



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Estudio de nuevos procesos reguladores de mitofagia y apoptosis

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA, CURSO ACADÉMICO 2015/2016

Alumna: Alba Calatayud Sánchez

Tutora académica UPV: María Desamparados Pascual-Ahuir Giner

Co-tutor externo: Markus Hans Proft

Valencia, Julio 2016



TÍTULO: Estudio de nuevos procesos reguladores de mitofagia y apoptosis

Resumen:

La mitocondria es un orgánulo altamente dinámico, cuya actividad es muy sensible al entorno, es decir, a las condiciones metabólicas celulares. Es por ello que existen procesos moleculares bien descritos que garantizan el llamado control de calidad mitocondrial, como son la biogénesis mitocondrial y la mitofagia, ambos procesos fuertemente regulados por variaciones ambientales. Deficiencias en la homeostasis mitocondrial están asociadas a distintas enfermedades neurológicas en seres humanos, como el síndrome de Sjögren –Larsson. Un fallo en el sistema de control de calidad mitocondrial supone un desajuste metabólico, la acumulación de daños por el incremento del estrés oxidativo, y en último término puede derivar en procesos apoptóticos. Estos fallos pueden estar provocados por distintos estreses como son el estrés osmótico o la acumulación de ciertos metabolitos tóxicos en la célula, como se ha estudiado en este trabajo.

La levadura es un sistema modelo estupendo para el estudio de biogénesis mitocondrial y la mitofagia, pero no lo es tanto para los estudios de apoptosis, debido principalmente a la ausencia de elementos claves como son las proteínas de la familia Bcl-2 presentes en mamíferos. Sin embargo el empleo de levaduras humanizadas con miembros apoptóticos y antiapoptóticos de la familia Bcl-2, sorprendentemente ha demostrado que es un excelente sistema modelo para entender el proceso de apoptosis a nivel molecular.

El TFG tendrá como objetivo vislumbrar nuevas rutas de regulación sobre los procesos de mitofagia y apoptosis, con el fin de poder alcanzar un conocimiento más completo del escenario molecular. Concretamente, se pretende determinar la implicación del hexadecenal y la respuesta a estrés osmótico en la activación de la apoptosis por liberación de factores mitocondriales inducida por BAX, proteína proapoptótica de la familia Bcl-2.

Palabras clave: apoptosis; mitofagia; hexadecenal; levadura; mitocondria; Bcl-2; BAX.

Autora: Dña. Alba Calatayud Sánchez

Localidad y fecha: Valencia, Julio 2016

Tutora académica: Prof. Dña. María Desamparados Pascual-Ahuir Giner

Cotutor: D. Markus Hans Proft

Tipo de licencia de autorización de acceso y difusión del TFG: Creative Commons: Reconocimiento – NoComercial (by-nc) – Share Alike

TITLE: Study of new regulatory processes in mitophagy and apoptosis

Abstract:

The mitochondria is a highly dynamic organelle, which activity is very sensitive to the environment and the cell metabolic conditions. There are well described molecular processes that guarantee the so-called mitochondrial quality control, such as mitochondrial biogenesis and mitophagy, both processes are profoundly regulated by environmental variations. Deficiencies in mitochondrial homeostasis are associated with various neurological diseases in humans, such as the Sjögren–Larsson syndrome. A malfunction in mitochondrial quality control will induce a metabolic imbalance, accumulation of damage by increasing oxidative stress, and might eventually lead to apoptotic processes. These malfunctions can be caused by several factors such as the osmotic stress and the accumulation of toxic metabolites in the cell, as researched in this study.

Yeast is a wonderful model system for the study of mitochondrial biogenesis and mitophagy, but it is not for studies of apoptosis, mainly due to the absence of key elements such as proteins of the Bcl-2 family, present in mammals. However, the use of humanized yeast with apoptotic and anti-apoptotic members of the Bcl-2 family, has surprisingly proved to be an excellent model system for understanding the process of apoptosis.

The TFG will aim to discern new regulatory pathways to apoptosis and mitophagy, in order to achieve a more complete understanding at the molecular level. It will be especially focused on the implication of hexadecenal and osmotic stress response in the activation of apoptosis because of the release of mitochondrial factors induced by the pro-apoptotic Bcl-2 family member BAX.

Key words: apoptosis; mitophagy; hexadecenal; yeast; mitochondria; Bcl-2; BAX.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	I
ABSTRACT.....	II
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	VI
ABREVIATURAS.....	VII

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 ADAPTACIÓN A ESTRESSES	1
1.1.1 Estrés osmótico	1
1.1.2 Esfingolípidos	2
1.1.2.1 Importancia Hfd1p	4
1.2 APOPTOSIS	5
1.2.1 Apoptosis en mamíferos: familia Bcl-2	5
1.2.1.1 BAX	6
1.2.1.2 Proceso apoptótico en la mitocondria regulado por BAX	6
1.2.1.3 Bcl-X _L	7
1.2.2 Apoptosis en levadura	7
1.2.3 Relación de los esfingolípidos con la apoptosis mediada por BAX	8
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS	10
3.1. CEPAS	10
3.2. CONDICIONES DE CULTIVO	10
3.3. PLÁSMIDOS	11
3.4. ANTICUERPOS EMPLEADOS EN LA DETECCIÓN DE PREOTÉINAS	11
3.5. TÉCNICAS DE TRANSFERENCIA GÉNICA	11
3.5.1 Preparación de células de <i>S. cerevisiae</i> competentes	11
3.5.2 Transformación	12
3.6. ENSAYO MEDIANTE GOTEO “DROP TEST”	12
3.7. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS	12
3.7.1 Sistemas de expression Tet-Off y Tet-On	12
3.7.2 Obtención de la fracción proteica citosólica y mitocondrial	14
3.7.3 Electroforesis de proteínas en gel SDS-poliacrilamida	14
3.7.4 Transferencia a membrana	15
3.7.5 Western Blot	16
3.8. CONSUMO DE OXÍGENO	16
3.9. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	17
4. RESULTADOS	18
4.1. PAPEL DEL HEXADECENAL EN EL DESENCADENAMIENTO DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR BAX	18
4.1.1 Efecto del hexadecenal en células de levadura que sobreexpresan los genes BAX y Bcl-XL de humanos	18
4.1.2 Localización de BAX en células de levadura	19
4.1.3 Localización del gen de <i>S. cerevisiae</i> YBH3 (homólogo de BAX humano) tras tratamiento con estreses	20
4.2. RELACIÓN ENTRE LA RESPUESTA CELULAR AL ESTRÉS OSMÓTICO Y LA ENTRADA EN APOPTOSIS INDUCIDA POR BAX	22
4.2.1 Efecto del estrés osmótico en células que sobreexpresan BAX y Bcl-X _L	22

4.3 FUNCIÓN DEL ENZIMA HFD1.....	26
4.3.1 Efecto de la sobreexpresión de BAX sobre la funcionalidad mitocondrial.....	26
4.3.2 Correlación entre el estrés osmótico y la ruta de degradación de la esfingosina-1-fosfato	27
5. DISCUSIÓN	29
5.1 Modelo molecular	30
6. CONCLUSIONES	31
7. BIBLIOGRAFÍA.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Acciones intra- y extracelulares de la S1P (Maceyka et al., 2012)	3
Figura 2. Ruta metabólica de degradación de S1P a palmitoil-CoA en mamíferos y levadura (Modificado de Nakahara et al., 2012).....	4
Figura 3. Modelo en dos etapas para la permeabilización mitocondrial inducida por BAX (Priault et al., 2003).....	8
Figura 4. Interacción física entre el hexadecenal y BAX (Chipuk et al., 2012)	8
Tabla 1. Cepas silvestres y mutantes de delección	10
Figura 5. Representación esquemática de la regulación génica en el sistema de expresión Tet-Off (Clontech Laboratories, Inc., 2012)	13
Figura 6. Efecto del hexadecenal sobre células que sobreexpresan BAX y Bcl-XL.....	18
Figura 7. Visualización por inmunodetección de la proteína <i>myc-tagged</i> BAX.....	20
Figura 8. Observación mediante microscopía de fluorescencia de la localización de OM14p (dsRed) e Ybh3p (GFP).....	21
Figura 9. Efecto del estrés osmótico en células que sobreexpresan BAX y Bcl-XL “overnight” sin Dox	23
Figura 10. Efecto del estrés osmótico en células que sobreexpresan BAX y Bcl-XL “overnight” con 1 µg/ml de Dox	24
Figura 11. Efecto del estrés osmótico en células que sobreexpresan BAX y Bcl-XL “overnight” con 5 µg/ml de Dox	25
Figura 12. Medida del consumo de oxígeno de las cepas silvestre y mutante de delección de Hfd1 con y sin sobreexpresión del gen proapoptótico BAX de humanos.....	26
Figura 13. Efecto del estrés osmótico en células que sobreexpresan BAX de cepas silvestre y mutante de delección para Hfd1	28
Figura 14. Modelo del mecanismo de apoptosis inducido por la interacción de BAX y el hexadecenal	30

ABREVIATURAS

Na⁺: catión de sodio
NaCl: cloruro sódico o sal común
S. cerevisiae: *Saccharomyces Cerevisiae*
MAP quinasas: “mitogen-activated protein kinases”
HOG: “High Osmolarity Glycerol”
Sl1: “Synthetic Lethal of N-end rule”
Sho1: “Synthetic High Osmolarity-sensitive”
Om14p: “Outer Membrane 14”
Hfd1p: “Homolog of Fatty aldehyde Dehydrogenase”
FALDH: “Fatty aldehyde Dehydrogenase”
ALDH3A2: “Aldehyde Dehydrogenase 3 Family Member A2”
Dpl1p: “Dihydrosphingosine phosphate lyase”
SPL: “Sphingosine-1-phosphate lyase”
Bcl-2: “B-cell lymphoma 2”
BAX: “BCL2 Associated X protein”
Bcl-X_L: “B-cell lymphoma extra-large”
BH: Dominios de homología Bcl-2
BID: “BH3 interacting-domain death agonist”
BAK: “Bcl-2 homologous antagonist/killer”
MOMP: “Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization”
ROS: “reactive oxygen species”
MAC: “Mitochondrial apoptosis channel”
Apaf1: “Apoptosis protease-activating factor-1”
BAD: “Bcl-2-associated death promoter”
Akt: serina/treonina kinasa 1
AIF: “Apoptosis inducer factor”
PTP: Poro de transición a la permeabilidad
Yca1p: “Yeast metacaspase 1”
Uth1p: diminutivo de yoUTH
URA3: gen aminoácido uracilo
TRP1: gen aminoácido triptófano
CEN: gen centrorradial
LEU: gen aminoácido leucina
AmpR: gen de resistencia a ampicilina
Ybh3: gen de levadura también conocido como BXI1 “BAX inhibitor”
GFP: “Green Fluorescent Protein”
GPD: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
dsRED: proteína fluorescente roja de *Discosoma* sp.
Dox: doxiciclina
Tc: tetraciclina
S1P: esfingosina-1-fosfato
WT: “wild type” o cepa Silvestre

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ADAPTACIÓN A ESTRESSES

Se considera estrés a todo cambio en el ambiente de la célula que provoca un cambio adaptativo en ésta para poder crecer y proliferar con normalidad. Estos cambios requieren de mecanismos celulares de reconocimiento y respuesta específicos para cada determinado estrés. Existen varios tipos de estreses: osmótico, oxidativo, presencia de moléculas tóxicas, etc. Sin embargo, en este trabajo nos vamos a centrar en el estrés osmótico y su relación con los esfingolípidos en la activación de la apoptosis mediada por la mitocondria.

1.1.1 Estrés osmótico

El estrés osmótico puede estar producido por elevadas concentraciones de iones como el Na⁺ (por ionización de la sal NaCl), o por baja disponibilidad de agua en el ambiente. El estrés osmótico causa graves daños en la membrana plasmática a nivel de estructura, permeabilidad y propiedades mecánicas al alterar su conformación lipídica y por tanto, el nivel de distribución, síntesis y funcionalidad de las proteínas transmembrana, transportadores y osmosensores localizados en ella.

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la cascada de MAP quinasas HOG (“*High Osmolarity Glycerol*”) se ve activada en respuesta a este tipo de estrés, la cual culmina con la activación de la expresión de genes que codifican para enzimas de biosíntesis de glicerol, el mayor osmolito de levadura. En dicha activación participan los factores de transcripción Sko1p, Hot1p, Smp1p, Msn2p y Msn4p (Alepez, 2003; Bermejo et al., 2007).

La mitocondria es un orgánulo que presenta una elevada especificidad y juega un importante papel en la adaptación a estrés, ya que modifica sus procesos fisiológicos y su morfología para adaptarse al mismo. Estudios realizados anteriormente en nuestro grupo demuestran que la mitocondria juega un papel fundamental en la respuesta a estrés osmótico en las células de la levadura *S. cerevisiae*. En ellos se ha descrito que: a nivel transcripcional, se activa la expresión de ciertos enzimas que participan en el Ciclo de Krebs o en la cadena respiratoria, y a nivel proteómico, estudiando el proteoma mitocondrial bajo condiciones normales y bajo estrés hiperosmótico, se han identificado algunas proteínas que se acumulan en el orgánulo adaptado a estrés (Martínez-Pastor, Proft and Pascual-Ahuir, 2010), entre ellas Lsp1p, Mcr1p, Om14p, Rdl1p, y Hfd1p, siendo esta última de especial interés para este trabajo como se explicará más adelante. Estas proteínas se localizan en la membrana externa de la mitocondria de *S. cerevisiae* (Zahedi, 2006), pero se desconoce gran parte de su función en el proceso de adaptación a estrés.

Sin embargo, se ha descrito que Hfd1p, también denominada “Homolog of Fatty aldehyde Dehydrogenase”, participa en la ruta de degradación de la esfingosina-1-fosfato (S1P) degradando el esfingolípido intermedio hexadecenal a ácido hexadecenoico (Nakahara et al., 2012). La sobreexpresión de *Hfd1* bajo condiciones de estrés salino lleva a pensar que los niveles de esfingolípidos se regulan negativamente por estrés osmótico, ya que Hfd1p participa en su degradación. Aún así, solo se ha comprobado hasta el momento la disminución de los niveles de ergosterol en condiciones de estrés osmótico (no la disminución de esfingolípidos), siendo este un determinante importante en la adaptación a este tipo de estrés (Montañés, Pascual-Ahuir and Proft, 2010).

Otra conexión entre el estrés osmótico y los esfingolípidos es que la activación de la ruta HOG se produce, sobre todo, por la ausencia de esfingolípidos complejos. Esto se debe a que los sistemas de activación de esta ruta (Sln1 y Sho1; Hohmann, 2009) se localizan en membranas ricas en rafts lipídicos, los cuales comprenden en su estructura determinados esfingolípidos. La ausencia de estos esfingolípidos provoca cambios en las propiedades físicas y estructurales de los rafts e influye en la detección del estrés en levadura. A pesar de esta relación, sería necesario realizar un estudio más profundo en este campo para determinar el mecanismo con mayor exactitud (Tanigawa et al., 2012).

