



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Programa de doctorado en Biotecnología

**Estudio de la adaptación metabólica en respuesta a
estrés: regulación de la actividad peroxisomal y del
metabolismo de esfingolípidos**

Sara Manzanares Estreder

TESIS DOCTORAL

Directores

Dr. Markus Proft

Dra. Amparo Pascual-Ahuir Giner

Valencia, enero 2017

La Dra. Amparo Pascual-Ahuir Giner, Doctora en Biología y Profesora Titular en el departamento de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia, y el Dr. Markus Proft, Doctor en Biología y Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Biomedicina de Valencia,

CERTIFICAN:

Que la licenciada en Biotecnología por la Universidad Politécnica de Valencia, Sara Manzanares Estreder, ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación titulado "**Estudio de la adaptación metabólica en respuesta a estrés: regulación de la actividad peroxisomal y del metabolismo de esfingolípidos**" y autorizan su presentación para optar al grado de Doctora en Biotecnología. Para que así conste, firman el presente documento en Valencia, a 8 de enero de 2017.

Amparo Pascual-Ahuir Giner

Markus Proft



Agradecimientos

¿Cómo empezar a escribir los agradecimientos de mi tesis, sin olvidarme de nadie?... Es difícil pero lo voy a intentar...

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directores, Markus y Payo. Los cuales me han guiado nada menos que durante mis primeros cinco años en un laboratorio. No creo que existan mejores directores que ellos, que te ayuden, te guíen, te comprendan y siempre dispuestos a enseñarte cosas nuevas a pesar de las circunstancias, por esos proyectos denegados, esas semanas con necesaria dedicación familiar, y a pesar de ello, siempre con ese buen humor. Mi trabajo fin de carrera, mi trabajo de fin de máster, mi primer contrato de investigación y mi tesis doctoral ha sido gracias a vosotros y por ello, os estaré siempre infinitamente agradecida.

En segundo lugar, no me gustaría decir nombres por sí me dejo a alguien, lo cual no me lo perdonaría. Me gustaría agradecer a todos y cada uno de mis compañeros de laboratorio que han compartido una parte de su vida conmigo desde hace 5 años. Me han alegrado los días, acompañado en las comidas diarias, aguantado en los malos momentos y apoyado cuando algo no salía bien. Al fin y al cabo habéis sido con los que he compartido mi día a día en el laboratorio desde el IBMCP, hasta el IBV donde he finalizado mi tesis. Y sin vosotros no hubiese sido lo mismo. Y cómo no, agradecer la ayuda infinita a mis vecinos de laboratorio del IBV, los cuales han estado ahí en mi última fase de este trabajo, prestándome su ayuda, resolviéndome dudas y haciéndome pasar muy buenos ratos.

Me gustaría agradecer también, a esas personas responsables de los servicios de secuenciación y microscopía tanto del IBMCP como del IBV, los cuales siempre me han prestado su ayuda para obtener los mejores resultados. Además, no podría olvidarme de esas personas de recepción del IBV que siempre me han regalado su buen humor desde primera hora de la mañana.

No me puedo olvidar de esos alumnos que han venido de prácticas al laboratorio, así como a realizar los trabajos de fin de carrera y a los cuales mis directores me han permitido enseñarles un poquito de lo que sé. Y ver cómo el esfuerzo realizado ayudándoles, a pesar de tener muchísimo trabajo, ha tenido

sus frutos y han salido las buenas notas que se merecen los trabajos dirigidos por mis directores. Me he confirmado a mí misma que me gusta enseñar (algo que ya sabía, pero que sólo había tenido la oportunidad de poner en práctica con mis clases de tenis).

Y hablando de enseñar, considero que enseñar ciencia es una de las cosas más bonitas del mundo, quizá sea porque mi decisión de estudiar biotecnología haya venido por la pasión con la que esas profesoras, que tanto me han marcado durante la ESO y el bachiller, me han enseñado esta rama tan importante para la vida. Y cómo no, no puedo olvidarme de esos profesores de la carrera (incluyendo a mi directora), también miembros de mis tribunales de mis anteriores trabajos, que me han aportado tantísimo y prestado su ayuda.

En general, debo agradecer a mi escuela de tenis, aunque parezca raro. Ya que a pesar de haber pasado tres años de tesis duros, compaginando el trabajo del laboratorio con una escuela de 150 personas, estoy feliz de haberlo hecho. Ya que me ha permitido desconectar cada día y dedicarme a esas personitas que me han alegrado las tardes y se han preocupado cada día por mí preguntándome cómo voy. Tengo la suerte de haber conocido a cada uno de esos alumnos, siendo cada uno de ellos especial y aportándome algo positivo siempre.

Y cómo no, agradecer la ayuda de los entrenadores de la escuela de tenis que me han ayudado en las clases necesarias para yo poder acabar muchos de los experimentos de este trabajo. Sin ellos, no hubiese sido duro... Hubiese sido imposible...

No quiero olvidarme de mis chicas, las cuáles a pesar de ya no vernos casi, siempre tenéis un hueco para mí, para un café o una cena. Que a pesar de que los años pasan sé que estáis ahí. Y os estaré infinitamente agradecida siempre de que en una hora seamos capaces de ponernos al día de todo un año. De que me animéis con mis agobios. Y de que parezca que el tiempo no pase... Love you...

A los Manzanares y los Estrederes (como nos llamamos nosotros), no sabéis lo importantes que sois para mí, todos y cada uno de vosotros. Me encanta mi familia... Todos me aportáis cosas, que hacen que los momentos duros como este se lleven mejor. A pesar de que hay sillas vacías, sé que desde el cielo o desde donde quiera que estén todas esas personitas que ya no están con nosotros y que me han querido tanto, lo siguen haciendo y me dan fuerza para

seguir luchando. Gracias por esos momentos familiares en los que después de días duros de trabajo nos juntamos para celebrar cumpleaños y santos, comernos la paellita del yayo tan buena, celebrar ocasiones especiales, etc. Que siempre hacen que sigamos con nuestra vida un poco más felices.

Por último, a mis padres. Los que al fin y al cabo me sabéis sacar cuando me hundo o me bajáis cuando estoy demasiado arriba... Los que siempre estáis ahí pase lo que pase y habéis vivido conmigo mis peores momentos de este período de mi vida. Vosotros, aunque debo nombrar especialmente a Benja, me habéis sufrido en mí día a día y me habéis ayudado a seguir adelante en esos momentos en los que lo dejaría todo. Sin vuestra ayuda, no hubiese podido acabar este trabajo. Sólo puedo deciros GRACIAS.

Aunque ocurran accidentes y tenga que defender la tesis a la pata coja, lo haré con toda mi ilusión. Esta es mi tesis doctoral... Y sinceramente, no me lo puedo creer...

Resumen

En el presente trabajo se estudia la adaptación metabólica en respuesta a estrés en el modelo de levadura, y de forma más concreta se investiga la regulación de la actividad peroxisomal y el metabolismo de esfingolípidos.

Los peroxisomas son orgánulos dinámicos, encargados de forma específica de la β -oxidación de ácidos grasos en células de levadura. Aquí se muestra cómo la función peroxisomal es crucial para la adaptación al estrés salino, especialmente en condiciones de ayuno de glucosa. Se regula a múltiples niveles tanto la actividad peroxisomal como su número ante condiciones de estrés. La activación de la MAP quinasa Hog1 desencadena la inducción de genes que codifican enzimas para la activación, importación peroxisomal y β -oxidación de los ácidos grasos. Esta regulación génica ocurre a través del activador transcripcional ADR1, que se asocia transitoriamente con los genes que codifican enzimas metabólicas de ácidos grasos de una manera dependiente del estrés y de Hog1. Además, el estrés causado por Na^+ y Li^+ , provoca un aumento en el número de peroxisomas por célula de manera independiente de Hog1, que depende a su vez de la ruta retrógrada y de las dinaminas GTPasas Dnm1 y Vps1. La fuerte activación de la acil-CoA sintetasa Faa1, que se localiza específicamente en las partículas lipídicas y los peroxisomas, indica que la adaptación a estrés salino requiere una mayor movilización de ácidos grasos de los almacenes de lípidos internos. Estos resultados

indican que la β -oxidación peroxisomal inducida por estrés desencadena un aumento de la respiración ante el choque salino.

Los esfingolípidos son reguladores de la muerte celular mediada por la mitocondria en eucariotas superiores. Sin embargo, se desconoce cómo, cambios en el metabolismo de los esfingolípidos y en intermediarios aguas abajo, afectan a las funciones mitocondriales. En este trabajo se describe cómo en la ruta de degradación de esfingolípidos de levadura, la producción de hexadecenal a través de Dpl1 y su degradación a través de Hfd1, es crítica para la función mitocondrial y la muerte celular. Intervenciones genéticas que favorecen la acumulación de hexadecenal, disminuyen el consumo de oxígeno de las células e incrementan la producción de ROS y la fragmentación mitocondrial, y a la inversa. La localización de Hfd1, que es la enzima que degrada el hexadecenal, es puntual en lugares cercanos a la red mitocondrial. Y esta localización depende de un complejo ERMES funcional, lo que indica que la modulación de los niveles de hexadecenal en lugares específicos de contacto entre el retículo endoplasmático y la mitocondria, podría ser un importante desencadenante de la muerte celular. Estos datos son apoyados por el hecho de que el hexadecenal añadido de forma externa o la ausencia de Hfd1, promueve la muerte celular inducida por la proteína Bax humana. Finalmente, la inducción de la ruta de degradación de esfingolípidos en condiciones de estrés, está controlada por la MAP quinasa Hog1. Por lo tanto, la modulación de la degradación de esfingolípidos regulada por estrés, podría ser una vía conservada para inducir la muerte celular en organismos eucariotas.

Abstract

In the present work we study the metabolic adaptation in response to stress in the yeast model, and more specifically we investigate the regulation of peroxisomal activity and the metabolism of sphingolipids.

Peroxisomes are dynamic organelles and the sole location for fatty acid β -oxidation in yeast cells. Here we find that peroxisomal function is crucial for the adaptation to salt stress, especially upon sugar limitation. Multiple layers of control regulate both peroxisomal activity and number upon stress. Activated Hog1 MAP kinase triggers the induction of genes encoding enzymes for fatty acid activation, peroxisomal import and β -oxidation through the Adr1 transcriptional activator, which transiently associates with genes encoding fatty acid metabolic enzymes in a stress- and Hog1-dependent manner. Moreover, Na^+ and Li^+ stress induces an increase in peroxisomal number per cell in a Hog1-independent manner, which depends instead of the retrograde pathway and the dynamin related GTPases Dnm1 and Vps1. The strong activation of the Faa1 fatty acyl-CoA synthetase, which specifically localizes to lipid particles and peroxisomes, indicates that adaptation to salt stress requires the enhanced mobilization of fatty acids from internal lipid stores. Taken together, these results suggest that stress-induced peroxisomal β -oxidation triggers enhanced respiration upon salt shock.

Sphingolipids are regulators of mitochondria-mediated cell death in higher eukaryotes. However, how changes in sphingolipid metabolism and downstream intermediates impinge on mitochondrial function is unknown. Here we found in yeast that within the sphingolipid degradation pathway, the production via Dpl1 and degradation via Hfd1 of hexadecenal is critical for mitochondrial function and cell death. Genetic interventions, which favor hexadecenal accumulation, diminish oxygen consumption rates and increase ROS production and mitochondrial fragmentation and viceversa. The location of the hexadecenal degrading enzyme Hfd1 in punctuate structures all along the mitochondrial network depends on a functional ERMES complex, indicating that modulation of hexadecenal levels at specific ER-mitochondria contact sites might be an important trigger of cell death. This is further supported by the finding that externally added hexadecenal or the absence of Hfd1 enhance cell death caused by human Bax protein. Finally, the induction of the sphingolipid degradation pathway upon stress is controlled by the Hog1 MAP kinase. Therefore the stressregulated modulation of sphingolipid degradation might be a conserved way to induce cell death in eukaryotic organisms.

Resum

Al present treball s'estudia l'adaptació metabòlica en resposta a estrés al model de llevat, i de forma més concreta s'investiga la regulació de l'activitat peroxisomal i el metabolisme d'esfingolípid.

Els peroxisomes són orgànuls dinàmics, encarregats de forma específica de la β -oxidació dels àcids grassos en cèl·lules de llevat. Ací es mostra com la funció peroxisomal es crucial per a l'adaptació a l'estrés salí, especialment en condicions de dejuni de glucosa. Es regula a múltiples nivells tant l'activitat peroxisomal com el seu número, davant de condicions d'estrés. L'activació de la MAP quinasa Hog1 desencadena la inducció de gens que codifiquen enzims per a l'activació, importació peroxisomal i β -oxidació dels àcids grassos. Aquesta regulació gènica té lloc mitjançant l'activador transcripcional Adr1, que s'assòcia transitoriament amb els gens que codifiquen enzims metabòliques d'àcids grassos d'una manera dependent de l'estrés i de Hog1. A més, l'estrés causat per Na^+ i Li^+ , provoca un augment en el número de peroxisomes per cèl·lula de manera independent de Hog1, que depèn a la vegada de la ruta retrògrada i de les dinamines GTPases Dnm1 i Vps1. La forta activació de la acil-CoA sintetasa Faa1, que es localitza específicament a les partícules lipídiques i als peroxisomes, indica que l'adaptació a estrés salí necessita d'una major movilització d'àcids grassos dels magatzems de lípids interns. Estos resultats indiquen que la β -

oxidació peroxisomal induïda per estrés desencadena un augment de la respiració davant el xoc salí.

Els esfingolípidis són reguladors de la mort cel·lular mitjada per la mitocòndria en eucariotes superiors. No obstant, es desconeix cóm, canvis al metabolisme dels esfingolípidis i en intermediaris aigües baix, afecten a les funcions mitocondrials. En aquest treball es descriu cóm en la ruta de degradació de esfingolípidis de llevat, la producció d'hexadecenal mitjançant Dpl1 i la seua degradació mitjançant Hfd1, és crítica per a la funció mitocondrial i la mort cel·lular. Intervencions genètiques que afavorixen l'acumulació d'hexadecenal, disminueixen el consum d'oxigen de les cèl·lules i incrementen la producció de ROS i la fragmentació mitocondrial, i a la inversa. La localització de Hfd1, que es l'enzim que degrada l'hexadecenal, és puntual en llocs propers a la red mitocondrial. I esta localització depén d'un complex ERMES funcional, el que indica que la modulació dels nivells d'hexadecenal en llocs específics de contacte entre el reticle endoplasmàtic i la mitocòndria, podria ser un important desencadenant de la mort cel·lular. Estes dades son recolzades pel fet de que l'hexadecenal afegit de forma externa o l'absència de Hfd1, promou la mort cel·lular induïda per la proteïna Bax humana. Finalment, la inducció de la ruta de degradació d'esfingolípidis en condicions d'estrés, està controlada per la MAP quinasa Hog1. Por tant, la modulació de la degradació d'esfingolípidis regulada per estrés, podria ser una via conservada per a induir la mort cel·lular en organismes eucariotes.

Índice

Índice de figuras.....	XIX
Índice de tablas.....	XXV
Abreviaturas.....	XXVII

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

Índice de figuras

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Metabolismo de los ácidos grasos en levadura.....	7
Figura 2. Esquema estructural de la esfingomielina, de un gangliósido, un cerebrósido y un globósido.....	17
Figura 3. Implicación en procesos patofisiológicos de la S1P.....	22
Figura 4. Ruta de biosíntesis en mamíferos de la dihidroesfingosina (DHS), la dihidroesfingosina-1-fosfato (DHS1P) y de la esfingosina-1-fosfato (S1P).....	24
Figura 5. Ruta de biosíntesis en levadura de la dihidroesfingosina (DHS) y dihidroesfingosina-1-fosfato (DHS1P).....	25
Figura 6. Ruta de degradación de la dihidroesfingosina (DHS) y la esfingosina-1-fosfato (S1P), conservada en mamíferos y levadura.....	27
Figura 7. Representación de los transportadores Crc1 y MPC en levadura.....	33
Figura 8. Representación de la morfología mitocondrial de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en presencia de glucosa y glicerol como fuentes de carbono.....	35
Figura 9. Esquema de la fusión y fisión mitocondrial.....	36
Figura 10. Ruta HOG (“ <i>High osmolarity glycerol</i> ”) en la levadura <i>S. cerevisiae</i>	42
Figura 11. Complejo ERMES.....	46

Figura 12. Regulación transcripcional de la biosíntesis y degradación de esfingolípidos en respuesta a estrés por NaCl.....	49
Figura 13. Apoptosis activada vía mitocondrial en mamíferos.....	51
Figura 14. Inducción de la permeabilización de la membrana mitocondrial externa por Bax y Bak.....	53

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 15. Estructura química de MitoTracker® Red CM-H2XRos (Invitrogen).....	87
Figura 16. Estructura química de BODIPY® 493/503.....	88

RESULTADOS

Figura 17. La eficiencia de crecimiento de las células de levadura en condiciones de estrés salino depende de la concentración de glucosa....	102
Figura 18. La función peroxisomal es importante para la tolerancia a estrés salino, especialmente en condiciones de ayuno de glucosa.....	104
Figura 19. Genes representativos involucrados en la activación de ácidos grasos, importe a los peroxisomas y β -oxidación.....	105
Figura 20. Inducción transcripcional de los genes del metabolismo de los ácidos grasos bajo condiciones de estrés causado por NaCl.....	106
Figura 21. La inducción transcripcional de los genes peroxisomales depende de Hog1.....	108
Figura 22. La inducción por salinidad de los genes peroxisomales es independiente de la inducción durante el cambio diáuxico.....	109

Figura 23. Los factores Adr1 y Oaf1 son los responsables de la inducción provocada por la presencia de oleato en el medio, de los genes del metabolismo de los ácidos grasos.....	111
Figura 24. El factor Adr1 es el responsable de la inducción por estrés salino de los genes del metabolismo de los ácidos grasos.....	112
Figura 25. Hog1 estimula la asociación de Adr1 a los genes involucrados en la activación de los ácidos grasos y la β -oxidación.....	113
Figura 26. Estudio de la interacción de Hog1 y Adr1 in vitro.....	114
Figura 27. Faa1 es una acil-CoA graso sintetasa que se induce por salinidad.....	116
Figura 28. Faa1 colocaliza con las partículas lipídicas y los peroxisomas.....	117
Figura 29. Na^+ y Li^+ incrementan la abundancia de estructuras peroxisomales independientemente de Hog1.....	119
Figura 30. La inducción del número de peroxisomas es específica de cationes.....	120
Figura 31. La ruta retrógrada y las proteínas de fisión Dnm1 y Vps1 son necesarias para producir un incremento del número de peroxisomas en respuesta a estrés salino.....	121
Figura 32. Hog1 y Rtg1 son necesarios para la inducción de <i>PEX3</i> en condiciones de estrés salino.....	122
Figura 33. El transportador de carnitina mitocondrial es importante para la adaptación a estrés salino, mientras que el transportador de piruvato mitocondrial es esencial para el crecimiento respiratorio.....	124
Figura 34. Los iones Li^+ y Na^+ provocan una inhibición específica en medio parcialmente respiratorio.....	126

Figura 35. Ruta de biosíntesis de esfingolípidos complejos (izquierda) y de degradación de esfingolípidos (derecha).....	128
Figura 36. Efecto de la ruta de degradación de esfingolípidos en la capacidad respiratoria.....	129
Figura 37. Función de enzimas del metabolismo del hexadecenal en la acumulación de ROS.....	131
Figura 38. Hfd1 localiza en múltiples focos a lo largo de la red mitocondrial.....	132
Figura 39. La sobreexpresión de Dpl1 inhibe el crecimiento en un mutante <i>Δhfd1</i>	134
Figura 40. La cepa <i>Δhfd1</i> que sobreexpresa la proteína Dpl1 muestra un aumento de las ROS intracelulares.....	135
Figura 41. La sobreexpresión de Dpl1 induce fragmentación mitocondrial en el mutante <i>Δhfd1</i>	136
Figura 42. El hexadecenal es el intermediario de la ruta con mayor efecto inhibitorio del crecimiento.....	138
Figura 43. La adición externa del hexadecenal provoca fragmentación mitocondrial dependiente de Hfd1.....	140
Figura 44. El crecimiento con galactosa contrarresta la inhibición del crecimiento que produce el hexadecenal.....	141
Figura 45. El hexadecenal induce fragmentación mitocondrial a través de la GTPasa Dnm1.....	142
Figura 46. La supresión de la fisión mitocondrial no contrarresta la inhibición del crecimiento producida por el hexadecenal.....	143

Figura 47. Ybh3 se asocia a la mitocondria tras un estímulo por ácido acético, pero no por hexadecenal.....	145
Figura 48. La sensibilidad al hexadecenal no se ve alterada en mutantes $\Delta ybh3$	146
Figura 49. La inhibición de crecimiento por Bax se ve incrementada en mutantes $\Delta hfd1$	148
Figura 50. Estudio de colocación de Hfd1-GFP con la subunidad Mmm1-mCherry del complejo ERMES.....	149
Figura 51. La localización intracelular de Hfd1 es diferente en mutantes del complejo ERMES.....	150
Figura 52. Los mutantes ERMES son hipersensibles a hexadecenal.....	151
Figura 53. Esquema resumen de la biosíntesis y degradación de esfingolípidos en levadura.....	152
Figura 54. La expresión de los genes involucrados en la degradación de esfingolípidos se activa de manera dependiente de Hog1.....	154
Figura 55. La pérdida de función de Hog1 provoca sensibilidad a hexadecenal.....	155
Figura 56. El estrés salino induce fragmentación mitocondrial en el mutante $\Delta hfd1$	156
Figura 57. La pérdida de función de Hog1 contrarresta la inhibición por Bax.....	157

DISCUSIÓN

Figura 58. Modelo de la regulación del metabolismo peroxisomal en respuesta a estrés.....	166
---	-----

Figura 59. Modelo de la regulación del metabolismo de esfingolípidos en respuesta a estrés.....	169
---	-----

Índice de tablas

Tabla 1. Funciones peroxisomales.....	5
Tabla 2. Cepas de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas en el presente trabajo.....	65
Tabla 3. Plásmidos utilizados en el presente trabajo.....	67

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribunucleico

ADNc: Ácido desoxirribunucleico copia

AG: Ácidos grasos

APAF1: Proteasa de apoptosis activadora del factor 1.

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ATP: Adenosín trifosfato

B-ox: β -oxidación

BSA: Suero Albúmina Bovina

CAT: Carnitina acetil transferasa

ChIP: Inmunoprecipitación de la cromatina (*“chromatine immunoprecipitation”*)

CoA: Coenzima A

DCF: Diclorofluoresceína

DHS: Dihidroesfingosina

DHS1P: Dihidroesfingosina – 1 – fosfato

DMSO: Dimetilsulfóxido

DsRed: proteína verde fluorescente

DTT: Ditioneitol

E. coli: *Escherichia coli*

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético

ER: Retículo endoplasmático

ERMES: Estructura de encuentro de retículo endoplasmático y mitocondria ("*Endoplasmic reticulum/mitochondria encounter structure*")

EtOH: Etanol

FALDH: Deshidrogenasa de aldehídos grasos ("*fatty aldehyde dehydrogenase*")

Gal: Galactosa

GFP: Proteína verde fluorescente ("*Green fluorescent protein*")

Gluc: Glucosa

Glic: Glicerol

GST: ("*Glutathione S-transferase*")

GTP: Guanosín trifosfato

HDL: Lipoproteína de alta densidad

HOG: Ruta de respuesta a elevada osmolaridad ("*High osmolarity glicerol*")

IBMCP: Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas

Kb: Kilobases

LB: Medio Luria Bertani

MAE: MOPS – acetato de etilo – EDTA

MAP: Proteína activada por mitógeno

MAPK: Proteína MAP quinasa

Mena: Menadiona

Min: Minutos

MOMP: Permeabilización de la membrana externa mitocondrial (*“mitochondrial outer membrane permeabilization”*)

MPC: Transportador de piruvato mitochondrial (*“mitochondrial pyruvate carrier”*)

MtDNA: ADN mitochondrial

MQ: Milli Q

NAD: Nicotinamida Adenina Dinucleótido

NF: Factor de necrosis

OD: Densidad óptica

ORE: Elementos de respuesta a oleato

ORF: Pauta de lectura abierta (*“Open Reading Frame”*)

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDH: Piruvato deshidrogenasa

PHB: Prohibitina

PKC: Proteína quinasa C

PTS: Señales de direccionamiento peroxisomal (*“Peroxisome targeting signals”*)

PVDF: Polivinilideno de difluorido

ROS: Especies reactivas de oxígeno

rpm: Revoluciones por minuto

RT: Transcripción reversa

RTG: Ruta retrógrada

S. cerevisiae: *Saccharomyces cerevisiae*

SD: Medio sintético con glucosa

SDS: Dodecil sulfato sódico

SLS: Síndrome de Sjögren – Larsson

SOB: Medio “*Super Optimal Broth*”

Sph: Esfingosina

S1P: Esfingosina-1-fosfato

TAE: Tris – Acetato - EDTA

TCA: Ácidos tricarbóxicos

TE: Tris – EDTA

TEMED: N',N',N',N'- Tetrametiletlenodiamida

TFC: Trabajo Final de Carrera

TNF: Factor de necrosis tumoral

TRAF: Factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral

TRIS: (Hidroximetil) aminometano

U: Unidades

Val: Valinomicina

Wt: Cepa silvestre

XIAP: Inhibidor de la apoptosis ligado a X

YPD: Medio rico (extracto de levadura peptona – dextrosa)

Introducción

1. Introducción a los peroxisomas.

En 1954 y gracias a Johannes A G Rhodin, se describieron los peroxisomas por primera vez (Jonannes A G Rhodin, 1954). Pero inicialmente no se conocían con este nombre, si no con el nombre de “microcuerpos”. No fue hasta 1966 cuando Christian de Duve y su equipo los caracterizaron como orgánulos independientes con el nombre de peroxisomas (De Duve and Baudhuin, 1966).

El nombre de peroxisoma procede de la presencia de enzimas involucradas en la producción y degradación de peróxido de hidrógeno. Son orgánulos muy activos tanto dinámica como metabólicamente y están presentes en las células eucariotas. Sus dimensiones son de 0,1 a 1 μm de diámetro, están constituidos por una simple membrana y generalmente son esféricos. Aunque pueden cambiar su forma y sufrir una elongación. Además, pueden contener enzimas metabólicas que en determinados casos forman un núcleo cristalino (Smith and Aitchison, 2013). Sus propiedades metabólicas pueden variar substancialmente dependiendo de la especie en que se encuentre, incluso a nivel de un único organismo los peroxisomas pueden contener enzimas alternativas dependiendo del tejido en que se encuentren o de las condiciones ambientales. Además, algunos peroxisomas encontrados en determinados grupos de organismos o tejidos son tan diferentes que inicialmente se habían descrito como orgánulos distintos y de hecho, actualmente se utilizan nombres alternativos para referirse a ellos. Algunos ejemplos de estos orgánulos son los glicosomas o los glioxisomas (Gabaldon, 2010).

1.1. Metabolismo peroxisomal.

Al igual que existen varios subtipos de retículo endoplasmático con funciones especializadas: rugoso, liso y de transición, dependiendo del tipo celular los peroxisomas también tienen diferentes apariencias, contenidos y funciones. En los peroxisomas tienen lugar muchas reacciones metabólicas, las más destacables son la β -oxidación de los ácidos grasos y la degradación del peróxido de hidrógeno. Otras funciones más especializadas que sólo se encuentran en determinados organismos o tipos celulares, están relacionadas con el metabolismo del glicerol y con el mantenimiento de la integridad celular (Smith and Aitchison, 2013).

Todas las proteínas peroxisomales están codificadas en el núcleo celular y son trasladadas al citosol e importadas a los peroxisomas gracias a un conjunto de proteínas altamente conservadas, que reconocen péptidos de señalización PTS (*“peroxisome targeting signals”*) en las proteínas peroxisomales (Hetteema et al., 2014). Este conjunto de receptores y transportadores, coordinan un transporte de proteínas necesario para coordinar las diferentes funciones peroxisomales.

En la siguiente tabla se muestran las funciones metabólicas de los peroxisomas y los reinos en los que se desarrollan:

Rutas peroxisomales	Plantas	Hongos	Protozoos	Animales
Biosíntesis				
Ácidos biliares				✓
Moléculas de señalización hormonal	✓			✓
Ácidos grasos poliinsaturados				✓
Plasmalógenos			✓	✓
Pirimidinas			✓	✓
Purinas				✓
Purina salvaje			✓	
Antibióticos (penicilina)		✓		
Toxinas para patogénesis de plantas		✓		
Lisina		✓		
Biotina	✓	✓		
Metabolitos secundarios	✓	✓		
Isoprenoides y colesterol	✓			Desc.
Degradación				
Prostaglandinas				✓
Aminoácidos		✓		✓
Poliaminas	✓	✓		✓
Degradación de H ₂ O ₂ por la catalasa	✓	✓	✓	✓
Oxidación de ácidos grasos	✓	✓	✓	✓
Purina	✓		✓	✓
Destrucción del radical superóxido por la superox. dismut.	✓		✓	✓
Metabolismo del glicerol			✓	
Glicólisis			✓	
Degradación de metanol		✓		
Ciclo del glioxilato	✓	✓		
Fotorrespiración	✓			
Otras				
Mantenimiento de la integridad celular		✓		
Bioluminiscencia de la luciferasa				✓
Plataformas de señalización en inmunidad innata viral				✓
Señalización de H ₂ O ₂ en neuronas hipotalámicas				✓

Tabla 1. Funciones peroxisomales. En los peroxisomas tienen lugar muchas rutas metabólicas entre las que se encuentran la biosíntesis de moléculas como ácidos grasos, toxinas o antibióticos, la degradación de aminoácidos o el mantenimiento de la integridad celular, entre otras. Estas funciones no se dan en plantas, hongos, protozoos y animales, si no que cada una de ellas se da en alguno/s de los reinos. Las funciones más

Introducción

conservadas y que tienen lugar en los cuatro reinos son: la oxidación de los ácidos grasos y la degradación del peróxido de hidrógeno. (Tabla modificada de Smith and Aitchison, 2013).

La β -oxidación de los ácidos grasos, es el proceso metabólico más común que se produce en los peroxisomas, en levadura de hecho esta β -oxidación se produce exclusivamente en este orgánulo. En mamíferos en cambio, este proceso se da principalmente en la mitocondria, ya que los ácidos grasos de cadena corta y media son transportados directamente a la mitocondria para producirse allí su β -oxidación. Sin embargo, los ácidos grasos de cadena larga, de cadena ramificada, los dicarboxílicos y tricarboxílicos, sufren su β -oxidación en los peroxisomas (Wanders, 2014).

Además de la β -oxidación comentada, en los peroxisomas humanos también se produce la α -oxidación. Esta oxidación es necesaria para los ácidos grasos de cadena ramificada trimetilados, los cuales necesitan sufrir una primera alfa-oxidación para generar un ácido graso dimetilado que pueda ser metabolizado por β -oxidación. Estos peroxisomas además, tienen un papel crucial en la detoxificación del glioxilato (Wanders, 2014).

En las células de la levadura *S. cerevisiae* los ácidos grasos sufren su β -oxidación de forma exclusiva a nivel peroxisomal, como ya se ha comentado anteriormente. En la figura 1 se muestra de forma esquemática el metabolismo de los ácidos grasos en la levadura *S. cerevisiae*.

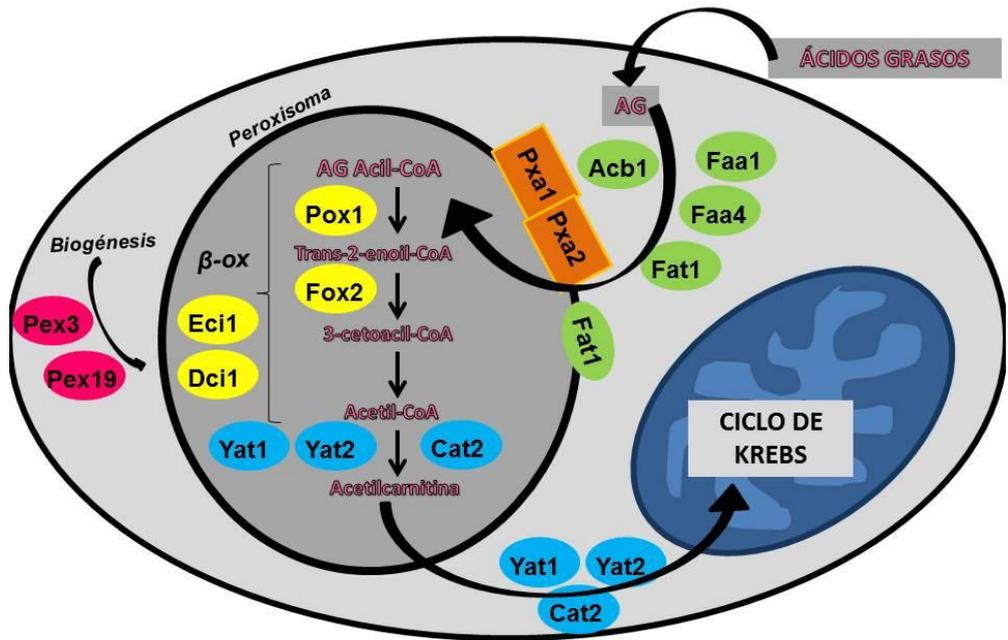


Figura 1. Metabolismo de los ácidos grasos en levadura. En los peroxisomas de la levadura *S. cerevisiae* se produce la β -oxidación de los ácidos grasos de la célula, los cuales penetran a la misma por simple difusión o a través de transportadores como Fat1. Tras ser activados por Coenzima-A son introducidos al peroxisoma donde se produce su β -oxidación. La acetilcarnitina que es el producto final de este proceso se exporta a la mitocondria para la obtención de energía en el ciclo de Krebs. (Figura adaptada de Hiltunen et al., 2003).

Los ácidos grasos presentes en el medio, son introducidos al interior de las células por simple difusión a través de la membrana plasmática y a través de transportadores como Fat1. En el interior de las células, éstos ácidos grasos deben ser activados por Coenzima A. De esta activación, así como de su transporte, se encargan las proteínas Faa1, Faa4 y Fat1. Esta última proteína está implicada principalmente en la activación y transporte de ácidos grasos de cadena muy larga (Trotter, 2001).

Para el transporte de estos ácidos grasos activados por Coenzima A, es importante la proteína Acb1 (nombre procedente de “*acyl-CoA binding protein*”). Una vez activados, éstos se internalizan a los peroxisomas a través de transportadores como son: el heterodímero formado por Pxa1 y Pxa2, así como por la proteína también de activación Fat1.

