY4741 <i>hog1::KANMX4</i>	Euroscarf
$\Delta atg11$	BY4741 <i>atg11::KANMX4</i>	Euroscarf
$\Delta atg32$	BY4741 <i>atg32::KANMX4</i>	Euroscarf
$\Delta atg20$	BY4741 <i>atg20::KANMX4</i>	Euroscarf
$\Delta atg21$	BY4741 <i>atg21::KANMX4</i>	Euroscarf
$\Delta atg23$	BY4741 <i>atg23::KANMX4</i>	Euroscarf
$\Delta atg24$	BY4741 <i>atg24::KANMX4</i>	Euroscarf
$\Delta atg33$	BY4741 <i>atg33::KANMX4</i>	Euroscarf
$\Delta sod2$	BY4741 <i>sod2::KANMX4</i>	Euroscarf
$\Delta fis1$	BY4741 <i>fis1::KANMX4</i>	Euroscarf
$\Delta yme1$	BY4741 <i>yme1::KANMX4</i>	Euroscarf
$\Delta afg3$	BY4741 <i>afg3::KANMX4</i>	Euroscarf
$\Delta pim1$	BY4741 <i>pim1::KANMX4</i>	Euroscarf
$\Delta fmp48$	BY4741 <i>fmp48::KANMX4</i>	Euroscarf
Cepas con el epítipo -GFP		
ATG11-GFP	BY4741 <i>ATG11-GFP- His3MX</i>	Huh <i>et al.</i> , 2003
ATG11-GFP $\Delta atg32$	BY4741 <i>ATG11-GFP-His3MX</i> <i>atg32::KANMX4</i>	Este estudio
NDI1-GFP	BY4741 <i>NDI1-GFP- His3MX</i>	Huh <i>et al.</i> , 2003
QCR2-GFP	BY4741 <i>QCR2-GFP- His3MX</i>	Huh <i>et al.</i> , 2003
OM45-GFP	BY4741 <i>OM45-GFP-His3MX</i>	Huh <i>et al.</i> , 2003