1.1.2 Esfingolípidos

Los esfingolípidos constituyen una amplia familia de lípidos, caracterizados por una estructura cuya base de cadena larga la constituye la esfingosina O 1,3-dihidroxi-2-amino-4-octadeceno (Barenholz and Thomson, 1980). A esta base pueden unirse grupos funcionales o ácidos grasos mediante enlaces amida, dando lugar a la S1P y a las ceramidas (Hannun, 1995). Las ceramidas a su vez pueden ser modificadas a ceramida-1-fosfato, esfingomielina y glicoesfingolípidos simples y complejos como los gangliósidos, cerebrósidos y globósidos (Chalfant, 2005; Barenholz, 1984; Svennerholm, 1980).

Los esfingolípidos se localizan en las bicapas lipídicas de las células eucariotas, pero sobre todo, se encuentran en tejido nervioso y cerebral (Spiegel and Mistiel, 2003). Las esfingomielinas pertenecen al grupo de los fosfoesfingolípidos por poseer un grupo fosfato y se localizan sobre todo en la vaina de mielina de las neuronas y en las membranas de las células del tejido adiposo (Barenholz, 1984). Por otro lado, los gangliósidos se caracterizan por la unión de varias unidades de oligosacáridos a la ceramida, mediante enlace o-glicosídico y se localizan sobre todo en las terminaciones nerviosas del sistema nervioso central (Svennerholm L. 1980). Los cerebrósidos tienen unido un único oligosacárido a la ceramida y dependiendo del mismo, presentará unas características u otras, es decir, si el oligosacárido se trata de una galactosa se conocen como galactocerebrósidos (los cuales se localizan mayoritariamente en las membranas plasmáticas de las células nerviosas). Si el oligosacárido unido a la ceramida es una glucosa, se trata de glucocerebrósidos (los cuales se localizan mayoritariamente en las membranas plasmáticas de los tejidos no nerviosos). Por último, los globósidos se caracterizan por la unión de oligosacáridos neutros a la ceramida (Linnington and Rumsby, 1980).

Los esfingolípidos, además juegan un papel importante como componentes bioactivos dada su capacidad de formar múltiples puentes de hidrógeno con otras moléculas. Así, participan en procesos de señalización celular y transducción de señales como mensajeros secundarios, procesos que a su vez forman parte de los procesos de diferenciación, migración, muerte celular programada e inflamación (El Alwani et al., 2006).

En este sentido, tienen especial importancia los esfingolípidos participantes en la ruta de degradación de la S1P, debido a la gran variedad de procesos fisiológicos y patofisiológicos en los cuales está involucrada esta molécula. Principalmente, esta molécula de señalización regula el crecimiento celular (Olivera and Spiegel, 1993) y suprime procesos de apoptosis (Cuvillier et al., 1996) como se puede observar en la figura 1, donde se muestra que una de las funciones de la S1P es la de inhibir la síntesis de ceramida, la cual está implicada en activar los procesos de senescencia, apoptosis y autofagia.

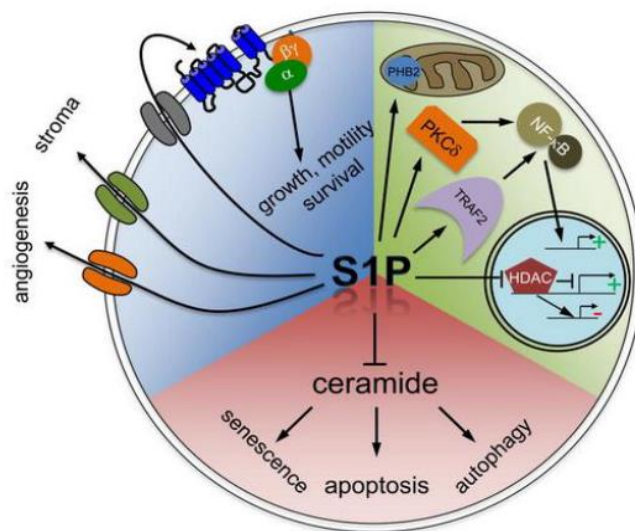


Figura 1. Acciones intra- y extracelulares de la S1P.

La esfingosina-1-fosfato producida intracelularmente inhibe la síntesis de la ceramida, la cual interviene en procesos de senescencia, apoptosis y autofagia (sector rojo). Además posee otras dianas intracelulares (sector verde), o puede ser exportada al exterior de la célula para actuar de forma paracrina o autocrina a través de sus receptores (sector azul) (Maceyka et al., 2012).

Además, la S1P participa como intermediaria en la ruta de conversión de los esfingolípidos a glicerolípidos. En esta, se produce un primer paso de conversión de la S1P a hexadecenal por una S1P liasa (Dpl1p en levadura, SPL en mamíferos), el cual es degradado a ácido hexadecenoico por la enzima de levadura nombrada anteriormente, Hfd1p (ALDH3A2 en mamíferos), y es finalmente convertido a hexadecenoil-CoA y palmitoil-CoA, precursor de los glicerolípidos (Nakahara et al., 2012).

1.1.2.1 Importancia Hfd1p

Este trabajo se centrará en el papel de la Hfd1p por su implicación en el síndrome de Sjögren - Larsson y su relación con la respuesta a estrés osmótico. Además de en la mitocondria, esta enzima se localiza en partículas lipídicas y endosomas (Huh et al., 2003). Es un ortólogo de la proteína ALDH3A2, un enzima aldehído deshidrogenasa graso (FALDH, “fatty aldehyde dehydrogenase”) presente en humanos, que se encarga de la catálisis de la oxidación de aldehídos grasos en ácidos grasos. Los aldehídos como el hexadecenal son altamente reactivos, por lo que deben ser metabolizados inmediatamente a otros compuestos no tóxicos, en este caso, ácidos carboxílicos. Por lo tanto, una disfunción de ALDH3A2, causada por una mutación, da lugar a la acumulación de hexadecenal, y provoca un desorden neurocutáneo conocido como Síndrome de Sjögren-Larsson o SLS (Nakahara et al., 2012; Rizzo, 2007). El SLS es un desorden hereditario neurodegenerativo, que se caracteriza por ictiosis congénita, retraso mental y espasticidad.

Tanto la ruta de síntesis de glicerolípidos como la ruta de degradación de la S1P se encuentran muy conservadas entre mamíferos y levadura (Fig. 2), por ello, la levadura *S. cerevisiae* se considera un excelente organismo modelo para el estudio de los esfingolípidos, especialmente los implicados en la ruta de la S1P, como el hexadecenal.

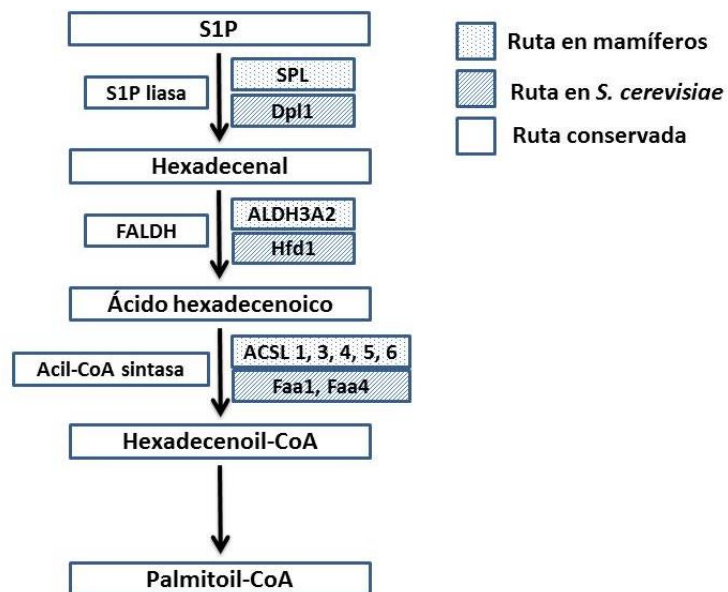


Figura 2. Ruta metabólica de degradación de S1P a palmitoil-CoA en mamíferos y levadura.

La S1P es modificada a hexadecenal mediante una S1P liasa. Este hexadecenal es transformado a ácido hexadecenoico mediante una “fatty aldehyde dehydrogenase” y este pasa a hexadecenoil Co-A tras la transformación mediada por una Acil-CoA sintasa. Finalmente el hexadecenoil-CoA es transformado a Palmitoil-CoA. Cada una de las enzimas implicadas se encuentra tanto en mamíferos como en levadura bajo el nombre de proteínas homólogas. Esta ruta se encuentra altamente conservada entre mamíferos y levadura. Modificado de Nakahara et al., 2012.

1.2 APOPTOSIS

1.2.1 Apoptosis en mamíferos: familia Bcl-2

La apoptosis, o muerte celular programada, en mamíferos es un proceso altamente regulado, cuyos mecanismos han sido extensamente estudiados. En ella participan numerosas familias de proteínas, sin embargo, en este trabajo nos centraremos en aquellas que interactúan con la mitocondria, principalmente la familia Bcl-2, cuyas integrantes se localizan, en mayor parte, en la membrana externa de la mitocondria. Estas proteínas, una vez integradas en la mitocondria, modulan la permeabilización de sus membranas y posiblemente alteran su función bioactiva (Priault et al., 2003), pero se desconocen los mecanismos moleculares mediante los cuales esto sucede.

Las proteínas de la familia Bcl-2 poseen algunas características peculiares: en primer lugar, comparten un alto grado de similitud entre ellas, tanto en su estructura primaria como en la terciaria (Muchmore et al., 1996; Suzuki et al., 2000); a pesar de ello, sus funciones difieren, ya que entre ellas se encuentran tanto proteínas pro-apoptóticas como anti-apoptóticas, pudiendo ser transformadas las de un grupo en otro mediante “splicing” alternativo o digestión específica de la proteína madura (Cheng et al., 1997; Liang et al., 2002); además, dentro del grupo de pro-apoptóticas y anti-apoptóticas se pueden reemplazar entre ellas con facilidad. Son cambios conformacionales muy sutiles los que determinan su localización y, consecuentemente, su función.

Todas las proteínas de esta familia poseen de 1 a 4 dominios de homología Bcl-2 (BH1-4). La rama pro-apoptótica de estas incluye las proteínas multidominio BAX y BAK (Antonigani and Youle, 2006), así como las proteínas de BH3 único como BID o BIM (Kelekar and Thompson, 1998). Son las proteínas BAX y de BH3 único las que inician la permeabilización de la membrana externa mitocondrial tras la inducción de la apoptosis (Büttner et al., 2011).

Esta complejidad, junto con el hecho de que las células de mamífero poseen sus propios genes endógenos de Bcl-2, dificulta el estudio mediante expresión heteróloga de los mecanismos por los que esta familia regula la apoptosis en la célula. Es por ello que se necesita emplear un modelo celular adecuado en este estudio. La levadura *S. cerevisiae* no posee homólogos obvios de las proteínas involucradas en la regulación de la apoptosis en mamíferos, lo que la convierte en un excelente sistema modelo para descubrir la función de las proteínas de la familia Bcl-2 de nuestro interés en relación a la apoptosis regulada mediante la mitocondria (Priault et al., 2003). Estas son: la pro-apoptótica BAX y la anti-apoptótica Bcl-X_L.

1.2.1.1 BAX

La proteína nativa intacta BAX se encuentra en el citosol de células sanas de mamífero, pero tras la inducción de la apoptosis se transloca a la membrana mitocondrial, siendo la señal de localización mitocondrial la estructura en α -hélice localizada en el extremo N-terminal entre los aminoácidos 24 y 37 de BAX (llamada α 1) (Cartron et al., 2003). Dicha translocación no ocurre de forma espontánea *in vitro*, al contrario que la interacción de Bcl-X_L con la mitocondria, aunque se desconoce la naturaleza de la molécula efectora de la translocación de BAX (Tremblais et al., 1999). Sin embargo, se ha demostrado que la proteína modificada *c-myc*-tagged BAX (empleada en este trabajo) sí es capaz de anclarse a la membrana mitocondrial de células sanas de mamífero espontáneamente (Manon, Chaudhuri and Guérin, 1997) provocando la muerte celular.

1.2.1.2 Proceso apoptótico en la mitocondria regulado por BAX

El principal papel de la mitocondria en el desencadenamiento de la apoptosis es la liberación de una serie de proteínas desde el espacio intermembrana al espacio citosólico. De estas, se han identificado cuatro hasta el momento: el factor inductor de la apoptosis (AIF de sus siglas en inglés); el smac/diablo; la endonucleasa G; y el citocromo c, cuya liberación representa un paso clave en la iniciación de la apoptosis (Priault et al., 2003). Esta liberación ocurre por un proceso conocido como permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP de sus siglas en inglés), cuyos mecanismos están aún por determinar.

Cabe destacar que, la mitocondria, además de estar involucrada en procesos de apoptosis, también puede sufrir mitofagia, siendo uno de los dos procesos el elegido por la célula a cada momento, son respuestas contrarias frente al estrés. La mitofagia 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). 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. Este aspecto de la funcionalidad mitocondrial es importante para el presente estudio, ya que se ha sugerido que la presencia del esfingolípido hexadecenal puede ser decisiva para que la célula opte por activar la apoptosis en lugar de la mitofagia.

Se ha propuesto la hipótesis de que, tras la interacción entre BAX y la mitocondria, esta proteína formaría un canal mitocondrial inducido por apoptosis (MAC de sus siglas en inglés) cuyo tamaño y especificidad permitirían la permeabilización de la membrana mitocondrial al paso del citocromo c, proteína globular de 3 nm de diámetro y carga positiva. Una vez en el citosol, el citocromo c interactúa con Apaf1 y la procaspasa 9 para iniciar la activación de las

caspasas 3, 6 y 7, principales proteasas ejecutoras de los procesos apoptóticos (Li et al., 1997). Estas proteasas atacarían la membrana mitocondrial y desencadenarían la liberación del AIF, el smac/diablo y la endonucleasa G mediante un mecanismo conocido como “poro de transición a la permeabilidad” (PTP; Bernardi, 1999) del cual no se conocen con seguridad su estructura ni sus reguladores, pero cuya apertura estaría modulada positivamente por BAX, y negativamente por Bcl-X_L (Priault et al., 2003).

1.2.1.3 Bcl-X_L

Se ha demostrado que la proteína Bcl-X_L impide la muerte celular cuando es co-expresada con BAX mediante el bloqueo o retraso de la liberación del citocromo c. Por otra parte, Bcl-X_L también inhibe la activación de las caspasas tanto *in vivo* como *in vitro*. Bajo condiciones normales, Bcl-X_L se encuentra secuestrada en el citosol por la proteína BAD, sin embargo, tras la señalización pertinente de los receptores de factor de crecimiento, BAD es fosforilada por la quinasa Akt de forma que Bcl-X_L es liberado y enviado a la mitocondria. Por tanto, cuando los niveles de factor de crecimiento disminuyen o este no es sintetizado correctamente, Bcl-X_L queda secuestrado y BAX da lugar al inicio de la apoptosis (Finucane et al., 1999).