Los ácidos grasos activados por CoA, una vez en el interior de los peroxisomas, se oxidan a través del proceso de β -oxidación, el cual se puede resumir en los siguientes pasos: los acil-CoA se convierte en trans-2-enoil-CoA, a través de la proteína Pox1. Éste se transforma en 3-cetoacil-CoA gracias a la proteína Fox2, y por último se obtiene el producto de la β -oxidación acetil-coenzima A. En este proceso simplificado, además participan otras enzimas auxiliares como son: Dci1 y Eci1. El acetil-CoA que se obtiene se transforma en acetilcarnitina gracias a las enzimas: Cat2, que tiene localización peroxisomal y mitocondrial (Elgersma et al., 1995); Yat1, que también se ha localizado en la membrana externa mitocondrial (Schmalix and Bandlow, 1993); y Yat2 que tiene una localización más citosólica (Swiegers et al., 2001). Estas últimas, también se encargan del transporte de la acetilcarnitina a la mitocondria para permitir la entrada a través de la translocasa Crc1 y su posterior entrada en el ciclo de Krebs. (Palmieri et al., 1999).

1.2. Interacción entre peroxisoma, mitocondria y retículo endoplasmático.

Se conoce la relación entre los peroxisomas y otros orgánulos celulares. El orgánulo principal con el que se relaciona es la mitocondria.

Esto es debido a que los peroxisomas no contienen un ciclo del ácido cítrico, por lo que el acetyl-CoA producido tras la β -oxidación en los peroxisomas, no puede ser degradado a CO_2 y H_2O . Además, los peroxisomas tampoco poseen una cadena respiratoria como la mitocondria, por lo que hace necesaria la actuación de una lanzadera para regenerar el NAD^+ a partir del NADH. En *Saccharomyces cerevisiae* la reoxidación intraperoxisomal del NADH se produce gracias a una lanzadera compuesta por malato deshidrogenasas tanto peroxisomales como citosólicas (van Roermund et al., 1995). Por eso, es necesaria la actuación de la mitocondria como captador de los productos de la β -oxidación peroxisomal que no pueden ser degradados en los mismos (Wanders, 2014).

Los peroxisomas también se han visto asociados al retículo endoplasmático. Esta asociación se encuentra en la ruta de biosíntesis de los eterofosfolípidos y se ha observado en el modelo de ratón. Produce su primer paso en los peroxisomas, seguido de la transferencia de alquil-dihidroacetona fosfato al retículo endoplasmático para su posterior conversión en eterofosfolípidos, incluyendo plasmalógenos (da Silva et al., 2012).

La mitocondria también presenta una estrecha conexión con el retículo endoplasmático a través del complejo ERMES ("*Endoplasmic Reticulum/Mitochondria Encounter Structure*") y otros complejos proteicos, tal y como se explicará posteriormente en el apartado 3.6.

1.3. Biogénesis peroxisomal.

Las membranas de los peroxisomas contienen proteínas que son transportadores de metabolitos primarios y peroxinas. Se conocen 31 peroxinas en levadura, las cuales están involucradas en diversos aspectos de la biogénesis peroxisomal, entre los que se incluyen la generación de nuevos peroxisomas, la división de los mismos y el importe de proteínas de membrana y de la matriz peroxisomal. Las peroxinas están codificadas por los genes *PEX*, catorce de los cuales se han identificado en humanos. Además estos genes se asocian a desórdenes de la biogénesis peroxisomal o PBDs tal y como se explica en el apartado 1.3 (Smith and Aitchison, 2013).

En levadura se proponen dos mecanismos de biogénesis peroxisomal: mediante generación de novo a partir del retículo endoplasmático y a partir de peroxisomas preexistentes. La biogénesis de novo a partir de vesículas del retículo endoplasmático, se produce gracias a la actividad de Pex3 y Pex19. Se forman dos tipos de vesículas cuyos contenidos no serán funcionales hasta su posterior fusión en una única vesícula o peroxisoma maduro. De esta fusión se encargan las peroxinas Pex1 y Pex6. Por otro lado, el proceso de generación de peroxisomas maduros por crecimiento y división se basa en el crecimiento de los peroxisomas tras su fusión con otras vesículas procedentes del retículo endoplasmático. Tras este crecimiento, interviene la peroxina Pex11, para producir la elongación de una parte del peroxisoma y por último gracias a

proteínas de fisión como Fis1, se produce la división para dar lugar a nuevos peroxisomas maduros (Smith and Aitchison, 2013).

1.4. Peroxisomas y enfermedad.

A lo largo de los años se han propuesto diversas clasificaciones para los desórdenes peroxisomales, no obstante existe un consenso general que los clasifica en dos grupos: los desórdenes de la biogénesis peroxisomal y los desórdenes en funciones peroxisomales.

Dentro de los desórdenes de la biogénesis peroxisomal, encontramos los del grupo A y los del grupo B, los cuales se caracterizan por una deficiencia en la biogénesis peroxisomal. En el grupo A se enmarcan los desórdenes de Zellweger, en el cual se encuentran: El síndrome de Zellweger, la adrenoleucodistrofia neonatal y la enfermedad infantil de Refsum. Estas enfermedades ocurren a 1 de cada 50.000 individuos (Wanders, 2014).

Formas del Síndrome de Zellweger incluyen mutaciones en los genes *PEX*. Estas formas y sus genes afectados se conocen como: Síndrome de Zellweger (afectado *PEX1*), PBD2A (afectado *PEX5*), PBD3A (afectado *PEX12*), PBD4A (afectado *PEX6*), adrenoleucodistrofia neonatal (afectado *PEX2*), PBD6A (afectado *PEX10*), PBD7A (afectado *PEX26*), PBD8A (afectado *PEX16*), enfermedad infantil de Refsum (afectado *PEX3*), PBD11A (afectado *PEX13*), PBD12A (afectado *PEX19*) y PBD13A (afectado *PEX14*). Se trata de un desorden autosómico recesivo, caracterizado clínicamente

Introducción

por una disfunción neurológica, hepática y renal, con anomalías craneofaciales. Bioquímicamente, carecen de peroxisomas. Los individuos que se ven severamente afectados por este síndrome, mueren al primer año de vida (Wanders, 2014).

La mutación en el gen *PEX1* es la más común, asociada con el 68% de todos los individuos afectados por deficiencias en la biogénesis peroxisomal. Mutaciones en los genes *PEX6*, *10*, *12* y *26*, ocurren en el 26% de los individuos afectados. Y en los genes *PEX2*, *3*, *5*, *13*, *14*, *16* y *19*, se observa en el 6% de los afectados (Wanders, 2014).

En el grupo B de los desórdenes de la biogénesis peroxisomal, se conoce la condrodiasplasia rizomélica tipo 1, caracterizada por una mutación en el gen *PEX7*. Los síntomas más característicos de esta enfermedad son el acortamiento de las extremidades superiores, rigidez en las articulaciones, microcefalia y epífisis punteada (Mohamadynejad et al., 2013).

Actualmente no existen tratamientos para esta enfermedad, dado que deberían aplicarse prácticamente antes del nacimiento. No obstante, se han conseguido algunos tratamientos sintomáticos, entre los que se incluyen: dietas bajas en ácido fitánico, administración oral de ácido bílico o precursores de plasmalógenos y trasplante de hígado (Setchell et al., 1992). Además se están investigando sobre nuevas terapias potenciales en modelos de células en cultivo. De hecho se han obtenido modelos de ratones para deficiencias de algunos de los genes *PEX*, muy útiles para desarrollar nuevas aproximaciones de tratamiento (Steinberg et al., 2006).

Por otro lado, en cuanto a los desórdenes de funciones peroxisomales se caracterizan por la presencia de mutaciones en enzimas implicadas en procesos peroxisomales, afectando así a su función. La mayoría de este tipo de alteraciones tiene lugar a nivel de la β -oxidación de los ácidos grasos, entre las que se encuentran la Adrenoleucodistrofia ligada a X y la deficiencia en la Acil-CoA oxidasa. Daños en este proceso, provocan una acumulación de ácidos grasos (Wanders, 2014). Pero también pueden estar alterados otros procesos como son: la biosíntesis de eterofosfolípidos, provocando la Condrodisplasia rizomélica de tipo 2 y 3; la alfa-oxidación, provocando la enfermedad de Refsum; el metabolismo del glioxilato, provocando la hiperoxaluria primaria tipo 1; la síntesis de ácidos biliares; o el metabolismo del peróxido de hidrógeno (Wanders, 2014).

1.5. Dinámica peroxisomal.

Los peroxisomas pueden incrementarse en tamaño y en número en coordinación con cambios morfológicos en otros compartimentos subcelulares, entre los que se incluyen la mitocondria, las partículas lipídicas y determinados dominios de la membrana plasmática. Lo que se sugiere es que esta dinámica no simplemente consiste en un aumento del volumen de los peroxisomas para favorecer una inducción de su metabolismo, sino que reconfiguraciones de forma y tamaño tienen un efecto más complejo en las funciones peroxisomales (Smith and Aitchison, 2013).

Introducción

El mantenimiento del número y de la calidad de los peroxisomas, por tanto, es muy importante para el mantenimiento de la homeostasis peroxisomal. Los procesos de biogénesis explicados anteriormente (por generación de novo y por fisión) están coordinados y regulados para controlar la abundancia peroxisomal y su función. Dependiendo de las condiciones ambientales y del estadio celular, las células realizan un tipo u otro de biogénesis. Y su movilidad por la célula tiene lugar a través de los filamentos de actina en el caso de levadura o a través de los microtúbulos en el caso de las células de mamífero. Esta movilidad es importante para su biogénesis, ya que por ejemplo en levadura, es necesario este movimiento para una correcta distribución a las células hijas durante la división celular. Y no sólo para su biogénesis, si no que esta movilidad a través de los filamentos de actina se produce durante el proceso de pexofagia (Smith and Aitchison, 2013).

El proceso de pexofagia es un tipo específico de autofagia que tiene lugar a nivel peroxisomal. Existen dos tipos de pexofagia, la micropexofagia que tiene lugar cuando un conjunto de peroxisomas son secuestrados a través de la membrana vacuolar y la macropexofagia que tiene lugar cuando un peroxisoma es rodeado por la membrana de un fagóforo formando un pexofagosoma, que será liberado posteriormente a la vacuola (Till et al., 2012).

En ausencia de cualquier estímulo de proliferación peroxisomal, éstos se multiplican de forma comparable al ciclo celular. Y no sólo se regulan estos aspectos, si no que la elongación que sufren los

peroxisomas, por ejemplo en respuesta a determinados factores de transcripción o a ácidos grasos poliinsaturados, es otro mecanismo que permite alterar la actividad de algunas rutas metabólicas peroxisomales para una mejor adaptación celular (Smith and Aitchison, 2013).

Los peroxisomas de la levadura *S. cerevisiae*, adaptan su número y función fisiológica en respuesta a cambios en el estado metabólico de la célula. En presencia de un exceso de glucosa, las células de levadura muestran bajos niveles de peroxisomas en cuanto a número y actividad. Sin embargo, en presencia de una fuente de carbono no fermentable, como son los ácidos grasos (por ejemplo el oleato), etanol o aminoácidos, se activa rápidamente la proliferación peroxisomal (Sibirny, 2016).

Esta dinámica peroxisomal tiene un fuerte componente transcripcional por la acción coordinada de los factores de transcripción Oaf1/Pip2 y Adr1 (Turcotte et al., 2010). Los activadores Oaf1/Pip2 median la respuesta celular a oleato. Oaf1 se activa por la unión directa a ácidos grasos y junto a Pip2, se une como un heterodímero a la secuencia consenso de los elementos de respuesta a oleato (ORE): CGGN₃TNAN₉₋₁₂CCG, que se encuentran en los promotores de los genes de proliferación y β -oxidación peroxisomal (Rottensteiner et al., 1997). Por otro lado, Adr1 se une a otro motivo diferente de los mismos promotores de los genes peroxisomales y activa su expresión en respuesta a una disminución de los niveles energéticos intracelulares. Y esta ruta de señalización está activada por la proteína kinasa Snf1 (Ratnakumar and Young, 2010). En el presente

trabajo se estudia un modo alternativo de activación peroxisomal en levadura, que está modulado por estrés salino.

2. Introducción a los esfingolípidos.

Los esfingolípidos constituyen una amplia clase de lípidos que se localizan en las membranas de las células eucariotas, así como en tejido nervioso y cerebral (Spiegel and Milstien, 2003). Están constituidos por una esfingosina o 1,3-dihidroxi-2-amino-4-octadeceno, a la cual pueden unirse varios grupos funcionales o ácidos grasos mediante enlaces amida, constituyendo las conocidas como esfingosina-1-fosfato y ceramidas (Hannun and Obeid, 1995). Estas ceramidas, a su vez, pueden modificarse para constituir diferentes tipos de lípidos. Por un lado, la ceramida-1-fosfato, (Chalfant and Spiegel, 2005), esfingomielinas (Barenholz, 1984) y glicoesfingolípidos simples y complejos, incluyendo los gangliósidos, cerebrósidos y globósidos (Hakomori, 2003).

Las esfingomielinas se localizan principalmente en la vaina de mielina de las neuronas y en las membranas de las células del tejido adiposo. Poseen un grupo fosfato, por lo que pertenecen al grupo de los fosfoesfingolípidos (Barenholz, 1984). Por otro lado, dependiendo del oligosacárido unido a la ceramida se forman los gangliósidos, cerebrósidos y globósidos. Por ejemplo, los primeros se forman por la unión de varias unidades de oligosacáridos a la ceramida, mediante enlace o-glicosídico. Y se localizan principalmente en las terminaciones del sistema nervioso

central (Svennerholm, 1980). Los segundos, por la unión de un único oligosacárido a la ceramida (si es una galactosa se constituyen los galactocerebrósidos y si es una glucosa se constituyen los glucocerebrósidos). Se localizan principalmente en membranas plasmáticas. Por último, el tercer grupo se caracteriza por la unión de oligosacáridos neutros a la ceramida (Linington and Rumsby, 1978).

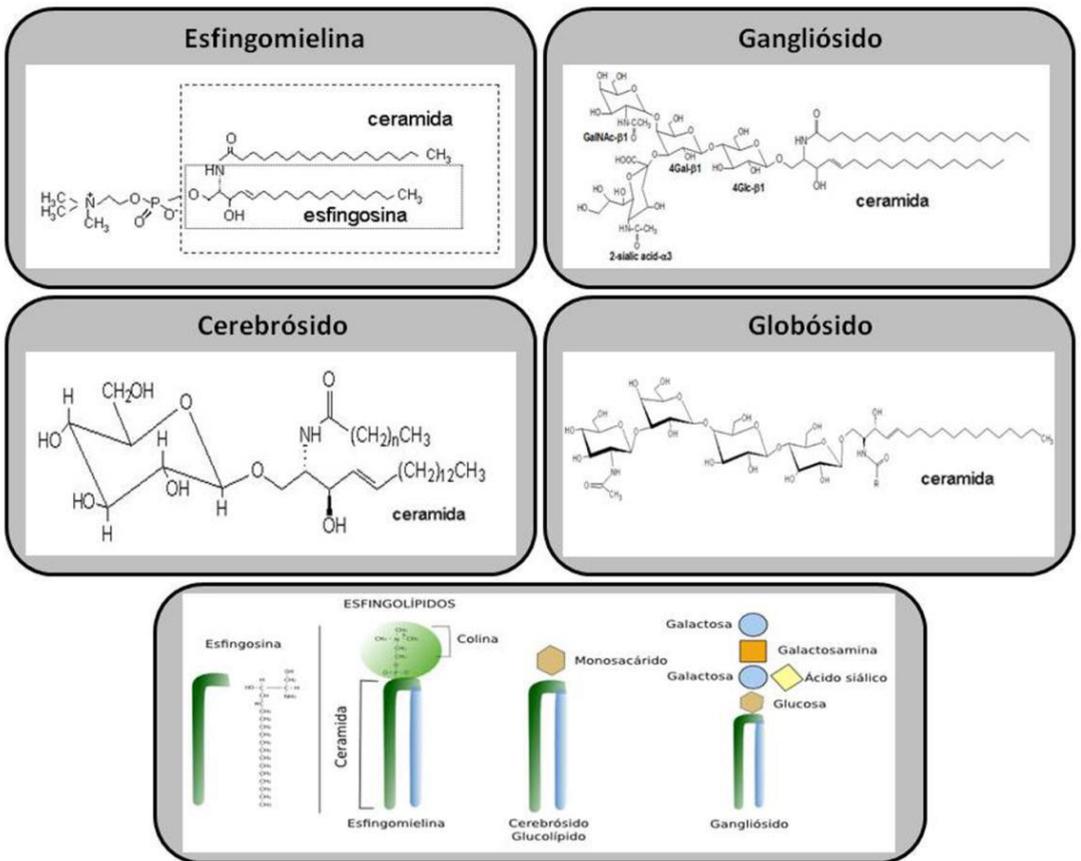


Figura 2. Esquema estructural de la esfingomieline, de un gangliósido, un cerebroósido y un globósido. En la imagen superior izquierda se muestra la esfingomieline que posee un grupo fosfato unido a la unidad básica estructural de este tipo de lípidos, la ceramida. En la imagen superior derecha se muestra como los gangliósidos se caracterizan por la unión de varios oligosacáridos a la ceramida. En la imagen central

izquierda se observa un cerebrósido, el cual tiene unido un único oligosacárido a la ceramida. En la imagen central derecha se muestra un globósido, el cual se caracteriza por la unión de oligosacáridos neutros a la ceramida. Por último, en la parte inferior se muestra un esquema de los esfingolípidos. (Imagen adaptada de Sanchez A and Díaz-Laviada I., 2006; y Janmey and Kinnunen, 2006).

2.1. Papel bioactivo de los esfingolípidos.

Los esfingolípidos, además de su papel estructural, son muy importantes como lípidos bioactivos. Participan activamente como segundos mensajeros en diversas rutas de señalización celular, gracias a su capacidad para formar múltiples puentes de hidrógeno con otras moléculas (Rao and Acharya, 2008). Muchas de estas rutas están implicadas en procesos esenciales como son la diferenciación, migración, muerte celular programada e inflamación (El Alwani et al., 2006).

Por lo tanto no es sorprendente que los esfingolípidos se hayan visto implicados en diversas enfermedades como cáncer, diabetes, enfermedades del corazón, infecciones microbianas, desórdenes neurológicos incluyendo la enfermedad de Alzheimer y disfunciones inmunológicas (Dickson, 2008).

La biosíntesis de los esfingolípidos comienza en el retículo endoplasmático, a partir de precursores solubles y finaliza en el complejo de Golgi y en la membrana plasmática. En las membranas plasmáticas existen unos dominios de menor fluidez denominados rafts lipídicos, que se producen por la interacción de esfingomielinas, colesterol y glicoesfingolípidos. Y parece que están involucrados en la señalización

celular, clasificación de lípidos y proteínas y en el tráfico o transporte transmembrana (Chakraborty and Jiang, 2013).

2.2. Esfingosina-1-fosfato y enfermedad.

A nivel bioactivo, la esfingosina-1-fosfato o S1P está considerada como uno de los esfingolípidos más importantes por su implicación en una gran variedad de procesos fisiológicos y patofisiológicos.

Uno de los procesos en los que interviene esta molécula es en la inhibición de la ceramida, la cual interviene en procesos de senescencia apoptosis y autofagia. Por lo que estos procesos se ven regulados negativamente por la esfingosina-1-fosfato.

La S1P puede actuar extracelularmente, cuando es exportada desde el citoplasma de las células al exterior de las mismas. Y una vez en el exterior puede actuar de forma autocrina o paracrina a través de receptores acoplados a proteína G y así participa en procesos de reclutamiento de células madre, diferenciación y mantenimiento del estado de pluripotencia (Pitson and Pebay, 2009). Numerosos estudios han mostrado que la producción de S1P promueve el crecimiento tumoral, la resistencia a apoptosis, la angiogénesis tumoral y la metástasis. En este sentido, puede actuar de forma autocrina para promover el propio crecimiento, supervivencia, motilidad y metástasis (Salas et al., 2011) o paracrina, induciendo la producción de moléculas de adhesión endotelial,

angiogénesis y regulando interacciones celulares, así como reclutando células inflamatorias (Anelli et al., 2010).

Se conocen varias dianas intracelulares de la esfingosina-1-fosfato. Por un lado, las histonas deacetilasas son inhibidas por la S1P, lo que desencadena variaciones en el balance de la acetilación de histonas y por tanto en la regulación de determinados genes dianas (Hait et al., 2009). Por otro lado, el factor 2 asociado al receptor del TNF (TRAF2) cuando es activado por esta molécula actúa como supresor de la apoptosis (Alvarez et al., 2010). La proteína quinasa C δ (PKC δ) es otra diana intracelular de la S1P, la cual se sugiere que cuando es activada *in vivo*, media la activación inducida por toxinas del NF- κ B, interviniendo por tanto en el shock séptico (Puneet et al., 2010). Y por último, la prohibitina 2 (PHB2), es otra diana de esta molécula. Está altamente conservada y regula el ensamblaje de la cadena respiratoria mitocondrial y su función. Se ha sugerido que la interacción de la S1P con PHB2 es importante para el ensamblaje de la citocromo-c oxidasa y la respiración mitocondrial (Artal-Sanz and Tavernarakis, 2009).

Como ya se ha comentado, es evidente la implicación de esta molécula en procesos tumorales. Pero la patofisiología de la misma se extiende todavía más. La S1P, por su capacidad de unión a la lipoproteína de alta densidad (HDL) y a la albúmina, está presente en elevada concentración en la circulación. De esta manera actúa sobre diferentes tipos celulares como los monocitos, interviniendo en el desarrollo de la aterosclerosis (Daum et al., 2009). La diabetes se asocia con un

metabolismo de esfingolípidos alterado y aunque muy pocos estudios se han centrado en el papel de la S1P en esta área, es la ceramida la molécula que en este caso se ha asociado a la resistencia a insulina. La ceramida interviene en la inhibición de determinadas rutas de señalización de insulina, inhibiendo así su papel en el músculo esquelético. La acumulación de esfingolípidos en el hígado, por otro lado, parece ser insuficiente para producir esta resistencia. Se han realizado experimentos en roedores que demuestran que la inhibición de la síntesis de esfingolípidos incrementa la sensibilidad a insulina, resuelve la esteatosis hepática y previene la diabetes en los mismos (Summers, 2010).

La S1P también tiene la capacidad de estimular la motilidad de los osteoclastos y mantener la homeostasis de los minerales en los mismos, estando involucrada, por tanto, en osteoporosis (Ishii et al., 2010). Bajas concentraciones de esta molécula provoca una acción quimiotáctica para los precursores osteoclasticos, sin embargo, concentraciones elevadas inhiben su movimiento (Ishii et al., 2009).

En resumen, la esfingosina-1-fosfato está implicada en numerosas condiciones patofisiológicas y enfermedades que afectan a la mayoría de órganos del cuerpo humano. Algunas de estas enfermedades se muestran en la siguiente figura, entre las que se encuentran las ya comentadas.

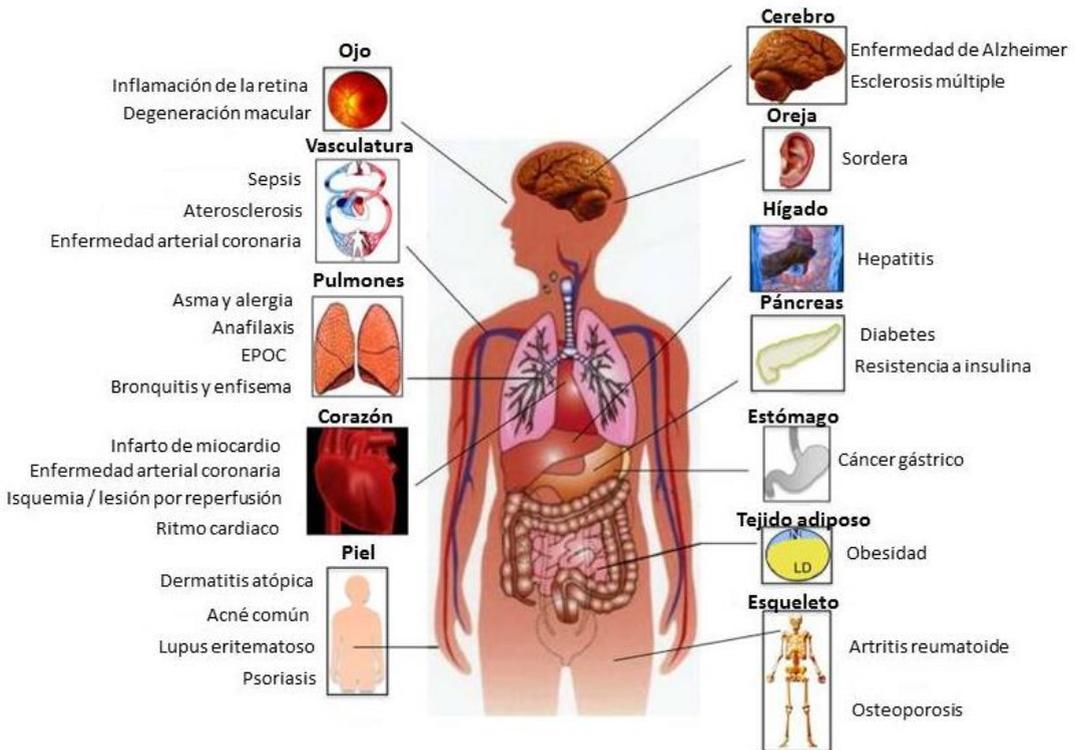


Figura 3. Implicación en procesos patofisiológicos de la S1P. La esfingosina-1-fosfato está implicada en numerosas condiciones patofisiológicas y enfermedades que afectan a la mayoría de órganos del cuerpo humano. Entre estos órganos se encuentra el ojo, la vasculatura, los pulmones, el corazón, la piel, el cerebro, la oreja, el hígado, el páncreas, el estómago, el tejido adiposo y el esqueleto. (Figura modificada de Maceyka et al., 2012).

2.3. Ruta de degradación de la S1P, SLS y hexadecenal.

Los esfingolípidos, contienen principalmente, residuos de ácidos grasos saturados. Y esta característica no los hace favorables para la β -oxidación peroxisomal (Shadyro et al., 2015).

Existe una ruta metabólica de conversión de esfingolípidos a glicerolípidos donde la S1P es un intermediario importante. La dihidroesfingosina (DHS), que es un precursor de la esfingosina-1-fosfato, se genera a través de la ruta de síntesis de esfingolípidos *de novo* y se metaboliza de manera similar a la S1P.

En mamíferos, la esfingosina-1-fosfato y la dihidroesfingosina-1-fosfato se producen a través de una ruta de biosíntesis a partir de Palmitoil-CoA. Esta ruta se muestra en la figura 4. En esta figura se observa como a partir de Palmitoil-CoA se produce la esfingosina-1-fosfato y la dihidroesfingosina-1-fosfato a través de los intermediarios: 3-cetodihidroesfingosina, dihidroesfingosina (DHS), dihidroceramida, ceramida y esfingosina (Nakahara et al., 2012).

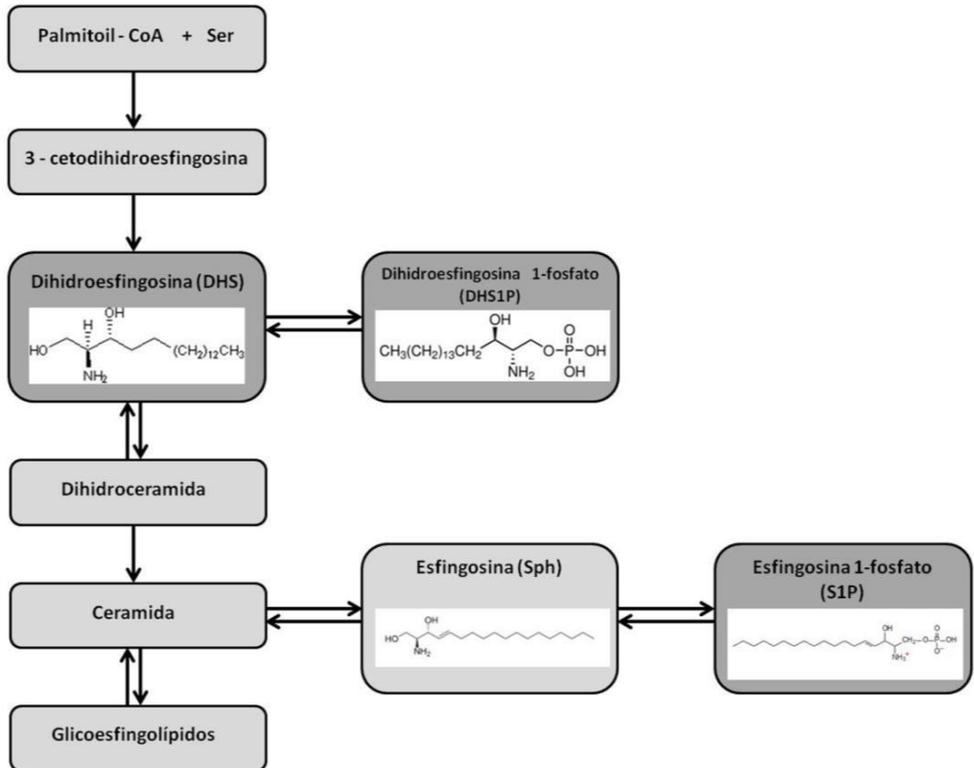


Figura 4. Ruta de biosíntesis en mamíferos de la dihidroesfingosina (DHS), la dihidroesfingosina-1-fosfato (DHS1P) y de la esfingosina-1-fosfato (S1P). La dihidroesfingosina-1-fosfato y la esfingosina-1-fosfato (remarcadas en gris oscuro), se sintetizan en mamíferos a partir de Palmitoil-CoA. Intervienen además, otros intermediarios en la ruta, como son: la 3-cetodihidroesfingosina, la dihidroceramida, la ceramida y la esfingosina. (Imagen adaptada de Nakahara et al., 2012).

En levadura, la ruta de biosíntesis de la dihidroesfingosina-1-fosfato es más sencilla que en mamíferos, tal y como se muestra en la figura 5. En este caso, esta molécula se produce a partir de Acil-CoA, a través de los intermediarios: 3-cetodihidroesfingosina y dihidroesfingosina (DHS) (Nakahara et al., 2012).

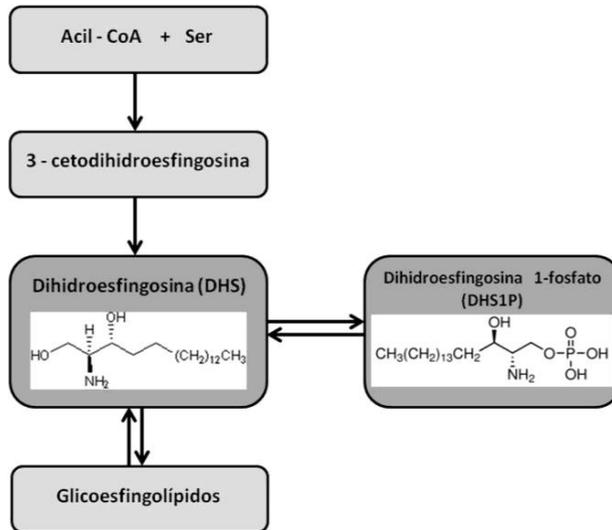


Figura 5. Ruta de biosíntesis en levadura de la dihidroesfingosina (DHS) y dihidroesfingosina-1-fosfato (DHS1P). Esta ruta de biosíntesis de la dihidroesfingosina y la dihidroesfingosina-1-fosfato, es la que tiene lugar en levadura. Estas moléculas se encuentran remarcadas en gris oscuro y su biosíntesis tiene lugar a través del intermediario: 3-cetodihidroesfingosina. (Imagen adaptada de Nakahara et al., 2012).

A pesar de las ligeras diferencias en la ruta de biosíntesis de la dihidroesfingosina y la esfingosina-1-fosfato entre mamíferos y levaduras, la ruta de degradación de ambas moléculas se encuentra conservada. Por ello, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un muy buen organismo modelo para el estudio de los esfingolípidos. Además, esta conservación se extiende a los reinos fúngico y vegetal en el caso del primer paso de esta ruta de degradación.

Introducción

La esfingosina-1-fosfato se convierte a glicerolípidos (llegando previamente a su precursor: palmitoil-CoA) en esta ruta de degradación. A través de una S1P liasa se produce un primer paso de conversión de la S1P a hexadecenal. Y el hexadecenal se convierte en palmitoil-CoA a través del ácido hexadecenoico y del hexadecenoil-CoA (figura 6).

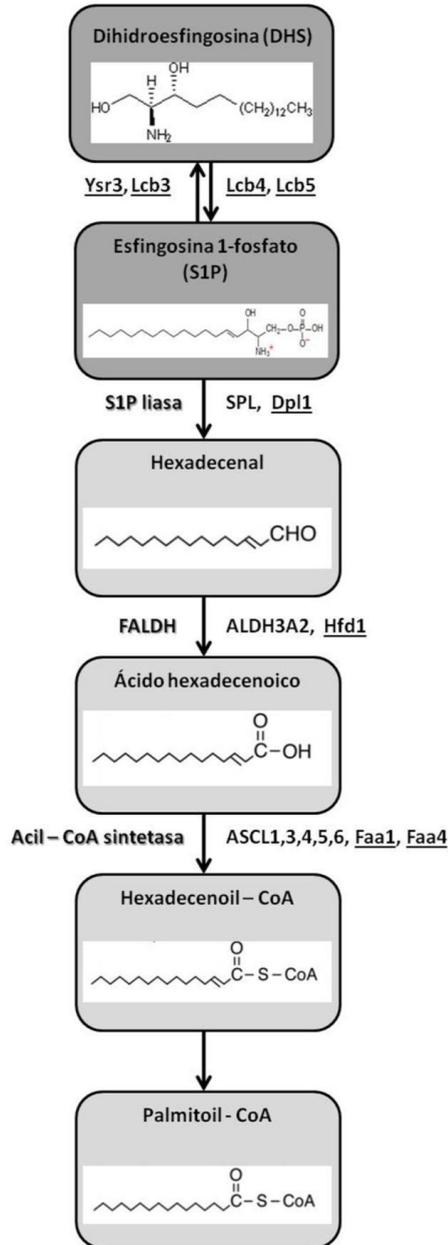


Figura 6. Ruta de degradación de la dihidroesfingosina (DHS) y la esfingosina-1-fosfato (S1P), conservada en mamíferos y levadura. Se muestran todos los intermediarios de la ruta de degradación, con sus correspondientes enzimas de levadura

Introducción

implicadas (subrayadas) y las de mamífero (en mayúscula). (Imagen adaptada de Nakahara et al., 2012).

