

ÍNDICE TESIS Sara Manzanares

Índice de figuras.....	XV
Índice de tablas.....	XXI
Abreviaturas.....	XXIII
Introducción.....	1
1. Introducción a los peroxisomas.....	3
1.1. Metabolismo peroxisomal.....	4
1.2. Interacción entre peroxisoma, mitocondria y retículo endoplasmático.....	8
1.3. Biogénesis peroxisomal.....	10
1.4. Peroxisomas y enfermedad.....	11
1.5. Dinámica peroxisomal.....	13
2. Introducción a los esfingolípidos.....	16
2.1. Papel bioactivo de los esfingolípidos.....	18
2.2. Esfingosina-1-fosfato y enfermedad.....	19
2.3. Ruta de degradación de la S1P, SLS y hexadecenal.....	22
3. La mitocondria.....	29
3.1. Estructura y funciones generales.....	29
3.2. Transportadores Crc1 Y Mpc mitocondriales.....	31
3.3. Dinámica mitocondrial.....	34
3.3.1. Fisión y fusión mitocondrial.....	36
3.4. Estrés celular y mitocondria.....	37
3.5. Ruta HOG.....	41
3.6. Ruta retrógrada.....	43

3.7. Complejo ERMES.....	44
4. Relación de los esfingolípidos con el estrés celular y osmótico.....	47
5. Hexadecenal y apoptosis.....	50
Objetivos.....	57
Materiales y métodos.....	61
1. Cepas y condiciones de cultivo de bacterias.....	63
2. Cepas y condiciones de cultivo de levadura.....	63
3. Cebadores utilizados en el presente trabajo.....	66
4. Plásmidos utilizados.....	66
5. Ensayos de sensibilidad.....	67
5.1. Comparación cuantitativa del crecimiento en medio líquido de cepas de levadura (BIOSCREEN).....	67
5.2. Ensayo de sensibilidad en medio sólido (goteos).....	68
6. Análisis de expresión mediante RT-PCR.....	69
6.1. Cinéticas de tratamiento con estrés.....	69
6.2. Purificación del ARN por el método del fenol ácido.....	70
6.3. Cuantificación del ARN.....	70
6.4. Comprobación de la calidad del ARN en gel de agarosa.....	71
6.5. Síntesis de ADNc con transcriptasa reversa.....	71
6.6. PCR cuantitativa a tiempo real.....	73
7. Cuantificación del consumo de O ₂	74
8. Cuantificación de la producción de ROS.....	75
9. Técnicas de transferencia genética.....	76
9.1. Preparación de células de bacteria quimiocompetentes.....	76

9.2.	Transformación de bacterias quimiocompetentes.....	77
9.3.	Transformación de levadura.....	78
10.	Técnicas de manipulación del ADN.....	78
10.1.	Purificación de ADN genómico total de levadura.....	78
10.2.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	79
10.3.	Manipulación de fragmentos de ADN.....	80
10.4.	Digestión de fragmentos de ADN mediante endonucleasas o enzimas de restricción.....	80
10.5.	Purificación de ADN plasmídico.....	81
10.6.	Diseño de construcciones de delección.....	82
10.7.	Construcción de plásmidos mediante el sistema Gateway.....	82
11.	Microscopía confocal.....	84
11.1.	Conteo del número de peroxisomas.....	85
11.2.	Visualización mitocondrial GFP y Mitotracker.....	86
11.3.	Tinción de las partículas lipídicas con BODIPY.....	87
12.	Análisis de proteínas.....	89
12.1.	Obtención de extractos proteicos totales.....	89
12.2.	Co-inmunoprecipitación de proteínas.....	89
12.3.	Cuantificación de proteína mediante el método de Bradford.....	91
12.4.	Electroforesis de proteínas en gel SDS-poliacrilamida.....	92
12.5.	Transferencia a membrana de proteínas (<i>Western Blot</i>).....	93
12.6.	Tinción de membranas con Direct Blue 71.....	94
12.7.	Detección inmunológica de proteínas.....	94
13.	Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).....	95

Resultados.....	99
1. Función del peroxisoma en la adaptación a estrés salino.....	101
1.1. La función peroxisomal es necesaria para la adaptación a estrés, especialmente en condiciones limitantes de glucosa.....	101
1.2. La activación transcripcional de los genes involucrados en el metabolismo de los ácidos grasos depende de la MAP quinasa Hog1 y del factor Adr1 bajo condiciones de estrés salino.....	105
1.3. El estrés salino induce de forma específica la expresión de Faa1, una acil-CoA graso sintetasa que se localiza en las partículas lipídicas y en los peroxisomas.....	115
1.4. El estrés salino induce un incremento del número de peroxisomas de manera independiente de Hog1, pero dependiente de las proteínas Rtg, Dnm1 y Vps1.....	117
1.5. Función de los peroxisomas en la activación de la respiración mitocondrial inducida por estrés salino.....	123
2. Función del metabolismo de esfingolípidos en la regulación de la actividad mitocondrial y la muerte celular.....	127
2.1. La ruta de degradación de esfingolípidos es un regulador de la función mitocondrial.....	128
2.2. El hexadecenal es el principal inductor de la disfunción mitocondrial y su fragmentación.....	137
2.3. La modulación del metabolismo de esfingolípidos activa la muerte celular mitocondrial en levadura.....	144
2.4. Control genético de la ruta de degradación de esfingolípidos a través de la MAP quinasa Hog1.....	152
Discusión.....	159
Conclusiones.....	173
Bibliografía.....	177
Tablas suplementarias.....	197