1.2.2 Apoptosis en levadura

El proceso por el cual BAX inicia la apoptosis descrito anteriormente se ha denominado: modelo en dos etapas para la permeabilización mitocondrial inducida por BAX (Fig. 3), y recoge las distintas hipótesis que relacionan BAX con la apoptosis mediada por la mitocondria en células de mamífero. Sin embargo, en *S. cerevisiae* el citocromo c citosólico no produce la misma activación de las caspasas ni la permeabilización completa de la membrana mitocondrial externa que ocurre en mamíferos, lo que proporciona una ventaja a la hora de emplear levadura como organismo modelo, ya que se puede estudiar este primer paso (liberación del citocromo c) en detalle, independientemente de pasos posteriores (Priault et al., 1999).

En levadura, BAX puede inducir la apoptosis de dos formas. Por una parte, y de forma similar a células de mamífero, la liberación de factores mitocondriales produce la activación de una serie de proteasas, entre ellas la caspasa Yca1p, enzima implicada en la respuesta a estrés oxidativo (Madeo et al., 2002). Por otra parte, existe una ruta alternativa que implica la activación de otra proteína de la membrana mitocondrial externa, la Uth1p, la cual está altamente relacionada con los procesos de autofagia en las células de levadura (Camougrand et al., 2003). Esto sugiere que existe una relación entre la muerte celular inducida por BAX y la autofagia.

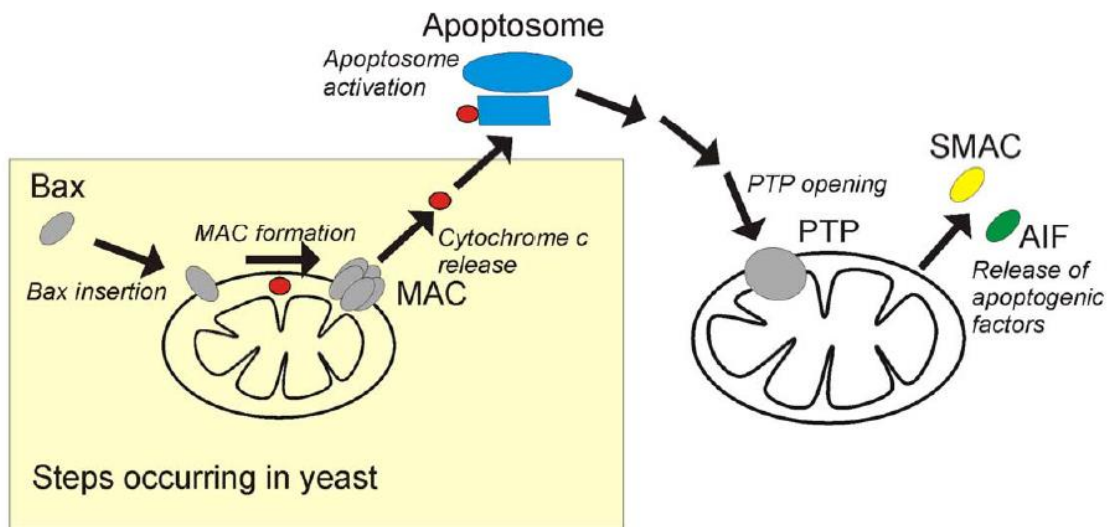


Figura 3. Modelo en dos etapas para la permeabilización mitocondrial inducida por BAX.

Cuando BAX se inserta en la membrana mitocondrial externa forma el MAC que cataliza la liberación de citocromo c mediante permeabilización selectiva de la membrana. Este mecanismo puede ser reproducido en levadura empleando *c-myc tagged* BAX. En células de mamífero, el citocromo c activa pasos de apoptosis subsiguientes, los cuales inducen la apertura de PTP permitiendo la liberación de otros reguladores de la apoptosis como AIF o smac/diablo. Esta permeabilización completa no se observa en levadura (Priault et al., 2003).

1.2.6 Relación de los esfingolípidos con la apoptosis mediada por BAX

Se ha comprobado que los niveles de liberación de citocromo c son mayores en aquellas células que expresan BAX y se les añaden esfingolípidos, que en aquellas que únicamente tienen BAX. Además esta liberación se ve inhibida cuando se co-expresa con Bcl-X_L en células de mamífero. El metabolismo de los esfingolípidos está involucrado en procesos de apoptosis y coordina la activación de BAX mediante un producto concreto, el hexadecenal. Se ha demostrado que el hexadecenal se asocia físicamente a BAX de forma específica *in vitro*, ya que no se une a Bcl-X_L (Fig. 4), pero se desconoce si esta unión tiene lugar *in vivo* o si tiene algún papel en la interacción entre BAX y la mitocondria, lo cual será investigado en este trabajo (Chipuk et al., 2012).

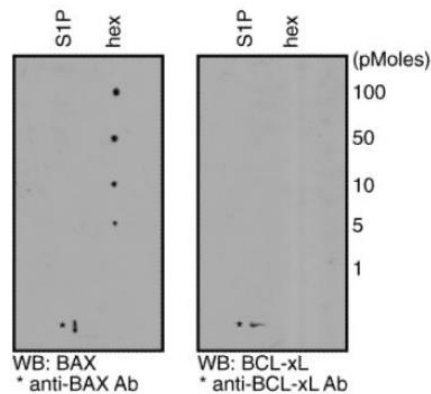


Figura 4. Interacción física entre hexadecenal y BAX.

Membranas de nitrocelulosa microinyectadas con los picomoles indicados de S1P o hexadecenal combinado con BSA y ponceau red para su visualización. Se incubaron las membranas con 50 ng de BAX o Bcl-X_L y testadas frente anticuerpos anti-BAX (marca vertical) o anti-Bcl-X_L (marca horizontal). Los controles positivos (*) se realizaron con un anticuerpo de inmunoprecipitación para BAX o Bcl-X_L (Chipuk et al., 2012).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es investigar el potencial de la levadura *S. cerevisiae* como sistema experimental en el estudio del papel del esfingolípido hexadecenal en el mecanismo de apoptosis celular. Para ello, se han fijado tres objetivos principales:

- Establecer la implicación del hexadecenal en el desencadenamiento de la apoptosis inducida por proteínas del tipo BAX de humanos.
- Determinar si la respuesta celular al estrés osmótico bloquea la entrada en apoptosis inducida por BAX.
- Concretar la función de la enzima Hfd1

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 CEPAS

Las cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* empleadas en este trabajo se muestran a continuación en la Tabla 1:

Tabla 1. Cepas silvestres y mutantes de delección.

Cepa	Genotipo
W303	MATa/MAT α {leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15} [phi+]
BY4741	MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0
Δ dpl1	BY4741 dpl1::KAN
Δ hfd1	BY4741 hfd1::KAN

3.2 CONDICIONES DE CULTIVO

Los medios empleados para los cultivos de levadura *S. cerevisiae* fueron los siguientes:

Medio YPD (Yeast extract – Peptone – Dextrose) líquido:

Se disuelven en agua MiliQ un 1% de extracto de levadura, un 2% de peptona y un 2% de glucosa (dextrosa). Se autoclava a 121°C y 1.2 atmósferas durante 20 minutos. Los cultivos en este medio se incubaron a 28°C en agitación (180 – 200 rpm).

Medio YPD (Yeast extract-Peptone-Dextrose) sólido:

Se disuelven en agua MiliQ un 1% de extracto de levadura, un 2% de peptona, un 2% de glucosa (dextrosa) y un 2% de agar bacteriológico. Se autoclava a 121°C y 1.2 atm durante 20 minutos. En este medio, los cultivos se incubaron a 28°C.

Medio SD (Synthetic Dextrose) líquido:

Se disuelven en agua MiliQ 6,7 g/l de base nitrogenada de levadura, 20 g/l de glucosa (dextrosa) y 50 mM de ácido succínico pH=5,5. El medio se puede suplementar con los aminoácidos requeridos a una concentración 1x. Se autoclava a 121°C y 1.2 atm durante 20 minutos. Los cultivos en este medio se incubaron en agitación a 28°C (180 – 200 rpm).

Medio SD (Synthetic Dextrose) sólido:

Se disuelven en agua MiliQ 6,7 g/l de base nitrogenada de levadura, 20 g/l de glucosa (dextrosa), 50 mM de ácido succínico pH=5,5 y 20 g/l de agar bacteriológico. El medio se puede suplementar con los aminoácidos requeridos a una concentración 1x. Se autoclava a 121°C y 1.2 atm durante 20 minutos. Los cultivos en este medio se incubaron a 28°C.

3.3 PLÁSMIDOS

Para estudiar el efecto del gen BAX se empleó el plásmido pCM189/tetp-BAX, mientras que para estudiar el gen BCL-X_L se empleó el plásmido pCM184/tetp-bcl-xl, además de sus correspondientes plásmidos vacíos pCM189/tetp y pCM184/tetp. Dichos plásmidos son centroméricos, cuentan con las secuencias del represor tetR y el operador tetO, y los genes BAX y Bcl-X_L fueron insertados entre los sitios HpaI y BamHI de pCM189 (portador de URA3 como marcador de selección para levadura) y entre los sitios StuI y BamHI de pCM184 (portador de TRP1 como marcador de selección), correspondientemente. Ambas construcciones fueron cedidas por Stéphen Manon (Priault *et al.*, 1999).

Para estudiar la localización del gen YBH3 (homólogo de BAX en *S. cerevisiae*) se empleó el plásmido pUG36-EGFP, y el plásmido OM14-dsRed. El plásmido llamado pUG36-EGFP (CEN, URA3, AmpR) se empleó vacío y ligado a *Ybh3* (Büttner *et al.*, 2011). El plásmido llamado OM14-dsRed es el plásmido pAG415-GPD-OM14-dsRed (LEU) que permite visualizar la mitocondria en color rojo bajo microscopio de fluorescencia (cedido por Markus Proft).

3.4 ANTICUERPOS EMPLEADOS EN LA DETECCIÓN DE PROTEÍNAS

Dado que la proteína BAX empleada en este trabajo se encuentra fusionada a la “tag” myc, en su detección se emplearon los anticuerpos: anticuerpo anti-myc (Roche anti-c-myc clone 9E10 anticuerpo monoclonal de ratón, 11667203001 5mg/ml) como anticuerpo primario a una dilución 1:10000; y un anticuerpo “anti-mouse” (Amersham ECL Mouse IgG NA931-100ul, anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado a peroxidasa de rábano) como anticuerpo secundario a una dilución 1:5000.

3.5 TÉCNICAS DE TRANSFERENCIA GÉNICA

3.5.1 Preparación de células de *S. cerevisiae* competentes

Para realizar la transformación en levadura se empleó el método del acetato de litio (Gietz *et al.*, 1995) siguiendo los siguientes pasos.

En primer lugar, se prepararon células de levadura competentes. Para ello, se crecieron cultivos de las cepas de levadura de interés en 50 ml de medio YPD líquido, hasta una densidad óptica a 600 nm de longitud de onda (OD₆₀₀) entre 1 y 1.5. Los cultivos fueron transferidos a tubos (Falcon) de 50 ml y se centrifugaron durante 3 minutos a 1500 rpm. Se realizó un primer lavado con agua MiliQ estéril (30 ml) y un segundo lavado con 30 ml de LiTE 1X estéril (0.1 M LiAcetate en 1X TE (10 mM Tris/HCl pH=7.6, 1mM EDTA)). Posteriormente, se resuspendieron las células en 0.5 ml de TE 1X estéril de los cuales se transfirieron 60 µl a tubos Eppendorf de 1.5 ml y se incubaron 15 min a 30° C.

3.5.2 Transformación

Una vez preparadas las células, se añadió a los tubos: 3 µl del plásmido de interés y 300 µl de LiTE/40% PEG4000 (desde un stock fresco preparado mezclando 9 volúmenes de 45% PEG4000 con 1 volumen de 10X LiTE). Se incubó la mezcla a 30° C durante 30 minutos y seguidamente a 42° C durante 20 minutos exactamente. Se centrifugaron las células a 1300 rpm durante 60 segundos para precipitar las células y se lavaron con 1 ml de agua MiliQ estéril. Finalmente se plaquearon las células en medio selectivo sólido y se incubaron a 30° C durante 1 o 2 días.

3.6 ENSAYO MEDIANTE GOTEO (“DROP TEST”)

Para realizar este ensayo, en primer lugar se obtuvieron precultivos de las cepas de interés sometidas a distintos tratamientos “overnight” (inducción de la expresión génica o estrés osmótico con 0.4, 0.6 o 0.8 M NaCl). Se recolectaron los cultivos con una OD₆₀₀ entre 1 y 2 y se emplearon para realizar diluciones seriadas (1:10; 1:100; 1:1000) en una placa multipocillo estéril obteniendo un volumen total de 100 o 200 µl con el medio SD con o sin tratamiento adicional (presencia de hexadecenal, inducción de la expresión génica o estrés osmótico). Con la ayuda de un aplicador manual (Sigma) se transfirieron aproximadamente 3 µl de cada dilución a placas de YPD sólido a distintos intervalos de tiempo de incubación de la placa multipocillo en la estufa a 28° C. Una vez plaquedadas, fueron incubadas a 28° C durante 2 días.

3.7 TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

3.7.1 Sistemas de expresión Tet-Off y Tet-On

Los sistemas de expresión Tet-Off y Tet-On se basan en los sistemas de alta expresión génica descritos por Gossen y Bujard (1992; Tet-Off) y Gossen et al. (1995; Tet-On). En el sistema Tet-Off la expresión del gen de interés se encuentra reprimida en presencia de tetraciclina (Tc) o doxiciclina (Dox; un derivado de Tc), y se induce cuando estas son retiradas del medio de cultivo. Por el contrario, el sistema Tet-On funciona a la inversa, la adición de Dox activa la expresión del gen de interés, este sistema además solo responde a Dox, no a Tc. Ambos sistemas permiten un estricto control sobre los niveles de expresión, variando las concentraciones de Tc y Dox.

En este trabajo se ha empleado el sistema Tet-Off incluido en los plásmidos cedidos por Stéphen Manon, añadiendo Dox como represor de la expresión a unas concentraciones de 2 µg/ml y 5 µg/ml. Se prefiere el uso de Dox en lugar de Tc porque se requiere una

concentración significativamente menor para una completa inactivación (0.01–1 µg/ml Dox vs. 1–2 µg/ml Tc). Dichas concentraciones de los antibióticos se encuentran siempre por bajo de los niveles citotóxicos para cultivos celulares o estudios con animales transgénicos. Una ventaja adicional del uso de Dox frente a Tc es la vida media, pues la vida media de la Dox es de 24 horas mientras que la de la Tc es de 12 horas (Clontech Laboratories, Inc., 2012).

Este sistema presenta varias ventajas frente a otros sistemas alternativos que son de interés en el presente estudio. Por una parte, se trata de un sistema de expresión débil, por lo que la activación de la expresión del gen apoptótico BAX no supondrá una amenaza inmediata para la supervivencia de la célula. Además, como es inducible, permite alcanzar una masa celular apropiada antes de activar la expresión de una proteína tóxica como es BAX, de lo contrario, si esta proteína se expresara desde el comienzo del cultivo, las células morirían sin poder ser sometidas a otro tratamiento o condición y esto dificultaría el estudio.