Cepas con el epitopo –TAP

MPC3-TAP	BY4741 <i>MPC3-TAP-His3MX</i>	Ghaemmaghami <i>et al</i> ,2003
MPC2-TAP	BY4741 <i>MPC2-TAP-His3MX</i>	Ghaemmaghami <i>et al</i> ,2003
MPC1-TAP	BY4741 <i>MPC1-TAP-His3MX</i>	Ghaemmaghami <i>et al</i> ,2003
NDE1-TAP	BY4741 <i>NDE1-TAP-His3MX</i>	Ghaemmaghami <i>et al</i> ,2003
NDI1-TAP	BY4741 <i>NDI1-TAP-His3MX</i>	Ghaemmaghami <i>et al</i> ,2003
QCR2-TAP	BY4741 <i>QCR2-TAP-His3MX</i>	Ghaemmaghami <i>et al</i> ,2003
SDH2-TAP	BY4741 <i>SDH2-TAP-His3MX</i>	Ghaemmaghami <i>et al</i> ,2003
CYC1-TAP	BY4741 <i>CYC1-TAP-His3MX</i>	Ghaemmaghami <i>et al</i> ,2003
COX6-TAP	BY4741 <i>COX6-TAP-His3MX</i>	Ghaemmaghami <i>et al</i> ,2003
ATP5-TAP	BY4741 <i>ATP5-TAP-His3MX</i>	Ghaemmaghami <i>et al</i> ,2003
FBA1-TAP	BY4741 <i>FBA1-TAP-His3MX</i>	Ghaemmaghami <i>et al</i> ,2003
GPM1-TAP	BY4741 <i>GPM1-TAP-His3MX</i>	Ghaemmaghami <i>et al</i> ,2003
TPI1-TAP	BY4741 <i>TPI1-TAP-His3MX</i>	Ghaemmaghami <i>et al</i> ,2003
HXK2-TAP	BY4741 <i>HXK2-TAP-His3MX</i>	Ghaemmaghami <i>et al</i> ,2003
ATG11-TAP	BY4741 <i>ATG11-TAP-His3MX</i>	Ghaemmaghami <i>et al</i> ,2003
NDI1-TAP $\Delta hog1$	BY4741 <i>NDI1-TAP-His3MX hog1::KANMX4</i>	Este estudio
NDI1-TAP $\Delta atg11$	BY4741 <i>NDI1-TAP-His3MX atg11::KANMX4</i>	Este estudio
NDI1-TAP $\Delta atg32$	BY4741 <i>NDI1-TAP-His3MX atg32::KANMX4</i>	Este estudio
NDI1-TAP $\Delta fzo1$	BY4741 <i>NDI1-TAP-His3MX fzo1::KANMX4</i>	Este estudio
NDI1-TAP $\Delta sod2$	BY4741 <i>NDI1-TAP-His3MX sod2::KANMX4</i>	Este estudio
NDI1-TAP $\Delta fmp48$	BY4741 <i>NDI1-TAP-His3MX fmp48::KANMX4</i>	Este estudio
NDI1-TAP $\Delta fis1$	BY4741 <i>NDI1-TAP-His3MX fis1::KANMX4</i>	Este estudio
NDI1-TAP $\Delta afg3$	BY4741 <i>NDI1-TAP-His3MX afg3::KANMX4</i>	Este estudio
NDI1-TAP $\Delta yme1$	BY4741 <i>NDI1-TAP-His3MX yme1::KANMX4</i>	Este estudio
NDI1-TAP $\Delta pim1$	BY4741 <i>NDI1-TAP-His3MX pim1::KANMX4</i>	Este estudio
QCR2-TAP $\Delta hog1$	BY4741 <i>QCR2-TAP-His3MX hog1::KANMX4</i>	Este estudio
QCR2-TAP $\Delta atg11$	BY4741 <i>QCR2-TAP-His3MX atg11::KANMX4</i>	Este estudio
QCR2-TAP $\Delta atg32$	BY4741 <i>QCR2-TAP-His3MX atg32::KANMX4</i>	Este estudio
QCR2-TAP $\Delta fzo1$	BY4741 <i>QCR2-TAP-His3MX fzo1::KANMX4</i>	Este estudio
QCR2-TAP $\Delta sod2$	BY4741 <i>QCR2-TAP-His3MX sod2::KANMX4</i>	Este estudio
QCR2-TAP $\Delta fmp48$	BY4741 <i>QCR2-TAP-His3MX fmp48::KANMX4</i>	Este estudio
QCR2-TAP $\Delta fis1$	BY4741 <i>QCR2-TAP-His3MX fis1::KANMX4</i>	Este estudio
QCR2-TAP $\Delta afg3$	BY4741 <i>QCR2-TAP-His3MX afg3::KANMX4</i>	Este estudio
QCR2-TAP $\Delta yme1$	BY4741 <i>QCR2-TAP-His3MX yme1::KANMX4</i>	Este estudio
QCR2-TAP $\Delta pim1$	BY4741 <i>QCR2-TAP-His3MX pim1::KANMX4</i>	Este estudio

FBA1-TAP $\Delta atg11$	BY4741 <i>FBA1-TAP-His3MX atg11::KANMX4</i>	Este estudio
GPM1-TAP $\Delta atg11$	BY4741 <i>GPM1-TAP-His3MX atg11::KANMX4</i>	Este estudio
TPI1-TAP $\Delta atg11$	BY4741 <i>TPI1-TAP-His3MX atg11::KANMX4</i>	Este estudio
HXK2-TAP $\Delta atg11$	BY4741 <i>HXK2-TAP-His3MX atg11::KANMX4</i>	Este estudio

Tabla suplementaria TS1. Cepas de *S. cerevisiae* empleadas durante la realización de este trabajo. En la tabla, se muestran las diferentes cepas de levadura utilizadas, junto con su genotipo y su procedencia.