Uno de los pasos más importantes que hay que destacar de la ruta que se muestra en la figura 6 es el paso de la S1P a hexadecenal a través de la proteína Dpl1. Se trata de una dihidroesfingosina fosfato liasa que regula los niveles intracelulares de moléculas como la esfingosina-1-fosfato (Saba et al., 1997).

El hexadecenal es un aldehído altamente reactivo que debe ser metabolizado inmediatamente a otro compuesto no tóxico, en este caso a un ácido carboxílico. Algunos de los efectos que produce el hexadecenal en las células son la reorganización del citoesqueleto y la inducción de la apoptosis (Kumar et al., 2011). Además, tiene la capacidad de formar aductos con el ADN que puede desencadenar mutaciones (Upadhyaya et al., 2012).

La enzima encargada de metabolizar el hexadecenal es la deshidrogenasa Hfd1. Esta proteína es un ortólogo de la proteína ALDH3A2, una deshidrogenasa de aldehídos grasos (FALDH “*fatty aldehyde dehydrogenase*”), que interviene en la catálisis de los aldehídos grasos en ácidos grasos (Rizzo, 2007); (Nakahara et al., 2012).

En humanos, mutaciones en el gen ALDH3A2, se asocia al Síndrome de Sjögren-Larsson (SLS). Este síndrome se trata de un desorden hereditario neurodegenerativo que se caracteriza por los síntomas de ictiosis congénita, retraso mental y espasticidad. En esta patología, la conversión del hexadecenal no se produce debido a que es la proteína

encargada de su conversión la que está mutada. De esta manera, parece ser que la acumulación de este tipo de moléculas puede provocar daño celular al reaccionar con importantes componentes celulares (Rizzo, 2007); (Nakahara et al., 2012).

3. La mitocondria.

3.1. Estructura y funciones generales.

La mitocondria es un orgánulo semiautónomo y dinámico presente en el citoplasma de las células eucariotas. Se encuentra en contacto con el citoesqueleto y otros orgánulos como el retículo endoplasmático y en las células de levadura, concretamente se encuentra formando una red tubular cercana a la membrana plasmática. Tiene su propio ADN mitocondrial (mtDNA) que se organiza en moléculas circulares de doble hebra muy compactas, denominadas nucleoides. Este mtDNA codifica para 8 proteínas en la levadura *S. cerevisiae* y 13 proteínas en el caso de humanos y diversos rRNAs y tRNAs (Foury et al., 1998); (Boore, 1999). Sin embargo, la mayor parte de proteínas mitocondriales están codificadas en genoma nuclear y tras sintetizarse en el citosol, se importan a la mitocondria (Schmidt et al., 2010).

En cuanto a su estructura, la mitocondria se caracteriza por una estructura de doble membrana (membrana externa y membrana interna), que permite separar lo que se conoce como matriz mitocondrial del citoplasma, dejando entre ellas el espacio intermembrana.

Introducción

La membrana externa es la que se encuentra en contacto con el citoplasma. Esta membrana es muy permeable y necesaria para diversos procesos celulares como son la generación de ATP, la regulación del transporte de metabolitos, regulación de la homeostasis mitocondrial y recepción y transducción de estímulos apoptóticos. Debido a su elevada permeabilidad, la composición del espacio intermembrana es muy similar a la del citoplasma. Contiene entre un 60 y un 70% de proteínas entre las que se encuentra la proteína Hfd1, de interés en este trabajo (Zahedi et al., 2006).

La membrana interna, por otro lado, se caracteriza por su elevado contenido en proteínas y por la formación de crestas o invaginaciones hacia el interior de la matriz mitocondrial que permite aumentar la superficie de la misma. En estas crestas se acumulan determinadas proteínas específicas especializadas en la generación de ATP (Vogel et al., 2006). Asociadas a ambas membranas se encuentran las llamadas porinas, que consisten en poros formados por proteínas que permiten el paso de determinadas proteínas al interior de la mitocondria.

Entre las funciones principales de la mitocondria se encuentran la generación de ATP y la formación de centros hierro-sulfuro (Pandey et al., 2012). Pero también participa en procesos como la muerte celular programada o apoptosis, el almacenamiento de iones de calcio y en diferentes rutas de señalización y diferenciación. Mediante el metabolismo mitocondrial se obtiene energía a partir de diferentes

moléculas como aminoácidos, lípidos y carbohidratos (Zhang and Qi, 2008).

Los ácidos grasos presentes en el citosol, son oxidados a acetil-CoA en la matriz mitocondrial de algunos organismos a través de la β -oxidación. En las células de levadura, como ya se ha comentado anteriormente y a diferencia de otros eucariotas, la β -oxidación de los ácidos grasos se produce íntegramente en los peroxisomas (van Roermund et al., 2003). Las moléculas de acetil-CoA obtenidas del metabolismo de lípidos, al igual que las obtenidas a partir del piruvato procedente de la glicólisis, se oxidan a CO₂ en el ciclo de los ácidos tricarbónicos (ciclo TCA).

3.2. Transportadores Crc1 y Mpc mitocondriales.

El piruvato tiene un papel muy importante en el metabolismo mitocondrial ya que es el producto final de la glicólisis y además el principal sustrato para el ciclo TCA (figura 7) (Vanderperre et al., 2015). El piruvato se internaliza al interior de la mitocondria a través del transportador Mpc (*"Mitochondrial Pyruvate Carrier"*) (Herzig et al., 2012); (Bricker et al., 2012) y allí puede ser convertido en acetil-CoA por la piruvato deshidrogenasa (PDH) para introducirse en el ciclo TCA. Además, en el interior de la mitocondria, el piruvato también puede participar en la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada (leucina o valina) (Kohlhaw, 2003); (McCommis and Finck, 2015).

Introducción

La familia MPC de levadura está constituida por tres proteínas: Mpc1, Mpc2 y Mpc3. Y la deleción de estos genes de forma individual o conjunta, lleva a una disminución del piruvato mitocondrial (Herzig et al., 2012). La función de Mpc1 está conservada en levadura, *Drosophila melanogaster* y humano. Mpc1 forma un complejo multimérico con Mpc2 localizado en la membrana mitocondrial interna (siendo Mpc1 la subunidad minoritaria y Mpc2 la mayoritaria) (Bricker et al., 2012). Este complejo se forma mayoritariamente en condiciones fermentativas, en las que el piruvato mitocondrial se desvía hacia la biosíntesis de aminoácidos. Sin embargo, en condiciones respiratorias, es el complejo formado por las proteínas Mpc1 y 3 el mayoritario y el piruvato internalizado es direccionado al ciclo TCA para la obtención de energía (Bender et al., 2015).

Por otro lado, el acetil-CoA es el producto final de la β -oxidación de los ácidos grasos que tiene lugar en los peroxisomas. La mitocondria es impermeable al acetil-CoA, por lo que para atravesar la membrana mitocondrial interna se une a la carnitina (Bieber, 1988) a través de una carnitina acetil transferasa (CAT) localizada tanto en los peroxisomas como en la mitocondria (Elgersma et al., 1995). Se conocen como CAT las proteínas Cat2 (Kispal et al., 1993), Yat1 y Yat2 (Schmalix and Bandlow, 1993), mostradas en la figura 1. La acetil-carnitina sí que puede ser transportada al interior de la mitocondria a través de una acetil-carnitina translocasa, conocida como Crc1 y que se localiza en la membrana mitocondrial interna (Palmieri et al., 1999);(Bieber, 1988). El acetil-CoA

unido a la carnitina, gracias a la misma enzima CAT es liberado de la misma para ser incorporado al ciclo TCA (van Roermund et al., 1995). (Figura 7).

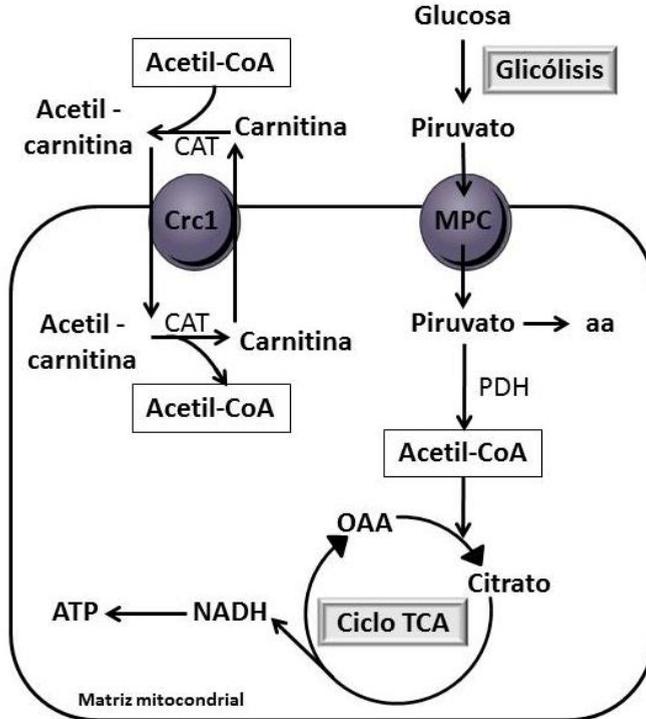


Figura 7. Representación de los transportadores Crc1 y MPC en levadura. En la levadura *S. cerevisiae* el acetil-CoA procedente de diferentes rutas, entre las que se encuentra la β -oxidación peroxisomal, se internaliza al interior de la mitocondria. Es el transportador Crc1 el encargado de internalizar esta molécula gracias a su unión a carnitina a través de una carnitina acetil transferasa (CAT). Por otro lado, el piruvato procedente de la glicólisis se internaliza al interior de la mitocondria a través de los transportadores Mpc1, 2 y 3 (MPC). (Figura adaptada de van Rossum et al., 2016).

3.3. Dinámica mitocondrial.

La mitocondria es capaz de adaptarse a diferentes estímulos ambientales y a estrés. Por ello, el número de mitocondrias, su tamaño y su morfología en las células depende del estado fisiológico y metabólico de éstas. En la levadura *S. cerevisiae* la mitocondria presenta más o menos ramificaciones dependiendo del estado metabólico de la célula y además se encuentra en constante modificación morfológica (Hoffmann and Avers, 1973); (Detmer and Chan, 2007).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un buen organismo modelo para el estudio de la mitocondria ya que, tiene la capacidad de activar y desactivar la respiración en respuesta a cambios en la fuente de carbono presente en el medio. Ante una disfunción mitocondrial severa en la que el proceso de respiración no puede producirse, las células pueden propagarse en medio fermentativo (Lasserre et al., 2015). Además, al cambiar el tipo de fuente de carbono, se puede apreciar en las células de levadura un aumento de biomasa mitocondrial tal y como se observa en la figura 8. Esta morfología mitocondrial se desarrolla a medida que las células necesitan una activación de la respiración. Por ello, al pasar de una fuente de carbono fermentativa (glucosa) a parcial o totalmente respiratoria (galactosa o glicerol, respectivamente), la mitocondria desarrolla una extensa red que se extiende por toda la célula para potenciar su actividad.

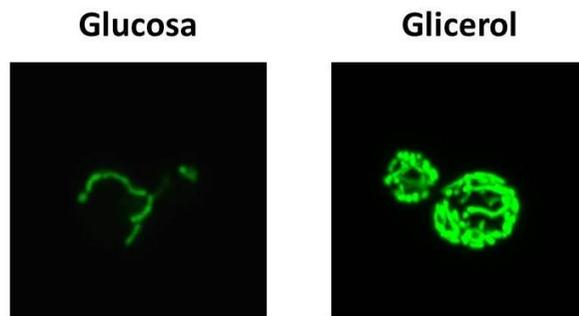


Figura 8. Representación de la morfología mitocondrial de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de glucosa y glicerol como fuentes de carbono. Se muestran células de levadura silvestre que contienen el plásmido pVT100U que expresa GFP fusionado a un péptido de localización mitocondrial (mt-GFP). Tras crecer las células toda la noche con las diferentes fuentes de carbono se observa cómo la mitocondria pasa de una forma tubular típica de “y griega” (en condiciones fermentativas con glucosa como fuente de carbono) a una red tubular más desarrollada por toda la célula (en condiciones respiratorias con glicerol como fuente de carbono).

La levadura se utiliza para la caracterización de múltiples rutas mitocondriales y presenta un elevado grado de conservación de estas rutas entre humano y levadura. Por ello, se ha convertido en un modelo muy valioso para el estudio de enfermedades mitocondriales humanas (Rutter and Hughes, 2015).

Los procesos de fusión y fisión son necesarios para el correcto funcionamiento mitocondrial, para la adaptación morfológica respiratoria comentada, así como para una correcta regulación de la herencia de la misma (Berman et al., 2008). Disfunciones en estos procesos se han relacionado con diferentes patologías, con procesos de desarrollo embrionario y envejecimiento. Además, se ha sugerido que las especies

ROS actúan sobre proteínas de fisión y fusión mitocondriales (Willems et al., 2015).

3.3.1. Fisión y fusión mitocondrial.

El proceso de fisión mitocondrial está mediado por las GTPasas Drp1 (en mamíferos) o Dnm1 (en levadura) conservadas evolutivamente. En levadura, gracias al receptor de membrana Fis1 se produce el reclutamiento de la proteína Mdv1 a la membrana mitocondrial. Y este dímero recluta a Dnm1, el cual forma estructuras multiméricas tubulares, se produce la hidrólisis de GTP y desencadena la fisión mitocondrial (Zhao et al., 2013).

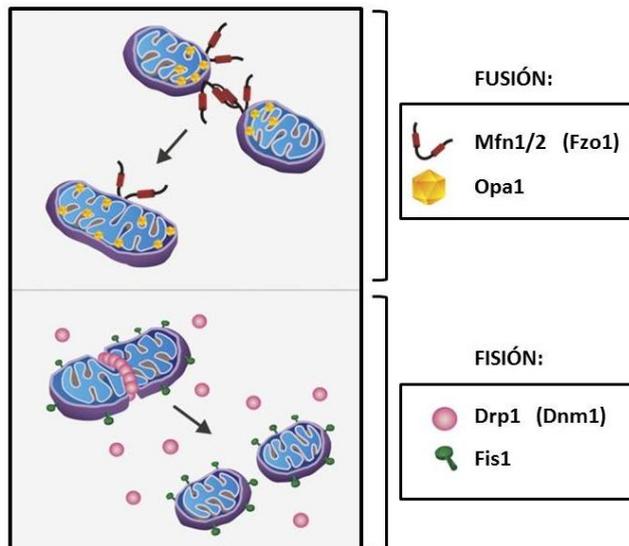


Figura 9. Esquema de la fusión y fisión mitocondrial. Representación esquemática de la fusión y fisión mitocondrial y de su maquinaria principal en mamífero y levadura (en paréntesis). (Figura modificada de Powers et al., 2012).

Por otro lado, el proceso de fusión mitocondrial está muy bien caracterizado en *S. cerevisiae* y se requieren las proteínas Fzo1 y Ugo1 (presentes en la membrana mitocondrial externa) y la proteína Mgm1 (presente en la membrana mitocondrial interna). Las proteínas Fzo1 de diferentes mitocondrias interaccionan formando complejos que permiten fusionar las membranas mitocondriales externas, gracias a su función GTPasa (Zhao et al., 2013). La proteína encargada de realizar esta fusión pero en este caso, con las membranas mitocondriales internas de diferentes mitocondrias es la proteína Mgm1. En este proceso, la proteína Ugo1 interacciona con las proteínas anteriormente comentadas para coordinar la fusión entre ambas membranas (Hoppins et al., 2009).

3.4. Estrés celular y mitocondria.

Cuando las condiciones de crecimiento de una célula no son óptimas, se dice que está en situación de estrés, ante la cual debe desencadenar mecanismos de percepción y respuesta que permitan su adaptación, supervivencia y crecimiento. Las condiciones del medio que desencadenan un estrés celular pueden ser muy diferentes, desde cambios en factores como pH, osmolaridad, temperatura a diferentes nutrientes y agentes tóxicos. Estos cambios son detectados por receptores específicos en las células que permiten transducir la señal. De esta forma, gracias, por ejemplo, a una reprogramación génica que se produce debido a esta señalización, se activan los mecanismos de adaptación de la célula y se producen los cambios adaptativos para sobrevivir al estrés en cuestión.

Se han realizado múltiples estudios de la regulación de la expresión génica en levadura que se produce ante diferentes estreses. Los más interesantes para este trabajo son el osmótico (Martinez-Montanes et al., 2010) y el oxidativo (de la Torre-Ruiz et al., 2015).

La mitocondria es un orgánulo con una elevada especificidad, que tiene un papel muy importante en la adaptación a estrés, ya que como se ha comentado en apartados anteriores, puede modificar sus procesos fisiológicos y su morfología para adaptarse al mismo.

El estrés osmótico puede estar producido por una baja disponibilidad de agua en el ambiente o por elevadas concentraciones de iones como el Na^+ . Este tipo de estrés afecta a la membrana plasmática a nivel de permeabilidad, estructura y propiedades mecánicas. Esto es debido a la alteración de su conformación lipídica y por tanto, del nivel de distribución, síntesis y funcionalidad de las proteínas transmembrana, transportadores y osmosensores localizados en ella.

Estudios anteriores en nuestro grupo de investigación han demostrado que la mitocondria tiene un papel fundamental en la adaptación de las células a estrés osmótico. Se ha visto que mutantes en varias funciones mitocondriales, como la respiración mitocondrial, el ciclo de Krebs o de biogénesis, son sensibles a estrés causado por estrés salino y acumulan más ROS durante dicho estrés. Además, las proteínas quinasas Hog1 y Snf1 coordinan la activación de genes involucrados en la respiración mitocondrial en presencia del estrés comentado (Pastor et al., 2009). Se han identificado algunas proteínas que se acumulan en la

mitocondria durante la adaptación al estrés salino, entre las que se encuentran Lsp1, Mcr1, Rdl1, Om14 y Hfd1 (esta última tiene especial interés en este trabajo) (Martinez-Pastor et al., 2010).

Se ha descrito una adaptación más específica al estrés salino, que está relacionada con el transportador de piruvato mitocondrial: Mpc. Ante condiciones de estrés salino, se induce la formación de un complejo Mpc1/Mpc3 más eficiente para permitir un mayor importe de piruvato al interior de la mitocondria (Timón-Gómez et al., 2013).

El estrés oxidativo, por otro lado, se genera por la formación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS). Éstas se producen por la reducción parcial del O_2 durante la respiración mitocondrial, la β -oxidación de los ácidos grasos o la exposición a radiación, luz y determinadas drogas.

Se necesita un correcto mantenimiento del medio redox para evitar la formación de estos reactivos y así permitir que se den correctamente las reacciones metabólicas de oxidación-reducción de la célula. Las ROS son altamente reactivas y algunas de las más conocidas son el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión superóxido (O_2^-), o el radical hidroxilo ($OH\cdot$). La presencia de estas especies provoca que las proteínas se agreguen o fragmenten, la peroxidación de lípidos y la oxidación del ADN, que desencadena roturas, mutagénesis o un bloqueo de la replicación provocando el declive funcional conocido como envejecimiento (Davies, 1987). Además se ha visto que las células que mueren por apoptosis, así como las que mueren debido al envejecimiento, acumulan radicales libres (Simon et al., 2000).

La mitocondria también tiene un papel muy importante en la regulación de las ROS para una correcta adaptación de las células a estrés oxidativo (Manoli et al., 2007). Aunque las mitocondrias también han desarrollado sus propios mecanismos de detoxificación de estas especies a nivel enzimático, como son: las superóxido dismutasas (Culotta et al., 1995), las catalasas (Marchler et al., 1993) y las peroxidasas (Brigelius-Flohe, 2006). Y también a nivel no enzimático, como son: el glutatión (Folch-Mallol et al., 2004), las metalotioneínas (Hamer, 1986), la vitamina E (Raspor et al., 2005), la ubiquinona (Frei et al., 1990), las poliaminas y el ácido ascórbico (Kim et al., 1996). A pesar de ello, es posible que los niveles de ROS de las células superen la capacidad de las mismas de detoxificarlas, pudiendo generar graves daños que desencadenan mecanismos apoptóticos.

En cuanto a la regulación del estrés oxidativo a nivel transcripcional, se deben destacar dos factores de transcripción que participan de forma cooperativa en esta respuesta. Estos son: Yap1 y Skn7. La ruta mediada por Yap1 se activa gracias a la existencia de sensores de equilibrio redox. Yap1, que se localiza en el citoplasma en ausencia de estrés, se concentra en el núcleo en presencia de oxidantes. De esta manera se activa la expresión de genes que codifican antioxidantes y otros genes de respuesta a estrés (Lee et al., 1999). Los sensores de equilibrio comentados contienen residuos de cisteína, que son los encargados de transducir la señal y de activar proteínas involucradas en la respuesta. Varias de éstas requieren la presencia de Skn7, que contiene un dominio receptor y otro de respuesta a estrés (Morgan et al., 1997).

3.5. Ruta HOG.

Las células poseen sus propios sistemas de osmorregulación para defenderse frente al estrés osmótico. De esta manera, estos sistemas permiten mantener la homeostasis celular y el equilibrio osmótico entre el exterior y el interior celular. Tras la detección de este tipo de estrés, la levadura *S. cerevisiae* activa una cascada de señalización de MAP quinasas HOG (“*High Osmolarity Glycerol*”) que permite un reajuste de la expresión génica y proteica (Hohmann, 2009). La activación de HOG permite estimular la expresión de genes que codifican para la biosíntesis de glicerol, el mayor osmolito en levadura y de esta manera contrarrestar la concentración de solutos extracelulares para reestablecer el equilibrio osmótico.

Hog1 tiene la capacidad de modular funciones de transporte en la membrana plasmática (Proft and Struhl, 2004) y adapta a las condiciones de estrés la eficiencia de la traducción (Warringer et al., 2010) y la progresión del ciclo celular (Duch et al., 2012). Esta ruta HOG, permite activar un complejo programa transcripcional en el que participan varios factores de transcripción como: Sko1, Hot1, Smp1, Rtg1/3, Msn2 y Msn4 (Montanes et al., 2011); (Saito and Posas, 2012). La actividad de estos factores produce la estimulación transcripcional de muchos genes que están involucrados en diferentes aspectos fisiológicos de la respuesta a estrés (Posas et al., 2000).

La ruta HOG puede activarse por dos vías diferentes. Una vía se basa en el sistema de dos componentes de la histidina quinasa Sln1, que se

activa debido a pequeñas variaciones de osmolaridad celular. Y la otra vía se basa en el sistema osmosensor Sho1, el cual requiere diferencias más significativas en la osmolaridad celular (Hohmann, 2009).

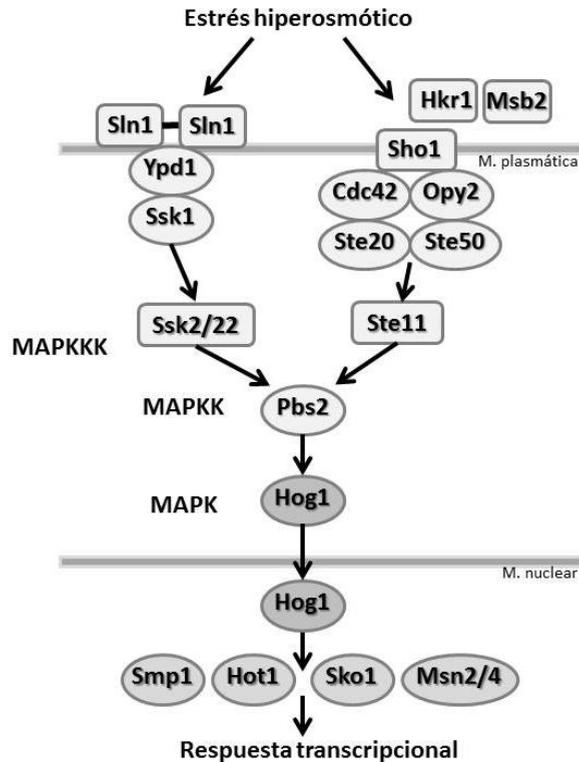


Figura 10. Ruta HOG ("High osmolarity glycerol") en la levadura *S. cerevisiae*. El estrés osmótico puede detectarse a partir de dos mecanismos independientes. A través del osmosensor Sln1, se activan las MAP quinasas Ssk2 y Ssk22. Y a través del osmosensor Sho1 se activa la MAP quinasa Ste11. La transmisión de la señal a través de cualquiera de las dos vías converge en la activación de Pbs2 que es un activador de Hog1. Hog1 se acumula en el núcleo en respuesta a estrés y activa un complejo programa transcripcional en el que participan los factores de transcripción: Smp1, Hot1, Sko1 Msn2 y Msn4. (Figura adaptada de Hohmann, 2009).

3.6. Ruta retrógrada.

Ante una disfunción mitocondrial, la pérdida de ADN mitocondrial o por una disminución en la disponibilidad de nutrientes, la actividad mitocondrial puede regular la expresión de determinados genes nucleares. El daño producido desencadena una bajada del potencial de membrana mitocondrial y activa esta respuesta. Este fenómeno se conoce como respuesta retrógrada (RTG) y abarca todo un conjunto de señales metabólicas que se emiten desde la mitocondria y provocan un cambio en el patrón de expresión de los genes nucleares implicados en la biogénesis y diversas funciones mitocondriales (Liao and Butow, 1993).

La ruta retrógrada depende de tres proteínas principales: Rtg1, Rtg2 y Rtg3. Los factores de transcripción Rtg1 y Rtg3 forman un heterodímero que reconoce secuencias específicas de ADN: GTCAC (*R box*). Este complejo heterodimérico Rtg1/3, cuando se activa (a través del dominio de activación de Rtg3) se transloca del citoplasma al núcleo para controlar la expresión de determinados genes diana que codifican proteínas mitocondriales (Jia et al., 1997). Para permitir esta translocación, Rtg3 se desfosforila parcialmente gracias a la actuación de Rtg2. Además, esta ruta puede estar regulada negativa o positivamente por las proteínas Mks1, Bmh1 y Grr1 (da Cunha et al., 2015). Además, el complejo 1 de la ruta TOR (TORC1) también parece ser un regulador negativo de esta ruta (Giannattasio et al., 2005).

La RTG interactúa con múltiples rutas de señalización en la célula y también está relacionada con la resistencia a estrés osmótico. La expresión

de genes de la ruta retrógrada se ve activada bajo este tipo de estrés y depende de la Map quinasa Hog1. Hog1 interacciona con los factores Rtg1/3 y permite su translocación al núcleo. Aunque la presencia de Hog1 es suficiente para la translocación nuclear de Rtg1/3, su actividad es necesaria para la unión de este heterodímero a la cromatina (Ruiz-Roig et al., 2012).

Ante la activación de la RTG las células alteran la expresión de más de 400 genes que desencadenan cambios en el metabolismo celular. Uno de los cambios que se puede destacar es la activación del ciclo del glioxilato en los peroxisomas (Epstein et al., 2001).

3.7. Complejo ERMES.

Se ha propuesto que la mitocondria está estructuralmente y funcionalmente ligada a otros orgánulos a través de proteínas que residen en la membrana mitocondrial externa. Estas interacciones entre orgánulos forman lugares únicos que regulan la biosíntesis, transporte de lípidos y la señalización del Ca^{2+} entre orgánulos (Scorrano et al., 2003); (Walter and Hajnoczky, 2005).

Esta conexión entre orgánulos celulares es necesaria para una buena homeostasis celular. La mitocondria, por tanto, además de sus funciones energéticas y reguladoras del metabolismo del calcio y de la apoptosis, tiene un papel importante en el metabolismo de lípidos. Muchos lípidos y proteínas necesarios para la biogénesis mitocondrial necesitan ser

importados a la mitocondria ya que no se sintetizan en la misma. Los lípidos de membrana por ejemplo, se sintetizan principalmente en el retículo endoplasmático y se distribuyen a otros orgánulos (Kornmann et al., 2009). Se sabe bastante sobre el importe de proteínas a la mitocondria. Sin embargo, hay poco conocimiento acerca de la transferencia de fosfolípidos a la mitocondria. La síntesis de fosfolípidos tiene lugar en su mayor parte en el retículo endoplasmático y la mitocondria los adquiere del mismo a través de zonas concretas de contacto entre ambos orgánulos (Lang et al., 2015). En estas zonas de contacto de membrana, se transfieren desde lípidos hasta pequeñas moléculas de señalización y no sólo son importantes como se ha comentado para el intercambio de lípidos, si no que estos contactos también son importantes para la señalización del calcio (Kornmann, 2013), para la apoptosis, la enfermedad de Alzheimer y la replicación viral (Kornmann and Walter, 2010); (Lahiri et al., 2014).

En levadura, se ha identificado el complejo ERMES (*“ER-mitochondria encounter structure”*), que está compuesto por la glicoproteína del retículo endoplasmático Mmm1, la proteína citosólica Mdm12 y dos proteínas de la membrana externa mitocondrial, Mdm10 y Mdm34 (Kornmann et al., 2009). Con una disfunción en alguna de estas cuatro proteínas, parece ser que el complejo pierde su función (Lahiri et al., 2014). (Figura 11). Para la función de este complejo principalmente se ha propuesto el transporte de fosfolípidos del retículo a la mitocondria (Lang et al., 2015). Pero además es importante mencionar que recientemente se ha encontrado una función de ERMES en la iniciación de

Introducción

la fisión mitocondrial en el proceso de mitofagia (Böckler and Westermann, 2014).

Resultados recientes han demostrado que además, existe una relación con la peroxina Pex11. Como ya se ha comentado en apartados anteriores, esta peroxina es importante para la proliferación peroxisomal. Se ha visto que deleciones en los genes *MDM10*, *12* y *34*, varían la localización de Pex11. Además, existe una interacción entre Pex11 y Mdm34 que permiten establecer el contacto entre mitocondria y retículo endoplasmático a través de este complejo. Se ha propuesto, por lo tanto, que los componentes citosólicos y mitocondriales del complejo ERMES establecen una interacción directa entre peroxisomas y mitocondria a través de Pex11 (Mattiuzzi Usaj et al., 2015).

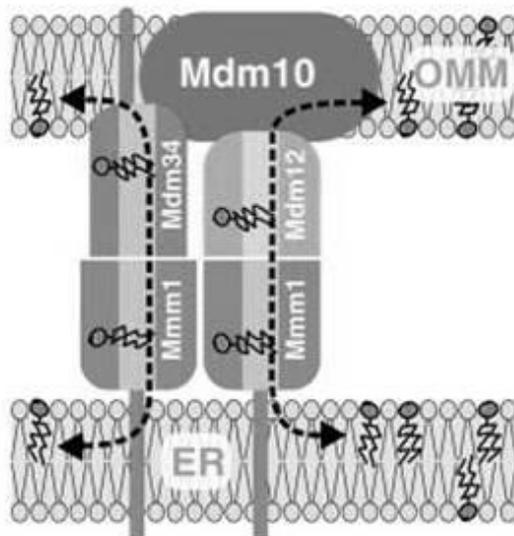


Figura 11. Complejo ERMES. El complejo ERMES permite la conexión entre el retículo endoplasmático (ER) y la mitocondria. Está compuesto por la glicoproteína de retículo Mmm1, la proteína citosólica Mdm12 y dos proteínas de la membrana

mitocondrial externa (OMM), Mdm10 y Mdm34. Este complejo permite el transporte de fosfolípidos a la mitocondria, entre otras posibles funciones. (Imagen modificada de Lang et al., 2015).

4. Relación de los esfingolípidos con el estrés celular y osmótico.

Los esfingolípidos se han visto implicados en la protección de las células frente a distintos tipos de estrés, entre los que se encuentran el estrés térmico, el estrés osmótico y el estrés oxidativo.

En primer lugar, se ha determinado que la inhibición de la biosíntesis de ergosterol, induce la activación de la ruta HOG. Las vías de activación de la ruta HOG parece ser que se localizan en membranas ricas en rafts lipídicos y su activación se produce, principalmente por la ausencia de esfingolípidos complejos y no tanto por la acumulación de intermediarios biosintéticos de esfingolípidos. Esta activación, al igual que ocurre por estrés osmótico, tiene lugar vía Sln1 y vía Sho1. Sin embargo, afecta a estos componentes de distinta manera. Cambios en las propiedades físicas y estructurales de los rafts lipídicos podría influir en la detección del estrés osmótico en levadura. A pesar de ello, todavía es necesario ampliar la investigación en este campo (Tanigawa et al., 2012).

Una conexión entre estrés osmótico y esfingolípidos es que el estrés salino lleva a una disminución de esfingolípidos por activar su degradación y/o inactivar su biosíntesis. Esto se observó gracias a la inducción transcripcional en levadura de algunos pasos de la degradación de esfingolípidos comentada anteriormente, por estrés salino (NaCl). Los

Introducción

genes que desplazaban la ruta hacia la degradación de esfingolípidos se encontraban activados, mientras que los genes que desplazaban la ruta hacia la biosíntesis de esfingolípidos complejos, se encontraban reprimidos. En la figura 12 se muestra un esquema de los genes activados (en verde) y reprimidos (en rojo) en respuesta a estrés salino (Ni et al., 2009).