Tet-Off

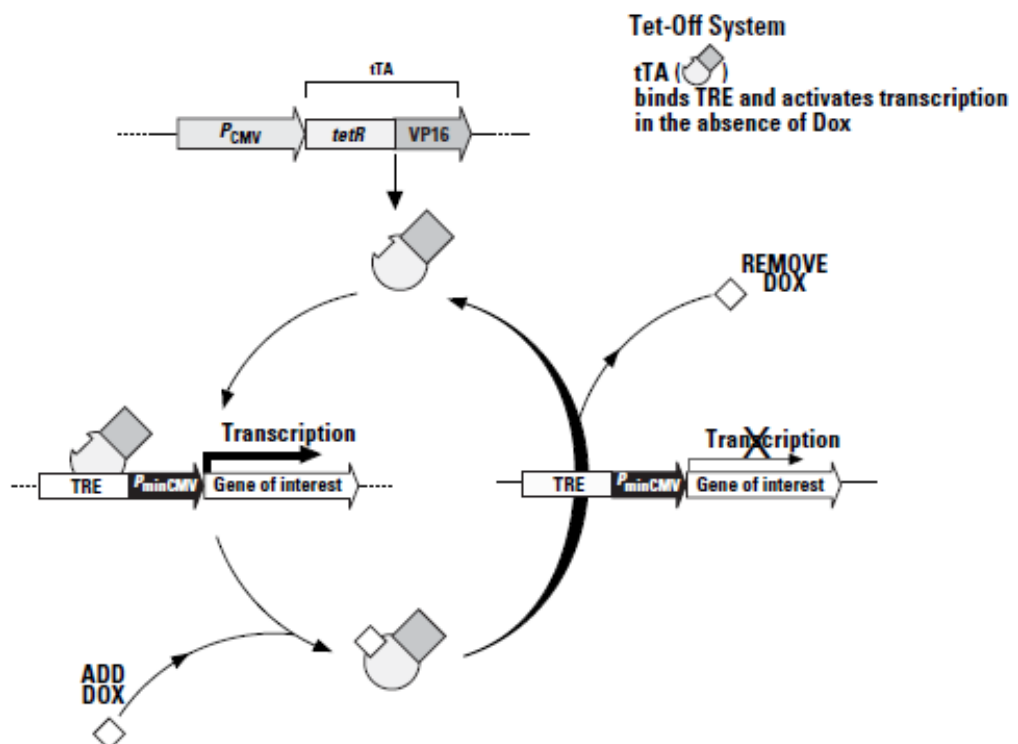


Figura 5. Representación esquemática de la regulación génica en el sistema de expresión Tet-Off.

El TRE (Tet Response Element) se localiza aguas arriba del promotor de citomegalovirus (P_{minCMV}), el cual se encuentra silenciado en ausencia de activación. El tTA (tetracycline-controlled transactivator) se une al TRE, permitiendo la activación de la transcripción del gen X de interés, en ausencia de Tc o Dox (Clontech Laboratories, Inc., 2012).

3.7.2 Obtención de la fracción proteica citosólica y mitocondrial

Para enriquecer la fracción mitocondrial del extracto total de las células de *S. Cerevisiae* se empleó el método de centrifugación mitocondrial descrito por Pon y Schon (2001).

En primer lugar, se obtuvo un cultivo de 100 ml en medio SD (-URA o -TRP según necesario; sin Dox) de cada una de las cepas silvestres y mutantes de interés, con y sin transformar con BAX, a una OD₆₀₀ entre 1 y 2. Las células se recuperaron por centrifugación a 1500 rpm durante 3 min, se lavaron con 1 ml del buffer TSB (10 mM Tris/HCl pH 7.5, 0.6 M Sorbitol) y se resuspendieron en 1 ml de buffer TSB + 10 µl de PMSF (100x). A continuación, se tomaron 500 µl de la suspensión y se les añadieron de bolas de vidrio (0.4-0.5 nm de diámetro) hasta ocupar dos tercios del volumen del tubo Falcon (15 ml) para lisar las células mediante 5 pases de 1 minuto con el "vortex". Las células se mantuvieron siempre en hielo.

La solución resultante se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 ml, y se centrifugó durante 5 minutos a 600 g y 4°C. Esta centrifugación a baja velocidad permitió que se sedimentaran el debris celular, células sin lisar y los núcleos, dejando las mitocondrias, otras membranas celulares y el citosol en el sobrenadante, que se recuperó y se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf y se centrifugó de nuevo durante 10 minutos a 1200 g y 4°C. Para recuperar la fracción mitocondrial (junto con otras membranas celulares contaminantes) se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo (fracción citosólica) y el pellet se resuspendió en 200 µl de buffer TSB + 2 µl PMSF (100x). Las fracciones se mantuvieron en el congelador a -20°C.

3.7.3 Electroforesis de proteínas en gel SDS-poliacrilamida

Mediante el detergente aniónico SDS (sodium dodecyl sulphate), se consigue que la movilidad de las proteínas en el gel dependa sólo de su peso molecular y no de su composición. Este detergente desnaturaliza las proteínas convirtiéndolas en estructuras lineales. Aproximadamente está presente una molécula de SDS por cada dos aminoácidos haciendo que la densidad de carga eléctrica sea constante para diferentes proteínas independientemente de su composición aminoacídica, debido a que las cargas eléctricas de los aminoácidos son enmascaradas por la gran cantidad de moléculas cargadas negativamente de SDS.

Para realizar la electroforesis, fue necesario preparar el gel de SDS-poliacrilamida para proteínas. Este gel consiste en dos fases, una superior o fase de empaquetamiento en la cual se concentran los complejos SDS-proteína, para posteriormente ser separados en la fase inferior o fase de separación en la cual los complejos se separan de acuerdo a su tamaño. El gel de separación al 12% de acrilamida se preparó teniendo en cuenta el peso molecular de la proteína de interés BAX (21 kDa). Esta fase contenía 5 ml de tampón de separación 2x (0,75 M de Tris/HCl pH 8,8 y 0,2% SDS), 3 ml de acrilamida – bis 38:2, 4 ml de agua Milli Q, 100 µl de peroxodisulfato de amonio (APDS) 10% en agua Milli Q y 5 µl de tetrametiletlenodiamina (TEMED). Los componentes anteriores se mezclaron y se colocaron en el casete Mini Protean 3 System de BioRad. Para permitir la polimerización del gel, la cual requiere ausencia de oxígeno,

se añadió una fina capa superior de isobutanol. Una vez polimerizado el gel, esta capa de isobutanol se descartó y se eliminaron todos los restos.

A continuación, se preparó el gel de empaquetamiento al 3% de acrilamida, el cual contenía 1,8 ml de tampón de empaquetamiento 2x (0,25 M de Tris/HCl pH 6,8 y 0,2% SDS), 0,3 ml de acrilamida-Bis 38:2, 1,5 ml de agua Milli Q, 100 µl de APDS y 3 µl de TEMED. Una vez mezclados los componentes se vertieron encima del gel de separación que ya estaba polimerizado. Se colocó el peine, con precaución para no generar burbujas entre los pocillos y se dejó polimerizar. Una vez preparado el gel, se colocó en el tanque de electroforesis y se rellenó con tampón SDS PAGE 1x (SDS PAGE 10x: 1,92 M de glicina, 1% de SDS, ajustando el pH a 8,3 con Tris). Antes de inyectar las muestras en el gel, se prepararon en tampón Laemmli 1x (Laemmli 5x: 0,3M Tris/HCl pH 6,8, 7,5 % SDS, 0,1M DTE, 10mM EDTA, 30% sacarosa y 0,25mg/ml de azul de bromofenol). En el gel se inyectaron unos 20 µl de las muestras preparadas (tras hervirlas durante 5 minutos a 95°C) y el marcador de pesos moleculares y se comenzó la electroforesis a 70 V durante 20 minutos, y se terminó con 40 minutos a 100 V, empleando el Mini Protean 3 System.

3.7.4 Transferencia a membrana

Una vez concluida la electroforesis, se transfirieron las proteínas a una membrana PVDF Immun-Blot® (BioRad) para facilitar el acceso de los anticuerpos en el paso posterior. Fue necesario separar el SDS de las proteínas para facilitar la unión de las proteínas a la membrana, unión que tiene lugar en gran parte por interacciones hidrofóbicas y por tanto difícil en presencia de SDS. Esta separación se consiguió gracias al metanol, el cual está presente en el tampón de transferencia (100 ml de SDS-PAGE BUFFER 10x, 100 ml de metanol y 800 ml de agua Milli Q).

El gel de separación (el cual contenía las proteínas) se colocó junto con la membrana en la cual se iba a producir la transferencia, entre dos papeles de filtro y a su vez, a modo de sándwich, entre dos esponjas, de forma que al hacer pasar una corriente las proteínas se desplazaran del gel hacia la membrana. Todos los componentes estaban humedecidos en tampón de transferencia, excepto la membrana que se sumergió, antes de colocarla junto al gel, en metanol para activarla. Se eliminaron todas las posibles burbujas formadas en el sándwich antes de proceder a la transferencia, la cual se realizó a 10 V “overnight”.

3.7.5 Western Blot

Para comenzar con la inmunodetección, la membrana libre de colorante se sumergió en 10 ml de una disolución de bloqueo de los sitios de unión no específicos. Se empleó una disolución de leche en polvo al 2% en TBS 1x (TBS 10x: 1,5M NaCl, 0,2M Tris/HCl pH 7,6), resultando el tampón TBSL, y se incubó en agitación durante 1 hora. A continuación, se eliminó la solución de bloqueo, y empleando la misma disolución se incubó la membrana con el anticuerpo primario (anticuerpo Anti-myc monoclonal 9E10 MOUSE de ROCHE) a una dilución 1:10000 (10 ml aproximadamente) durante 1 hora en agitación. Posteriormente, se eliminó la disolución anterior y se realizaron 2 lavados de 5 minutos empleando la disolución de bloqueo, y un tercer lavado empleando TBS 1x, para eliminar los restos de anticuerpo primario. Seguidamente se incubó el segundo anticuerpo (Amersham ECL Mouse IgG NA931-100ul, anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado a peroxidasa de rábano) a una dilución 1:5000 (10 ml aproximadamente) en TBS 1x, durante 1 hora en agitación. Transcurrido este tiempo, se lavó la membrana 3 veces durante 5 minutos con TBS 1x, para eliminar los restos de anticuerpo secundario. Para la detección de las proteínas mediante quimioluminiscencia se empleó el kit ECLTM Prime Western Blotting Detection System, de AmershamTM, el cual nos permite, gracias a la presencia de peroxidasa en el segundo anticuerpo utilizado, detectar las proteínas de interés. La señal se analizó utilizando películas de rayos X (Biomax Light-1, Kodak).

3.8 CONSUMO DE OXÍGENO

Para realizar este experimento preparamos precultivos de la cepa silvestre BY4741 (WT) y el mutante de delección *Δhfd1*, en 3 ml de medio SD suplementado con los aminoácidos requeridos y sin Dox para inducir la expresión del gen BAX en las cepas transformadas. Estos precultivos se crecieron hasta una OD₆₀₀ de entre 1 y 2. Se midió la OD exacta de cada uno de ellos, para el análisis posterior de los resultados.

Para cada uno de los precultivos se realizó un primer lavado de las células con agua MiliQ. A continuación se realizó un segundo lavado, en este caso con NaPO₄ (40 mM, pH= 7,4). Justo en el momento previo a cada medida del consumo de O₂ de cada cepa, se resuspendieron las células en 1 ml de NaPO₄ suplementado con 1% de glucosa (sustrato para la fermentación) y se incubaron en agitación a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Para realizar las medidas del consumo de O₂ de cada una de las cepas empleamos un electrodo de oxígeno (Si Strathkelvin Instruments). Antes de realizar estas medidas, fue necesario calibrar el equipo utilizando agua MiliQ para valores máximos de O₂ y bisulfito sódico (pH>8) para valores mínimos de O₂. Para realizar las medidas se utilizó un volumen de muestra de 500 μl. El consumo se midió durante 30 minutos para cada una de las cepas y se realizaron dos medidas de cada una.

3.9 MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

La fluorescencia es una propiedad que poseen ciertas sustancias, caracterizada por la capacidad de absorber energía en forma de radiaciones electromagnéticas y luego emitir parte de esa energía en forma de radiación electromagnética con una longitud de onda diferente, resultando en una luz de un color particular (Skoog, Holler and Nieman, 1998). Dicha emisión es simultánea a la absorción y no persiste tras esta. En biología molecular se emplea este fenómeno para visualizar mediante microscopía cualquier molécula (proteína, componente de membrana, etc.) que se haya fusionado a un epítipo fluorescente para estudiar su localización.

Para estudiar la localización intracelular de la proteína de fusión YBH3-GFP en células vivas, se obtuvieron cultivos “overnight” a una OD_{600} alrededor de 1 y se trataron con 120 mM de ácido acético (Büttner et al., 2011), 2 mM de haxadecenal o se dejaron en condiciones normales durante 30 minutos y se analizaron empleando microscopía de epifluorescencia. La mitocondria fue visualizada empleando una proteína DsRed Sul-69, codificada en el vector pAG415-GPD-OM14-dsRed. Para la microscopía se empleó el microscopio NIKON ECLIPSE E600 con el objetivo Plan Fluor 100x/1.30 Oil DICH y la cámara de detección digital Nikon DS – Ri1 para tomar las imágenes.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 PAPEL DEL HEXADECENAL EN EL DESENCADENAMIENTO DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR BAX

4.1.1 Efecto del hexadecenal en células de levadura que sobreexpresan los genes BAX y Bcl-X_L de humanos

Siguiendo el estudio realizado por el equipo de Chipuk et al. (2012) que demostraba la interacción entre el esfingolípido hexadecenal y la proteína BAX *in vitro*, además de la inhibición de la muerte celular en presencia de Bcl-X_L, en este trabajo se quiso comprobar el efecto de la sobreexpresión de estas proteínas y su respuesta a la adición de distintas concentraciones de hexadecenal en el modelo celular de levadura *S. cerevisiae*. Este efecto se traduciría en cambios en la capacidad de crecimiento de las células que se evaluó mediante un ensayo de goteo (Fig. 6).