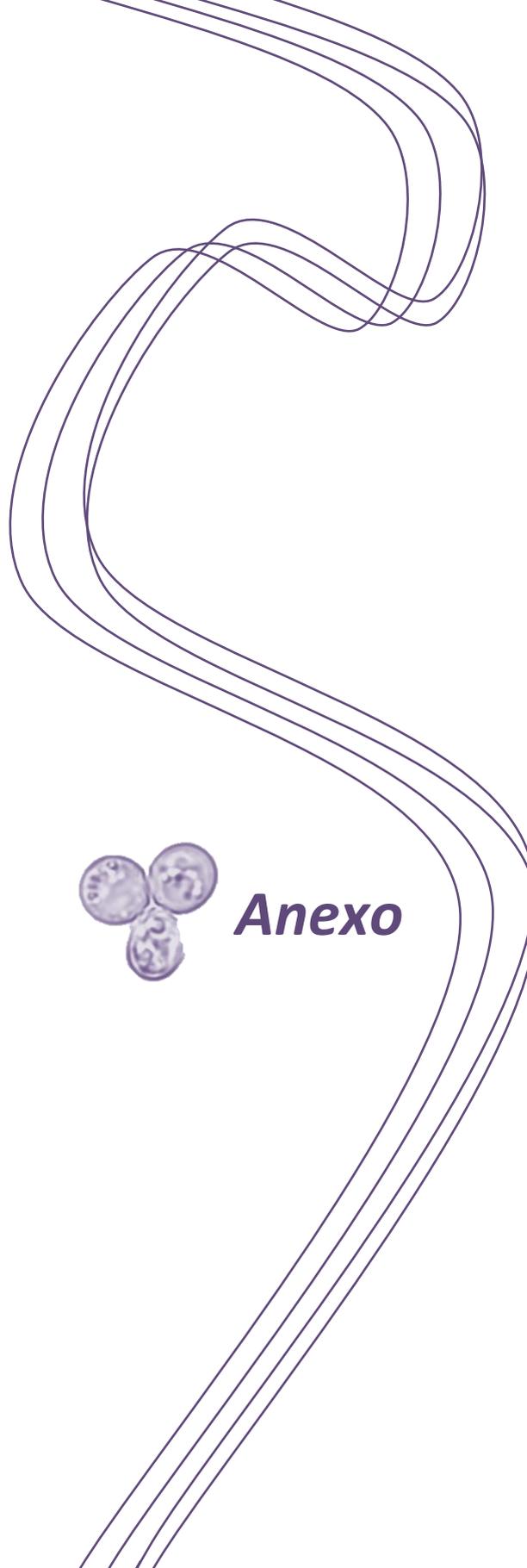
<i>Gen</i>	<i>Secuencia del oligonucleótido (5'-3')</i>	<i>Descripción</i>
Oligonucleótidos para la delección de genes (Sistema <i>KANMX</i>)		
KAN1	5'-GTTGGAATTTAATCGCGGCCTC-3'	Verificación delección directo
HOG1	5'-GGAACAAAGGGAAAACAGGGAAAACACTACAAC ATTCGTATATAATACAGCTGAAGCTTCGTACGC-3'	Cebador directo
	5'-AAAAAGAAGTAAGAATGAGTGGTTAGGGACATT AAAAAACACGTGCATAGGCCACTAGTGGATCTG-3'	Cebador reverso
	5'-GGGAGGATCTTCGAAGGGAA-3'	Verificación delección reverso
ATG11	5'-CTGTTGTTGTTTCGGAAAGTACTTCTTTTATTTTCTT TTATACATAACCAGCTGAAGCTTCGTACGC-3'	Cebador directo
	5'-TACATAATTAATAATCTTGTGACAAACGT TTAGCACTGTGCATAGGCCACTAGTGGATCTG-3'	Cebador reverso
	5'-AAGGCTTGCCATGGAGAGCC-3'	Verificación delección reverso
CRC1	5'-TATTGTACGACTTTCCTTATCCTCCACAAACGTCAT CGTGTCAGTACAGTGAAGCTTCGTACGC-3'	Cebador directo
	5'-AATGCCAGAAAAAATGGGAGGCAGGTCCACCT AACAAAAATTTAAGCATAGGCCACTAGTGGATCTG- 3'	Cebador reverso
	5'-GATGCATGATGGTATAATTCCT-3'	Verificación delección reverso
ATG32	5'-TCCTAATCACAAAAGCAAAAAAATCTGCCAGGA ACAGTAAACATCAGCTGAAGCTTCGTACGC-3'	Cebador directo
	5'-AAAAAGTGAGTAGGAACGTGTATGTTTGTGTATA TTGGAAAAAGGCATAGGCCACTAGTGGATCTG-3'	Cebador reverso
	5'-TAAGTGCAGTAAGCTTCC-3'	Verificación delección reverso
FZO1	5'-TATCTGATATCACGGATAGAGGCAAAACGGTAGG CTCATTAAACGCAGCTGAAGCTTCGTACGC-3'	Cebador directo
	5'-TTATGTATATTGATTTGAAAAGACCTCATATATTT ACAAGAATATGCATAGGCCACTAGTGGATCTG-3'	Cebador reverso
	5'-AATAACTCGCGCAAAGACCGA-3'	Verificación delección reverso