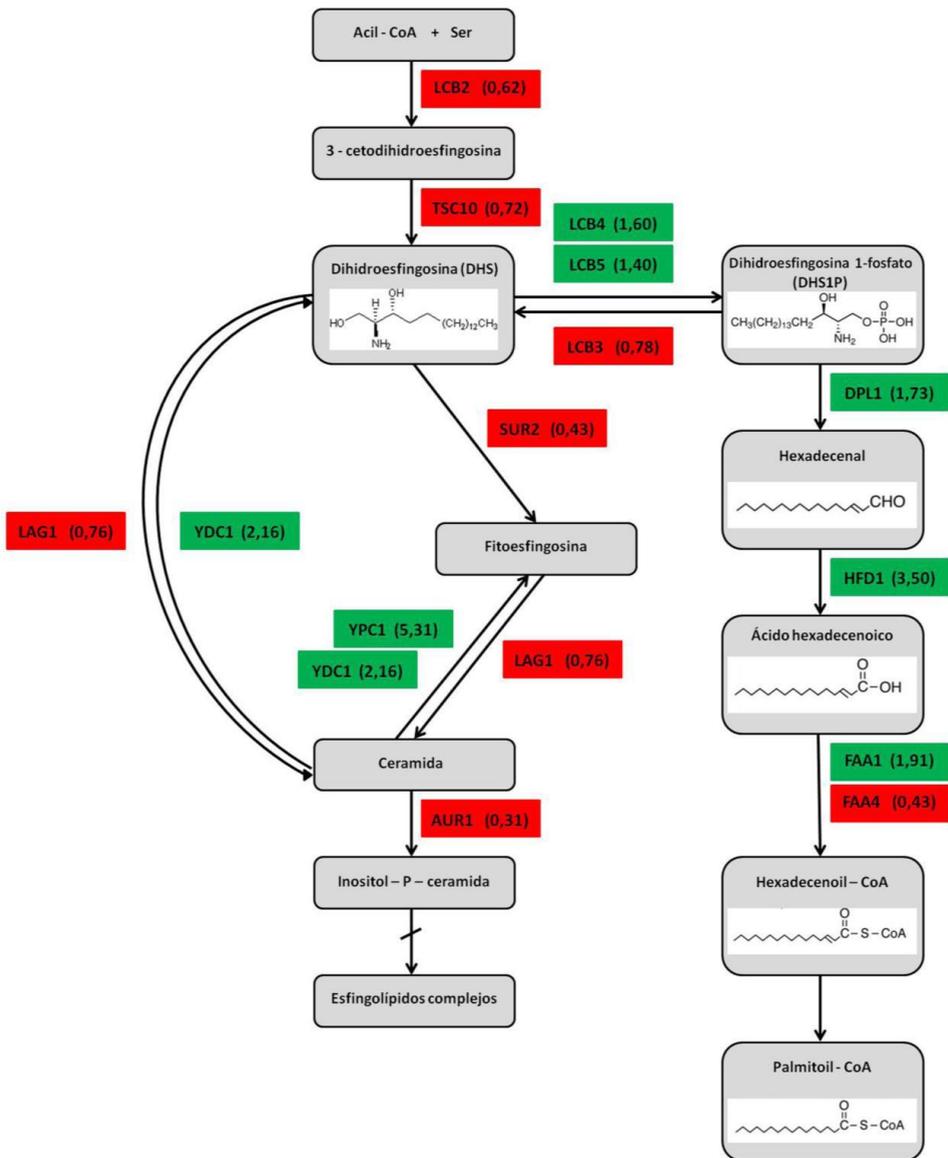


Figura 12. Regulación transcripcional de la biosíntesis y degradación de esfingolípidos en respuesta a estrés por NaCl. Se muestra la ruta de degradación de la dihidroesfingosina y de la formación de esfingolípidos complejos, en levadura. Se muestran en verde los genes que tienen una regulación positiva: *LCB4*, *LCB5*, *DPL1*, *HFD1*, *FAA1*, *YDC1* e *YPC1*, y que por tanto se activan en respuesta a estrés salino. Y en rojo se muestran los genes que tienen una regulación negativa: *LAG1*, *YDC1*, *YPC1*, *LCB2*, *TSC10*, *LCB3*, *FAA4*, *SUR2*,

LAG1 y *AUR1* y que se reprimen en respuesta a dicho estrés. (Figura con datos adaptados de Ni et al., 2009).

A pesar de estas evidencias, la disminución de esfingolípidos por estrés osmótico se desconoce, pero sí se ha visto con ergosterol. La disminución de este compuesto es un determinante importante en la adaptación a estrés osmótico (Montanes et al., 2011).

5. Hexadecenal y apoptosis.

Se conocen tres tipos de muerte celular, la apoptosis (también conocida como muerte celular de tipo I), la autofagia (tipo II) y la necrosis (tipo III) (Kroemer et al., 2007). La más estudiada en el presente trabajo es la apoptosis, que se caracteriza por la formación de ampollas en la membrana a la vez que se encoge la célula y se condensa la cromatina (Kerr et al., 1972).

La apoptosis puede ser activada a través de receptores apoptóticos o vía mitocondrial. Esta última vía, también conocida como la ruta intrínseca, es la apoptosis más común que tiene lugar en vertebrados. Esta activación de la apoptosis se muestra en la figura 13. Se activa en respuesta a diferentes estreses celulares, entre los que se incluyen el daño al ADN, la privación de factores de crecimiento o el estrés de retículo endoplasmático. Y concluye con la activación de las caspasas efectoras que se activan mediante corte por la caspasa-9, activada a su vez por el apoptosoma como se explicará a continuación (Bratton and Salvesen, 2010).

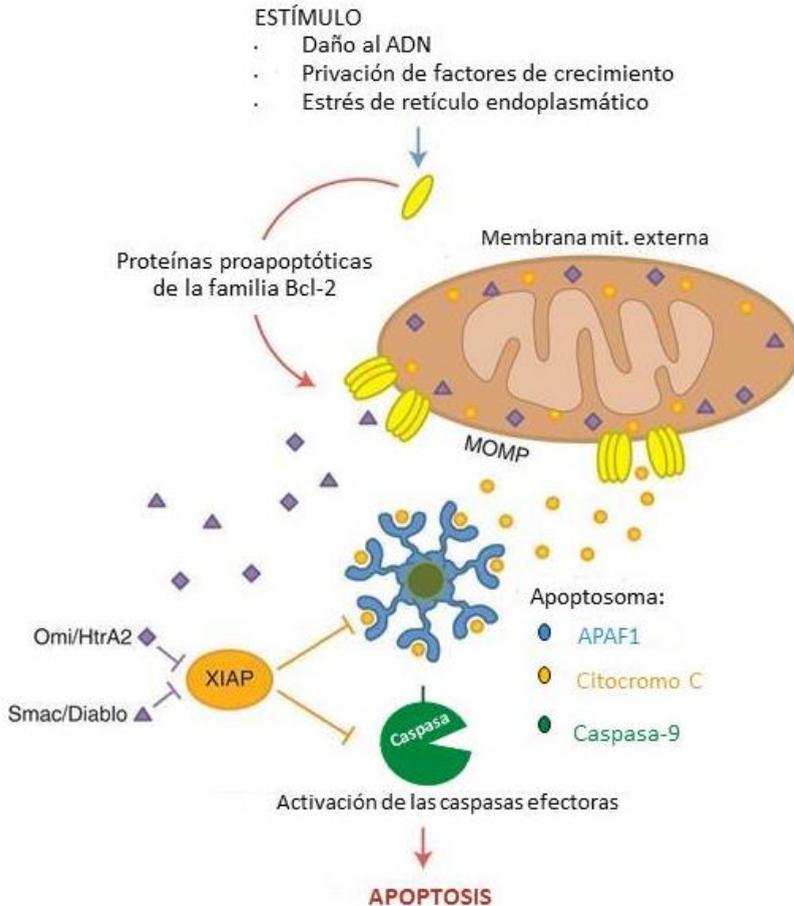


Figura 13. Apoptosis activada vía mitocondrial en mamíferos. En respuesta a diferentes estreses celulares, miembros de la familia Bcl2 proapoptótica induce la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP: “mitochondrial outer membrane permeabilization”), permitiendo la liberación al citosol de factores propapoptóticos del espacio intermembrana mitocondrial (incluyendo citocromo c, Smac y Omi). En el citosol, el citocromo c se une a APAF1 y permite su oligomerización. Esta plataforma recluta a la caspasa-9 y la activa, formando el conocido apoptosoma. La caspasa-9 catalíticamente activa, corta y activa las caspasas efectoras -3 y -7. Omi y Smac, en el citosol, se encargan de inhibir el inhibidor de caspasas (XIAP: “X-linked Inhibitor of Apoptosis”), permitiendo una mayor activación de caspasas por el apoptosoma. (Figura modificada de Fabien Llambi, 2015).

En células sanas, el citocromo c sólo se encuentra en el espacio intermembrana mitocondrial. Tras un estímulo apoptótico, se produce la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, tal y como se muestra en la figura 13, permitiendo la salida del citocromo c y su interacción con APAF1 (Tait and Green, 2013). Esta permeabilización permite además, la salida de otros factores del espacio intermembrana al citosol, como son Smac (también conocida como Diablo) y Omi (también conocida como HtrA2). Estos factores son antagonistas de los inhibidores de caspasas, potenciando la apoptosis (Eckelman et al., 2006).

La permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP) es un evento regulado por miembros de la familia Bcl2, que comparten uno o más dominios BH homólogos. Se conocen tres clases de proteínas Bcl2: las proapoptóticas efectoras Bax y Bak, que son necesarias para la permeabilización; las proteínas antiapoptóticas Bcl2 (Bcl2, Bcl-xL y Mcl1), que bloquean esta permeabilización; y las proteínas de un único dominio BH3 (Bid, Bim, Bad y Noxa), que activan a los proapoptóticos efectores y/o neutralizan las proteínas antiapoptóticas Bcl2 (Chipuk et al., 2010).

Bax y Bak son las responsables directas de la pérdida de la integridad de la membrana mitocondrial externa. Tras su activación, forman oligómeros que se insertan en la membrana y provocan su disrupción tal y como se muestra en la figura 14 (Dewson and Kluck, 2009). Al menos una de estas dos proteínas se requiere para producir esta permeabilización, ya que tienen función redundante.

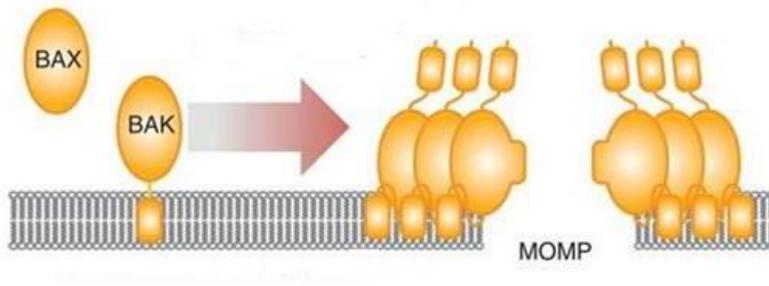


Figura 14. Inducción de la permeabilización de la membrana mitocondrial externa por Bax y Bak. Los efectores propapoptóticos residen en las células de una forma inactiva, unidas a la membrana mitocondrial externa (Bak) o de forma soluble en el citosol (Bax). Tras su activación, Bax y Bak oligomerizan y se insertan en la membrana, provocando su permeabilización (MOMP) y como consecuencia la apoptosis. (Figura adaptada de Fabien Llambi, 2015).

La levadura *S. cerevisiae* no posee homólogos obvios de las proteínas apoptóticas de mamífero comentadas, por lo que es un buen sistema modelo para estudiar la función de estas proteínas en relación con la apoptosis regulada a través de la mitocondria (Priault et al., 2003). En levadura, el citocromo c presente en el citosol no produce la misma activación de las caspasas que tiene lugar en mamíferos (Priault et al., 1999). La liberación de los factores mitocondriales produce la activación de una serie de proteasas, entre las que se encuentra la caspasa Yca1 (Madeo et al., 2004). Pero también existe una ruta alternativa que implica la activación de la proteína Uth1, presente en la membrana mitocondrial externa y relacionada con procesos de autofagia en levadura (Camougrand et al., 2003).

En levadura, la proteína Ybh3 es la que actúa de forma similar a Bax de mamíferos. Esta proteína muestra una localización vacuolar en condiciones normales. Sin embargo, se ha visto que ante un estímulo apoptótico, se transloca de la vacuola al citosol, colocaliza con la mitocondria y contribuye a la muerte celular inducida por ácido acético (Buttner et al., 2011). Pero Ybh3 también se ha descrito con una función anti-apoptótica (Cebulski et al., 2011).

Los esfingolípidos, no son sólo elementos estructurales de las membranas celulares, sino que además son moléculas de señalización esenciales. Se ha propuesto que el metabolismo de esfingolípidos regula la apoptosis, pero realmente no se sabe el nexo de unión entre éstos y la familia de proteínas Bcl2 (Hannun and Obeid, 2008). Cuando se aplica a las células ceramidas exógenas, se promueve la apoptosis (Obeid et al., 1993). Y como se ha comentado en apartados anteriores la ceramida es un precursor de la esfingosina-1-fosfato y del hexadecenal, que parece ser que también intervienen en la permeabilización de la membrana externa mitocondrial por facilitar la activación de Bax y Bak. La mitocondria, además, podría estar regulando la composición de esfingolípidos a través de esta ruta comentada (Chipuk et al., 2012).

El hexadecenal es un aldehído de especial interés en este trabajo, como ya se ha comentado, y se ha relacionado con la apoptosis. Existen pocos estudios sobre esta relación, pero se ha establecido que el hexadecenal se asocia físicamente a Bax de forma específica e induce MOMP en mitocondrias de mamíferos in vitro (Chipuk et al., 2012).

Además, se ha visto que la quinasa JNK regula la apoptosis mediada por hexadecenal (Kumar et al., 2011). Por lo tanto es importante descifrar la función de intermediarios del metabolismo de esfingolípidos in vivo, su posible regulación por estrés y su impacto en la muerte celular inducida. Este objetivo de investigación se ha realizado en esta tesis utilizando el modelo de levadura.

Objetivos

Para estudiar la regulación de la actividad peroxisomal y el metabolismo de esfingolípidos, así como su adaptación a estrés, se proponen cuatro objetivos específicos:

- Determinar la función de los peroxisomas en la adaptación a estrés salino.
- Caracterizar los mecanismos moleculares de la regulación de la actividad y biogénesis peroxisomal por estrés salino.
- Determinar la función y regulación del metabolismo de esfingolípidos en la respuesta a estrés.
- Caracterizar la regulación de la función mitocondrial y muerte celular por intermediarios del metabolismo de esfingolípidos.

Materiales
 y
 métodos

1. Cepas y condiciones de cultivo de bacterias.

En el presente trabajo se empleó la cepa de *E. coli* DH5 α ($F'\Phi80dlacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF) deoRrecA1 endA1 hsdR17(rK-mK^+)phoA supE44 \lambda^{-1} thi^{-1}$) para la propagación y aislamiento de plásmidos. Y para el cultivo y la manipulación de las bacterias se siguieron los métodos estándar (Sambrook and Russell, 2006).

El medio de cultivo empleado para el crecimiento de estas bacterias fue el LB (Luria Bertani) sólido o líquido, compuesto por 0,5% de extracto de levadura, 1% de triptona y 1% de cloruro sódico. Para la selección de plásmidos se suplementó con kanamicina (100 $\mu\text{g/ml}$) o ampicilina (50 $\mu\text{g/ml}$), según se requería. Las condiciones de cultivo de las bacterias fueron a 37 $^{\circ}$ C y en agitación en caso del medio líquido (180 – 200 rpm).

2. Cepas y condiciones de cultivo de levadura.

Las cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que se utilizaron para realizar el presente trabajo se muestran en la tabla 2.

Cepa	Genotipo	Procedencia
BY4741	MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0	EUROSCARF
BY4741 <i>pex3</i>	BY4741 <i>pex3::KanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>pex19</i>	BY4741 <i>pex19::KanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>pox1</i>	BY4741 <i>pox1::KanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>fox2</i>	BY4741 <i>fox2::KanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>eci1</i>	BY4741 <i>eci1::KanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>hog1</i>	BY4741 <i>hog1::KanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>oaf1</i>	BY4741 <i>oaf1::KanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>adr1</i>	BY4741 <i>adr1::KanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>rtg1</i>	BY4741 <i>rtg1::KanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>crc1</i>	BY4741 <i>crc1::KanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>mpc1</i>	BY4741 <i>mpc1::KanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>faa1</i>	BY4741 <i>faa1::KanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>faa4</i>	BY4741 <i>faa4::KanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>fzo1</i>	BY4741 <i>fzo1::KanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>hfd1</i>	BY4741 <i>hfd1::KanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>dpl1</i>	BY4741 <i>dpl1::KanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>fis1</i>	BY4741 <i>fis1::KanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>dnm1</i>	BY4741 <i>dnm1::KanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>ybh3</i>	BY4741 <i>ybh3::KanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>mdm12</i>	BY4741 <i>mdm12::KanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>mdm10</i>	BY4741 <i>mdm10::KanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>vps1</i>	BY4741 <i>vps1::KanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>rtg2</i>	BY4741 <i>rtg2::KanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 ADR1-HA	BY4741 ADR1-3xHA::KAN MX	Este estudio
<i>hog1</i> ADR1-HA	BY4741 ADR1-3xHA::KAN <i>loxp hog1::KAN MX</i>	Este estudio
BY4742 GFP ⁺ -PTS1	BY4742 <i>can1::GFP⁺-PTS1</i>	E. Hettema
BY4742 GFP ⁺ -PTS1 <i>Faa1-dsRed</i>	BY4742 <i>can1::GFP⁺-PTS1</i> con el plásmido pAG423-GPD-FAA1-dsRed (HIS3)	Este estudio
BY4741 GFP-PTS1	BY4741 con el plásmido pTPI11-GFP-PTS1 (URA3)	Este estudio
BY4741 <i>Faa1-dsRed</i>	BY4741 con el plásmido pAG423-GPD-FAA1-dsRed (HIS3)	Este estudio
<i>hog1</i> GFP-PTS1	BY4741 <i>hog1::KAN</i> con el plásmido pTPI1-GFP-PTS1 (URA3)	Este estudio
<i>rtg1</i> GFP-PTS1	BY4741 <i>rtg1::KAN</i> con el plásmido pTPI1-GFP-PTS1 (URA3)	Este estudio
<i>rtg2</i> GFP-PTS1	BY4741 <i>rtg2::KAN</i> con el plásmido pTPI1-GFP-PTS1 (URA3)	Este estudio
<i>fis1</i> GFP-PTS1	BY4741 <i>fis1::KAN</i> con el plásmido pTPI1-GFP-PTS1 (URA3)	Este estudio
<i>dnm1</i> GFP-PTS1	BY4741 <i>dnm1::KAN</i> con el plásmido pTPI1-GFP-PTS1 (URA3)	Este estudio
<i>vps1</i> GFP-PTS1	BY4741 <i>vps1::KAN</i> con el plásmido pTPI1-GFP-PTS1 (URA3)	Este estudio
BY4741 GFP-PTS, Om14-dsRed	BY4741 con el plásmido pTPI1-GFP-PTS1 (URA3) y pAG423-GPD-OM14-dsRed (HIS3)	Este estudio
BY4741 GST-Hog1	BY4741 con el plásmido pRS426TEG1HOG1 (URA3)	Este estudio
ADR1-TAP, GST	BY4741 ADR1-TAP-HIS3 con el plásmido pRS426TEG (URA3)	Este estudio
ADR1-TAP, GST-Hog1	BY4741 ADR1-TAP-HIS3 con el plásmido pRS426TEG1HOG1 (URA3)	Este estudio
BY4741 Om14-dsRed	BY4741 con el plásmido pAG415-GPD-OM14-dsRed (LEU2)	Este estudio

BY4741 Hfd1-GFP	BY4741 con el plásmido pAG426-GPD-HFD1-GFP (URA3)	Este estudio
BY4741 Dpl1-HA	BY4741 con el plásmido pAG426-GAL1-DPL1-HA (URA3)	Este estudio
BY4741 ccdB-HA	BY4741 con el plásmido pAG426-GAL1-ccdB-HA (URA3)	Este estudio
hfd1 Dpl1-HA	BY4741 con el plásmido pAG426-GAL1-DPL1-HA (URA3)	Este estudio
hfd1 ccdB-HA	BY4741 con el plásmido pAG426-GAL1-ccdB-HA (URA3)	Este estudio
BY4741 pVT100U	BY4741 con el plásmido pVT100U-mtGFP (URA3)	Este estudio
fis1 pVT100U	BY4741 <i>fis1::KAN</i> con el plásmido pVT100U-mtGFP (URA3)	Este estudio
dnm1 pVT100U	BY4741 <i>dnm1::KAN</i> con el plásmido pVT100U-mtGFP (URA3)	Este estudio
hfd1 pVT100U	BY4741 <i>hfd1::KAN</i> con el plásmido pVT100U-mtGFP (URA3)	Este estudio
BY4741 BAX	BY4741 con el plásmido pCM189-Bax tet-off-Bax-c-myc (URA3)	Este estudio
hfd1 BAX	BY4741 <i>hfd1::KAN</i> con el plásmido pCM189-Bax tet-off-Bax-c-myc (URA3)	Este estudio
dpl1 BAX	BY4741 <i>dpl1::KAN</i> con el plásmido pCM189-Bax tet-off-Bax-c-myc (URA3)	Este estudio
hog1 BAX	BY4741 <i>hog1::KAN</i> con el plásmido pCM189-Bax tet-off-Bax-c-myc (URA3)	Este estudio
BY4741 BAX vacío	BY4741 con el plásmido pCM189-tet-off (URA3)	Este estudio
hfd1 BAX vacío	BY4741 <i>hfd1::KAN</i> con el plásmido pCM189-tet-off(URA3)	Este estudio
dpl1 BAX vacío	BY4741 <i>dpl1::KAN</i> con el plásmido pCM189-tet-off(URA3)	Este estudio
hog1 BAX vacío	BY4741 <i>hog1::KAN</i> con el plásmido pCM189-tet-off(URA3)	Este estudio
BY4741 Ybh3-GFP	BY4741 con el plásmido Pug36-EGFP-YBH3 (URA3)	Este estudio
BY4741 Hfd1-GFP, Mmm1-mCherry	BY4741 con el plásmido pAG426-GPD-HFD1-GFP (URA3) y pAG413-GAL1-MMM1-mCherry (HIS3)	Este estudio
mmm1 Hfd1-GFP	BY4741 <i>mmm1::KAN</i> con el plásmido pAG426-GPD-HFD1-GFP (URA3)	Este estudio
mdm10 Hfd1-GFP	BY4741 <i>mdm10::KAN</i> con el plásmido pAG426-GPD-HFD1-GFP (URA3)	Este estudio
mdm12 Hfd1-GFP	BY4741 <i>mdm12::KAN</i> con el plásmido pAG426-GPD-HFD1-GFP (URA3)	Este estudio

Tabla 2. Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en el presente trabajo.

Las células de levadura se cultivaron según métodos estándar (Holz et al., 2003). Las condiciones de cultivo de estas fueron a 28° C y en los casos de cultivos líquidos en agitación a 200 rpm. Los medios principales utilizados fueron el medio rico (YPD) o el medio mínimo (SD). El medio YPD (*Yeast extract – Peptone – Dextrose*) está compuesto por un 2% de glucosa (dextrosa), un 2% de peptona bacteriológica y un 1% de extracto de levadura. Se suplementó con geneticina G418 (200 µg/ml) para la selección de mutantes de delección que contenían el marcador de resistencia a kanamicina. Y el medio SD (*Synthetic Dextrose*) está compuesto por un 2% de glucosa, un 0,7% de *yeast nitrogen base* y 50 mM de ácido succínico a pH 5,5 (ajustado con Tris). Este medio se utilizó para la

selección de cepas mediante auxotrofías, por lo que se suplementó con los aminoácidos o bases nitrogenadas necesarios: uracilo (30 µg/ml), histidina (100 µg/ml), leucina (100 µg/ml), lisina (36 µg/ml) y metionina (100 µg/ml), esterilizados por filtración.

Para los medios sólidos se añadió un 2% de agar bacteriológico. En los casos en que la fuente de carbono era diferente a la glucosa, se reemplazó por 2% de galactosa, 3% de glicerol, 3% de etanol, o el porcentaje requerido en cada experimento y según la fuente de carbono.

3. Cebadores utilizados en el presente trabajo.

Se emplearon los cebadores mostrados en la tabla suplementaria 1. Se encuentran indicados los cebadores utilizados para las RT-PCR y para los ensayos de ChIP, así como para las distintas construcciones realizadas en el presente trabajo.

4. Plásmidos utilizados.

Los plásmidos que se muestran en la tabla 3, fueron los utilizados para realizar las diferentes construcciones genéticas tanto en bacteria como en levadura.

Plásmidos	Características	Procedencia
pUG27	loxP-his5+(<i>S.pombe</i>)	Güldener, U. <i>et al.</i> (2002)
pUG6	AmpR, loxP-KANMX-loxP	Güldener, U. <i>et al.</i> (1996)
pRS426TEG1HOG1	promotor TEV, GST-Hog1, <i>URA3</i> , 2 micron	Francesc Posas
pRS426TEG (plásmido vacío)	promotor TEV, GST, <i>URA3</i> , 2 micron	Francesc Posas
pAG423-GPD-ccdB-HA	GPD-HA plásmido Gateway, 2 micron, <i>HIS3</i> , 2 micron,	Alberti, S. <i>et al.</i> (2007)
pAG423-GPD-FAA1-dsRed	<i>HIS3</i> , 2 micron, fusión Faa1-dsRed	Este trabajo
pDONR™221	KanR2, plásmido donador Gateway	Invitrogen
pAG413-GAL1-MMM1-mCherry	CEN, <i>HIS3</i> , fusión Mmm1-mCherry	William Prinz
pTPI11-GFP-PTS1	AmpR, <i>URA3</i> , fusión GFP-PTS1	Ewald Hetteema
pAG423-GPD-OM14-dsRed	2 micron, <i>HIS3</i> , fusión Om14-dsRed	Este trabajo
pAG415-GPD-OM14-dsRed	CEN, <i>LEU2</i> , fusión Om14-dsRed	Este trabajo
pAG426-GPD-HFD1-GFP	2 micron, <i>URA3</i> , fusión Hfd1-GFP	Este trabajo
pAG426-GAL1-DPL1-HA	2 micron, <i>URA3</i> , fusión Dpl1-HA, gal inducible	Este trabajo
pAG426-GAL1-ccdB-HA	2 micron, <i>URA3</i> , GAL1-HA plásmido Gateway	Alberti, S. <i>et al.</i> (2007)
pVT100U-mtGFP	AmpR, 2 micron, <i>URA3</i>	Benedikt Westermann
pCM189 tet-off (plásmido vacío)	AmpR, CEN, <i>URA3</i>	Stephen Manon
pCM189-Bax tet-off-Bax-c-myc	AmpR, CEN, <i>URA3</i>	Stephen Manon
pUG36 EGFP-YBH3	CEN, <i>URA3</i>	Frank Madeo
pUGH3HA	AmpR, 3XHA-loxP-KANMX-loxP	De Antoni y Gallwitz (2000)

Tabla 3. Plásmidos utilizados en el presente trabajo. Se muestra en la tabla los plásmidos utilizados, con sus características y su procedencia. (Alberti et al., 2007); (Guldener et al., 2002); (Guldener et al., 1996); (De Antoni and Gallwitz, 2000).

5. Ensayos de sensibilidad

5.1. Comparación cuantitativa del crecimiento en medio líquido de cepas de levadura (BIOSCREEN).

Este ensayo se basa en la comparación de las curvas de crecimiento de diferentes cepas de levadura. Se utilizó la densidad óptica (OD) de los cultivos de levadura para cuantificar el crecimiento de las diferentes cepas en medio líquido durante un periodo de tiempo determinado (Burke D. et al., 2000). La OD 1 equivale a 1 mg de peso fresco de levadura en 1 ml de cultivo. En todos los casos se partió de cultivos saturados, diluidos 100 veces en los diferentes medios con las condiciones de estrés requeridas en

cada caso. Los cultivos se crecieron por triplicado en microplacas de 100 pocillos. Y se utilizó como control negativo, los diferentes medios con los estreses utilizados en ausencia de células, y así descartar la existencia de contaminaciones.

Con ayuda de la estación microbiológica Bioscreen C (Thermo Labsystems) se midió la densidad óptica de los cultivos, utilizando un filtro de banda ancha (420 – 580 nm) para reducir la contribución del medio a la lectura de la absorbancia. Las medidas de OD se realizaron cada 30 minutos durante 48 horas y además con una agitación previa a cada lectura de 30 segundos. La temperatura de crecimiento fue constante a 28° C.

Los datos obtenidos se analizaron mediante el programa Excel y se realizó un ajuste para corregir la pérdida de linealidad de la lectura de absorbancia con respecto a la concentración de células a partir de ciertos valores (Warringer and Blomberg, 2003). Se realizó la media de cada uno de los triplicados y se corrigieron las medidas del siguiente modo, para obtener la curva de crecimiento típica sigmoideal:

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

5.2. Ensayo de sensibilidad en medio sólido (goteos).

Los ensayos de crecimiento en medio sólido se realizaron para comparar el crecimiento en placa de diferentes cepas de levadura. Esta técnica se denomina de goteos o *droptest*. Se partió de cultivos saturados

de las cepas en estudio en medio líquido, los cuales se utilizaron para realizar diluciones seriadas (1:10, 1:100 y 1:1000) de cada una de ellas. Estas diluciones se colocaron en placas de 96 pocillos y con ayuda de un replicador manual (Sigma), se transfirieron aproximadamente 3 µl de cada dilución a placas de medio sólido con las condiciones de cultivo de interés. Las placas se incubaron durante aproximadamente 48 horas a 28°C. En el análisis se tuvo en cuenta el diámetro de la colonia y la mayor dilución a la que se observaba el crecimiento.

6. Análisis de expresión mediante RT-PCR.

6.1. Cinéticas de tratamiento con estrés.

Para realizar un análisis de la expresión génica en diferentes cepas de levadura, el primer fue la obtención de las muestras a partir de las cuales realizar la extracción del ARNm. Para ello, las cepas que se quisieron estudiar se crecieron en matraces con 100 ml de medio líquido y con la fuente de carbono deseada, en agitación a 28°C y hasta fase exponencial. A los diferentes cultivos se les aplicó el estrés deseado en cada caso y se tomaron muestras de 10 ml a diferentes tiempos del tratamiento en agitación con el estrés. Cada una de las alícuotas de 10 ml se lavaron con agua Milli Q y se almacenaron a -20°C.

6.2. Purificación del ARN por el método del fenol ácido.

Para extraer el ARN total de las células, se partió de los *pellets* obtenidos en las cinéticas de tratamiento y se resuspendieron en 400 µl de tampón TES (10 mM Tris/HCl pH 7,5; 10 mM EDTA y 0,5% SDS). Éstos se mezclaron con 400 µl de fenol ácido (pH 4) con ayuda del vórtex. La mezcla se incubó a 65°C durante 45 minutos e inmediatamente en hielo durante 5 minutos. Para separar el ARN del fenol, se centrifugaron las muestras durante 1 minuto a 10.000 rpm. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se repitió de nuevo la extracción con 400 µl de fenol ácido. La nueva fase acuosa se volvió a transferir a un nuevo tubo y se añadieron 40 µl de acetato de sodio 3M a pH 5 y 2,5 volúmenes de etanol. A continuación se centrifugaron las muestras de nuevo a 14.000 rpm durante 10 minutos y se lavó el *pellet* con etanol al 70%. Se secaron bien las muestras y se resuspendieron en 100 µl de agua Milli Q.

6.3. Cuantificación del ARN.

El contenido de ARN presente en cada una de las muestras, se midió con el espectrofotómetro NanoDrop 3.0. La base de estos métodos se encuentra en la Ley de Lambert – Beer, la cual indica que la absorbancia de una molécula es proporcional a su concentración a una determinada longitud de onda. En este caso se cuantificó el ARN total presente, el cual presenta un máximo de absorción a 260 nm. Mediante NanoDrop se obtuvo directamente una medida de la concentración del ARN presente.

Se ajustaron las concentraciones de ARN de todas las muestras, para igualarlas y así tener la misma cantidad de ARN total.

6.4. Comprobación de la calidad del ARN en gel de agarosa.

Para comprobar la calidad del ARN se utilizó un gel de agarosa con formaldehído, para romper la estructura secundaria de las moléculas de ARN. El gel se preparó con un 1% de agarosa en tampón MAE 1X: 20 mM de MOPS pH 7; 5 mM de acetato de sodio y 1 mM de EDTA. Y se le añadió 6 ml de formaldehído al 37%. El tampón de electroforesis se preparó con con 100 ml de tampón MAE 10X y 30 ml de formaldehído al 37%, en un volumen final de 1 L. El tampón de carga para las muestras se preparó con 2,2 ml de formamida, 0,8 ml de formaldehído, 0,5 ml de tampón MAE 10X, 0,4 ml de glicerol al 80% y 0,1 ml de azul de bromofenol al 2%. Se mezcló 10 µl de muestra con 40 µl de tampón de carga y 2 µl de Bromuro de Etidio al 0,1%. Y tras calentar la mezcla a 56°C durante 10 minutos se corrieron en el gel a 150 V durante 2-3 horas, para poder apreciar los ARN ribosómicos a 3,5 y 1,8 Kb. Si se observa *smear* abundante y bandas difusas indica que el ARN se encuentra degradado.

6.5. Síntesis de ADNc con transcriptasa reversa.

Antes de realizar la transcripción reversa, se eliminó el posible ADN residual de la muestra mediante la enzima *DNasa I Amplification Grade* (1 U/µl). Se incubaron 50 µg de ARN total con 2 µl de enzima, 10 µl de tampón 10X y 1 µl de inhibidor de ribonucleasas (*RNase Out*, Invitrogen),

añadiendo agua hasta un volumen de 100 μl . Esta incubación se realizó a 37°C durante 30 minutos. Mediante el *RNeasy Mini Kit* (Qiagen), se purificó y concentró el ARN.

Para realizar la transcripción reversa (RT) del ARN obtenido en la fase anterior, se utilizó el kit *Superscript III First-Strand Synthesis System*. Se prepararon las muestras por duplicado, para tener un control “no RT” de cada una (sin enzima). Se mezclaron 5 μg de muestra de ARN purificado con 1 μl de 50 μM de cebador oligo (dT)₂₀, 1 μl de 10 mM de mezcla de dNTPs y agua Milli Q, hasta un volumen de 10 μl . Estas muestras se incubaron 5 minutos a 65°C para desnaturalizar el ARN y a continuación se pusieron en hielo durante al menos 1 minuto, para así permitir la unión de los cebadores a las colas poli-A del ARN mensajero.

A cada una de las muestras se les adicionó en el siguiente orden: 2 μl de tampón RT 10X, 4 μl de 25 mM de MgCl_2 , 2 μl de 0,1 M de DTT, 1 μl de *RNase Out* 40 U/ μl y 1 μl de *SuperScriptIII RT* 200 U/ μl . Este último componente se sustituyó por agua en el caso de los controles “no RT”. Se incubaron las muestras a 50°C durante 50 minutos y se terminó la reacción mediante una incubación de 5 minutos a 85°C. Tras esta incubación se pusieron inmediatamente en hielo y se añadió 1 μl de RNasa H, dejándola actuar durante 20 minutos a 37°C.

Tras los 20 minutos de incubación el ADNc ya estaba preparado. Se añadieron 90 μl de agua MQ y se guardaron las muestras a -20°C hasta su uso para el análisis de PCR cuantitativa a tiempo real.

6.6. PCR cuantitativa a tiempo real.

Para estudiar los niveles transcripcionales de los genes de interés, se utilizó la PCR cuantitativa a tiempo real mediante *Fast EVA GreenTM qPCR Master Mix* (Biotium). Esta técnica se basa en la amplificación de los genes de interés para determinar su abundancia en las diferentes condiciones de estrés aplicadas inicialmente. Los genes que necesiten un menor número de ciclos de amplificación para llegar a una determinada cantidad de producto de PCR serán aquellos más abundantes y por tanto con una expresión superior al resto. Mediante el *EVA Green* comentado, esto se puede detectar ya que este compuesto emite fluorescencia cuando se incorpora al producto de PCR durante su síntesis.