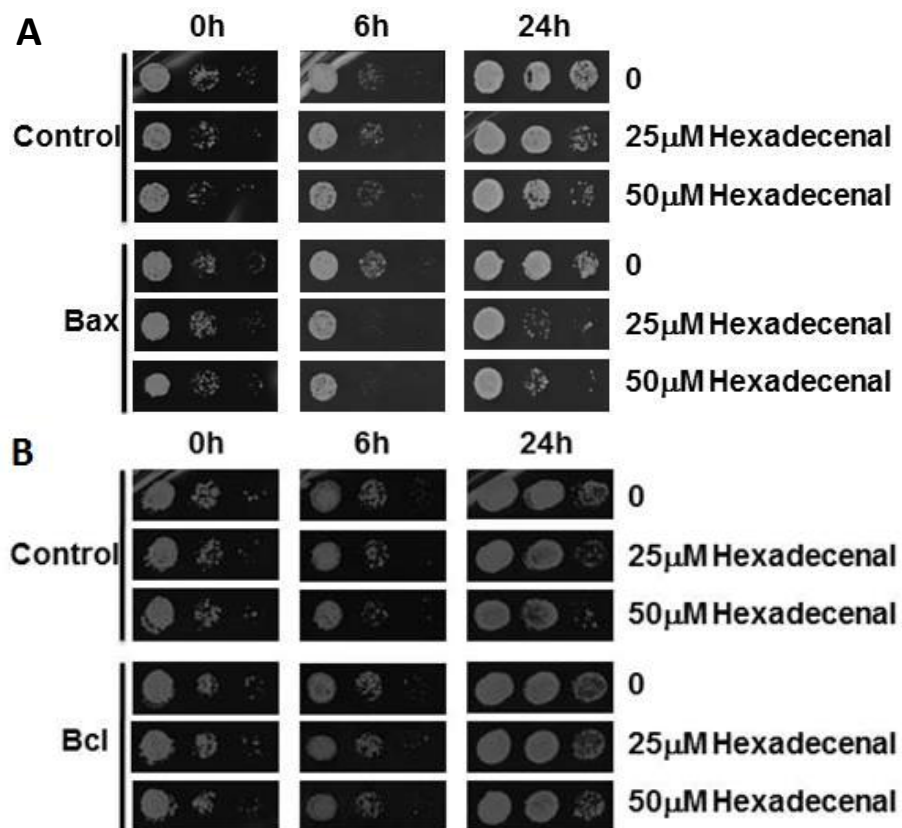


Figura 6. Efecto del hexadecenal sobre células que sobreexpresan BAX y Bcl-X_L.

Se comparó efecto del tratamiento con hexadecenal a 25 μM y 50 μM durante 0, 6 y 24 horas en varios cultivos de *S. cerevisiae* respecto a las condiciones normales (sin adición de hexadecenal): la subfigura 6A muestra el crecimiento de la cepa control, es decir, células de la cepa W303 transformadas con el plásmido pCM189 vacío, frente a células de la misma cepa transformadas con el plásmido unido al gen proapoptótico BAX de humanos; la subfigura 6B compara el crecimiento en medio sólido de la cepa W303 transformada con el plásmido pCM184 vacío, frente a la que sobreexpresa el gen antiapoptótico Bcl - X_L de humanos.

Este experimento corroboró que la adición de hexadecenal en células que sobreexpresan BAX provoca un incremento de la muerte celular dependiente de la dosis de hexadecenal en comparación con las cepas control que no la sobreexpresan. Este incremento se observó en las células que habían permanecido bajo el tratamiento durante 6 horas, sin embargo, tras 24 horas de tratamiento el crecimiento celular se recuperaba. Además, se observó que en aquellas células que sobreexpresan Bcl-X_L, la presencia de hexadecenal no afecta al crecimiento celular, siendo este incluso mayor que en las células control que no lo sobreexpresan.

Esto parece indicar que: en primer lugar, el esfingolípido hexadecenal contribuye de algún modo a la permeabilización de la membrana mitocondrial externa inducida por BAX que provoca la liberación del citocromo c del espacio intermembrana, desencadenando los procesos de apoptosis regulados por este (Priault et al., 2003). De esta forma, se podría considerar que el hexadecenal es la posible molécula transportadora de BAX desde el citosol a la membrana mitocondrial externa (dada su interacción *in vitro*; Chipuk et al., 2012) o el posible activador de una cascada que lleve a dicha translocación. En segundo lugar, la recuperación de la actividad celular pasadas 24 h de tratamiento con hexadecenal sugiere que las células de levadura cuentan con un mecanismo de respuesta a este estrés que les permite degradar este esfingolípido e impedir su efecto nocivo sobre el crecimiento celular. Este mecanismo podría tratarse de la ruta de degradación de la S1P en la que participa la encima Hfd1, que degrada el hexadecenal a ácido hexadecenoico (Nakahara et al., 2012).

Por otra parte, los resultados obtenidos en las células que sobreexpresan Bcl-X_L humana muestran que esta proteína no solo protege a la célula de los procesos apoptóticos que pueda desencadenar la presencia de hexadecenal (en caso de que la levadura posea algún sistema de apoptosis propio que responda al hexadecenal), sino también de aquellos endógenos a la propia actividad de la célula (respuesta a estreses no controlados en el experimento, disminución en los niveles de nutrientes en el medio de cultivo, envejecimiento celular, etc.), permitiendo un crecimiento mayor que en las células carentes de esta proteína exógena.

4.1.2 Localización de BAX en células de levadura

Para evaluar los efectos sobre la localización de BAX de la acumulación de hexadecenal en células de levadura en este caso no se añadió de forma exógena este esfingolípido, sino que se emplearon las cepas mutantes de delección para las enzimas Hfd1p (degrada hexadecenal) y Dpl1p (degrada S1P a hexadecenal). De esta forma, se esperaría observar una mayor presencia de BAX en la fracción proteica mitocondrial de las células en las que se acumula una mayor cantidad de hexadecenal, es decir, la cepa mutante para Hfd1. Además, también se evaluó el contenido en BAX de la fracción proteica del citosol. Para ello, tras realizar las extracciones proteicas correspondientes, se llevó a cabo la detección inmunológica mediante Western Blot (Fig. 7).

Los resultados obtenidos en este experimento no permiten obtener conclusiones significativas acerca del cambio de localización de BAX en la célula en respuesta a un aumento o

disminución de la concentración del hexadecenal celular. La película de revelado del Western Blot presenta una hibridación inespecífica entre los anticuerpos empleados y una proteína desconocida de tamaño mucho mayor al correspondiente a BAX (21 kDa), sin diferencias notables entre las células que sobreexpresan BAX y las cepas control. Las razones por las que no se detectó la proteína de interés pueden ser varias, por una parte, puede ser que esta proteína resulte demasiado tóxica para la célula y que el sistema de expresión no es lo suficientemente fuerte para alcanzar unos niveles de proteína detectables por este método; por otra parte hay que tener en cuenta que el epítipo myc se encuentra fusionado al extremo C-terminal de BAX, el cual es el más hidrófobo y se inserta en la membrana mitocondrial, lo cual podría suponer un obstáculo para la detección inmunológica. Este obstáculo se podría salvar si empleáramos microscopía de fluorescencia para observar directamente la localización de BAX. Aunque esto supondría preparar las construcciones de fusión de BAX a GFP, comprobar su funcionalidad y repetir el experimento para comparar su localización en los distintos mutantes.

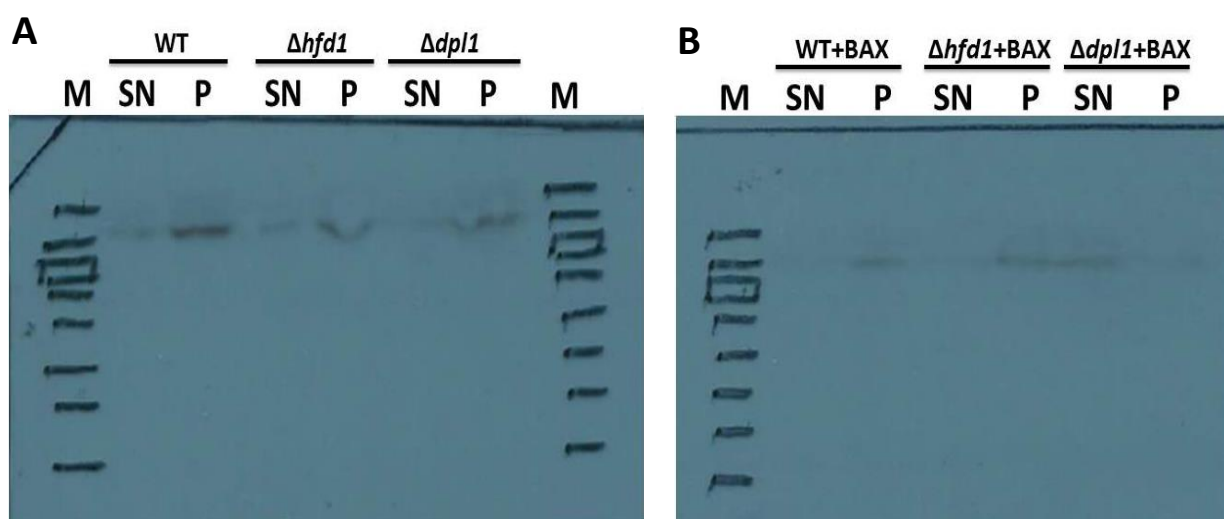


Figura 7. Visualización por inmunodetección de la proteína *myc-tagged* BAX.

Se realizó un ensayo Western Blot con las fracciones mitocondrial (P; pellet) y citosólica (SN; sobrenadante) de los extractos de las cepas silvestre (WT o BY4741) y mutantes de deleción para enzimas de la ruta de degradación de la S1P involucradas en el metabolismo del hexadecenal (Hfd1p y Dpl1p), transformadas, bien con el plásmido pCM189 vacío (subfigura 7A), o bien con el plásmido ligado al gen proapoptótico BAX de humanos (subfigura 7B). M indica el carril en el que se cargó el marcador de pesos moleculares.

4.1.3 Localización de la proteína de *S. Cerevisiae* Ybh3p (homólogo de BAX humano) tras tratamiento con estreses

En levadura, el mecanismo de apoptosis más extensamente estudiado es el inducido por ácido acético. El equipo de Büttner et al (2011) identificó una proteína de levadura (Ybh3p) que interactúa con Bcl-X_L y comprende un dominio BH3 funcional. Bajo tratamiento con ácido acético, esta proteína se transloca a la mitocondria y activa los procesos de apoptosis dependientes del dominio BH3, es decir, los mismos mecanismos que induce la proteína

humana pro-apoptótica BAX. Ybh3p induce la muerte celular y la disrupción del potencial transmembrana mitocondrial vía el transportador de fosfato mitocondrial Mir1p. Las deleciones de Mir1p y su ortólogo humano SLC25A3/PHC, inhibe la focalización a la mitocondria inducida por estrés de Ybh3p en levadura y de BAX en células de humano, respectivamente. Además, la deleción del gen *Ybh3* alargaba la vida de la célula y aumentaba su resistencia a la inducción de la apoptosis. Por tanto, se considera a Ybh3 una proteína de levadura con un dominio BH3 funcional que activa la muerte celular mediante mecanismos conservados con humanos (Büttner et al., 2011).

En esta línea, en el presente estudio se quiso determinar si esta proteína de levadura se comportaría del mismo modo bajo tratamiento con hexadecenal que con ácido acético. Para ello, se empleó la microscopía de fluorescencia para observar los posibles cambios de localización de Ybh3p (fusionado a GFP) en condiciones favorables y tras tratamiento con 50 μ M de hexadecenal durante 30 minutos y también para establecer si esta translocación conlleva la colocalización con la mitocondria, cuya proteína de membrana Om14p se encuentra fusionada a dsRed para este experimento. Cabe resaltar que, a diferencia de BAX, Ybh3p se encuentra en la vacuola de la célula en condiciones normales. Además, se repitió el experimento de Büttner et al. con 120 mM de ácido acético, para comprobar su reproducibilidad (Fig. 8).

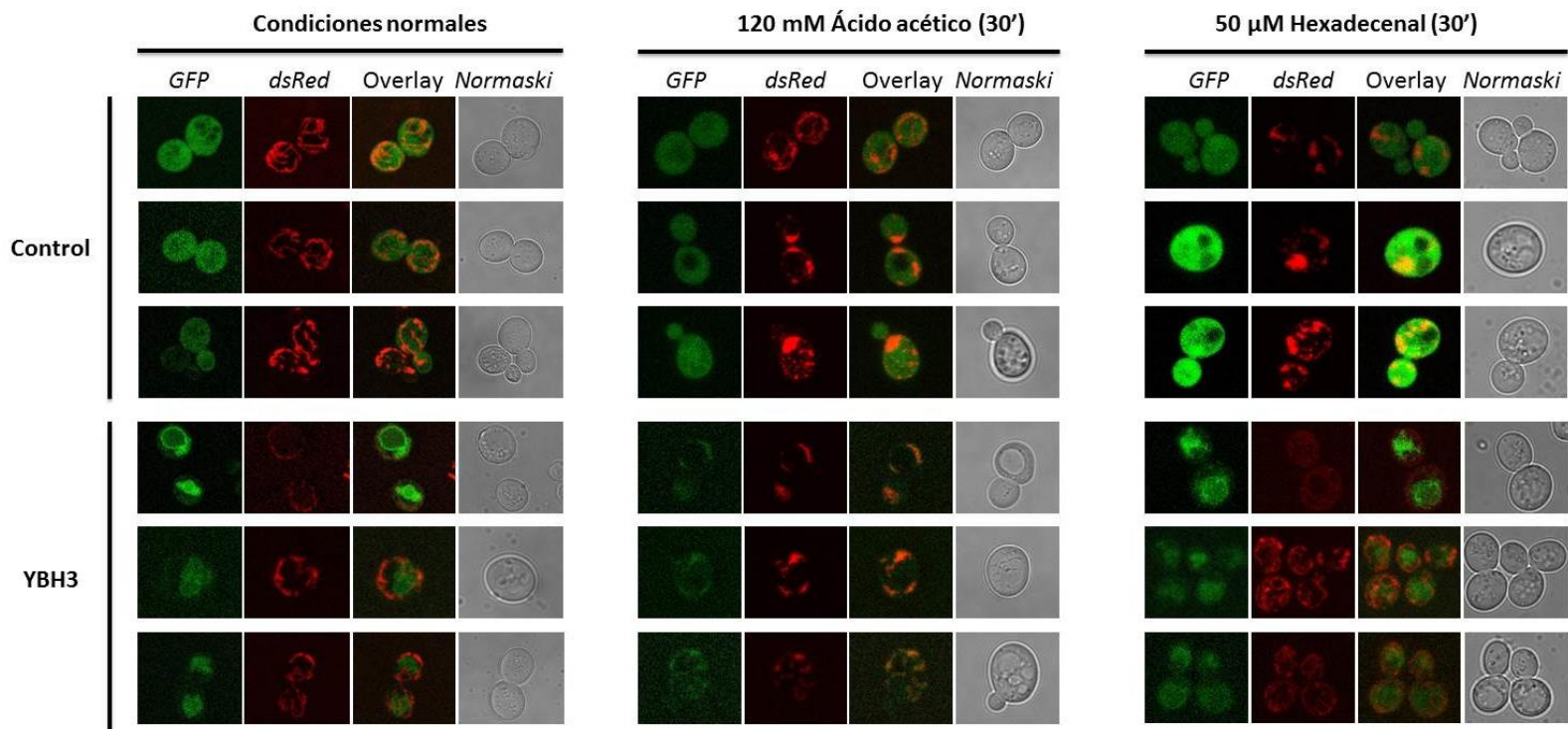


Figura 8. Observación mediante microscopía de fluorescencia de la localización de Om14p (dsRed) e Ybh3p (GFP).

Visualización bajo microscopía de fluorescencia de la localización celular de la proteína mitocondrial Om14p (en rojo) y la proteína homóloga de BAX en levadura Ybh3 (en verde) por separado, superpuestas, e imagen de la célula (*Normaski*) en condiciones normales (sin estrés), tras un tratamiento de 30 minutos con ácido acético a una concentración 120 mM y tras un tratamiento de 30 minutos con hexadecenal a una concentración de 50 μ M. El control es la cepa BY4147 transformada con los plásmidos pUG36 EGFP y pAG415-GPD-OM14-dsRed (vacíos); YBH3 indica los resultados de la cepa BY4147 transformada con los plásmidos pUG36 EGFP-Ybh3 y pAG415-GPD-OM14-dsRed-Ybh3.