SOD2	5'-AACGAAACCCCAATTGATAACTATAACCTCCTAAA ACGTACCAGGCAGCTGAAGCTTCGTACGC-3'	Cebador directo
	5'-TTTCTTTCTTTCTTCAGATCTTGCCAGCATCGAATC TTCTGGATGGCATAGGCCACTAGTGGATCTG-3'	Cebador reverso
	5'-GTTGGCGCGACCTTAAACCTG-3'	Verificación delección reverso
FIS1	5'-CGGCACATAGAAGCACAGATCAGAGCACAGCCAT ACAACATAAGTCAGCTGAAGCTTCGTACGC-3'	Cebador directo
	5'-TTCATTCTTATGTATGTACGTATGTGCTGATTTTT ATGTGCTTGGCATAGGCCACTAGTGGATCTG-3'	Cebador reverso
	5'-TCCAGCTCCAGGGCATAACAG-3'	Verificación delección reverso
FMP48	5'-ATAAGCACATCATTATCAGCATATACCGAATAAT AAAAAGCAAAACAGCTGAAGCTTCGTACGC-3'	Cebador directo
	5'-GATCAAGGAAAATGAGGCGAACTTTCAAAGGT CTTTTTACTTTCGCATAGGCCACTAGTGGATCTG-3'	Cebador reverso
	5'-CGGAGCTTAGTTGCATCTACC-3'	Verificación delección reverso
AFG3	5'-CTTCAAATAAAGGCATCATCCACTTATTTTATAAT ATACTAAGTGCAGCTGAAGCTTCGTACGC-3'	Cebador directo
	5'-TAAAGATATAAAGTGAGATGAAGAAGCCACCGTT TTATTTCCCCTGCATAGGCCACTAGGGATCTG-3'	Cebador reverso
	5'-CGTGATCGGAACTCTCACC-3'	Verificación reverso
YME1	5'-TAATTATAATACATTGTGGATAGAACGAAAACA GAGACGTGATAGCAGCTGAAGCTTCGTACGC-3'	Cebador directo
	5'-GTCTTGAGGTAGGTTCCCTTCATACGTTTAACTTCT TAGAATAAAAGCATAGGCCACTAGTGGATCTG-3'	Cebador reverso
	5'-CTGGTCGGGATTTCCGGATGC-3'	Verificación delección reverso
PIM1	5'-TTTTGGTTTTTCGAGGTGCTTGAACGAAAAGATTGC AAATAGAGCCAGCTGAAGCTTCGTACGC-3'	Cebador directo
	5'-TTTACAGAATGTTTAAACAGGTATTTAATCCATTT ATGAAAAGGCATAGGCCACTAGTGGATCTG-3'	Cebador reverso
	5'-GCTGGTCGTTGGTTCTCGTG-3'	Verificación