Las reacciones de PCR contenían 2 µl de ADNc molde (incluyendo las muestras “no RT”), 3 µl de 3,3 µM de una solución de los cebadores necesarios en cada caso (mostrados en la tabla suplementaria 1) y 5 µl de Master Mix con el fluoróforo de referencia: 5(6)-carboxi-X-rodamina (ROXTM, Biotium) diluido a 0,1 mM en DMSO.

Cada reacción de PCR se realizó por triplicado en placas ópticas de 96 pocillos (Applied Biosystems) y la detección se llevó a cabo mediante un detector de secuencias *7500 Fast Applied Biosystems*. El gen de referencia utilizado fue *ACT1*, ya que se trata de un gen endógeno que no está regulado en las condiciones de estrés aquí aplicadas. Las condiciones de amplificación que se utilizaron fueron: desnaturalización inicial a 95°C durante 2 minutos, 40 ciclos de 5 segundos a 95°C, 5 segundos a 53°C y 30 segundos a 72°C (paso en el que se produce la extensión y la recogida de datos). El programa muestra tanto las curvas de disociación de los

productos así como las de amplificación que nos muestran los Ct o *Threshold Cycle*, que es el Ciclo Umbral o número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de la fluorescencia significativo con respecto a la señal base o ruido de fondo. Este último parámetro es el más importante, a partir del cual se realizan todos los cálculos analíticos. El análisis de la expresión génica normalizada frente al gen de referencia *ACT1*, se realizó mediante la siguiente fórmula: $2^{\text{Ct}(\text{ACT1-GEN})}$. Y gracias a que el programa muestra las curvas de disociación, se pueden discriminar productos inespecíficos como puede ser la formación de “*primer dimers*”.

7. Cuantificación del consumo de O₂.

Para realizar el estudio del consumo de O₂ de diferentes cepas se utilizó el electrodo de oxígeno *MitoCell S200 Respirometry System with MT200 Respirometer* (Strathkelvin Instruments) y se siguió el protocolo de Béve y sus colaboradores (Beve et al., 2005).

En primer lugar, se obtuvieron cultivos de 3 ml saturados de las cepas de interés y éstos se diluyeron a una OD₆₆₀ de 0,15 en el medio de interés para obtener una OD₆₆₀ final de 0,6-1,2. Se midió la OD exacta de cada uno de ellos, para el análisis posterior de los resultados. La suspensión celular en cada caso se lavó una primera vez con agua MQ y posteriormente con 40 mM de NaPO₄ a pH 7,4. Justo en el momento previo a cada medida se resuspendieron las células en 2 ml de 40 mM de NaPO₄ a pH 7,4 suplementado con 1% de glucosa.

Para realizar las medidas del consumo de O₂ de cada una de las cepas fue necesario en primer lugar calibrar el electrodo utilizando agua MQ para valores máximos de O₂ y sulfito sódico (pH > 8) para valores mínimos de O₂. A continuación se cargaron 500 µl de la suspensión celular con 1% de glucosa en el electrodo. Y el consumo se midió durante 30 minutos para cada una de las cepas.

Para realizar el análisis de datos se empleó el software *Strathkelvin 782 System*, que calcula en µmol/h el consumo de oxígeno en función del volumen celular utilizado.

8. Cuantificación de la producción de ROS.

Para cuantificar la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) de diferentes cepas, se utilizó el compuesto 2',7'-dicloro-dihidrofluoresceína diacetato (H₂DCF-DA, Sigma). La base de este ensayo consiste en que este compuesto es permeable a la célula y no es fluorescente en estado reducido, pero al eliminarse sus grupos acetato por acción de las diesterasas sólo en células vivas y oxidarse al reaccionar con las ROS presentes, se convierte en 2',7'-diclorofluoresceína, que es fluorescente y puede detectarse para realizar la cuantificación.

Los cultivos de levadura se crecieron hasta una OD₆₆₀ de 0,6 a 0,8 y se tomaron muestras de 9 ml de cada cultivo para el tratamiento con fluoresceína y 9 ml para las muestras sin tratamiento (*mock*). Previamente a la recogida de muestras se trataron los cultivos con los estreses de interés. A las muestras de tratamiento con fluoresceína se les añadió 10

μM de $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ y se incubaron 30 minutos en agitación a 30°C . Las muestras se dividieron en 3 tubos y tras lavar las células con agua MQ, se resuspendieron las células en 1 ml de 50 mM de Tris-HCl (a pH 7,5), 10 μl de cloroformo Y 5 μL de 0,1% de SDS. Se agitaron las muestras con el vórtex durante 30 segundos para romper las células y se centrifugaron 3 minutos a 13.000 rpm. 300 μl del sobrenadante resultante se cargó en una placa multipocillo negra (Costar) y se midió la fluorescencia en un lector de microplacas *GLOMAX®-Multi Detection System* (Promega), utilizando un filtro de excitación de 492 nm y de emisión de 525 nm. Cada medida de fluorescencia se normalizó con respecto a cada valor obtenido a sus correspondientes muestras sin tratar con fluoresceína (*mock*) y frente a la OD inicial de cada cultivo celular.

9. Técnicas de transferencia genética.

9.1. Preparación de células de bacteria quimiocompetentes.

Para obtener células de bacterias competentes, para que sean capaces de incorporar ADN exógeno del ambiente, se partió de cultivos de células de *E. coli* DH5 α (Taylor et al., 1993), crecidas en agitación y a temperatura ambiente en 200 ml de medio SOB (2% de triptona, 0,5% de extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 10 mM de MgCl_2 y 10 mM de MgSO_4) hasta una OD de 0,4—0,8. Las células se enfriaron en hielo y se repartieron en tubos Sorvall (Thermo Scientific) estériles. Se centrifugaron a 5.000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en tampón TB frío (para 500

ml: 2,42 g de Pipes, 8 ml de 1 M de CaCl_2 , 28 ml de 3M de KCl, 20 ml de 1 M de MnCl_2 , y 334 ml de agua MQ estéril). El contenido de todos los tubos se mezcló en dos tubos Sorvall y se incubaron 10 minutos en hielo. A continuación se centrifugaron de nuevo y el contenido de cada tubo se resuspendió en 4 ml de TB frío. Se mezclaron los contenidos de ambos tubos en un único tubo y se añadió tampón TB hasta alcanzar 10 ml. Se añadieron 750 μl de DMSO y se repartieron en alícuotas de 100 μl de células competentes, las cuales se almacenaron a -80°C hasta su posterior uso. La eficiencia de transformación se calculó con el número de colonias transformantes / μg ADN.

9.2. Transformación de bacterias quimiocompetentes.

La transformación de bacterias por el método químico se realizó mediante el método de choque térmico (Hanahan, 1983). Se descongeló en hielo una alícuota de 100 μl de células competentes de *E. coli* y se inoculó 0,1-10 ng de ADN con el que se quería transformar. Las células se mantuvieron en hielo durante 30 minutos. A continuación, las células se sometieron a un choque térmico a 42°C durante 45 segundos y rápidamente se pusieron en hielo durante 5 minutos. De esta manera se produce la entrada del ADN plasmídico al interior de las células. Tras el choque térmico se añadió 1 ml de medio LB líquido y se incubó 1 hora a 37°C . Por último, se extendieron las células en placas LB con el antibiótico correspondiente para la correcta selección del plásmido.

9.3. Transformación de levadura.

La transformación de levadura se realizó mediante el método del acetato de litio modificado (Gietz et al., 1995). En primer lugar se prepararon las células de levadura competentes, para ello se partió de un cultivo de levadura a una $OD_{660} = 0,7 - 1,2$. Y se centrifugaron las células durante 3 minutos a 3.000 rpm. Se realizó un lavado con agua MQ estéril y un segundo lavado con LiTE 1X (0,1 M de LiAcetate en 1X TE (10 mM Tris/HCl pH=7,6, 1 mM EDTA)). Posteriormente se resuspendieron las células en 0,5 ml del mismo tampón y se incubaron las células 15 minutos a 30°C para hacerlas competentes.

Una vez preparadas las células, para realizar la transformación se le añadió a 60 μ l de células competentes, 1-10 μ g de ADN, 5 μ L de ADN monocatenario de salmón al 0,1% (Gietz and Schiestl, 2007), y 300 μ l de LiTE/PEG4000 40% (1V/9V). Se incubó la mezcla 30 minutos a 30°C y seguidamente se sometió a choque térmico a 42°C durante 20 minutos exactos, para permitir la entrada del ADN en la célula. Las células se lavaron con agua MQ estéril y se plaquearon en placas con el medio selectivo adecuado. Las placas se incubaron a 30°C 1-2 días.

10. Técnicas de manipulación del ADN.

10.1. Purificación de ADN genómico total de levadura.

Para obtener ADN genómico a partir de cepas de levadura, en primer lugar se obtuvieron cultivos saturados de 3 ml (crecidos durante toda la noche) y se lavaron con agua MQ. Se resuspendieron las células en 200 μ l

de tampón PP (Tris/HCl a 100 mM y a pH 7,5; EDTA a 10 mM; β -mercaptoetanol (10 μ l/ml); lisozima a 0,2 mg/ml). Se incubó 1 hora a 37°C y se añadieron 200 μ l de tampón de lisis, con 0,2 M de NaOH y 1% de SDS. La mezcla se incubó durante 20 minutos a 65°C y se le añadieron 200 μ l de acetato potásico a 5 M y a pH 5,5. Se centrifugó a máxima velocidad durante 3 minutos, se precipitó el ADN con isopropanol y se lavó con etanol al 70%. Por último, se resuspendió en 50 μ l de agua MQ.

10.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La PCR o reacción en cadena de la polimerasa es una reacción que permite amplificar un fragmento concreto de ADN. Para reacciones de 50 μ l se añadieron 5 μ l de tampón 10X comercial (Thermo Scientific), 1-4 mM de $MgCl_2$, 1,25-2 U de enzima *TrueStart Hot Start Taq DNA Polymerase* (Thermo Scientific), 0,2 mM de dNTPs, 0,1-1 μ M de cada uno de los cebadores, 10 ng de ADN molde y hasta 50 μ l de agua libre de nucleasas. Se utilizaron las siguientes condiciones de amplificación: un primer paso de desnaturalización de 1-2 minutos a 95°C, 30 ciclos de amplificación (0,5-1 minuto de desnaturalización a 95°C, 0,5-1 minuto a una temperatura de anillamiento que se corresponde con la T_m de los cebadores -5 y una extensión a 72°C de 1 minuto por kilobase de amplicón) y un paso final de extensión de 5-15 minutos a 72°C.

10.3. Manipulación de fragmentos de ADN.

Una vez obtenidos los fragmentos de interés mediante PCR, la cuantificación del ADN obtenido se llevó a cabo mediante el aparato *NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific) y su calidad y tamaño se comprobó en un gel de agarosa al 1%. En los casos en que se tuvo que purificar fragmentos de ADN de los geles, se utilizó el *GeneClean® Turbo Kit* (QBiogene, Inc).

10.4. Digestión de fragmentos de ADN mediante endonucleasas o enzimas de restricción.

Mediante las enzimas o endonucleasas de restricción se pueden reconocer secuencias específicas en el ADN de doble cadena y así producir cortes en regiones específicas gracias a este reconocimiento. Normalmente, este tipo de enzimas reconoce secuencias palindrómicas, y dejan como producto de la digestión extremos cohesivos o extremos romos.

En las reacciones de digestión que se realizaron se utilizaron de 2 a 5 μl de fragmento de ADN a digerir, 2 μl de tampón de digestión 10X comercial (Fermentas) y 0,5 μl de enzima de restricción (Fermentas). Se añadió agua a cada una de las reacciones hasta un volumen final de 20 μl . Las reacciones se incubaron 1-2 horas a la temperatura óptima de la enzima, incluso algunos casos se realizaron incubaciones durante toda la noche. Y los fragmentos obtenidos se comprobaron en un gel de agarosa al 1%.

10.5. Purificación de ADN plasmídico.

La purificación de ADN plasmídico de bacterias se realizó a partir de cultivos de 3 ml empleando el kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel). Se siguieron los pasos recomendados por este kit para realizar la purificación, los cuales se describen a continuación:

Para producir la lisis celular se bajaron las células mediante centrifugación y se resuspendieron bien en 250 µl de tampón A1. A continuación se añadieron 250 de tampón A2 y se incubó mínimo durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación se añadieron 300 µl de tampón A3 y se mezcló por inversión 6-8 veces hasta clarificar el lisado. Y se centrifugaron las células a 11.000 g 5 minutos. Para producir la unión del ADN a la membrana, se introdujo una columna en un tubo de 2 ml y se puso en la columna el sobrenadante del paso anterior. Se centrifugó 1 minuto a 11.000 g y se descartó el líquido filtrado. Para el lavado de la membrana se añadieron 600 µl de tampón A4 (suplementado con etanol) y se centrifugó de nuevo. Se volvió a descartar el líquido filtrado y se volvió a centrifugar durante 2 minutos para secar la membrana y descartar el tubo de 2 ml. Para producir la elución de ADN, se colocó la columna en un nuevo tubo de 1,5 ml y se añadieron 50 µl de tampón de elución AE. Se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó 1 minuto a 11.000 g.

Los plásmidos de levadura se obtuvieron mediante el sistema anterior modificado (Singh and Weil, 2002), en el cual se resuspendieron las células (cultivos de 3 ml) en 200 µl de tampón P1 y se añadieron 100 µl de solución lisozima (1,2 M de sorbitol, 0,1 M de NaPO₄ y 5 mg/ml de

lisozima). Se incubó la mezcla a 37°C durante 30 minutos y se añadieron 300 µl de tampón P2. De nuevo, se incubó 10 minutos a 22°C y se añadieron 420 µl de tampón P3. Se centrifugaron los lisados a 10.000 rpm durante 10 minutos y se continuó el protocolo descrito hasta la elución en 50 µl de agua MQ.

10.6. Diseño de construcciones de delección.

Para la construcción de cepas de delección se utilizó el plásmido pUG27 (Guldener et al., 2002). Se amplificó la secuencia *HIS3* del plásmido anterior, mediante oligonucleótidos diseñados con sitios de recombinación homóloga 200 pb aguas arriba y aguas abajo del ORF de interés (tabla suplementaria 1). Esta construcción se transformó en levadura y se seleccionaron las cepas en medio selectivo (-HIS). Posteriormente, la delección se comprobó mediante PCR de ADN genómico, con el primer cebador situado en el promotor del gen y el segundo situado en el ORF *HIS3* (tabla suplementaria 1). El producto de PCR se obtuvo en aquellos casos en que la inserción se producía en el lugar correcto.

10.7. Construcción de plásmidos mediante el sistema Gateway.

El sistema Gateway[®] (Invitrogen) se trata de un método molecular que permite transferir fragmentos de ADN entre plásmidos diferentes de forma que se mantenga la pauta de lectura. (Katzen, 2007). Para este procedimiento se emplearon secuencias de recombinación conocidas

como *Gateway att* y dos preparados enzimáticos llamados *LR Clonase*[™] y *BP Clonase*^{™ II}. Este método de clonación es más eficiente y rápido que las técnicas basadas en enzimas de restricción y ligasas, sin embargo es más caro.

Este sistema se basa en dos reacciones consecutivas de clonación. La primera es la reacción de clonación BP, que se basa en la subclonación del gen de interés en el vector plasmídico pDONR[™] 221, para constituir el clon de entrada. En esta reacción, la cantidad de producto de PCR que debe emplearse depende del tamaño del gen correspondiente. A este producto se le añadieron 150 ng/μl de vector pDONR, tampón TE 1X y *BP Clonase*^{™ II}. Se incubó durante 1 hora a 25°C y posteriormente se añadieron 0,5 μl de proteinasa K (2 mg/ml) y se incubó a 37°C durante 10 minutos. De esta manera se consigue catalizar la recombinación e inserción de los productos de PCR con las secuencias *attB* en los sitios de recombinación del vector pDONR[™] 221 denominadas *attP*. Una vez constituido el nuevo plásmido, las secuencias de recombinación pasan a llamarse *attL*.

La segunda reacción es la LR. En la que se pretende transferir el fragmento genético contenido en el clon de entrada a otro vector conocido como vector de destino. Este vector contiene secuencias específicas de recombinación conocidas como *attR*, que permiten la transferencia del fragmento de interés. Para realizar esta reacción se mezclaron el plásmido de entrada con el gen de interés (150 ng/μl), con el vector de destino pAG (150 ng/μl), además de tampón TE 1X y *LR Clonase*[™]. Se realizó una incubación de 1 hora a 25°C y tras ella se

añadieron 2 mg/ml de proteinasa K. Se incubó de nuevo 10 minutos a 37°C.

Este método concretamente se empleó para realizar la construcción Faa1-dsRed. Y se comprobó por restricción y microscopía confocal tras su transformación en levadura. Las construcciones obtenidas se comprobaron mediante el servicio de secuenciación del IBMCP.

11. Microscopía confocal.

La microscopía confocal permite realizar secciones ópticas de nuestras muestras con marcaje fluorescente y posteriormente realizar una imagen tridimensional en base a las secciones ópticas obtenidas. El fenómeno de fluorescencia se produce debido a la interacción de los electrones con las últimas capas atómicas y se caracteriza por producir una emisión de luz prácticamente simultánea a la absorción. Se puede aprovechar este fenómeno para visualizar mediante microscopía cualquier molécula unida a un epítipo fluorescente y así estudiar su localización *in vivo*. En el presente trabajo se estudia la localización de la proteína Faa1 fusionada a dsRed (λ_{exc} 545 y λ_{em} 572) y de las proteínas Hfd1 e Ybh3 fusionadas a GFP (λ_{exc} 488 y λ_{em} 509). La microscopía confocal posee un láser que permite excitar con la longitud de onda deseada y el “*pinhole*” que se trata de un pequeño diafragma que se localiza delante del detector para detectar un único plano focal. Mediante esta técnica es relativamente sencillo el estudio de muestras *in vivo* a lo largo de una secuencia temporal.

Para realizar los estudios de microscopía confocal se utilizaron los microscopios: Zeiss LSM 780 con un objetivo de plano acromático 40X aceite/1,3 de apertura numérica (del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas); y el Leica SP8 con el objetivo *HXCPL APO CS2* con un objetivo de plano acromático de 63X aceite/1,4 de apertura numérica (del Instituto de Biomedicina de Valencia).

11.1. Conteo del número de peroxisomas.

Para realizar el conteo del número de peroxisomas se utilizó la proteína fluorescente GFP como fusión a un péptido de localización peroxisomal PTS1 (GFP-PTS1). De esta manera esta construcción en diferentes cepas permite compararlas en cuanto a número de peroxisomas por célula. Para realizar este conteo, por un lado se obtuvieron cultivos de las cepas de interés a una OD_{660} aproximadamente de 1 y se trataron con una concentración de estrés determinada durante 2 y 4 horas, para su posterior visualización al microscopio. Por otro lado, algunos ensayos se realizaron con un tratamiento con estrés *overnight* a partir de diluciones de cultivos saturados para conseguir una OD_{660} de aproximadamente 1.

Las células se visualizaron en el microscopio confocal en las condiciones indicadas y utilizando una longitud de onda de excitación para la proteína GFP de 488 nm y de emisión de 509 nm. Se concentraron las células para poder visualizar un mayor número de células en un mismo plano y se visualizaron al microscopio confocal con los objetivos indicados

anteriormente. Se visualizaron 50 células por cepa y condición y se realizaron imágenes de cada uno de los planos de cada célula. De esta manera se pudieron contar todos los puntos de fluorescencia verde presentes en las 50 células y posteriormente realizar un promedio. Las imágenes de todos los planos se juntaron para conseguir una única imagen con todos los puntos fluorescentes.

11.2. Visualización mitocondrial GFP y Mitotracker.

La morfología mitocondrial se analizó mediante el plásmido pVT100U-mtGFP, con el fluoróforo GFP fusionado a una secuencia de localización mitocondrial (mtPreSu9, mt). De esta manera la mitocondria se encuentra marcada con fluorescencia verde.

Por otro lado, se utilizó otra tinción de la morfología mitocondrial *in vivo* de determinadas cepas, con MitoTracker® Red CM-H2XROS (Invitrogen). Se trata de una versión reducida y no fluorescente de MitoTracker Red (M-7512) que emite fluorescencia tras su oxidación. Su nombre sistemático según la IUPAC es: 1H,5H,9H,11H,15H-Xantheno[2,3,4-ij:5,6,7-i'j']diquinolizina,9-[4-(chloromethyl)phenyl]-2,3,6,7,12,13,16,17-octahydro- (Invitrogen), (figura 15). Esta molécula difunde pasivamente a través de la membrana plasmática de las células y llega a la mitocondria, entrando en el interior de la misma gracias a la diferencia de potencial existente en su membrana interna.

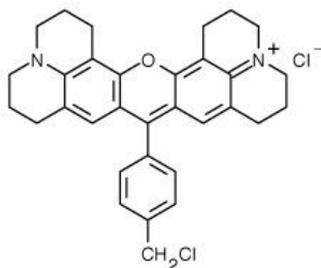


Figura 15. Estructura química de MitoTracker® Red CM-H2XROS (Invitrogen).

Para producir la tinción con MitoTracker®, en primer lugar se preparó un stock del mismo a una concentración de 1mM diluido en DMSO. Se crecieron cultivos de 3 ml de las cepas de levadura en estudio en las condiciones deseadas, hasta fase exponencial. Se tomó 1 ml de precultivo correspondiente y se trató con 1 μ l de disolución de MitoTracker® (1mM). Se incubaron los cultivos tratados durante 2 horas a 28°C en agitación y posteriormente se lavaron las células con agua MQ y se resuspendieron en 500 μ l de medio correspondiente. Las células obtenidas se encontraban preparadas para la visualización de sus mitocondrias mediante microscopía confocal.

11.3. Tinción de las partículas lipídicas con BODIPY.

Para poder visualizar las partículas lipídicas mediante microscopía confocal se utilizó el colorante BODIPY® 493/503 (figura 16). Presenta longitudes de onda de excitación y emisión similares a GFP. Este colorante es relativamente insensible a la polaridad del disolvente y al cambio de pH. Además tiene propiedades hidrofóbicas únicas, lo que lo hace ideal para la

tinción de lípidos, membranas y otros componentes lipofílicos. Wolinski y Kohlwein establecieron esta tinción como específica para las partículas lipídicas (Wolinski and Kohlwein, 2008).

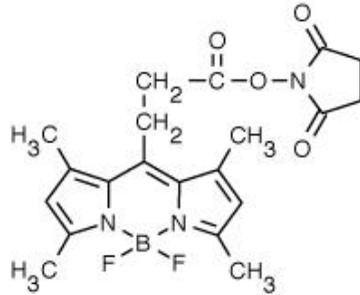


Figura 16. Estructura química de BODIPY® 493/503.

La tinción que se realizó se basó en añadir 1,2 μ l de BODIPY® (1 mg/ml) a 1 ml de cultivo crecido hasta fase exponencial. Se incubaron las muestras durante 15 minutos a 28°C en agitación y tras esta incubación se realizó un lavado con agua MQ. Por último se añadió medio nuevo a las muestras. En este momento las muestras estaban preparadas para su visualización mediante microscopía confocal. En definitiva, se pudo observar la fluorescencia verde correspondiente a la tinción con BODIPY®, la localización intracelular de las partículas lipídicas.

12. Análisis de proteínas.

12.1. Obtención de extractos proteicos totales.

A partir de células de levadura, la obtención de extractos proteicos totales se realizó mediante el método de hervido en tampón Laemmli. La composición del tampón Laemmli 5X es de 0,3 M de Tris/HCl pH 6,8, 7,5% de SDS, 0,1 M de DTT, 10 mM de EDTA, 30% de sacarosa y 0,25 mg/ml de azul de bromofenol. Las células se crecieron a una OD₆₆₀ de 0,8-1,2 y se tomaron 10 ml de cultivo. Las células se centrifugaron 5 minutos a 3.000 rpm y se lavaron con agua fría. Por último, se añadieron 150 µl de tampón Laemmli 2X y se hirvió durante 5 minutos a 95°C.

12.2. Co-inmunoprecipitación de proteínas.

Este ensayo se realizó para la co-inmunoprecipitación de proteínas marcadas con los epítomos TAP y GST. Concretamente para las cepas que contenían la proteína Adr1 unida a TAP y Hog1 a GST (las cuales se muestran en la tabla 2). Este ensayo se basa en la purificación por cromatografía de afinidad de una de las dos proteínas de fusión (a TAP o GST) y en la comprobación en cada una de las cepas si se detecta la no purificada, lo que indicará una unión entre ambas proteínas en estudio.

En primer lugar, se crecieron cada una de las cepas en 200 ml de medio selectivo (SD-URA) hasta una OD₆₆₀ aproximada de 1. Se trataron 100 ml de cultivo con 0,4 M de NaCl durante 20 minutos. Tras el tratamiento se lavaron las células con 1 ml de agua MQ fría y con 1 ml de tampón A (50 mM Tris/HCl pH=7,5; 15 mM EDTA; 2 mM DTT; 0,1% Tritón X-100; 150 mM

NaCl) frío. Y finalmente se resuspendieron las células en 1 ml de tampón A con 1 mM de PMSF y con inhibidor de proteasas (cOMplete Mini, EDTA-free (Roche), 1 tableta en 10 ml). El ml de resuspensión se transfirió a un micro tubo de 2 ml y se añadieron aproximadamente 500 µl de bolas de vidrio (0,5 mM Glass Beads, Biospec Products, Inc.). Se rompieron las células mediante agitación utilizando el aparato: Precellys® Evolution (Bertin Technologies), realizando dos ciclos de agitación durante 20 segundos a 7.500 rpm y con un descanso de 30 segundos entre éstos. Este protocolo de agitación se repitió 3 veces y se dejaron descansar durante 1 minuto los tubos en hielo entre medias.

Una vez rotas las células, se centrifugaron en frío durante 5 minutos a 10.000 rpm. El sobrenadante correspondiente se pasó a un nuevo tubo de 1,5 ml y se midió la concentración de proteína en cada una de las cepas mediante BRADFORD (apartado 10.3). Se equilibraron las muestras según la cuantificación y se guardaron 100 µl de cada muestra equilibrada para utilizarla en el western posterior como *INPUT*. El resto (aproximadamente 500 µl) se utilizaron para realizar la purificación.

Para purificar, se incubaron las muestras preparadas con 20 µl de resina Glutathione Sepharose™ 4B (GE Healthcare Life Sciences), lavada previamente 3 veces con tampón A, durante 2 horas a 4 °C. Tras la incubación, se lavó la resina 1 vez con 1 ml de tampón A con 1 mM de PMSF e inhibidor de proteasas y 4 veces con tampón A con 1 mM de PMSF. Por último, se resuspendió la resina en 50 µl de tampón de carga 2x Laemmli y se llevaron a ebullición las muestras a 95 °C durante 5 minutos.

Una vez las muestras preparadas se corrieron en un gel SDS-PAGE para proteínas (apartado 10.4): En el caso de las muestras guardadas como INPUT sin purificar de 100 μ l, se inyectaron en un gel (12% resolving, 4% stacking) 10 μ l de muestra tras añadirles 25 μ l de Laemmli 5x y llevarlas a ebullición. Y tras realizar la transferencia a la membrana de PVDF se incubó con 1 μ l de anticuerpo α -PAP (anti-rabbit), para ver si había detección de Adr1-TAP como control. En el caso de las muestras purificadas se inyectaron dos geles diferentes, uno con 10 μ l para incubar con el anticuerpo Anti-GST (anti-rabbit) y otro con 40 μ l para incubar con el anticuerpo α -PAP (anti-rabbit). El primero servirá para detectar la proteína GST o bien sola o bien unida a Hog1 según la cepa. Y el segundo servirá para ver si realmente existe unión entre Hog1 a Adr1 si se detectase Adr1-TAP en la cepa que contiene las dos proteínas fusionadas a los epítomos.

12.3. Cuantificación de proteína mediante el método de Bradford

Para determinar la cantidad de proteína se utilizó el método de Bradford. Para ello, se empleó el reactivo *Bio-Rad Protein Assay* de BioRad, que se utilizó diluyéndolo cinco veces y el cual contiene ácido fosfórico. Este ácido permite que en presencia de proteínas, el colorante Coomassie Blue G que inicialmente presenta un color pardo, se convierta en un color azul con una intensidad proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra.

Para determinar la concentración de proteína total que contienen las muestras, se realizó en primer lugar una recta de calibrado empleando un patrón proteico. Y a partir de dicha recta se extrapolaron los valores de concentración de proteína presente en distintas muestras a partir de sus absorbancias. En este caso se empleó sueroalbúmina bovina (BSA) como patrón. Se utilizaron cantidades conocidas de BSA (0, 0,2, 0,5, 1, 2, 4, 6 y 10 μg), 20 μl de reactivo Bradford y agua MQ hasta un volumen final en cada caso de 100 μl . Se midió la absorbancia empleando un lector multipocillo Wallac 1420 VICTOR2 (Perkin Elmer™), para obtener la recta de calibrado. Y las muestras se midieron a partir de 4 μl de muestra, 76 μl de agua MQ y 20 μl de reactivo Bradford.

12.4. Electroforesis de proteínas en gel SDS-poliacrilamida.

La electroforesis de proteínas se llevó a cabo mediante el sistema *Mini Protean 3* (BioRad), en el que se utilizan geles de poliácridamida al 10% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), lo que permite que la movilidad de las proteínas en estudio dependa sólo de su peso molecular y no de su composición. Aproximadamente está presente una molécula de SDS por cada dos aminoácidos lo que permite que la densidad de carga eléctrica sea constante para diferentes proteínas independientemente de su composición aminoacídica, debido a que las cargas de los aminoácidos son enmascaradas por la gran cantidad de moléculas cargadas negativamente de SDS.

Los geles tienen dos capas diferenciadas, una superior de empaquetamiento en la que los complejos SDS-proteína se concentran y una inferior de separación en la que los complejos se separan de acuerdo a su tamaño. La composición de la capa de empaquetamiento es de 4% de acrilamida:bisacrilamida 40:0,8, 0,1% de SDS, 125 mM de Tris/HCl, 1% de APS y 0,1% de TEMED a pH 6,8. La composición del gel de separación es de 12% de acrilamida:bisacrilamida 40:0,8, 0,1% de SDS, 375 mM de Tris/HCl, 1% de APS y 0,1% de TEMED a pH 8,8. La electroforesis se llevó a cabo a voltaje constante de 70-80 V. Y se utilizó el tampón de resolución SDS-PAGE 1X (0,19 M de glicina y 0,1% de SDS ajustado a pH 8,3 con Tris. Las muestras se inyectan en el gel junto al marcador de pesos moleculares *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Fermentas).

12.5. Transferencia a membrana de proteínas (*Western Blot*).

Una vez separadas las proteínas en el gel, deben ser transferidas a membranas para que sean más accesibles a la hora de realizar reacciones de detección mediante anticuerpos. Para ello, se utilizaron las membranas de *Immunoblot® PVDF 0,45 μm* (Amersham™ Hybond™, GE Healthcare) y para transferir las proteínas se utilizó el sistema *Mini-Trans Blot* (BioRad) mediante corriente eléctrica. Para poder separar el SDS de las proteínas y facilitar la unión de las proteínas a la membrana se utilizó el tampón de transferencia compuesto por SDS-PAGE 1X y 20% de metanol. La transferencia se realizó a 10V y a 4°C durante toda la noche.

12.6. Tinción de membranas con Direct Blue 71.

Como control interno de carga se utilizó el método de tinción DB71, para comprobar el correcto equilibrado de las cargas en la membrana. Esta tinción se conseguía gracias al colorante *DirectBlue 71* (DB71). Las membranas de PVDF se sumergieron en agitación en la solución de tinción al 0,008% durante 5 minutos. El exceso de colorante se eliminó mediante la solución de lavado (40% de etanol absoluto y 10% de ácido acético glacial) y se escaneó la membrana con ayuda de una funa de plástico transparente para evitar que se seque. Tras escanearla, se eliminó la tinción con la solución de desteñido (50% de etanol absoluto y 1 M de Bicarbonato de Sodio) dejándola actuar durante 15 minutos.

12.7. Detección inmunológica de proteínas.

Para comenzar la inmunodetección, la membrana libre de colorante se sumergió en 10 ml de una solución de bloqueo de los sitios de unión no específicos. Esta disolución estaba compuesta por leche en polvo al 2% en TBS 1X (TBS 10X: 1,5 M de NaCl y 0,2 M de Tris/HCl a pH 7,6). Se incubó en agitación durante 30 minutos y en la misma disolución se incubó la membrana con el anticuerpo primario específico en una dilución 1:10.000. En este caso los anticuerpos primarios utilizados en el presente trabajo fueron el anticuerpo policlonal de conejo α -PAP (Sigma) que reconoce el epítipo TAP y el anticuerpo policlonal α -GST (Santa Cruz Biotechnology) que reconoce el epítipo GST. La incubación con el anticuerpo fue de 1 hora en agitación y tras esta se lavó la membrana 3 veces durante 10 minutos con tampón TBS 1X y así se eliminó el exceso de anticuerpo

primario. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario (α -HRP-conejo) en una dilución 1:10.000 durante 1 hora y en agitación. Y para finalizar se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS 1X.

La detección se realizó mediante el sistema *ECLTM Prime Western Blotting Detection System* (GE Healthcare – Amersham Biosciences). Este sistema permite, gracias a la existencia de peroxidasa en el segundo anticuerpo utilizado, detectar las proteínas de interés. La señal de quimioluminiscencia se obtuvo de forma electrónica mediante la cámara LAS-3000 (Fujifilm).

13. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).

Mediante inmunoprecipitación de la cromatina se puede estudiar la unión de un determinado factor de transcripción, en este caso Adr1 a los promotores de los genes de interés (concretamente *POX1*, *FAA1*, *PXA2* y *ECI1*). El método de inmunoprecipitación de la cromatina empleado es una modificación del método publicado por Kuras y Struhl, 1999.