Las imágenes en la figura 8 demuestran que, bajo condiciones normales, Ybh3p se encuentra en la vacuola y tras inducir la apoptosis mediante el tratamiento con ácido acético durante 30 minutos, su localización cambia y coincide con la mitocondria, confirmando los resultados obtenidos anteriormente por Büttner et al. Sin embargo, tras el tratamiento con hexadecenal, esta translocación no se observa en ningún caso, e Ybh3p permanece en la vacuola. Estos resultados indican que la célula de levadura puede poseer un gen homólogo a BAX en cuanto a estructura y función, pero Ybh3p no interacciona con el hexadecenal ni su activación depende de la presencia de este esfingolípido en la célula.

4.2 RELACIÓN ENTRE LA RESPUESTA CELULAR AL ESTRÉS OSMÓTICO Y LA ENTRADA EN APOPTOSIS INDUCIDA POR BAX

4.2.1 Efecto del estrés osmótico en células que sobreexpresan BAX y Bcl-X_L

De forma paralela al efecto de la acumulación de hexadecenal en la célula, se evaluó la capacidad de recuperación de las células que sobreexpresan BAX y Bcl-X_L bajo tratamiento con estrés salino. En este experimento se pretende determinar si la acumulación en la célula del enzima Hfd1p en respuesta al estrés osmótico es capaz de bloquear la entrada en apoptosis activada por BAX, dos mecanismos altamente complejos y escasamente estudiados en conjunto por la dificultad de controlar todos los factores que pueden alterar los resultados y la obtención de conclusiones definitivas.

Los resultados del primer ensayo de este experimento no son concluyentes porque se observa una marcada disminución del crecimiento celular en todas las muestras con BAX a tiempo 0 en comparación con las control (Fig. 9), lo que indica que la inducción de la expresión de este gen mediante la retirada de Dox del medio durante el crecimiento “overnight” resulta demasiado tóxico para la célula y enmascara el posible efecto del tratamiento salino posterior.

Por ello, se repitió el experimento invirtiendo las condiciones, es decir, creciendo las células con Dox “overnight” para bloquear la expresión de los genes BAX y Bcl-X_L pero en un medio de cultivo con 0.4 y 0.6 M de NaCl; y se indujo la expresión tras alcanzar una densidad óptica adecuada (Fig. 10). La adaptación de las células afectadas por el estrés osmótico al crecimiento en un medio que además inducía la expresión de bien un gen pro-apoptótico (BAX) o un gen anti-apoptótico se evaluó a las 0, 1, 4 y 24 horas. De nuevo, no se pudieron extraer conclusiones de los resultados porque el sistema de inactivación de la expresión “overnight” había fallado y las células que sobreexpresaban BAX mostraban un crecimiento mucho menor a las demás. Se dedujo que la concentración empleada de Dox (1 µg/ml) no había sido suficiente para reprimir la expresión y se repitió el experimento añadiendo cinco veces más de este antibiótico, es decir, 5 µg/ml para reforzar la inhibición de la expresión (Fig. 11).

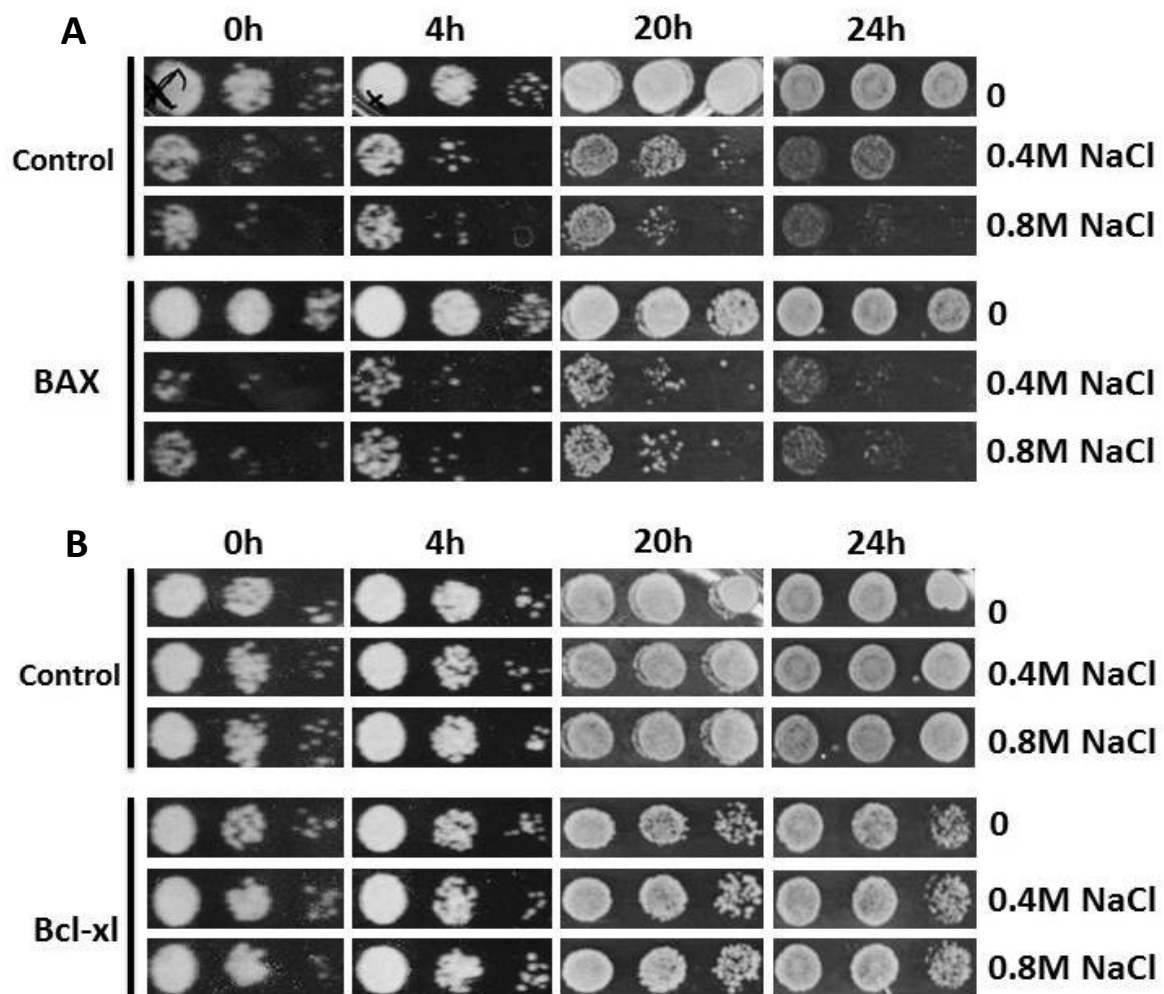


Figura 9. Efecto del estrés osmótico en células que sobreexpresan BAX y Bcl-XL “overnight” sin Dox.

Se comparó el efecto del tratamiento “overnight” sin Dox, tras 0, 4, 20 y 24 horas de incubación a 28°C con distintas concentraciones de NaCl (0.4 M y 0.8 M) en varios cultivos de *S. cerevisiae* respecto a las condiciones normales (sin tratamiento con NaCl): la subfigura 9A muestra el crecimiento en medio sólido de la cepa control, es decir, células de la cepa W303 transformadas con el plásmido pCM189 vacío, frente a células de la misma cepa transformadas con el plásmido unido al gen proapoptótico BAX de humanos; la subfigura 9B compara el crecimiento en medio sólido de la cepa W303 transformada con el plásmido pCM184 vacío, frente a la que fue transformada con el plásmido ligado al gen antiapoptótico Bcl-X_L.

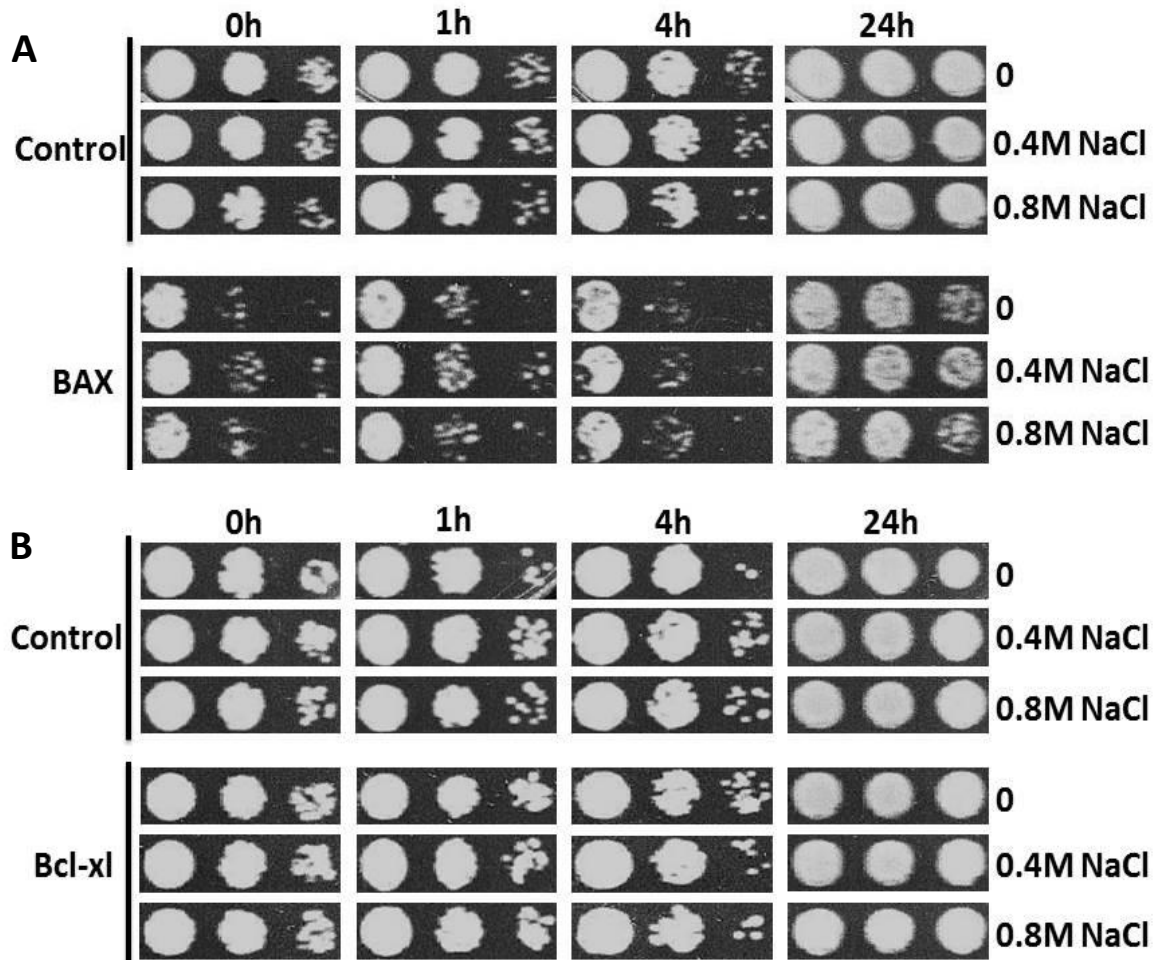


Figura 10. Efecto del estrés osmótico en células que sobreexpresan BAX y Bcl-XL "overnight" con 1 μ g/ml de Dox.

Se comparó el efecto del tratamiento "overnight" con distintas concentraciones de NaCl (0.4 M y 0.8 M) y 1 μ g/ml de Dox, tras 0, 1, 4 y 24 horas de incubación a 28°C sin Dox en varios cultivos de *S. cerevisiae* respecto a las condiciones normales (sin tratamiento con NaCl): la subfigura 10A muestra el crecimiento en medio sólido de la cepa control, es decir, células de la cepa W303 transformadas con el plásmido pCM189 vacío, frente a células de la misma cepa transformadas con el plásmido unido al gen proapoptótico BAX de humanos; la subfigura 10B compara el crecimiento en medio sólido de la cepa W303 transformada con el plásmido pCM184 vacío (control), frente a la que fue transformada con el plásmido ligado al gen antiapoptótico Bcl-X_L.

Finalmente, se consiguió que el crecimiento celular a las 0h de activación de la expresión fuese el mismo para todas las muestras, como se observa en la figura 11. Sin embargo, los resultados a las 1, 8 y 24 horas siguientes no muestran diferencias significativas entre la adaptación al estrés en las células que sobreexpresan BAX y Bcl-X_L y las que no. Por tanto, no se ha podido establecer relación entre la adaptación al estrés osmótico de células de levadura y la presencia de genes pro- o anti- apoptóticos humanos. Una de las razones por las que esto ha podido suceder es que la concentración escogida de NaCl (0.4 y 0.8 M) no sea suficientemente alta para causar daños visibles en la célula a los tiempos escogidos, dado que en la figura 11 no se observa una caída del crecimiento celular significativa entre las células "sanas" crecidas en condiciones normales (sin NaCl) y las tratadas en condiciones de salinidad.

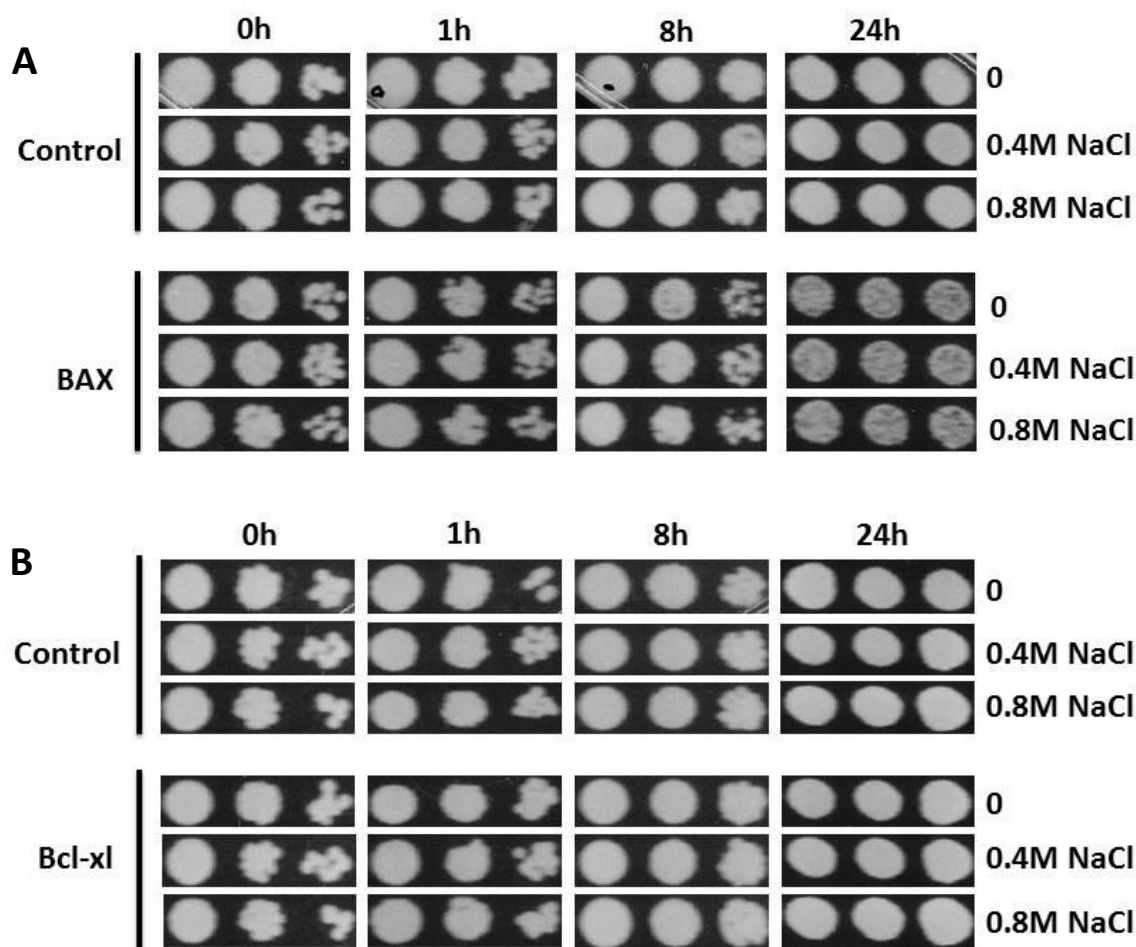


Figura 11. Efecto del estrés osmótico en células que sobreexpresan BAX y Bcl-XL “overnight” con 5 $\mu\text{g/ml}$ de Dox.