MPC1	5'-CTCTAGATAAGCAAACACAATTATTTTCAAAAA ATTTCTGCTAACAGCTGAAGCTTCGTACGC-3'	Cebador directo
	5'-AAGCGAATGCTTTCTTGTAGTAAAAAGTAGCTAG AAAGCGATTCAGCATAGGCCACTAGTGGATCTG-3'	Cebador reverso
	5'- CCTATGTTTCGTGAAGGACTC-3'	Verificación delección reverso
MPC2	5'-GACACACGAATTATATAAACGAAGTTATACAGAA AAAGATTAAGCAGCTGAAGCTTCGTACGC-3'	Cebador directo
	5'-TACATATCTTTGACAAAGCAAAGTTTCGAGTTGTA AATTCGGCGTGCATAGGCCACTAGTGGATCTG-3'	Cebador reverso
	5'-GAGTCACGTCAGTTGCTGAC-3'	Verificación delección reverso
MPC3	5'-TAAGACTATACGCATAAGCATTCAAGACACATAG AAACACAAACCCAGCTGAAGCTTCGTACGC-3'	Cebador directo
	5'-GGATGCAGTTTGCTTTGCTGCGACGGCTGCAGGA GTCTCCCCTTTGCATAGGCCACTAGTGGATCTG-3'	Cebador reverso
	5'-GCTATTAACGGCTTTACGTC-3'	Verificación delección reverso
Oligonucleótidos para la clonación de genes		
MPC1	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCAA TGTCTCAACCGGTTCAA-3'	Cebador directo
	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACT GTTTACCAGTTTTTCTTTC-3'	Cebador reverso
MPC2	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAA TGCTACATCATCCGTACG-3'	Cebador directo
	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATC TGCCCGTAGTAATTCCT-3'	Cebador reverso
MPC3	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAA TGTCAGCATCAGCTTTTAAT-3'	Cebador directo
	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGT GCGTTATTGGCGGATTAGT-3'	Cebador reverso
ATG11	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATG GCAGACGCTGATGAATATAG-3'	Cebador directo
	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAAA CTCCCTGGTATGAAACCAC-3'	Cebador reverso

OM14	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAACGAATCATTT CGAAT-3'	Cebador directo
	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAACCTCGTAAC CTAG-3'	Cebador reverso
OM45	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTATG TCATCAAGAATAATTGTCCG-3'	Cebador directo
	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGTC CTTTTCGAGCTCCAGAA-3'	Cebador reverso
Oligonucleótidos para RT-PCR		
MPC1	5'-TTACTGTTTGGATGCCACCTT-3'	Cebador directo
	5'-TTCCATTCTTATCTAGAGCTTTCTT-3'	Cebador reverso
MPC2	5'-TTTGGACTCGTTGGTCCTTT-3'	Cebador directo
	5'-CCTGTAGTTGGCAATTCTACCC-3'	Cebador reverso
MPC3	5'-GGATACGGAACGGTGATTCTT-3'	Cebador directo
	5'-CATCGATGTGGATGCAGTTT-3'	Cebador reverso
CRC1	5'-AGAATATGCTTTCCGCCACA-3'	Cebador directo
	5'-CAGGACCTAAACCAGGGAAA-3'	Cebador reverso
ACT1	5'-CCGAAAGAATGCAAAAGGAA-3'	Cebador directo
	5'-CTTGTGGTGAACGATAGATGGA-3'	Cebador reverso
ATG11	5'-TTGACGAAGGGGAAAGAATG-3'	Cebador directo
	5'-CGCAGTGACCTGAAACCAAA-3'	Cebador reverso
Oligonucleótidos utilizados en secuenciación		
LOCUS AD	5'-TACCACTACAATGGATGATG-3'	Secuenciación inserto del vector pACT (ensayo de doble híbrido)

Tabla suplementaria TS2. Secuencias de los oligonucleótidos empleados a lo largo del trabajo. Para cada secuencia se indica el gen al que corresponde y para qué se empleó cada cebador (RT-PCR, delección mediante el cassette *KANMX* o secuenciación). Los oligonucleótidos se guardaban a -20° C a una concentración de 100 µM.



Anexo