Los cultivos de las cepas en estudio se incubaron a 28°C en el medio de crecimiento requerido, y se crecieron hasta fase exponencial. Se realizaron las cinéticas de tratamiento con el estrés deseado y se fijaron las células con formaldehído al 1%. Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos, moviéndolos de forma ocasional y posteriormente se añadieron 6 ml de glicina 3 M y se incubó durante 5 minutos. Las muestras se lavaron con TBS 1X (20 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) frío y una vez con 5 ml de tampón de lisis FA frío (50

mM HEPES/KOH pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % TritonX-100, 1 mM PMSF, 0,1 % deoxicolato sódico) con 0,1 % SDS. El precipitado obtenido se resuspendió en 1 ml de tampón de lisis FA con 0,5 % SDS frío y se añadieron 0,5 ml de bolas de vidrio (*0,5 mm Glass Beads (Soda Lime)*) (BioSpec Products, Inc.). Las células se rompieron con ayuda del aparato Precellys® Evolution (Bertin Technologies), realizando dos ciclos de agitación durante 20 segundos a 7.500 rpm y con un descanso de 30 segundos entre éstos. Este protocolo de agitación se repitió durante 3 veces y se dejaron descansar durante 1 minuto los tubos en hielo entre medias. El lisado se recogió en un nuevo tubo frío y se centrifugó 1 minuto a 13000 rpm a 4°C. El sobrenadante se descartó y el precipitado que contenía la cromatina insoluble se disolvió en 1 ml de tampón de lisis FA con 0,1% SDS. Se centrifugó de nuevo 1 min a 13000 rpm y se resuspendió en 1 ml de tampón de lisis FA con 0,1 % SDS. A continuación se llevó a cabo la sonicación de las muestras para obtener fragmentos de ADN de 300-400 pb aproximadamente. Para ello se utilizó un sonicador UP200S (Hielscher Ultrasonics GmbH). Se realizaron 6 rondas de sonicación de 20 pulsos por cada muestra, manteniendo en hielo las muestras entre rondas. Éstas se centrifugaron durante 15 minutos en una minicentrífuga a 13.000 rpm y a 4°C. Y el sobrenadante que contenía los fragmentos de cromatina solubles, se transfirió a un nuevo tubo. Las muestras se almacenaron a -20°C para utilizarlas posteriormente.

Para realizar la inmunoprecipitación de la cromatina se utilizaron bolas Dynabeads® (Invitrogen), que se trata de partículas con propiedades magnéticas que permiten la separación de materiales biológicos como

proteínas o ácidos nucleicos gracias al acople por afinidad a la superficie de las mismas. En el presente trabajo, se utilizaron bolas que llevan acoplado covalentemente el ligando proteína A con afinidad por el anticuerpo α -HA (12CA5 monoclonal de ratón, Roche). Las bolas se suministraron en tampón PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄ a pH 7,3), lavadas 3 veces el día anterior al uso con 1 ml de tampón PBS suplementado con 5 mg/ml de BSA. Para realizar este lavado, se utilizó un concentrador de partículas magnéticas DynaMag™- 2 (Invitrogen), para someter las bolas a un campo magnético, de modo que las bolas se pudiesen separar rápidamente del sobrenadante. Después de los lavados se añadieron a las bolas magnéticas 1 ml de PBS suplementado con BSA y 5 μ l [5 mg/ml] de anti-HA por IP. Por último se incubó la mezcla toda la noche a 4°C. Posteriormente se llevaron a cabo tres lavados de las bolas con 1 ml de tampón PBS suplementado con 5 mg/ml de BSA y se resuspendieron en el volumen original usando tampón de lisis FA con 0,1 % de SDS.

Se incubaron 20 μ L de las bolas preparadas junto a 500 μ l de muestra al menos durante 90 minutos. Y se procedió a lavar las muestras inmunoprecipitadas. En primer lugar se realizaron dos lavados con 1 ml de tampón de lisis FA con PMSF y después otros dos lavados con 1 ml de tampón de lisis FA suplementado con 0,5 M NaCl. Posteriormente se realizó otro lavado adicional con 1 ml de tampón B (10 mM Tris/HCl pH 8, 0,25 M LiCl, 1 mM EDTA, 0,5 % NP-40, 0,5 % deoxicolato de sodio) y un último lavado con tampón TE 1X. Entre cada lavado se incubaron las muestras durante 3-5 minutos en un rotor a temperatura ambiente y se

separaron del sobrenadante sometiendo los tubos a un campo magnético con ayuda del DynaMag™. Las bolas se resuspendieron en 250 µl de tampón C (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 % SDS, 10 mM EDTA) y se eluyeron las muestras incubándolas durante 10 minutos a 65°C, en agitación. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo con 250 µl de tampón TE 1X y 20 µl de pronasa a 20 mg/ml, (Roche).

Para preparar la muestra de cromatina total sin inmunoprecipitar (muestras CT), se utilizaron 50 µl de cromatina fragmentada a la que se le añadieron 20 µL de Pronasa y 450 µl de tampón TE 1X para igualar el volumen de las muestras inmunoprecipitadas.

Todas las muestras se incubaron durante toda la noche a 65°C para producir una desligación de las proteínas de la cromatina. Y se le añadieron a cada una de ellas 50 µl de LiCl 0,4 M. Para realizar la extracción de los ácidos nucleicos se utilizó 0,5 ml de fenol-cloroformo/isoamilalcohol (1:1) y a continuación con 0,5 ml de cloroformo/isoamilalcohol (24:1). El ADN se precipitó con 1 ml de etanol y 2 µg de glicógeno (ROCHE), mediante una incubación durante toda la noche a -20°C. Tras la incubación las muestras se centrifugaron a 4°C todas las muestras durante 10 minutos a 14.000 rpm y se lavaron con etanol al 96%. Los precipitados se secaron bien y se resuspendieron en 100 µl de tampón TE 1X.

Las muestras obtenidas se diluyeron 200 veces para realizar el análisis mediante RT-PCR de los genes de interés.

Resultados

1. Función del peroxisoma en la adaptación a estrés salino.

1.1. La función peroxisomal es necesaria para la adaptación a estrés, especialmente en condiciones limitantes de glucosa.

Resultados anteriores de nuestro grupo de investigación mostraron que las células de levadura responden a estrés salino por una inducción parcial de la respiración mitocondrial (Pastor et al., 2009). En el presente trabajo se estudia si el balance entre fermentación y respiración tiene un efecto en la adaptación a estrés salino en levadura.

Se cuantificó la eficiencia de crecimiento de cultivos de una cepa silvestre de levadura en medio líquido bajo condiciones de estrés salino (NaCl), a medida que disminuía la concentración de glucosa en el medio. Se utilizó para ello el método Bioscreen C. En la figura 17 se muestra cómo la eficiencia de crecimiento en un medio con elevada salinidad (1M NaCl), se ve afectada dramáticamente en condiciones de baja disponibilidad de glucosa. Específicamente, la eficiencia cae de más de un 80% en condiciones de elevada disponibilidad de glucosa (4%), a aproximadamente un 20% en condiciones de baja glucosa (0,5%).

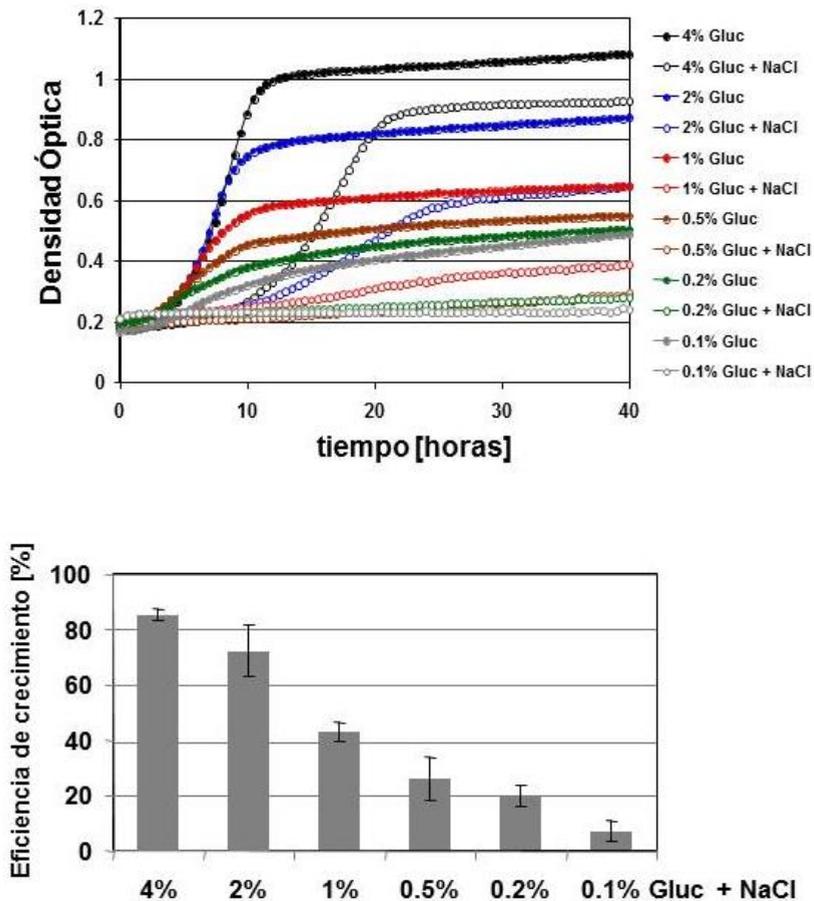


Figura 17. La eficiencia de crecimiento de las células de levadura en condiciones de estrés salino depende de la concentración de glucosa. El crecimiento de la cepa silvestre de levadura (BY4741) se monitorizó de forma continua en medio YPD, en cada una de las concentraciones de glucosa indicadas y en condiciones normales (sin estrés) o con una concentración de 1M de NaCl (primera gráfica). La eficiencia de crecimiento (segunda gráfica) se calculó como se indica en materiales y métodos. Para cada condición de crecimiento se analizaron tres cultivos independientes. Se muestran las correspondientes desviaciones estándar de los valores medios obtenidos.

Una posible explicación para este efecto tan dramático es que el estrés salino inhibe el flujo glicolítico y/o la adaptación al estrés aumenta el consumo de ATP, lo que hace necesario el uso de fuentes de energía

alternativas bajo condiciones de estrés. Una fuente de energía importante son los almacenes de lípidos intracelulares, que pueden ser movilizados por la β -oxidación peroxisomal en levadura.

Se quiso comprobar si la función peroxisomal es importante para la tolerancia a estrés salino. Se utilizaron para ello, dos tipos de mutantes de delección de levadura: los que carecían de peroxisomas por falta de componentes de su biogénesis ($\Delta pex3$ y $\Delta pex19$) o los que carecían de determinadas enzimas involucradas en el proceso de la β -oxidación ($\Delta pox1$, $\Delta fox2$ y $\Delta ec11$).

Como se muestra en la figura 18, la pérdida de estructuras peroxisomales provocaron una leve sensibilidad a NaCl en condiciones de elevada concentración de glucosa y esta sensibilidad se vio severamente agravada cuando se disminuyó la concentración de glucosa.

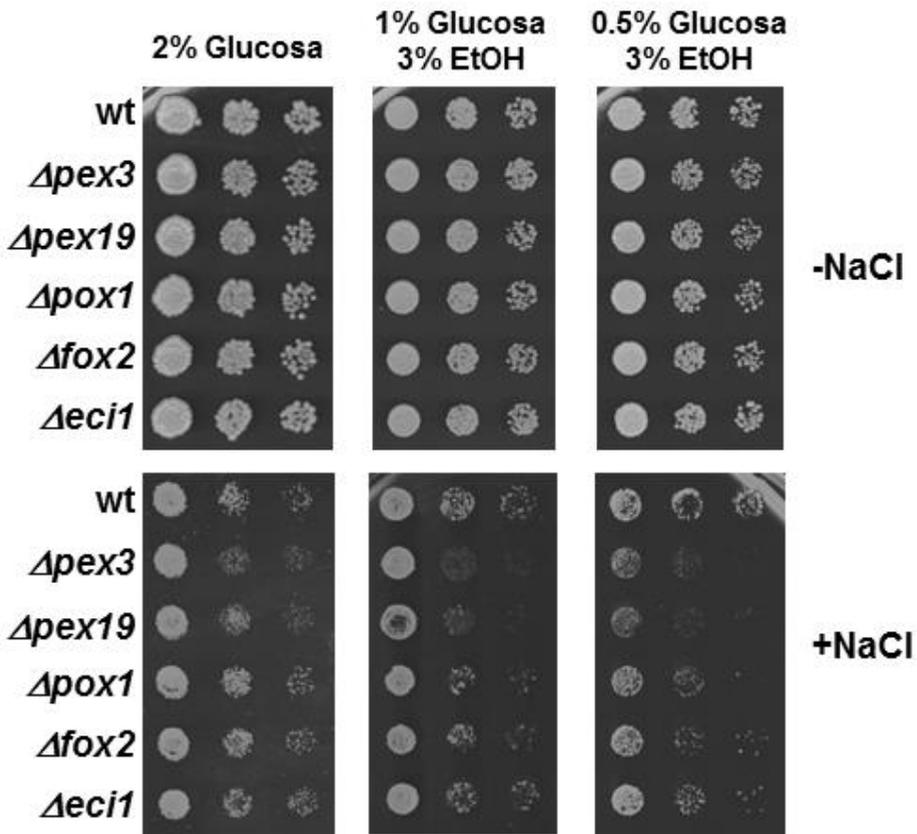


Figura 18. La función peroxisomal es importante para la tolerancia a estrés salino, especialmente en condiciones de ayuno de glucosa. Se estudió el crecimiento en medio rico (YP) de la cepa silvestre (BY4741) y de las cepas de delección mostradas. Se varió la concentración de glucosa y se suplementó con etanol. Se indujeron las condiciones de estrés salino mediante la adición al medio de 1M NaCl. Se muestran tres diluciones seriadas del cultivo en cada caso (1:10, 1:100 y 1:1000).

Interrupciones individuales en diferentes pasos de la β -oxidación peroxisomal no provocaron una sensibilidad a sal detectable en condiciones de elevada concentración de glucosa. Sin embargo, los mismos mutantes bajo condiciones de estrés salino y en baja concentración de glucosa mostraban hipersensibilidad.

Estos resultados indican que la función peroxisomal es esencial para la tolerancia a salinidad en condiciones de ayuno de glucosa.

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.

Se quiso estudiar si la expresión de los genes involucrados en la movilización de los ácidos grasos a los peroxisomas estaba regulada bajo condiciones de estrés salino. Se eligieron diferentes genes representativos de las distintas funciones, tal y como se muestra en la figura 19.

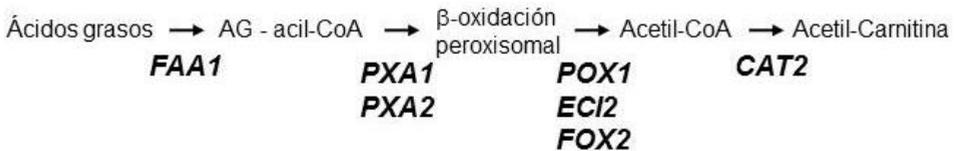


Figura 19. Genes representativos involucrados en la activación de ácidos grasos, importe a los peroxisomas y β-oxidación. Los genes indicados fueron los elegidos para el estudio del control transcripcional de la β-oxidación peroxisomal bajo condiciones de estrés salino.

Se eligió el gen *FAA1* de la activación de los ácidos grasos, los genes *PXA1* y 2 de la importación de los acil-CoA a los peroxisomas, los genes *POX1*, *ECI1* y *FOX2* de la β-oxidación, y *CAT2* de la síntesis de acetil-carnitina. (Figura 19).

Se observó que, con excepción del gen *FOX2*, la expresión de todos los genes se inducía rápidamente y de forma transitoria bajo condiciones

Resultados

de estrés salino (NaCl), de forma comparable al gen *GRE2* (gen control inducible por estrés osmótico). (Figura 20).

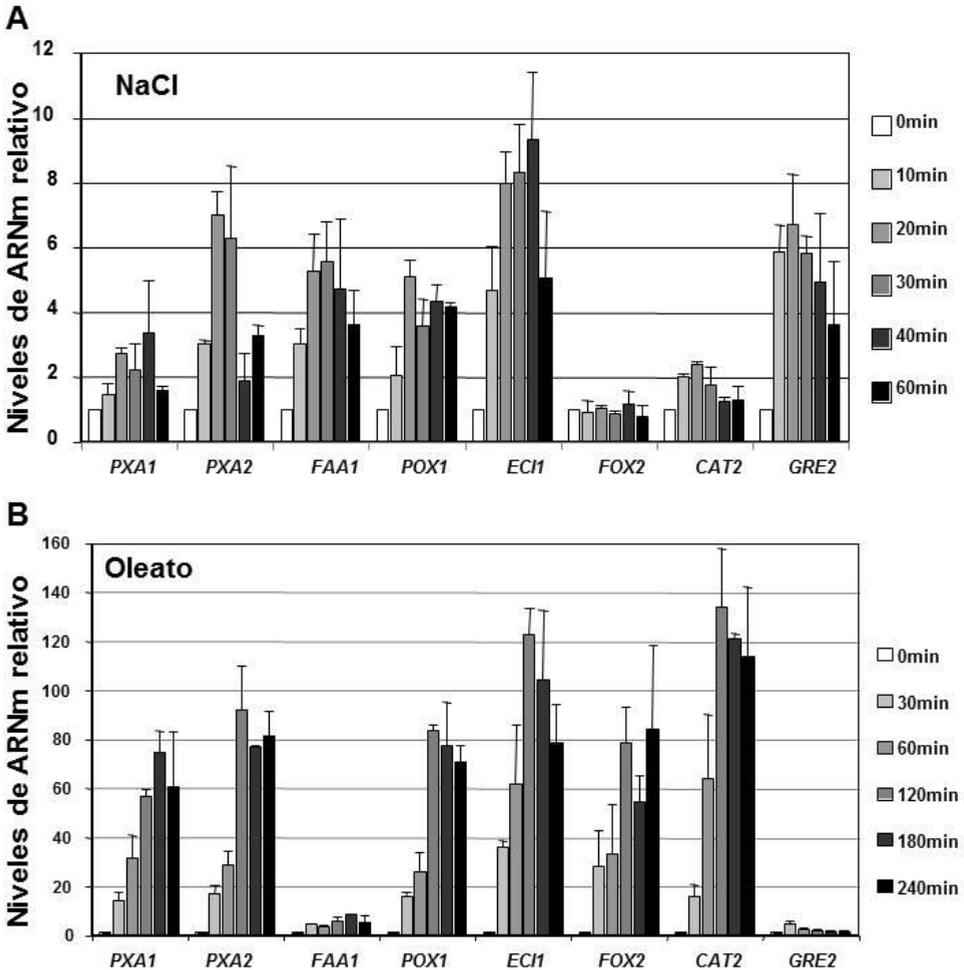
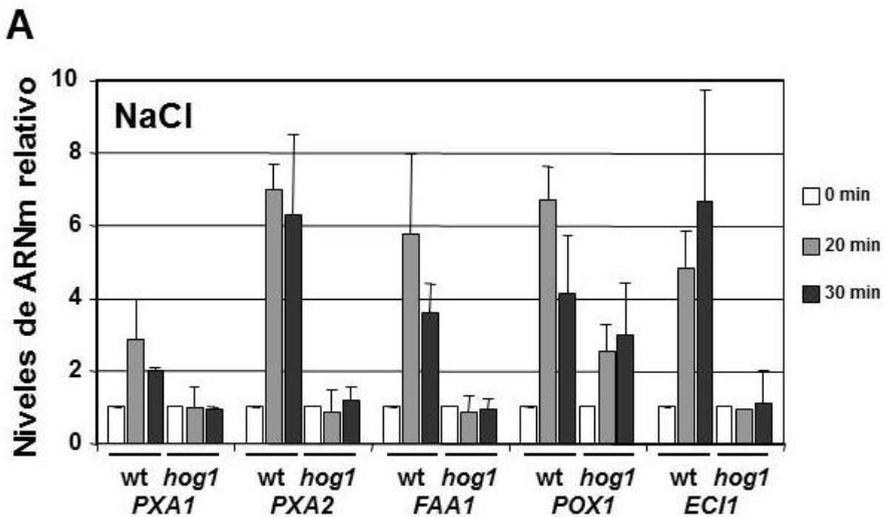


Figura 20. Inducción transcripcional de los genes del metabolismo de los ácidos grasos bajo condiciones de estrés causado por NaCl. Mediante RT-PCR se determinaron los niveles de ARNm de los genes indicados, involucrados en la degradación de los ácidos grasos, durante los primeros 60 minutos de adaptación a 0,4M de NaCl (A). Se utilizó la cepa silvestre BY4741 y como gen control inducible por estrés osmótico, *GRE2*. Y se muestra la inducción de estos genes por oleato (B). Los resultados muestran los valores medios de tres réplicas biológicas y se incluye la correspondiente desviación estándar.

Este control transcripcional tiene lugar de manera más rápida pero menos eficiente en comparación con la inducción que se produce al cambiar la fuente de carbono de glucosa a oleato.

La ruta de MAP quinasas HOG es la mayor reguladora de la expresión génica bajo condiciones de estrés osmótico en levadura. En el presente estudio se ha confirmado que la MAP quinasa Hog1 es indispensable para la activación transcripcional de los genes involucrados en la movilización de los ácidos grasos. (Figura 21 A).



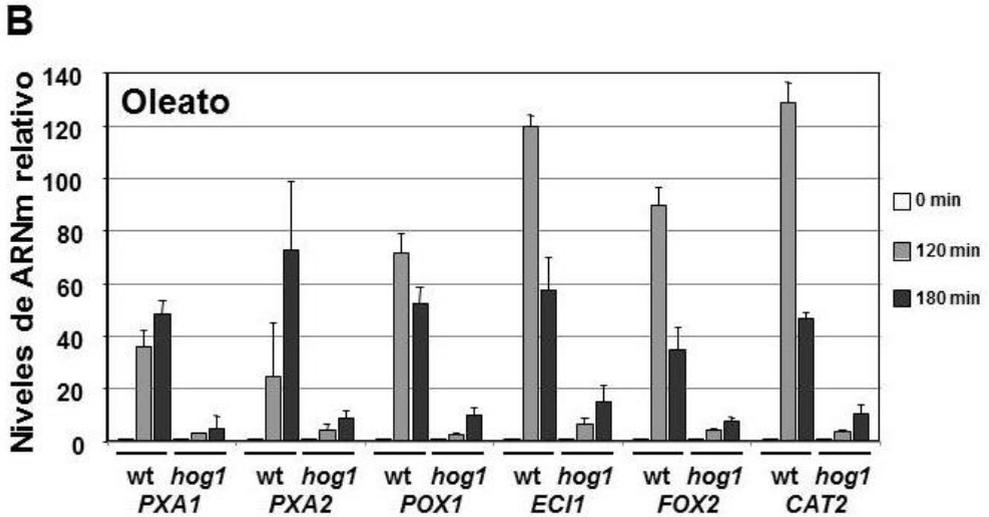


Figura 21. La inducción transcripcional de los genes peroxisomales depende de Hog1. La expresión de los genes indicados bajo condiciones de estrés salino (0,4M NaCl, A) o en un medio con oleato (B) se cuantificó mediante RT-PCR. Y se normalizaron los valores respecto al gen *ACT1*. Los valores de expresión de la cepa silvestre se compararon con los del mutante $\Delta hog1$. Los resultados que se muestran son los valores medios de tres réplicas biológicas incluyendo la correspondiente desviación estándar. Los niveles iniciales a tiempo 0, se relativizaron a 1.

Sorprendentemente, se observó que Hog1 era también responsable en gran parte de la inducción de los genes en estudio en condiciones de crecimiento con oleato, indicando que la función de Hog1 no se restringe al estrés salino en cuanto a su relación con el metabolismo de los ácidos grasos. (Figura 21 B).

Además, se quiso caracterizar esta inducción de la expresión de los genes peroxisomales por salinidad y la cuestión planteada fue si ocurría independientemente de la activación provocada por el crecimiento en condiciones no fermentativas. Para ello, se compararon los perfiles de inducción de la expresión de los genes *PXA2*, *POX1* y *ECI1* en medio

fermentativo (glucosa) y en medio respiratorio (glicerol/etanol). Como era de esperar por la inducción del metabolismo peroxisomal durante el cambio diáuxico, los niveles iniciales de ARNm de los genes en estudio, eran de 20 a 200 veces superior en condiciones respiratorias. (Figura 22).

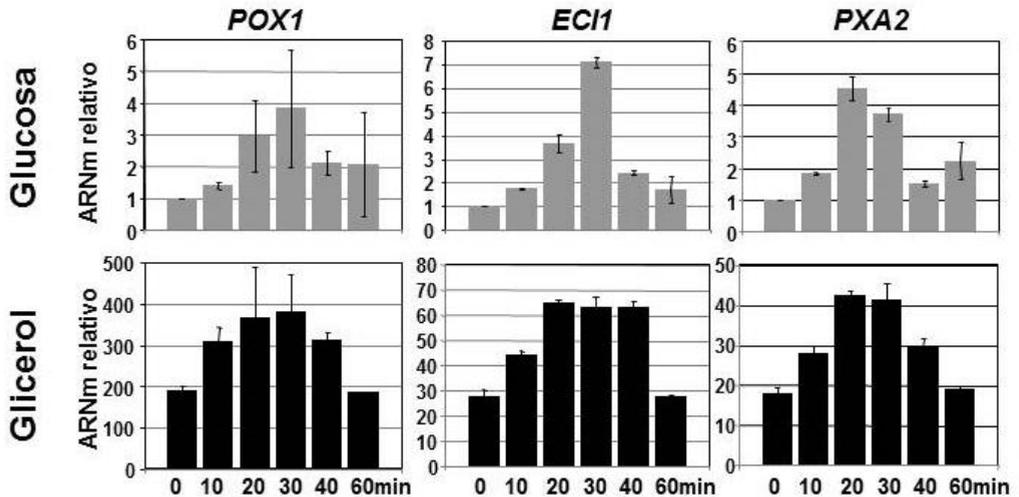


Figura 22. La inducción por salinidad de los genes peroxisomales es independiente de la inducción durante el cambio diáuxico. Los niveles de expresión de los genes indicados se determinaron mediante RT-PCR y se normalizó respecto al gen *ACT1*. Las gráficas superiores muestran los niveles de expresión de los genes en condiciones fermentativas, con glucosa en el medio. Las gráficas inferiores muestran los niveles de expresión en condiciones respiratorias con glicerol como fuente de crecimiento. Los niveles de expresión iniciales en condiciones fermentativas se relativizaron a 1 para poder comparar ambas condiciones. Los resultados que se muestran son los valores medios de tres réplicas biológicas incluyendo la correspondiente desviación estándar.

Sin embargo, la expresión de los tres genes estudiados se activaba rápidamente en respuesta a estrés salino. Esto indica que la inducción por salinidad de los genes relacionados con la β -oxidación peroxisomal ocurre

de manera independiente a la inducción producida durante el cambio diáuxico.

A continuación, se quisieron estudiar los acontecimientos moleculares que subyacen al control transcripcional de las funciones de los peroxisomas por estrés salino. Tal y como se ha comentado en la introducción, se conocen dos activadores transcripcionales que regulan los promotores de los genes de las funciones peroxisomales, Oaf1/Pip2 y Adr1. En primer lugar, se comprobó el papel de estos factores en respuesta a oleato, y se cuantificaron los perfiles de inducción de varios genes representativos peroxisomales en los mutantes de delección $\Delta oaf1$ y $\Delta adr1$ (figura 23). A excepción del gen *POX1*, la activación inducida por oleato se vio fuertemente disminuida en ambos mutantes. Y así, se pudo comprobar que ambos factores son importantes en la activación de estos genes para potenciar el uso de esta fuente de carbono presente en el medio.

En segundo lugar, para estudiar su posible función en la inducción producida por salinidad, se cuantificaron los perfiles de inducción de los mismos genes representativos en dichos mutantes de delección, en condiciones de estrés salino. Y como se puede observar en la figura 24, a excepción del gen *ECI1*, la activación inducida por estrés se vio fuertemente disminuida en el mutante $\Delta adr1$. Se puede decir, por lo tanto, que el factor Adr1 es el responsable de la inducción de la expresión por salinidad de los genes peroxisomales.

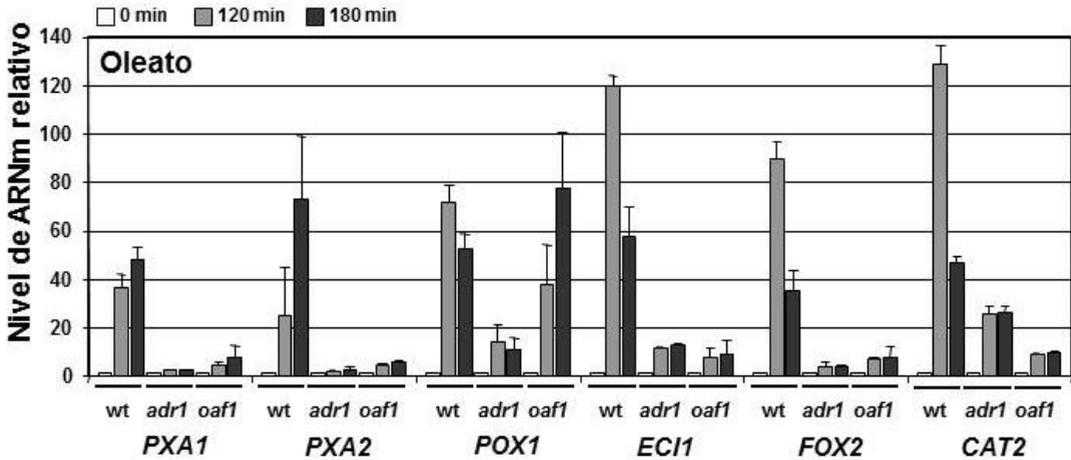


Figura 23. Los factores *Adr1* y *Oaf1* son los responsables de la inducción provocada por la presencia de oleato en el medio, de los genes del metabolismo de los ácidos grasos. Los niveles de ARNm de los genes indicados se determinaron mediante RT-PCR en los mutantes $\Delta adr1$ y $\Delta oaf1$ con oleato como fuente de carbono en el medio. Los resultados mostrados corresponden a los valores medios de tres réplicas biológicas y se incluye la correspondiente desviación estándar. Los niveles iniciales de ARNm se relativizaron a 1.

Se debe destacar la diferencia en cuanto a los niveles de activación de los genes peroxisomales que se produce con cada una de las condiciones. La cepa silvestre en respuesta a oleato en el medio, muestra una inducción de la expresión de los genes peroxisomales de hasta 120 veces respecto a las condiciones iniciales. (Figura 23). Sin embargo, cuando esta activación se produce a través del estrés salino, la inducción que se produce es de máximo 10 veces respecto a las condiciones iniciales.

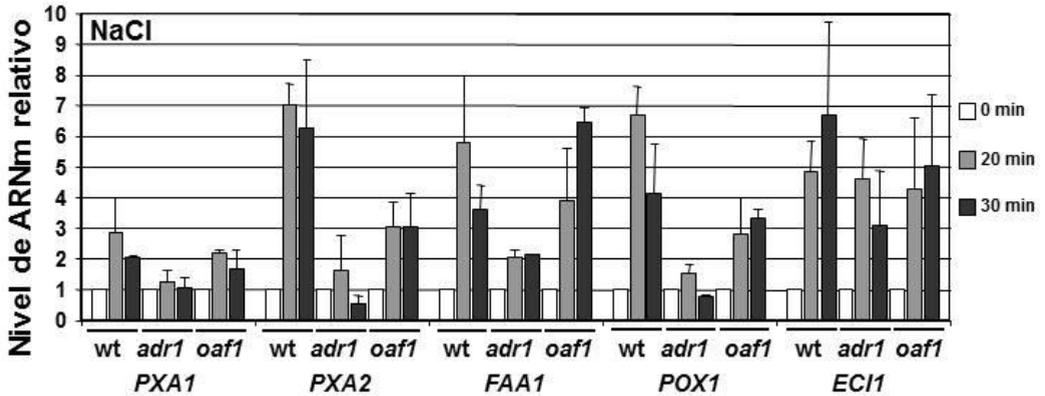


Figura 24. El factor Adr1 es el responsable de la inducción por estrés salino de los genes del metabolismo de los ácidos grasos. Los niveles de ARNm de los genes indicados se determinaron mediante RT-PCR en los mutantes $\Delta adr1$ y $\Delta oaf1$ bajo condiciones de estrés salino (0,4M NaCl). Los resultados mostrados corresponden a los valores medios de tres réplicas biológicas y se incluye la correspondiente desviación estándar. Los niveles iniciales de ARNm se relativizaron a 1.

Finalmente se quiso comprobar si se regulaba la unión directa de Adr1 a los promotores de los genes peroxisomales bajo condiciones de estrés salino, mediante inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) “*in vivo*”. Se observó una unión transitoria de Adr1 a los promotores de los genes *POX1*, *FAA1*, *PAX2* y *ECI1*, tras un tratamiento con estrés salino (0,4 M de NaCl). Además, esta unión se vio fuertemente reducida por la delección de Hog1. Lo que lleva a pensar que Hog1 controla positivamente la expresión génica de las funciones peroxisomales a través de la estimulación de la unión del activador transcripcional Adr1. (Figura 25).

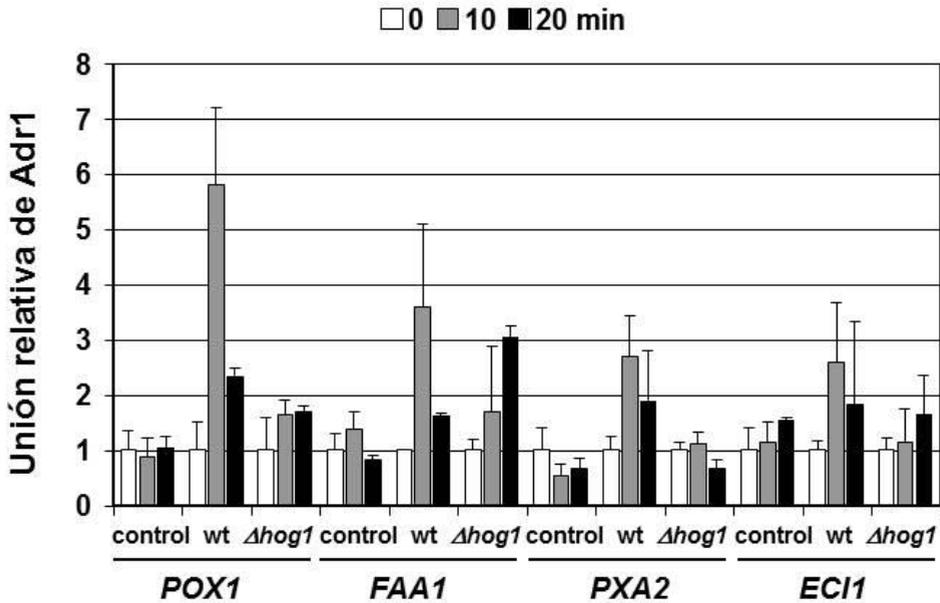


Figura 25. Hog1 estimula la asociación de Adr1 a los genes involucrados en la activación de los ácidos grasos y la β -oxidación. Mediante ChIP “*in vivo*” se determinó la unión de Adr1-HA a los promotores de los genes *POX1* (-486/-329), *FAA1* (-301/-121), *PXA2* (-492/-226) y *ECI1* (-251/-114). Las condiciones en las que se estudiaron fueron en medio rico YPD, a tiempo 0, 10 y 20 minutos de tratamiento con estrés salino (0,4M NaCl). Se midió en la cepa silvestre y en el mutante $\Delta hog1$. Se incluye la cepa silvestre sin el epítipo -HA como control. Se muestra en la gráfica la unión relativa, respecto al gen control *POL1*. Se muestran los valores medios correspondientes a tres réplicas biológicas, incluyendo su correspondiente desviación estándar.