Mismo procedimiento que en la figura 10 pero en este caso en el tratamiento “overnight” se añadió Dox a una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$.

Dado que esta técnica (Drop test) ha resultado poco adecuada para realizar esta investigación, podrían realizarse estudios alternativos como la medida cuantitativa de la liberación del citocromo c desde el espacio intermembrana mitocondrial al citosol celular. De esta forma se podría estudiar al detalle el efecto de BAX sobre las células sometidas a estrés osmótico donde la presencia de hexadecenal es mínima, dada la acumulación del enzima catalítico Hfd1. Sin embargo, cabe destacar que el mecanismo estudiado en este trabajo comprende una gran complejidad de rutas y genes involucrados que dificulta la obtención de resultados claros y determinantes.

Por otra parte, se ha demostrado que el estrés osmótico provoca la activación de mecanismos de mitofagia en la célula de levadura (Manzanares, Pascual-Ahuir y Proft, observaciones no publicadas), es por ello que quizá en este experimento la respuesta al estrés salino no sea detectable a nivel de crecimiento sino en la capacidad respiratoria de la célula. Para detectar este efecto se podría realizar la medida del consumo de oxígeno en cepas cultivadas en medios con una alta concentración de sal, con y sin inducción de la expresión de los genes BAX y Bcl-X_L.

4.3 FUNCIÓN DEL ENZIMA HFD1

4.3.1 Efecto de la sobreexpresión de BAX sobre la funcionalidad mitocondrial

Se evaluó la toxicidad de BAX sobre la mitocondria en cepa silvestre y mutante de delección para *Hfd1*, esperando que en este último, la acumulación de hexadecenal incrementara el daño en la mitocondria. Se analizó la medida de la tasa respiratoria celular de una colonia no transformada y dos clones independientes del cultivo transformado con el plásmido pCM189 ligado a BAX, para asegurar que la muestra fuera representativa. Esta medida se realizó mediante la cuantificación del consumo de oxígeno en células que sobreexpresaban BAX y los resultados se relativizaron tomando como consumo normal (control) el de la cepa silvestre sin sobreexpresión de BAX (Fig. 12).

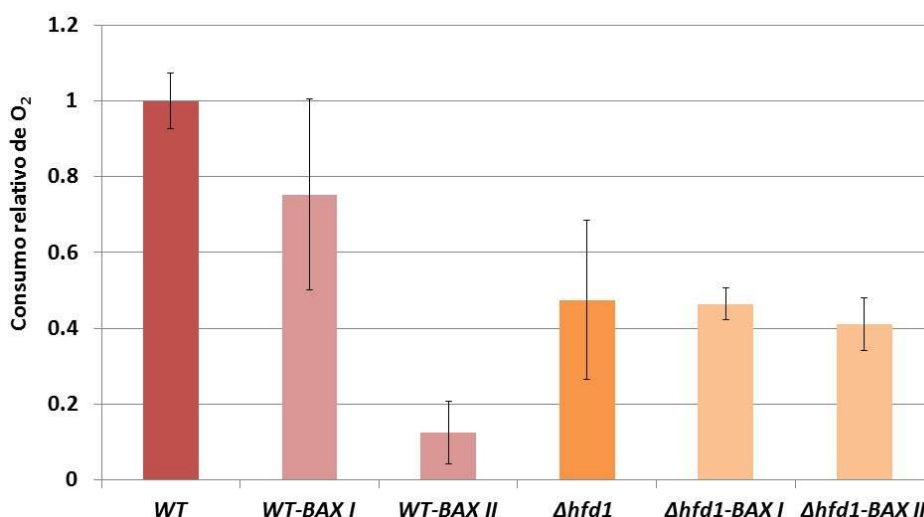


Figura 12. Medida del consumo de oxígeno de las cepas silvestre y mutante de delección de *Hfd1* con y sin sobreexpresión del gen proapoptótico BAX de humanos.

Se empleó un electrodo de oxígeno para cuantificar el consumo de oxígeno de las células de las cepas silvestre (WT o BY4147) y mutante de delección de *Hfd1* ($\Delta hfd1$) con y sin sobreexpresión del gen BAX de humanos. Los resultados se relativizaron tomando como tasa máxima (1) el consumo de la cepa silvestre. Se muestran el consumo relativo medio de cada duplicado realizado para cada cepa, así como la desviación estándar de los mismos. Se eligieron dos clones independientes de las cepas transformadas con BAX para asegurar la representatividad poblacional de la muestra: *WT-BAX I* y *II*, indican los clones del cultivo silvestre transformado y $\Delta hfd1$ -*BAX I* y *II* indican los clones del cultivo mutante transformado.

Analizando estadísticamente los resultados, se comprobó que: por una parte, las células de la cepa silvestre en las que se había inducido la sobreexpresión de BAX mostraban comportamientos distintos, ya que el clon 1 (*WT-BAX I*) mantuvo un consumo de oxígeno similar al de la cepa control ($p=0.32$), mientras que el clon 2 (*WT-BAX II*) redujo notablemente su capacidad respiratoria en comparación con la cepa silvestre ($p=0.0029$); en cuanto a las cepas mutantes $\Delta hfd1$, $\Delta hfd1$ -BAX I y $\Delta hfd1$ -BAX II, interesantemente se encontró que todas ellas compartían un consumo de oxígeno similar, pero este era relevantemente menor que el de la cepa silvestre sin BAX ($p=0.025$, $p=0.011$, $p=0.012$, respectivamente).

La disparidad de los resultados obtenidos en los clones de *WT-BAX* se explica por el hecho de que la célula de levadura transformada con un gen tóxico puede revertir y no expresar dicho gen, dando lugar a un comportamiento similar al de una célula sin transformar. De esta forma, teniendo en cuenta únicamente el resultado del segundo clon, se puede deducir que la presencia de BAX en la célula de la cepa silvestre afecta a la funcionalidad mitocondrial provocando la permeabilización de sus membranas, pero en aquellas células que no poseen el enzima Hfd1p la sobreexpresión de este gen no induce un daño mayor que el causado por la acumulación de hexadecenal. Lo cual nos lleva a especular que la presencia del enzima Hfd1p en la membrana mitocondrial externa puede jugar un papel relevante en el reclutamiento de BAX a la misma.

4.3.2 Correlación entre el estrés osmótico y la ruta de degradación de la esfingosina-1-fosfato

Se realizó un análisis “drop test” con el fin de analizar la relación entre la muerte celular activada mediante la sobreexpresión de BAX con la respuesta al estrés osmótico y con la ruta de la degradación de la S1P, en concreto, con el papel que desempeña el metabolito intermediario hexadecenal. Se estudió el crecimiento de la cepa silvestre en condiciones de estrés osmótico tanto con la sobreexpresión de BAX como sin ella y de la cepa mutante $\Delta hfd1$ bajo las mismas condiciones. En principio, la ausencia del enzima Hfd1p causaría el mismo efecto en la célula que la adición de hexadecenal, analizado anteriormente en este trabajo, pero además se propuso estudiar este efecto en células que crecen en adaptación a un medio salino con 0.4 o 0.8 M de NaCl “overnight” y tras 0, 1, 8 y 24 horas de inducción de la expresión de BAX (Fig. 13).

De nuevo, no fue posible observar una clara diferencia entre el crecimiento de las cepas sin tratamiento salino y las incubadas en condiciones favorables, como tampoco se detecta un menor crecimiento de las células en las que se acumula hexadecenal en comparación con la cepa silvestre. Sin embargo, en este caso, y en contraste con los resultados de la medida del consumo de oxígeno, se observa una disminución en la capacidad funcional de las células de la cepa mutante cuando sobreexpresan BAX.

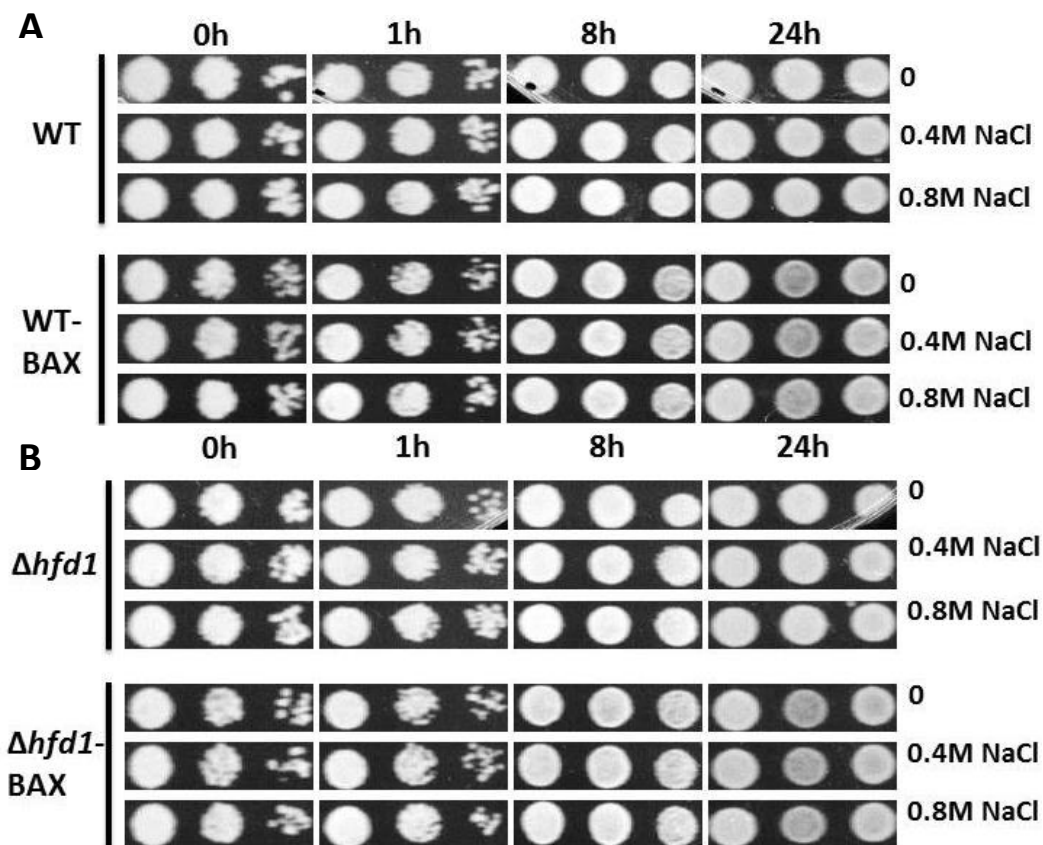


Figura 13. Efecto del estrés osmótico en células que sobreexpresan BAX de cepas silvestre y mutante de delección para Hfd1.

Efecto del tratamiento “overnight” con distintas concentraciones de NaCl (0.4 M y 0.8 M) y 5 $\mu\text{g/ml}$ de Dox, tras 0, 1, 8 y 24 horas de incubación a 28°C sin Dox en varios cultivos de *S. cerevisiae* respecto a las condiciones normales (sin tratamiento con NaCl): la subfigura 13A muestra el crecimiento en medio sólido de la cepa control, es decir, células de la cepa BY4147 transformadas con el plásmido pCM189 vacío, frente a células de la misma cepa transformadas con el plásmido unido al gen proapoptótico BAX de humanos; la subfigura 13B compara el crecimiento en medio sólido de la cepa mutante $\Delta hfd1$ transformada con el plásmido pCM184 vacío (control), frente a la que fue transformada con el plásmido ligado al gen proapoptótico BAX.

Esto podría significar que el efecto de la interacción entre la ausencia de la enzima Hfd1p con BAX no es observable al nivel de la respiración celular sino en otros procesos implicados en el crecimiento y la muerte celular. También es deducible que la ausencia de este enzima no provoca un efecto en la célula equiparable a la adición exógena de hexadecenal, ya que, como se observa en la figura 5, este último induce la entrada en apoptosis en la célula notablemente mientras que la delección de Hfd1p afecta especialmente a la capacidad respiratoria, como se observa en la figura 10.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta la complejidad de los procesos de apoptosis y respuesta a estrés en relación al papel del esfingolípido hexadecenal estudiados en este trabajo, podemos concluir que el empleo de la levadura *S. cerevisiae* ha resultado exitoso al permitir extraer varios resultados de gran interés y relevancia en este campo de estudio, demostrando ser un sistema modelo adecuado desde el que poder extrapolar conclusiones hasta organismos superiores como pueden ser los mamíferos, entre ellos el ser humano.

En este sentido, se ha podido comprobar que la aplicación directa del esfingolípido hexadecenal al medio de crecimiento incrementaba la tasa de muerte celular en aquellas cepas transformadas con *c-myc tagged* BAX de humanos, la cual se sabe que es capaz de desencadenar este proceso espontáneamente, en comparación con aquellas que no fueron tratadas con hexadecenal. Además, este proceso apoptótico se vio bloqueado en las cepas transformadas con el gen anti-apoptótico Bcl-X_L. Por otra parte, no se ha podido demostrar que la localización celular de BAX (ni la de su homólogo en levadura, Ybh3p) cambie de citosólica a mitocondrial bajo tratamiento con hexadecenal, aunque los resultados obtenidos con BAX no sean del todo concluyentes. Por todo ello, se deduce que este esfingolípido sí participa en el reclutamiento de BAX a la mitocondria, pero que las células de levadura deben de poseer un sistema alternativo de activación de la apoptosis en respuesta al hexadecenal, en el que no participa Ybh3p. Esta última conclusión también es observable en el hecho de que al sobreexpresar Bcl-X_L las células sobrevivían a la aplicación al hexadecenal, indicando que lo único que provocaba la muerte celular era la presencia del gen pro-apoptótico BAX, cuyo efecto es eliminado por Bcl-X_L.

En cuanto al bloqueo de la apoptosis inducida por BAX derivado de la sobreexpresión de *Hfd1* en respuesta al estrés osmótico, no se han podido extraer conclusiones sólidas. Sin embargo, se puede especular que los experimentos en esta línea no mostraron los resultados esperados porque la célula de levadura, sometida a estrés osmótico, activa directamente los sistemas de mitofagia para solucionar los posibles daños causados por la deshidratación y la acumulación de ROS en la mitocondria, anulando al mismo tiempo el posible efecto de la sobreexpresión de BAX, es decir, bloqueando la apoptosis, pero sin permitir hacer distinción entre las células transformadas y las no transformadas.

Finalmente, se ha encontrado que la aplicación directa de hexadecenal a la célula no provoca el mismo efecto que la delección del encima que lo degrada, *Hfd1p*, y que esta además podría estar implicada en el reclutamiento de BAX a la mitocondria, ya que sin ella, la sobreexpresión de BAX parece no causar ningún daño a la célula, permitiendo su crecimiento normal. Esto tendría sentido teniendo en cuenta que si efectivamente el hexadecenal es la molécula transportadora de BAX a la mitocondria, al llegar a la membrana externa mitocondrial sería degradado por *Hfd1p*, determinando así el punto en el que se anclaría BAX a la membrana.

5.1 MODELO MOLECULAR

Finalmente, a modo de resumen, se muestran las conclusiones de este trabajo de modo gráfico en un esquema del modelo molecular deducido que incluye las conclusiones más claras y las especulaciones.

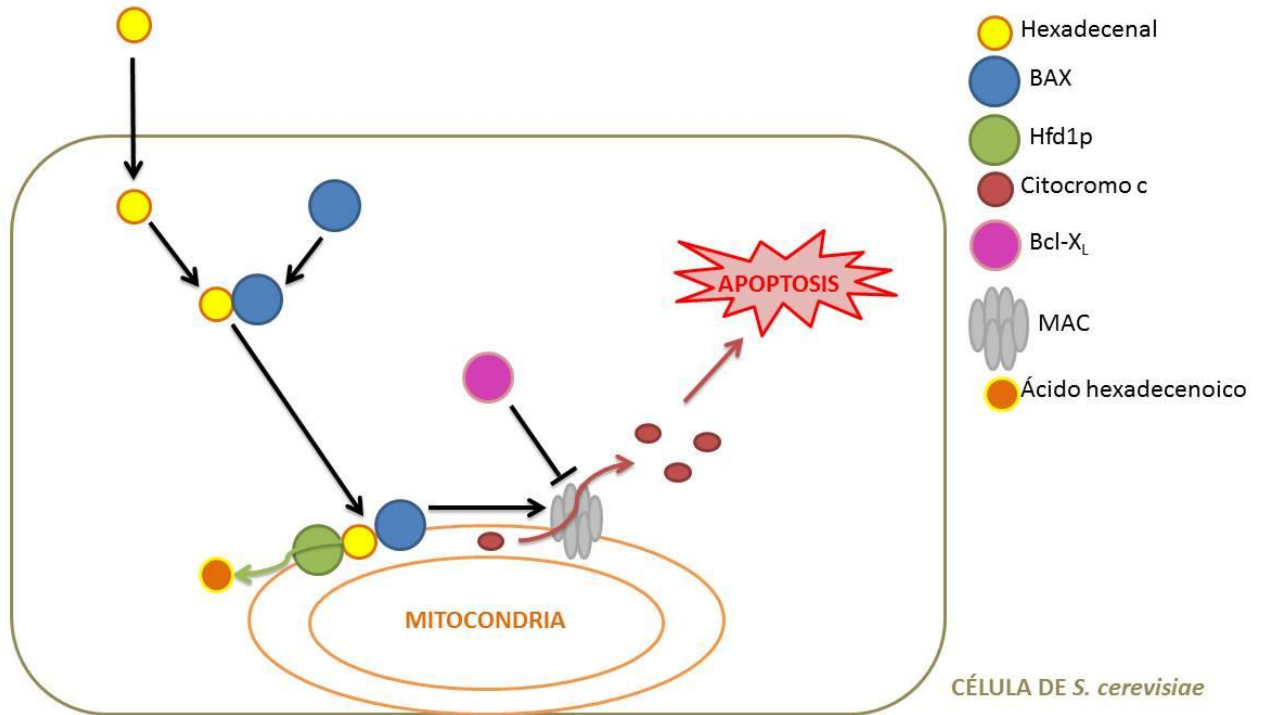


Figura 14. Modelo del mecanismo de apoptosis inducido por la interacción de BAX y el hexadecenal.

Se muestra una célula de la levadura *S. cerevisiae* simplificada con un solo orgánulo, la mitocondria. El proceso se iniciaría por la presencia de hexadecenal exógeno en la célula, el cual serviría de molécula translocadora de la proteína proapoptótica BAX humana (sobrexpresada de forma heteróloga) a la membrana externa de la mitocondria, a la cual se ancla en el punto donde se encuentre la enzima Hfd1p. Esta enzima degrada el hexadecenal a ácido hexadecenoico, mientras que la presencia de BAX en la membrana provoca la formación de MAC, el cual causa la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, permitiendo la salida desde el espacio intermembrana al citosol del citocromo c. El citocromo c, es el principal factor mitocondrial activador de los procesos de muerte celular o apoptosis. Por otra parte, la sobreexpresión del gen antiapoptótico Bcl-X_L humano, impide esta liberación del citocromo c, bloqueando así el efecto de BAX, y procurando la supervivencia de la célula.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

En general, tras los resultados obtenidos en este trabajo, se puede concluir que la levadura *S. cerevisiae* es un excelente sistema para el estudio del papel del hexadecenal en el desencadenamiento de la apoptosis, ya que ha permitido concretar las siguientes conclusiones:

- El hexadecenal es la molécula transportadora de BAX desde el citosol a la mitocondria, provocando la muerte celular.
- No se ha podido determinar si el estrés osmótico es capaz de bloquear la apoptosis inducida por BAX.
- Hfd1p es el enzima responsable de la degradación del hexadecenal, y además probablemente esté involucrado en el reclutamiento de BAX a la mitocondria.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alepuz, P. (2003). Osmostress-induced transcription by Hot1 depends on a Hog1-mediated recruitment of the RNA Pol II. *The EMBO Journal*, 22(10), pp.2433-2442.
- Antignani, A. and Youle, R. (2006). How do Bax and Bak lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane?. *Current Opinion in Cell Biology*, 18(6), pp.685-689.
- Barenholz, Y. and Thompson, T. (1980). Sphingomyelins in bilayers and biological membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 604(2), pp.129-158.
- Barenholz Y. (1984). Sphingomyelin-lecithin balance in membranes: composition, structure, and function relationships. In: Shinitzky M, editor. *Physiology of membrane fluidity*, vol.1 Boca Raton: CRC press: pp.131-74.
- Bermejo, C., Rodriguez, E., Garcia, R., Rodriguez-Pena, J., Rodriguez de la Concepcion, M., Rivas, C., Arias, P., Nombela, C., Posas, F. and Arroyo, J. (2007). The Sequential Activation of the Yeast HOG and SLT2 Pathways Is Required for Cell Survival to Cell Wall Stress. *Molecular Biology of the Cell*, 19(3), pp.1113-1124.
- Bernardi, P. (1999) Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers and permeability transition. *Physiological Reviews*, 79, pp.1127-1155.
- Büttner, S., Ruli, D., Vögtle, F., Galluzzi, L., Moitzi, B., Eisenberg, T., Kepp, O., Habernig, L., Carmona-Gutierrez, D., Rockenfeller, P., Laun, P., Breitenbach, M., Khoury, C., Fröhlich, K., Rechberger, G., Meisinger, C., Kroemer, G. and Madeo, F. (2011). A yeast BH3-only protein mediates the mitochondrial pathway of apoptosis. *The EMBO Journal*, 30(14), pp.2779-2792.
- Camougrand, N., Grelaud-Coq, A., Marza, E., Priault, M., Bessoule, J. and Manon, S. (2003). The product of the UTH1 gene, required for BAX-induced cell death in yeast, is involved in the response to rapamycin. *Molecular Microbiology*, 47(2), pp.495-506.
- Cartron, P.F., Priault, M., Oliver, L., McEah, K., Manon, S. and Vallette, F.M. (2003) The N-terminal end of BAX contains a mitochondrial-targeting signal. *Journal of Biological Chemistry*, 278, pp.11633-11641.
- Chalfant, C. (2005). Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling. *Journal of Cell Science*, 118(20), pp.4605-4612.
- Cheng, E.H., Kirsch, D.G., Clem, R.J., Ravi, R., Kastan, M.B., Bedi, A., Ueno, K. and Hardwick, J.M. (1997). Conversion of Bcl-2 to a BAX-like Death Effector by Caspases. *Science*, 278(5345), pp.1966-1968.
- Chipuk, J., McStay, G., Bharti, A., Kuwana, T., Clarke, C., Siskind, L., Obeid, L. and Green, D. (2012). Sphingolipid Metabolism Cooperates with BAK and BAX to Promote the Mitochondrial Pathway of Apoptosis. *Cell*, 148(5), pp.988-1000.
- Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P.G., Coso, O.A., Gutkind, S., Spiegel, S. (1996). Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature*, 381(6585), pp.800-803.
- El Alwani, M., Wu, B., Obeid, L. and Hannun, Y. (2006). Bioactive sphingolipids in the modulation of the inflammatory response. *Pharmacology & Therapeutics*, 112(1), pp.171-183.

- Finucane, D., Bossy-Wetzell, E., Waterhouse, N., Cotter, T. and Green, D. (1999). BAX-induced Caspase Activation and Apoptosis via Cytochrome c Release from Mitochondria Is Inhibitable by Bcl-xL. *Journal of Biological Chemistry*, 274(4), pp.2225-2233.
- Hannun, Y. (1995). Ceramide: an intracellular signal for apoptosis. *Trends in Biochemical Sciences*, 20(2), pp.73-77.
- Hohmann, S. (2009). Control of high osmolarity signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 583(24), pp.4025-4029.
- Huh, W., Falvo, J., Gerke, L., Carroll, A., Howson, R., Weissman, J. and O'Shea, E. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature*, 425(6959), pp.686-691.
- Kelekar, A. and Thompson, C. (1998). Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends in Cell Biology*, 8(8), pp.324-330.
- Kurihara, Y., Kanki, T., Aoki, Y., Hirota, Y., Saigusa, T., Uchiumi, T. and Kang, D. (2011). 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), pp.3265-3272.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91(4), pp.479-489
- Liang, Y., Nylander, K.D., Yan, C. and Schor, N.F. (2002). Role of Caspase 3-Dependent Bcl-2 Cleavage in Potentiation of Apoptosis by Bcl-2. *Molecular Pharmacology*, 61(1), pp.142-149.
- Linnington, C. and Rumsby, M. (1980). Accessibility of Galactosyl Ceramides to Probe Reagents in Central Nervous System Myelin. *Journal of Neurochemistry*, 35(4), pp.983-992.
- Maceyka, M., Harikumar, K., Milstien, S. and Spiegel, S. (2012). Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends in Cell Biology*, 22(1), pp.50-60.
- Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lächelt, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigrist, S., Wesselborg, S. and Fröhlich, K. (2002). A Caspase-Related Protease Regulates Apoptosis in Yeast. *Molecular Cell*, 9(4), pp.911-917.
- Manon, S., Chaudhuri, B. and Guérin, M. (1997). Release of cytochrome c and decrease of cytochrome c oxidase in BAX-expressing yeast cells, and prevention of these effects by coexpression of Bcl-x L. *FEBS Letters*, 415(1), pp.29-32.
- 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), pp.541-552.
- Montañés, F., Pascual-Ahuir, A. and Proft, M. (2010). Repression of ergosterol biosynthesis is essential for stress resistance and is mediated by the Hog1 MAP kinase and the Mot3 and Rox1 transcription factors. *Molecular Microbiology*, 79(4), pp.1008-1023.
- Muchmore, S., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R., Harlan, J., Yoon, H., Nettlesheim, D., Chang, B., Thompson, C., Wong, S., Ng, S. and Fesik, S. (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature*, 381(6580), pp.335-341.

- Nakahara, K., Ohkuni, A., Kitamura, T., Abe, K., Naganuma, T., Ohno, Y., Zoeller, R. and Kihara, A. (2012). The Sjögren-Larsson Syndrome Gene Encodes a Hexadecenal Dehydrogenase of the Sphingosine 1-Phosphate Degradation Pathway. *Molecular Cell*, 46(4), pp.461-471.
- Olivera, A. and Spiegel, S. (1993). Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature*, 365(6446), pp.557-560.
- Priault, M., Chaudhuri, B., Clow, A., Camougrand, N., Manon, S. (1999) Investigation of BAX-induced release of cytochrome c from yeast mitochondria permeability of mitochondrial membranes, role of VDAC and ATP requirement. *European Journal of Biochemistry*, 260(3), pp.684-91.
- Priault, M., Camougrand, N., Kinnally, K., Vallette, F. and Manon, S. (2003). Yeast as a tool to study BAX/mitochondrial interactions in cell death. *FEMS Yeast Research*, 4(1), pp.15-27.
- Rizzo, W. (2007). Sjögren–Larsson syndrome: Molecular genetics and biochemical pathogenesis of fatty aldehyde dehydrogenase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism*, 90(1), pp.1-9.
- Spiegel, S. and Milstien, S. (2003). Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(5), pp.397-407.
- Suzuki, M., Youle, R.J. and Tjandra, N. (2000) Structure of BAX: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell*, 103, pp.645-654.
- Svennerholm L. (1980). Ganglioside designation. *Advances in Experimental Medical Biology*, 125, pp. 11-19.
- Tanigawa, M., Kihara, A., Terashima, M., Takahara, T. and Maeda, T. (2012). Sphingolipids Regulate the Yeast High-Osmolarity Glycerol Response Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 32(14), pp.2861-2870.
- Tremblais, K., Oliver, L., Juin, P., Thérèse Le Cabellec, M., Meflah, K. and Vallette, F. (1999). The C-Terminus of BAX Is Not a Membrane Addressing/Anchoring Signal. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 260(3), pp.582-591.
- Wigdal, S.S., Kirkland, R.A., Franklin, J.L. and Haak-Frendscho, M. (2002) Cytochrome c release precedes mitochondrial membrane potential loss in cerebellar granule neuron apoptosis: lack of mitochondrial swelling. *Journal of Neurochemistry*. 82(5), pp.1029-1038.
- Yang, J. (1997). Prevention of Apoptosis by Bcl-2: Release of Cytochrome c from Mitochondria Blocked. *Science*, 275(5303), pp.1129-1132.
- Zahedi, R. (2005). Proteomic Analysis of the Yeast Mitochondrial Outer Membrane Reveals Accumulation of a Subclass of Preproteins. *Molecular Biology of the Cell*, 17(3), pp.1436-1450.