Para complementar este estudio se investigó si existía una interacción física entre Hog1 y Adr1. Se realizó un ensayo de copurificación por cromatografía de afinidad, tras un tratamiento con NaCl. Se utilizaron cepas que contenían las proteínas Hog1 y Adr1 fusionadas a los epítipos GST y TAP respectivamente y así permitir su detección mediante “*western blot*”.

Resultados

En la figura 26 se puede comprobar que mediante este ensayo no se observa interacción entre ambas proteínas. Es posible, que la interacción que se produzca entre éstas sea más transitoria y no seamos capaces de detectarla mediante este ensayo.

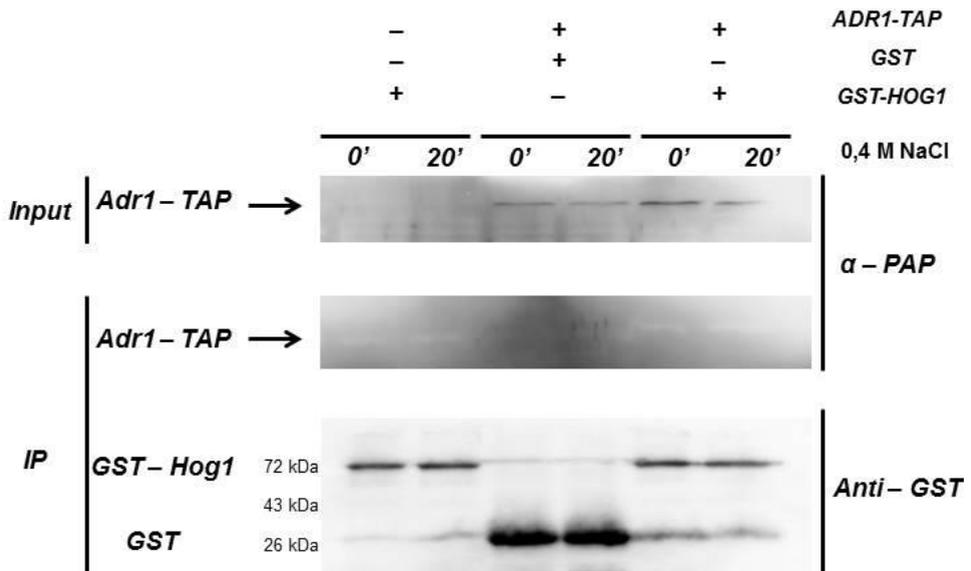


Figura 26. Estudio de la interacción de Hog1 y Adr1 in vitro. Mediante purificación por cromatografía de afinidad se estudió la copurificación de Adr1-TAP y Hog1-GST. Se utilizó la cepa silvestre que contenía Adr1 unida al epítipo TAP y la proteína GST; la que contenía Adr1 unida a TAP y Hog1 a GST; y la que contenía Hog1 unida a GST. Se realizó un tratamiento de 20 minutos con NaCl. Y tras la purificación con la resina Glutathione Sepharose™ para purificar GST se detecta en todas las cepas la proteína GST (sola o unida a Hog1) gracias al anticuerpo anti-GST. Sin embargo, no se detecta la proteína Adr1 fusionada a TAP gracias al anticuerpo α-PAP, en ninguna de las cepas. Se observa como control la proteína Adr1 unida a TAP en las muestras que no han sido purificadas y que contienen esta construcción.

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.

La inducción de los genes relacionados con el metabolismo peroxisomal de los ácidos grasos sugiere que la adaptación a estrés salino implica la inducción de la degradación de los ácidos grasos. Para estudiar el origen de estos ácidos grasos que podrían ser movilizados en respuesta a estrés, se decidió investigar la regulación de las acil-CoA graso sintetetasas, que catalizan el primer paso enzimático de la degradación oxidativa de los ácidos grasos. En levadura se conocen cinco tipos diferentes de acil-CoA graso sintetetasas, Faa1-4 y Fat1.

Se cuantificó la expresión de los cinco genes correspondientes en respuesta a estrés salino y se vio que el gen *FAA1* era el que más se inducía bajo estas condiciones (figura 27). Por otro lado, en condiciones de crecimiento con oleato en el medio, Faa1 continúa induciéndose, sin embargo, no es el que más se activa. Faa2 es la isoenzima más inducida en respuesta a oleato y no muestra inducción en respuesta a estrés salino.

En definitiva, el estrés salino y la presencia de oleato en el medio inducen de diferente manera los genes de las distintas acil-CoA sintetetasas, siendo Faa1 la más específica en respuesta a estrés salino.

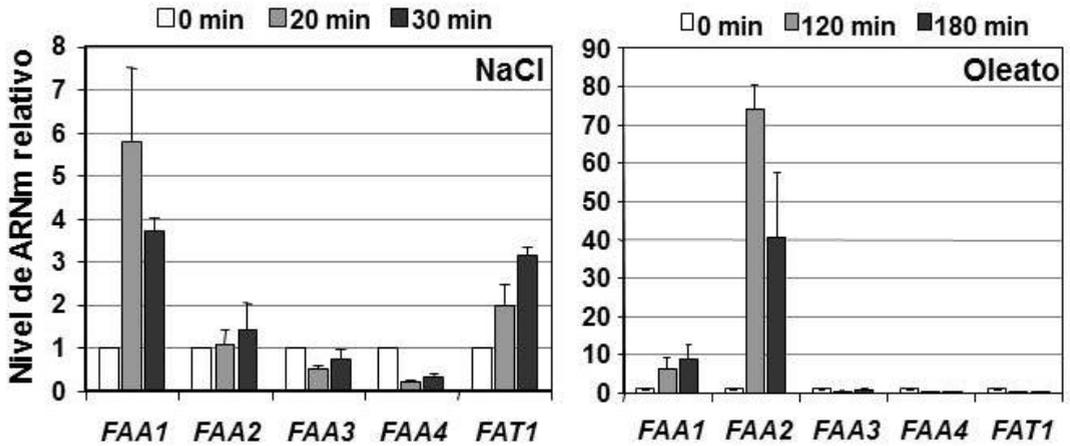


Figura 27. Faa1 es una acil-CoA graso sintetasa que se induce por salinidad. Mediante RT-PCR se cuantificó la expresión en la cepa silvestre, de cinco genes estructurales que codifican para las acil-CoA graso sintetisas: *FAA1*, *FAA2*, *FAA3*, *FAA4* y *FAT1*. Se estudió la expresión bajo condiciones de estrés salino causado por 0,4M NaCl y con oleato en el medio como fuente de carbono. Los resultados representan los valores medios de tres réplicas biológicas y se incluye la correspondiente desviación estándar. Los valores iniciales a tiempo 0 se han relativizado a 1 para poder comparar los resultados.

A continuación, se quiso determinar la localización intracelular de la proteína Faa1. Como se muestra en la figura 28, Faa1 colocaliza con las partículas lipídicas intracelulares y con la mayoría de los peroxisomas. Este resultado sugiere que el estrés salino induce de forma específica la expresión de la isoenzima Faa1 para incrementar la movilización de los ácidos grasos desde las partículas intracelulares de reserva de lípidos.

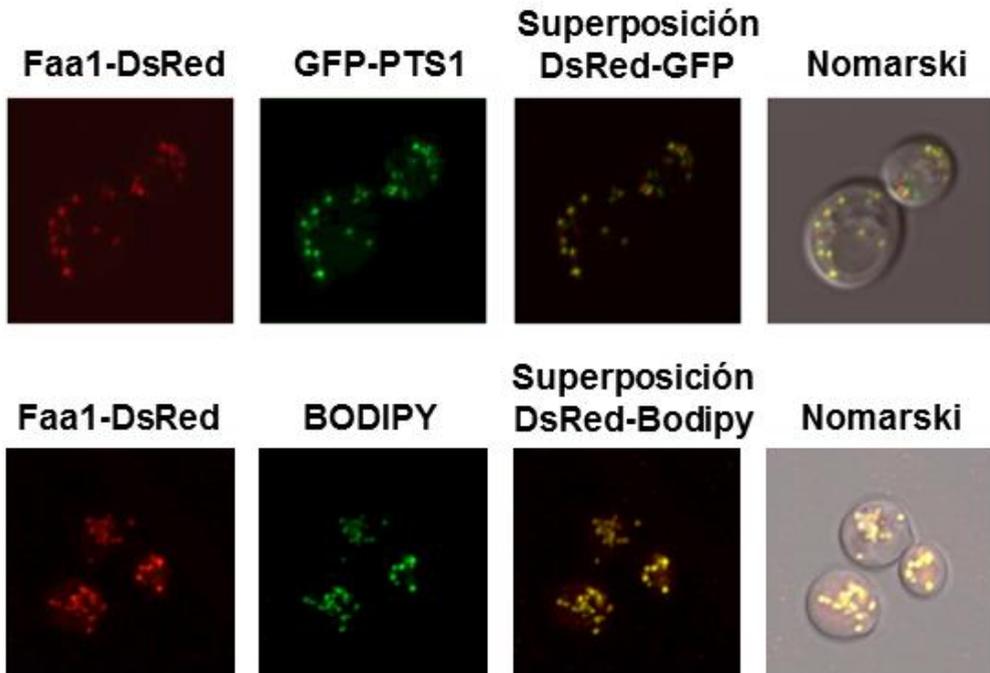


Figura 28. Faa1 colocaliza con las partículas lipídicas y los peroxisomas. En las imágenes superiores se muestra la colocalización de Faa1-dsRed con el GFP correspondiente a los peroxisomas (GFP-PTS1). En las inferiores se muestra la colocalización de Faa1 con las partículas lipídicas teñidas con Bodipy 493/503 en la cepa que expresa Faa1-dsRed.

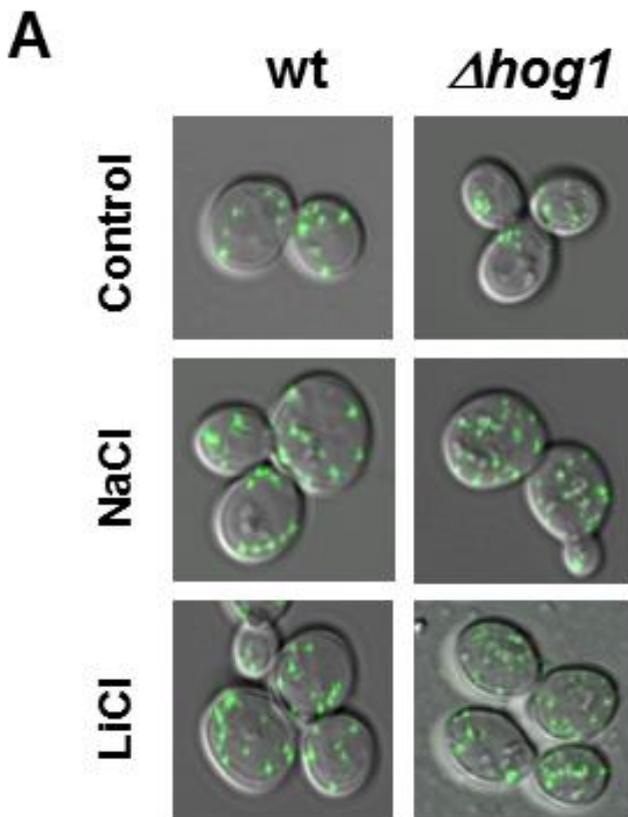
1.4. El estrés salino induce un incremento del número de peroxisomas de manera independiente de Hog1, pero dependiente de las proteínas Rtg, Dnm1 y Vps1.

Tras observar que el estrés salino induce la expresión de genes que codifican para enzimas peroxisomales involucradas en la β -oxidación, se quiso estudiar posibles cambios inducidos por estrés en cuanto a la abundancia peroxisomal a nivel celular. Para realizar este estudio, se

Resultados

visualizaron peroxisomas individuales en las células de levadura gracias a la expresión de GFP como fusión a la señal peroxisomal PTS1.

Como se muestra en la figura 29, se produce un incremento claro del número de peroxisomas en respuesta a estrés causado por NaCl y LiCl, en la cepa silvestre. El número de peroxisomas se incrementa de un promedio de 6 peroxisomas por célula a 12 o 14 peroxisomas con cada uno de los estreses respectivamente. Este incremento también tiene lugar en un mutante $\Delta hog1$. Por lo que este incremento de peroxisomas tiene lugar de manera independiente a la proteína Hog1.



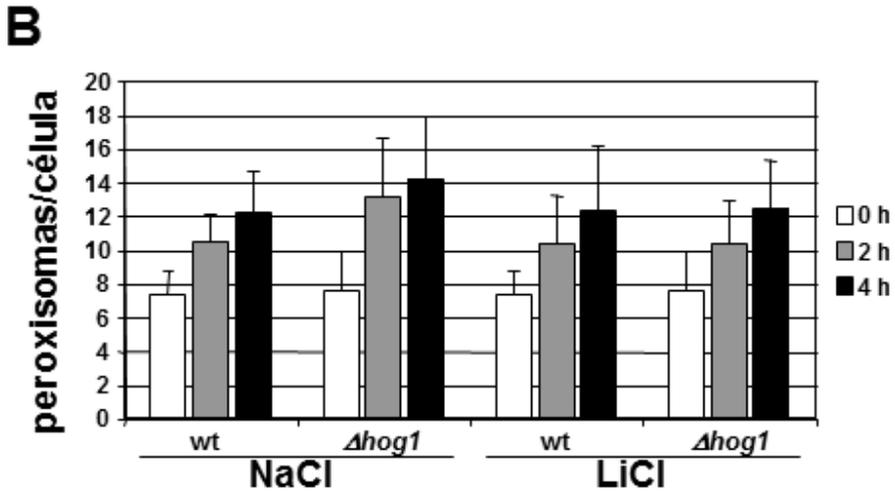


Figura 29. Na^+ y Li^+ incrementan la abundancia de estructuras peroxisomales independientemente de Hog1. Los peroxisomas fueron visualizados gracias a la expresión de GFP-PTS1 en la cepa silvestre y en el mutante $\Delta hog1$, en condiciones normales y tras un tratamiento de 2 y 4 horas producido por 0,8M de NaCl y 0,2M de LiCl. El número de peroxisomas se incrementa de 6 a 12 aproximadamente tras la aplicación del estrés (A). Para contabilizar el número de peroxisomas por células se realizaron “z-stacks” mediante microscopía confocal de todos los planos de las células. Y se contabilizaron un total de 50 células por condición. Se muestra en la gráfica el promedio correspondiente y su desviación estándar.

Este fenotipo observado de incremento de peroxisomas en respuesta a estrés causado por NaCl y LiCl, no se observa bajo condiciones de estrés osmótico en general (sorbitol o K^+) tal y como se muestra en la figura 30.

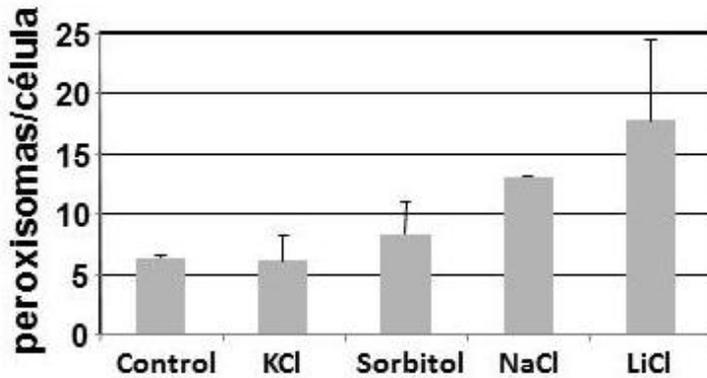


Figura 30. La inducción del número de peroxisomas es específica de cationes. El promedio del número de peroxisomas por célula se determinó como en la figura anterior, tras un tratamiento de 2 horas con 0,8M de KCl, sorbitol y NaCl y de 0,2M de LiCl.

A continuación, se quiso cuantificar la inducción del número de peroxisomas por Na^+ y Li^+ , en mutantes afectados por otras rutas de señalización relacionadas con las funciones peroxisomales. Las rutas que se tuvieron en cuenta para realizar este estudio fueron la ruta retrógrada (mutantes $\Delta rtg1$ y $\Delta rtg2$) y el proceso de fisión peroxisomal (mutantes $\Delta fis1$, $\Delta dnm1$ y $\Delta vps1$). Como se puede observar en la figura 31, el incremento del número de peroxisomas en respuesta a Na^+ y Li^+ no se observó en células de levadura que presentaban una interrupción en la ruta retrógrada. Además, Fis1 no parecía estar involucrada en este aumento. Sin embargo, las dinaminas Dnm1 y Vps1 sí que parecían ser necesarias para incrementar el número de peroxisomas en respuesta a estrés.

Se puede concluir que el estrés salino induce un incremento del número de peroxisomas por célula, a través de la ruta retrógrada y a través de GTPasas específicas necesarias para la fisión peroxisomal.

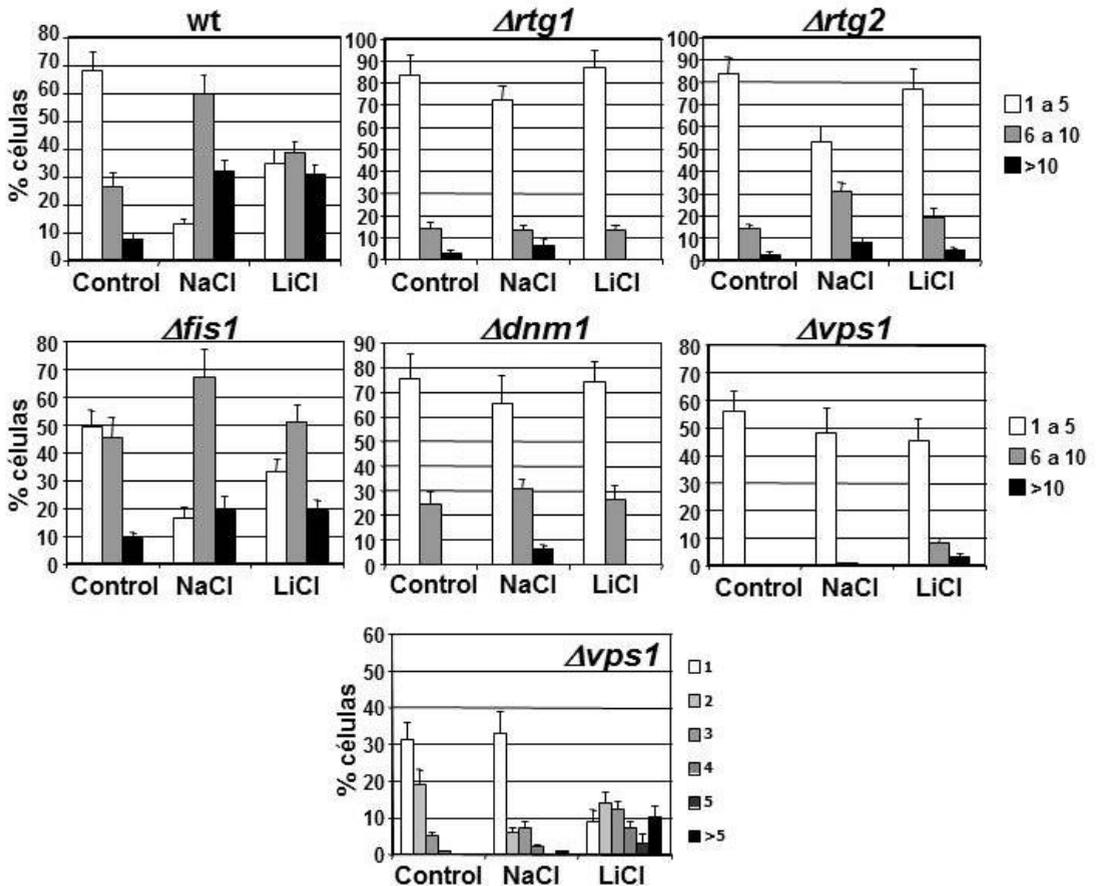


Figura 31. La ruta retrógrada y las proteínas de fisión Dnm1 y Vps1 son necesarias para producir un incremento del número de peroxisomas en respuesta a estrés salino. Se expresó GFP-PTS1 en las cepas de delección *Δrtg1*, *Δrtg2*, *Δfis1*, *Δdnm1* y *Δvps1*, y en la cepa silvestre. Se determinó el número de estructuras peroxisomales por célula de la misma forma que en la figura 30. Las células (n=50 en cada caso) se agruparon respecto al número de peroxisomas y se estableció un porcentaje. La delección de Vps1 provoca una reducción general en el número de peroxisomas, por lo que se cambió la forma de representarlo, como se muestra en la última gráfica.

Por último, se quiso estudiar si en la adaptación a estrés salino a largo plazo que se produce gracias a la fisión peroxisomal, también está involucrada la síntesis "de novo" de los peroxisomas. Para ello, se estudió la regulación del gen *PEX3*, que está involucrado en eventos tempranos de la biogénesis peroxisomal que se produce a partir del retículo endoplasmático. Se vio que la expresión de *PEX3* se induce fuertemente en respuesta a estrés salino (NaCl). (Figura 32).

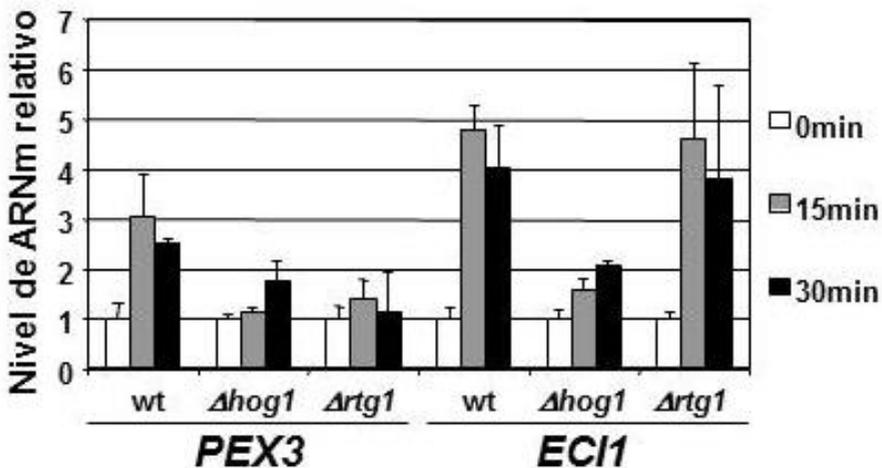


Figura 32. Hog1 y Rtg1 son necesarios para la inducción de *PEX3* en condiciones de estrés salino. La expresión de los genes *PEX3* y *ECI1* se cuantificó mediante RT-PCR en la cepa silvestre y en los mutantes $\Delta rtg1$ y $\Delta hog1$. Las condiciones de estrés que se utilizaron fueron de 0,4M de NaCl. Se muestran los valores medios de tres réplicas biológicas incluyendo la desviación estándar. Los valores iniciales de ARNm se relativizaron a 1 en cada uno de los genes y cepas.

Esta inducción del gen *PEX3* está regulada por la ruta HOG y la ruta retrógrada, ya que no se observa en los mutantes $\Delta hog1$ y $\Delta rtg1$. Esta regulación es diferente a la del gen *ECI1* que está involucrado en la β -

oxidación, ya que es dependiente de Hog1 pero independiente de Rtg1. (Figura 32).

1.5. Función de los peroxisomas en la activación de la respiración mitocondrial inducida por estrés salino.

Los resultados mostrados hasta el momento indican que existe un control genético de las enzimas involucradas en la degradación oxidativa de los ácidos grasos y una activación de la fisión peroxisomal y de la biogénesis. Y que éstos son importantes mecanismos adaptativos en respuesta a estrés salino para reforzar la β -oxidación en células de levadura.

Resultados anteriores, han mostrado que ante estas condiciones de estrés, las funciones mitocondriales se activan parcialmente. Por ello, se quiso estudiar si la regulación de la función peroxisomal durante el estrés se relaciona con la inducción de la respiración mitocondrial.

En levadura, existen dos vías principales, tal y como se ha descrito en la introducción, para introducir acetil-CoA en la mitocondria en condiciones en las que se requiere una alta tasa de respiración. El acetil-CoA es el principal sustrato del ciclo de Krebs y por eso necesita ser introducido en la mitocondria. (Figura 33).

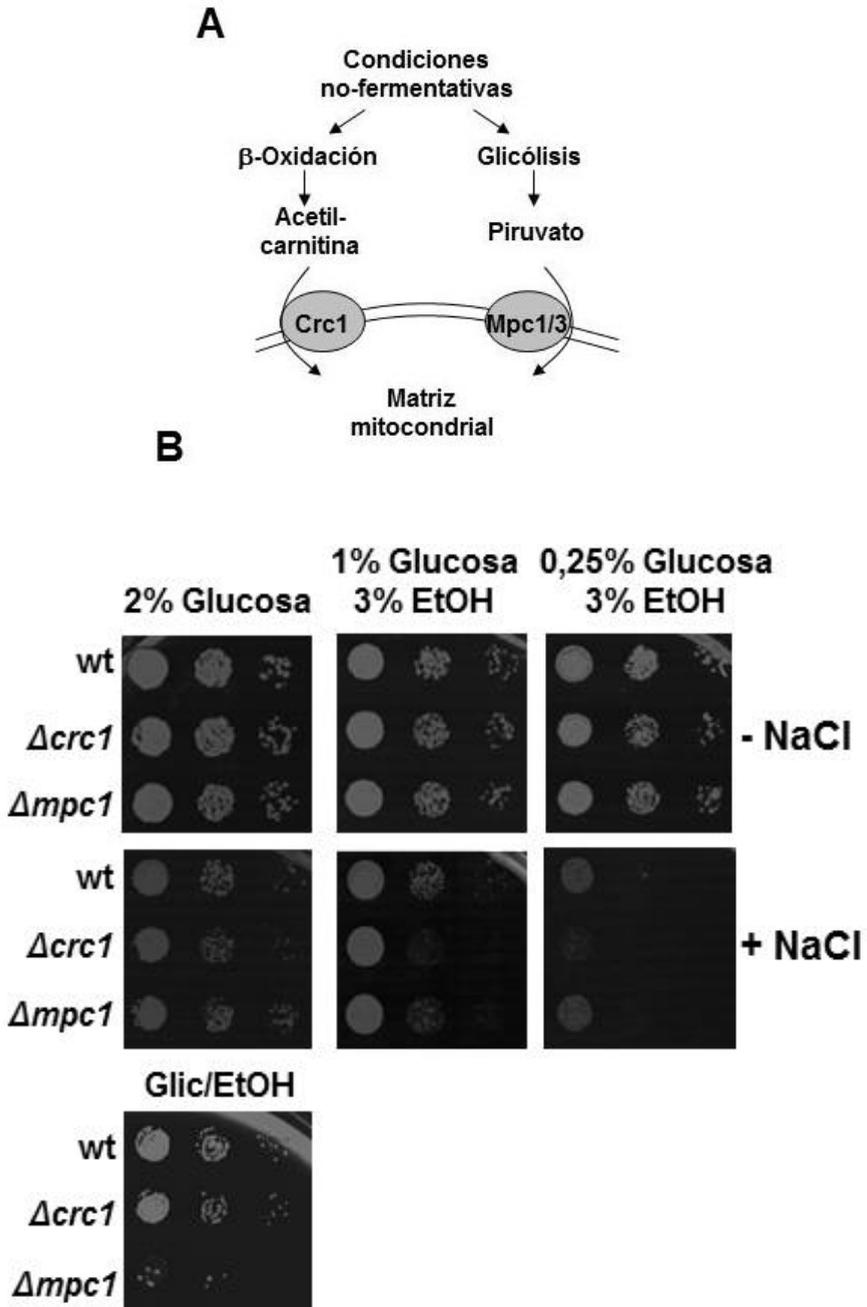


Figura 33. El transportador de carnitina mitocondrial es importante para la adaptación a estrés salino, mientras que el transportador de piruvato mitocondrial es esencial para el crecimiento respiratorio. En la parte superior se muestra una visión esquemática de las diferentes fuentes de acetil-CoA para el ciclo de Krebs mitocondrial (A). El crecimiento de las cepas mutantes *Δcrc1* y *Δmpc1*, y de la cepa silvestre BY4741 se 124

estudió en condiciones con baja (0.25 o 1%) y elevada (2%) disponibilidad de glucosa y sin o con la adición de 1M de NaCl (filas superiores). También se estudió en medio totalmente respiratorio que contenía glicerol (3%) y etanol (2%). (B). Se muestran tres diluciones seriadas del cultivo en cada caso (1:10, 1:100 y 1:1000).

La primera vía para introducir acetil-CoA es la que se produce gracias a la captación de piruvato, que es el producto final de la glicólisis, a través del transportador Mpc1/Mpc3. Y la segunda vía es la captación de acetil-carnitina procedente de la β -oxidación peroxisomal, a través del transportador Crc1. (Figura 33 A).

Para estudiar la importancia de ambos transportadores mitocondriales en la resistencia a estrés salino y en medio de crecimiento no fermentativo, se utilizaron los mutantes de delección $\Delta crc1$ y $\Delta mpc1$. En la figura 33 B se puede observar como las células que carecen del transportador de carnitina mitocondrial eran hipersensibles al estrés causado por NaCl, especialmente en condiciones limitantes de glucosa. Y ante estas mismas condiciones de estrés, parece ser que no es tan importante la captación de piruvato. Sin embargo, el transportador Mpc1 sí que era esencial para permitir el crecimiento en condiciones completamente respiratorias, mientras que en este caso el transportador Crc1 no era tan importante.

Estos datos indican que el importe de acetil-carnitina a la mitocondria es esencial para una eficiente adaptación a estrés, posiblemente por una activación de la respiración.

Por último, retomamos la idea de la importancia de los iones Na^+ y Li^+ , en la activación del metabolismo peroxisomal. Y se quiso comparar el

Resultados

crecimiento de la cepa silvestre en respuesta a diferentes concentraciones de los iones Na^+ , Li^+ y K^+ y en medio fermentativo (glucosa) o en un medio en que la célula activa la respiración (galactosa).

Como se puede observar en la figura 34, el estrés causado por Na^+ y Li^+ provoca un claro retraso del crecimiento respecto a las condiciones fermentativas. Y este retraso no es tan fuerte en el caso de K^+ , aunque también se produce. De este modo, se puede observar que el estrés por Na^+ o Li^+ limita el crecimiento mucho más en células que dependen de una respiración mitocondrial elevada. Se puede especular que estos iones inhiben específicamente la función mitocondrial.

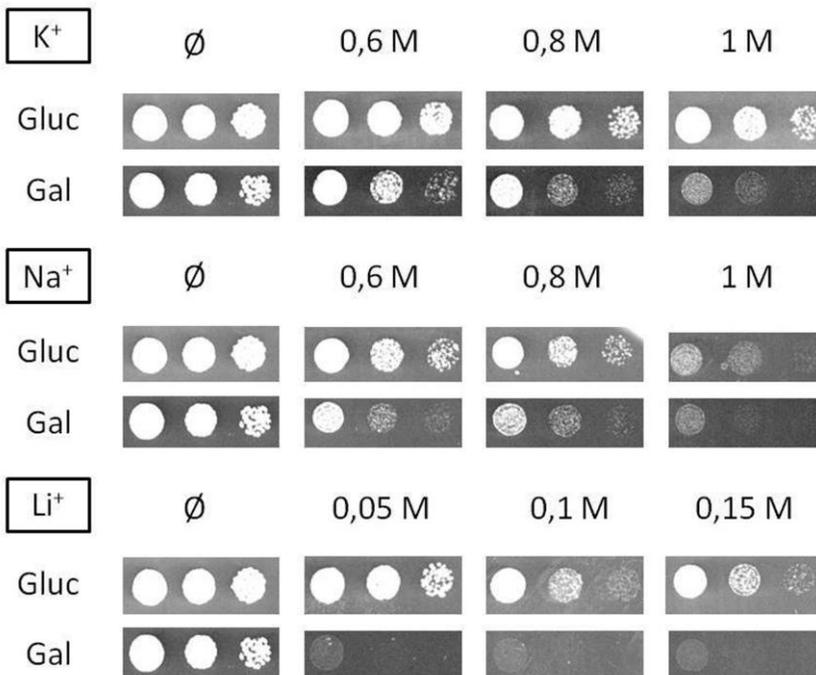


Figura 34. Los iones Li^+ y Na^+ provocan una inhibición específica en medio parcialmente respiratorio. Mediante un ensayo de crecimiento en medio fermentativo (glucosa) y medio parcialmente respiratorio (galactosa), se comparó el crecimiento de la

cepa silvestre en respuesta a diferentes concentraciones de los iones Na^+ , Li^+ y K^+ . Se muestran tres diluciones seriadas del cultivo en cada caso (1:10, 1:100 y 1:1000).

Estos resultados llevan a plantear que, los iones comentados provocan un daño en la respiración mitocondrial que podría llevar a la necesidad de reforzar este proceso a través de la inducción del metabolismo de los ácidos grasos.

2. Función del metabolismo de esfingolípidos en la regulación de la actividad mitocondrial y la muerte celular.

En el presente trabajo se estudia el metabolismo de esfingolípidos, ya que como se ha comentado en la introducción, son reguladores de la muerte celular mediada por la mitocondria en eucariotas superiores. Sin embargo, se desconoce cómo cambios en este metabolismo y de sus intermediarios influyen a nivel mitocondrial. Por ello, en el presente trabajo se estudia la ruta de degradación de esfingolípidos, en la cual se produce el intermediario hexadecenal a través de la proteína Dpl1 y se degrada gracias a la enzima Hfd1. Esta última enzima, como ya se ha comentado, se ha visto aumentada a nivel mitocondrial durante el estrés salino. Por ello, se decidió continuar el estudio por esta vía.

2.1. La ruta de degradación de esfingolípidos es un regulador de la función mitocondrial.

El hexadecenal, como se había comentado en la introducción se trata de un aldehído tóxico, presente como intermediario en la ruta de degradación de esfingolípidos que se muestra en la figura 35.

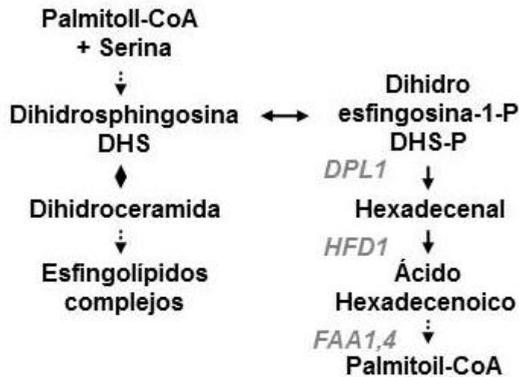


Figura 35. Ruta de biosíntesis de esfingolípidos complejos (izquierda) y de degradación de esfingolípidos (derecha). Se observa como a partir de palmitoil-CoA se constituyen esfingolípidos complejos a través de los intermediarios principales dihidroesfingosina y dihidroceramida y cómo la dihidroesfingosina se degrada a palmitoil-CoA a través de los intermediarios dihidroesfingosina-1-fosfato, hexadecenal y ácido hexadecenoico. Se muestran las enzimas más importantes de la ruta para este estudio: Dpl1, Hfd1 y Faa1 y 4.

Para poder estudiar esta ruta en más profundidad, así como el efecto dañino que produce el hexadecenal, se decidió estudiar en primer lugar distintos mutantes de esta ruta de degradación. Mediante diferentes ensayos se quiso ver el efecto que tiene este intermediario tóxico al inducir su producción o inhibir su biosíntesis.

Un primer ensayo que se realizó fue el estudio del consumo de O₂ de las cepas de levadura que carecían de las diferentes proteínas de esta ruta

de degradación: $\Delta hfd1$, $\Delta faa1$, $\Delta faa4$ y $\Delta dpl1$ en comparación con la cepa silvestre BY4741. Mediante este ensayo se puede relacionar el metabolismo de los esfingolípidos con la tasa de respiración y ver si alguno de los intermediarios de la ruta tiene algún efecto sobre este proceso.

Se midió el consumo de cada una de las cepas en estudio, en medio mínimo, tal y como se explica en el apartado de materiales y métodos. Y se utilizó como control negativo la cepa mutante $\Delta fzo1$ que carece de la mitofusina Fzo1 (responsable de la fusión mitocondrial en levadura) y como consecuencia, mutantes en esta enzima, muestran tasas de respiración reducidas (Merz and Westermann, 2009).

Las cepas mutantes $\Delta hfd1$, $\Delta faa1$ y $\Delta faa4$ mostraban una reducción del consumo de O_2 respecto a la cepa silvestre (figura 36). Sin embargo, el mutante $\Delta dpl1$ aumenta su tasa de respiración en condiciones normales.

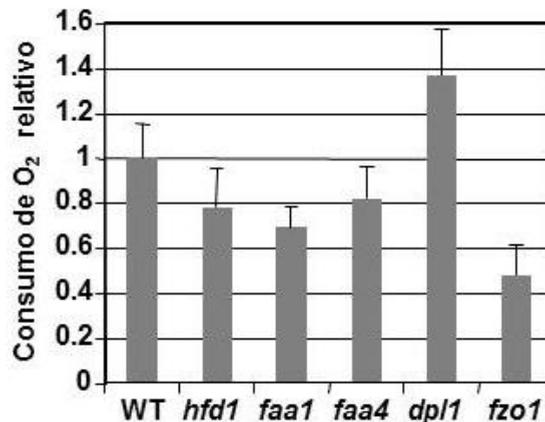


Figura 36. Efecto de la ruta de degradación de esfingolípidos en la capacidad respiratoria. Mediante un electrodo de oxígeno se midió el consumo de O_2 de cada una de las cepas BY4741 (WT), $\Delta hfd1$, $\Delta faa1$, $\Delta faa4$ y $\Delta dpl1$, durante 30 minutos y en medio mínimo. Los valores de consumo obtenidos para la cepa silvestre se ajustaron a 1 y se

Resultados

utilizó como control la cepa $\Delta fzo1$. Se muestran los valores de consumo relativo medio de cada triplicado realizado para cada cepa y la desviación estándar.

La cepa que muestra un mayor consumo es concretamente la que no sintetizaría el intermediario hexadecenal. El resto de mutantes que muestran un menor consumo son las que tienen interrumpida la ruta por debajo de este intermediario y podrían provocar una deficiencia en su metabolización, lo que podría llevar a una reducción en el consumo de oxígeno.

Siguiendo la misma estrategia de interrupción de la ruta comentada, se realizó un estudio de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) de los mutantes $\Delta hfd1$ y $\Delta dpl1$, que interrumpirían la ruta por arriba y por debajo del hexadecenal respectivamente. De esta manera se puede estudiar si el hexadecenal tiene algún efecto en cuanto al aumento de los niveles de ROS.

El estrés salino provoca cambios importantes en la actividad mitocondrial. Resultados anteriores habían demostrado que esta ruta de degradación de esfingolípidos se induce en respuesta a estrés salino (Ni et al., 2009). Además, en nuestro grupo de investigación se determinó que la proteína Hfd1 se acumulaba en mitocondrias en condiciones de estrés salino (Martinez-Pastor et al., 2010) y que además su expresión se inducía en las mismas condiciones de estrés (Ruiz P. resultados no publicados. 2012).

Se decidió medir los niveles de ROS de las cepas mutantes comentadas en comparación con la cepa silvestre BY4741 y en condiciones

de estrés salino en las que la ruta en estudio se encuentra inducida para forzar más el fenotipo de los mutantes en estudio. Las cepas se trataron durante dos horas con un estrés de 1M de NaCl. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 37.

Los niveles de ROS del mutante *Δdpl1* son inferiores a los de la cepa silvestre, al contrario que ocurre con el mutante *Δhfd1*. El mutante *Δdpl1* no sintetizaría hexadecenal y el mutante *Δhfd1* no lo metabolizaría y lo acumularía en la célula, lo que indica que el hexadecenal produce un efecto negativo en las células provocando un aumento de las ROS intracelulares.

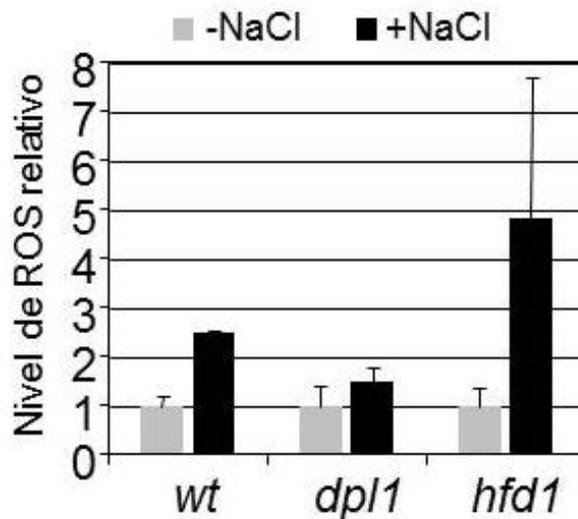


Figura 37. Función de enzimas del metabolismo del hexadecenal en la acumulación de ROS. Las cepas mutantes *Δdpl1*, *Δhfd1*, así como la cepa silvestre, se crecieron en medio rico hasta fase exponencial y se sometieron a un estrés de 2 horas de 1M NaCl. Los niveles de ROS se midieron mediante la oxidación de la diclorodihidrofluoresceína, como se describe en el apartado de materiales y métodos. Los niveles de fluorescencia obtenidos para las condiciones iniciales se relativizaron a 1 para una mejor comparación del aumento de las ROS con salinidad. Los niveles de ROS se determinaron por duplicado en tres cultivos independientes y se representa la media y la correspondiente desviación típica.

Resultados

Estos datos sugieren que la enzima Hfd1 que metaboliza el hexadecenal tiene una función importante en la modulación de la actividad mitocondrial.

A continuación se quiso determinar la localización intracelular de Hfd1. Para ello, se realizó un estudio mediante microscopía confocal en células de levadura que expresaban Hfd1 fusionado a GFP. Y para poder visualizar la fluorescencia roja correspondiente a la mitocondria se utilizó la fusión *OM14-dsRed*. Ambas construcciones se co-transformaron en la cepa en estudio (BY4741).

Este ensayo se realizó creciendo esta cepa en medio mínimo con dos fuentes de carbono diferentes: glucosa como fuente fermentativa y galactosa como fuente parcialmente respiratoria, hasta fase exponencial. Los resultados obtenidos se observan en la figura 38.

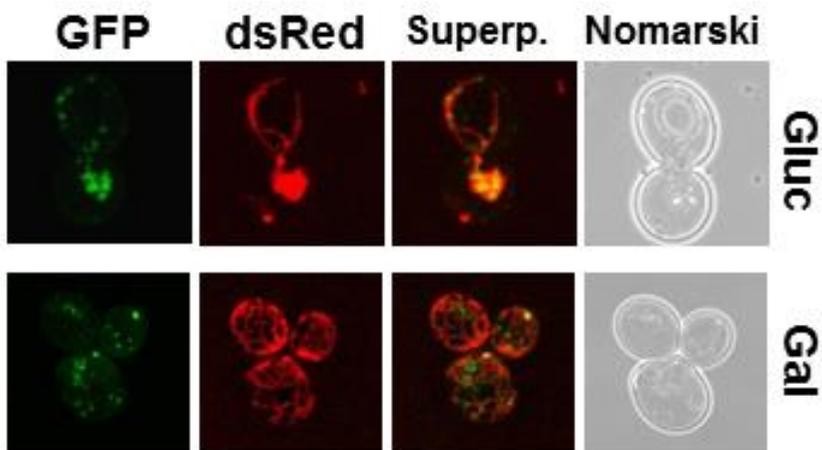


Figura 38. Hfd1 localiza en múltiples focos a lo largo de la red mitocondrial. La cepa silvestre BY4741 co-transformada con los plásmidos pAG415-GPD-OM14-dsRed y pAG426-GPD-HFD1-GFP, se creció en medio mínimo sin leucina y sin uracilo, y con glucosa (Gluc) o galactosa (Gal) como fuente de carbono. Se creció hasta fase exponencial

y se visualizó mediante microscopía confocal. Se observa en verde la fluorescencia correspondiente a la proteína Hfd1 (GFP) y en rojo la correspondiente a la mitocondria (dsRed). La tercera columna de imágenes (Superp.) muestra la superposición entre ambas fluorescencias y la cuarta la luz transmitida (Nomarski). Se muestran imágenes representativas para cada condición.

La localización de Hfd1 en condiciones normales (con glucosa como fuente de carbono), se encuentra en focos cercanos a la mitocondria. Y al inducir un aumento de la red mitocondrial al cambiar la fuente de carbono a galactosa, se sigue observando cómo la localización de Hfd1 sigue estando en focos puntuales cercanos a la mitocondria. Estos datos sugieren que la conversión de hexadecenal como consecuencia de la degradación de los esfingolípidos se produce en regiones concretas cercanas a la mitocondria.

Si los niveles intracelulares de hexadecenal provocan disfunción mitocondrial y estrés oxidativo, se espera que manipulaciones de esta ruta que favorecen la acumulación de hexadecenal afecten a la viabilidad celular. Por lo que, para continuar con el estudio de la toxicidad del hexadecenal, se decidió sobreexpresar la proteína Dpl1 en un mutante *Δhfd1* así como en la cepa silvestre. De esta manera se estará induciendo la producción de hexadecenal. Para ello, se construyeron las cepas BY4741 y *Δhfd1* con el plásmido pAG426-GAL1-DPL1-HA. La cepa mutante *Δhfd1* que sobreexpresa Dpl1 es la más importante en este ensayo debido a que sobreexpresa la enzima encargada de la síntesis de hexadecenal e inhibe su metabolización, provocando una acumulación de este intermediario.

Se obtuvieron cultivos en medio mínimo (sin uracilo) de las cepas comentadas hasta fase exponencial y se comparó su crecimiento en medio

Resultados

sólido sin o con la inducción de Dpl1 (glucosa o galactosa respectivamente) y además en presencia o no de daño mitocondrial (valinomicina a una concentración de 4 μ M).

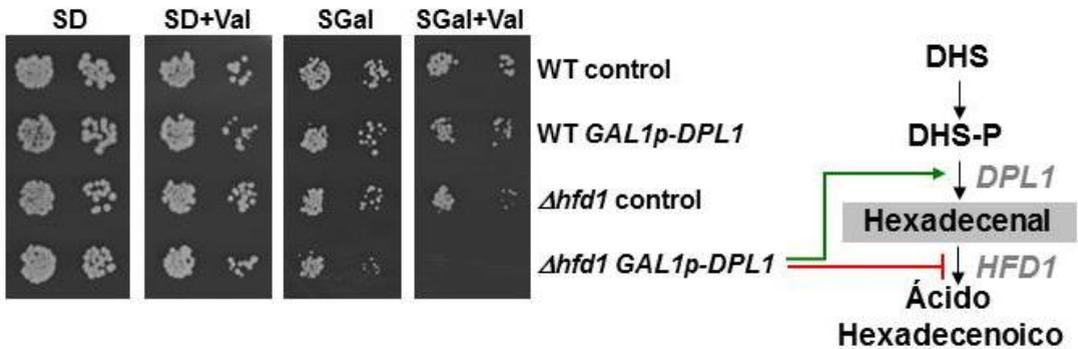


Figura 39. La sobreexpresión de Dpl1 inhibe el crecimiento en un mutante $\Delta hfd1$.

Mediante un ensayo de crecimiento en medio sólido se comparó el crecimiento de las cepas de sobreexpresión de Dpl1, BY4741 y $\Delta hfd1$ con el plásmido pAG426-GAL1-DPL1-HA; y las mismas cepas con el plásmido pAG426-GAL1-ccdB-HA, como control. Se compararon en condiciones normales (SD) y con estrés mitocondrial causado por Valinomicina a 4 μ M. Y en condiciones inductoras de la sobreexpresión en SGal sin y con Valinomicina. Se muestran tres diluciones seriadas del cultivo en cada caso (1:10, 1:100 y 1:1000).

En la figura 39 se muestra como la sobreexpresión de Dpl1 en un mutante $\Delta hfd1$ provoca un claro retraso del crecimiento en condiciones sin estrés. Esta inhibición del crecimiento se incrementa en condiciones de estrés mitocondrial causado por valinomicina. Este retraso del crecimiento no se observa en el mutante $\Delta hfd1$, ni en la cepa silvestre que sobreexpresa Dpl1, lo que indica que es el fenotipo conjunto el que fuerza el daño provocado por el hexadecenal a nivel de crecimiento.

Siguiendo con esta misma estrategia de sobreexpresión de Dpl1, se investigó si la manipulación genética de la ruta de degradación de esfingolípidos producía cambios en los niveles de ROS (figura 40).

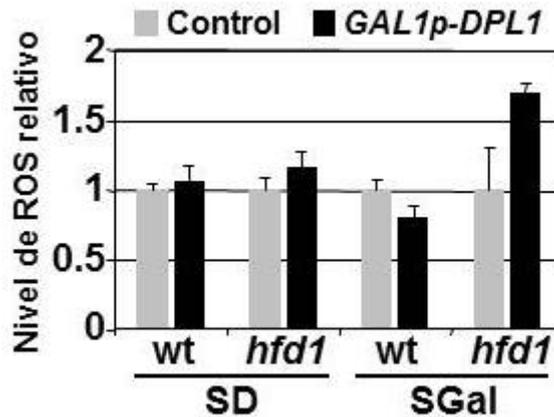


Figura 40. La cepa $\Delta hfd1$ que sobreexpresa la proteína Dpl1 muestra un aumento de las ROS intracelulares. Las cepas de sobreexpresión de Dpl1, BY4741 y $\Delta hfd1$ con el plásmido pAG426-GAL1-DPL1-HA y las mismas cepas con el plásmido pAG426-GAL1-ccdB-HA, como control, se crecieron en medio mínimo (SD y SGal) hasta fase exponencial. Los niveles de ROS se midieron mediante la oxidación de la diclorodihidrofluoresceína, como se describe en el apartado de materiales y métodos. Los niveles de fluorescencia obtenidos para las condiciones iniciales se relativizaron a 1. Los niveles de ROS se determinaron por duplicado en tres cultivos independientes y se representa la media y la correspondiente desviación típica.

La cepa mutante $\Delta hfd1$ que sobreexpresa la proteína Dpl1 muestra un aumento de las ROS intracelulares respecto al resto de cepas. Esto indica de nuevo la importancia de la acumulación de hexadecenal en la inhibición del crecimiento a través de cambios en los niveles de ROS.

A continuación se quiso estudiar si la intervención genética que favorece la acumulación de hexadecenal de alguna manera afectaba a la

morfología mitocondrial. Se visualizaron las mitocondrias con MitoTracker® en las cepas anteriormente descritas.

La figura 41 muestra como la cepa silvestre posee una mitocondria continua. Sin embargo, la mitocondria se encuentra ligeramente fragmentada en el mutante $\Delta hfd1$ que no sobreexpresa Dpl1 y esta fragmentación se incrementa con la sobreexpresión de Dpl1.

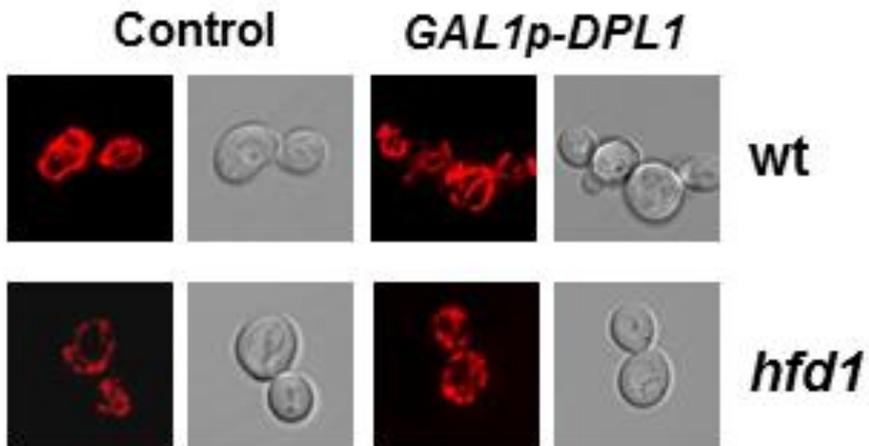


Figura 41. La sobreexpresión de Dpl1 induce fragmentación mitocondrial en el mutante $\Delta hfd1$. Las cepas de sobreexpresión de Dpl1, BY4741 y $\Delta hfd1$ con el plásmido pAG426-GAL1-DPL1-HA; y las mismas cepas con el plásmido pAG426-GAL1-ccdB-HA, como control, se crecieron en medio mínimo con galactosa como fuente de carbono para inducir la expresión de Dpl1. Las células se crecieron hasta fase exponencial y se realizó un tratamiento con MitoTracker® para visualizar la mitocondria mediante microscopía confocal.

Resumiendo los resultados de este apartado, se puede concluir que la modulación del metabolismo de esfingolípidos y en particular del hexadecenal, parece regular la función mitocondrial y la viabilidad celular.

2.2. El hexadecenal es el principal inductor de la disfunción mitocondrial y su fragmentación.

El efecto del hexadecenal en la viabilidad celular se estudió directamente por la adición externa del mismo a las células de levadura.

En primer lugar se decidió realizar un ensayo de crecimiento en medio sólido del mutante *Δhfd1* en comparación con la cepa silvestre. Pero no se adicionó únicamente hexadecenal de forma externa, si no que se realizó el estudio añadiendo otros intermediarios de la ruta como el ácido hexadecenoico, el ácido palmitoico y la esfingosina-1-fosfato para ver el efecto que producían sobre las células.

Las dos cepas se crecieron hasta fase exponencial en medio mínimo y se realizó un tratamiento de 2 horas con hexadecenal, así como con los intermediarios que se encontraban aguas abajo de la ruta (ácido hexadecenoico y palmitoico). Se realizaron diluciones seriadas para estudiar el crecimiento de estas cepas en medio sólido rico (YPD), con estrés oxidativo causado por Menadiona y en condiciones de estrés mitocondrial provocado por Valinomicina. Como se muestra en la figura 42, el hexadecenal inhibe fuertemente el crecimiento celular en la cepa silvestre, el cual se agrava ligeramente por estrés oxidativo o daño mitocondrial. Metabolitos que se encuentran aguas abajo como los ácidos hexadecenoico y palmitoico no provocan una inhibición del crecimiento, lo que demuestra la especificidad del hexadecenal. Además, se aprecia de forma clara que la enzima Hfd1, es importante para contrarrestar la toxicidad del hexadecenal.

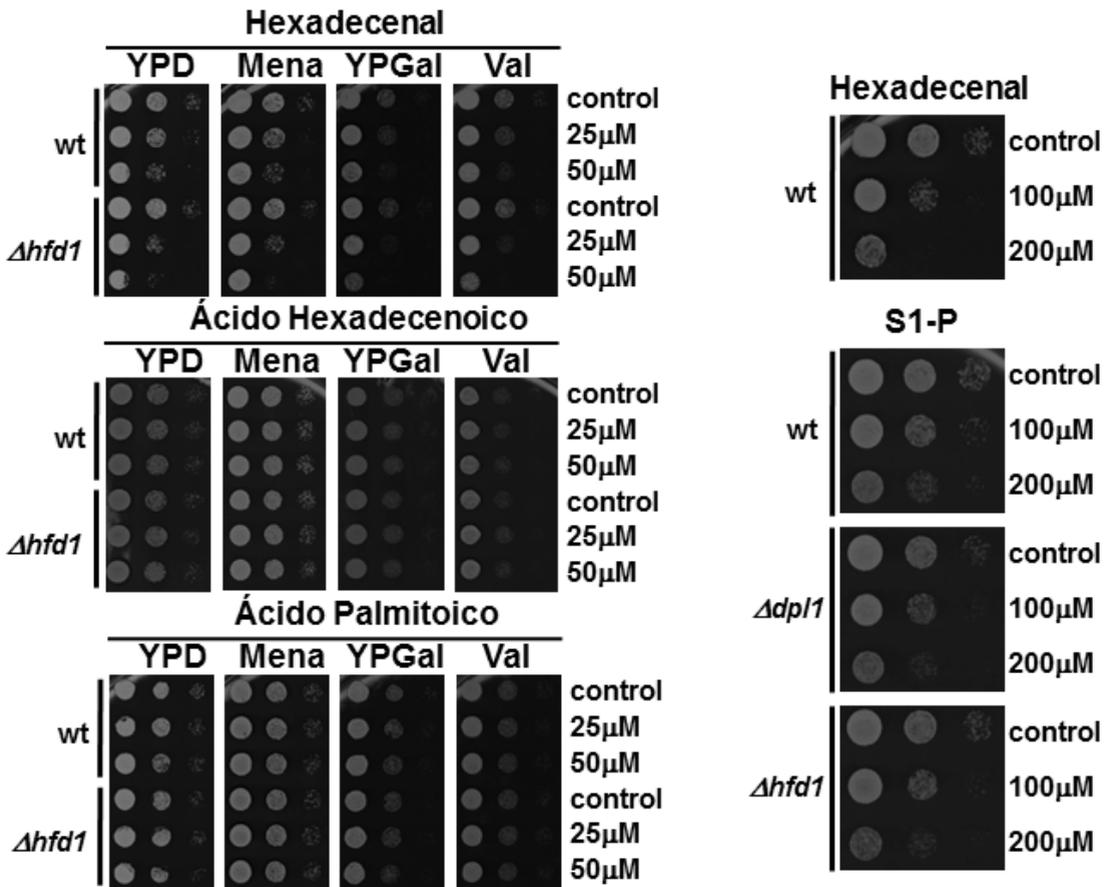


Figura 42. El hexadecenal es el intermediario de la ruta con mayor efecto inhibitorio del crecimiento. Las cepas BY4741, $\Delta hfd1$ y $\Delta dpl1$, se crecieron hasta fase exponencial en medio mínimo y se trataron durante 2 horas con los intermediarios de la ruta indicados y a las diferentes concentraciones que se muestran en la imagen. Posteriormente se cultivaron en medio sólido rico (YPD), con 50 μ M de Menadiona (Mena) y 4 μ M de Valinomicina (Val). En el caso de la esfingosina-1-fosfato se comparó el crecimiento directamente en medio rico.

Para estudiar el efecto de la esfingosina-1-fosfato también se comparó el crecimiento de la cepa mutante $\Delta dpl1$, la cual no metabolizaría este intermediario. En este caso se utilizaron concentraciones de intermediario más elevadas que en los casos anteriores, debido a que no

se observaban diferencias de crecimiento a dosis inferiores. Además, únicamente se realizó este ensayo en condiciones normales (YPD).

Los resultados mostraron que el metabolito que se encuentra aguas arriba, la esfingosina-1-fosfato, sí que induce aunque de forma más débil, muerte celular, independientemente de las actividades enzimáticas aguas abajo de Dpl1 y Hfd1 (figura 42). Por ello, parece ser que el metabolito más importante en cuanto a actividad biológica, en la ruta de degradación de la esfingosina-1-fosfato, es el hexadecenal.

A continuación, teniendo en cuenta que se había visto que la sobreexpresión de Dpl1 en un mutante $\Delta hfd1$ provocaba una fragmentación de la mitocondria, se quiso estudiar si la adición externa del hexadecenal también provocaba el mismo efecto.

Como se puede observar en la figura 43, un tratamiento con hexadecenal induce rápidamente la fragmentación de la mitocondria preferentemente en células crecidas en glucosa como fuente de carbono. Cuando la red mitocondrial de la cepa silvestre se encuentra totalmente desarrollada ante condiciones de crecimiento respiratorias, parece ser que está más protegida de la fragmentación que induce el hexadecenal. Esta protección no ocurre en el mutante $\Delta hfd1$.

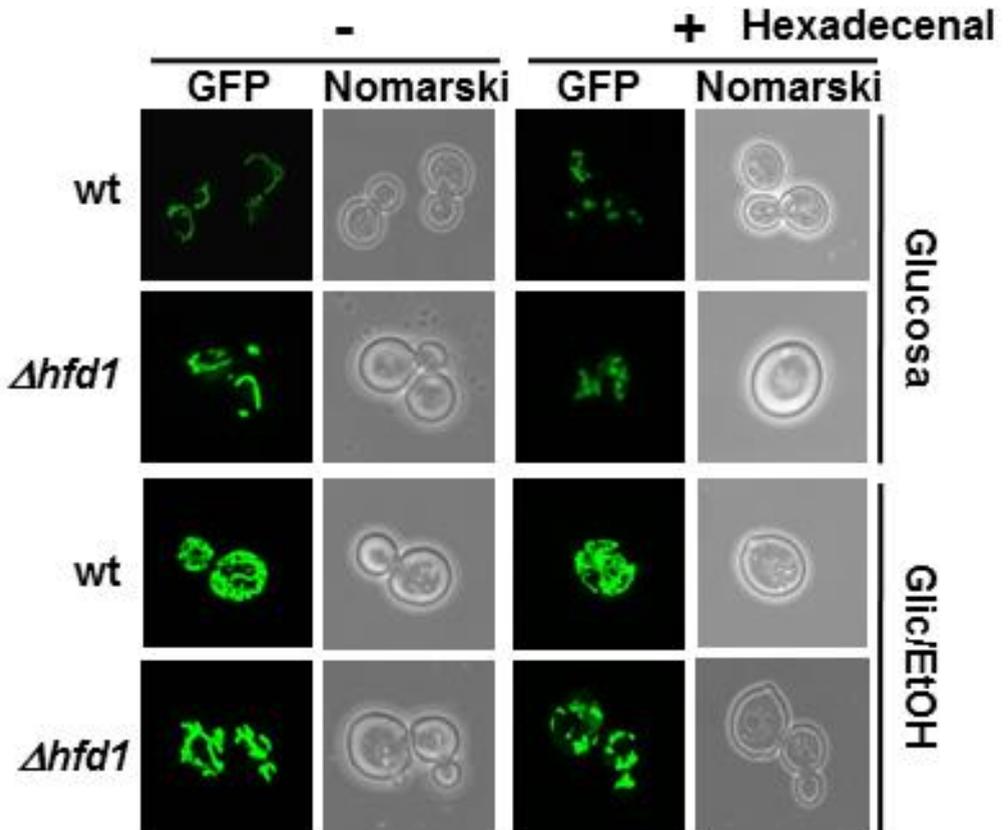


Figura 43. La adición externa del hexadecenal provoca fragmentación mitocondrial dependiente de Hfd1. Las cepas BY4741 y $\Delta hfd1$ transformadas con el plásmido pVT100U-mtGFP, se visualizaron mediante microscopía confocal, en medio fermentativo (SD) con glucosa como fuente de carbono y con medio respiratorio (Glic/EtOH) con glicerol como fuente de carbono. El hexadecenal fue añadido durante 1 hora a una concentración de 50 μ M.

Además, se realizó un ensayo de crecimiento en medio sólido fermentativo y en medio parcialmente respiratorio (galactosa) para ver si esta activación mitocondrial también protege de la muerte celular inducida por el hexadecenal. Se comparó de nuevo la cepa silvestre BY4741 y el mutante $\Delta hfd1$ en ambos medios y tras un tratamiento de 1 hora con hexadecenal a las concentraciones mostradas en la figura 44.

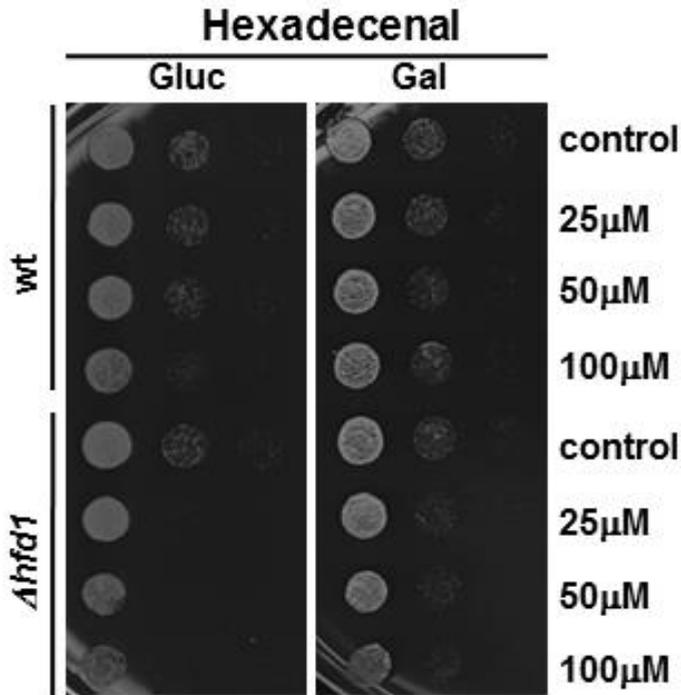


Figura 44. El crecimiento con galactosa contrarresta la inhibición del crecimiento que produce el hexadecenal. La cepa silvestre BY4741 y el mutante $\Delta hfd1$ se crecieron en medio fermentativo (Gluc) y en medio parcialmente respiratorio (Gal), hasta fase exponencial y se trataron durante 1 hora con diferentes concentraciones de hexadecenal. Posteriormente se cercieron en medio rico sólido.

En definitiva, con este ensayo se muestra que el crecimiento en galactosa contrarresta la inhibición del crecimiento que provoca el hexadecenal, el cual se continúa observando en el mutante $\Delta hfd1$.

Este estudio se continuó para ver de qué proteínas dependía esta fragmentación mitocondrial inducida por el hexadecenal. En este sentido, se realizó un ensayo mediante microscopía confocal en el cual se visualizaron las cepas mutantes $\Delta fis1$, $\Delta dnm1$ y en la cepa silvestre. Estas

Resultados

cepas carecen de la proteína de fisión Fis1 y de la GTPasa también implicada en este proceso Dnm1.

Como se muestra en la figura 45, la fragmentación mitocondrial inducida por el hexadecenal dependía de la GTPasa Dnm1 y no de la proteína de fisión Fis1. Ya que la cepa silvestre, tras la adición externa de hexadecenal muestra fragmentación mitocondrial, al igual que ocurre en la cepa mutante $\Delta fis1$. Sin embargo, esta fragmentación ya no se observa en el mutante $\Delta dnm1$.

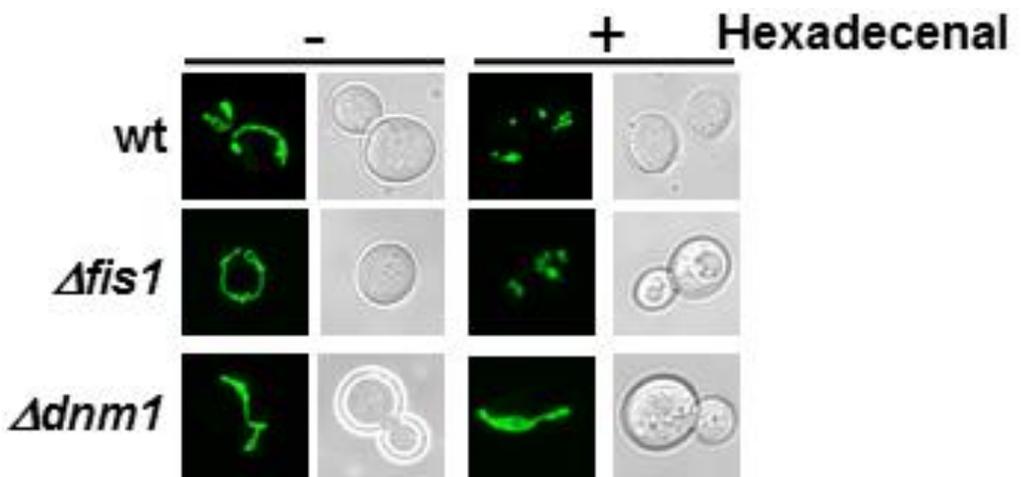


Figura 45. El hexadecenal induce fragmentación mitocondrial a través de la GTPasa Dnm1. Las cepas que se muestran en la imagen transformadas con el plásmido pVT100U-mtGFP, se crecieron en medio mínimo hasta fase exponencial y se trataron con 50 μ M de hexadecenal durante una hora, antes de visualizarlas al microscopio.

A continuación se quiso comprobar la relación de estas proteínas con la muerte celular inducida por el hexadecenal para poder entender mejor este proceso. Se comparó el crecimiento de la cepa silvestre BY4741 y de los mutantes $\Delta fis1$ y $\Delta dnm1$. Las tres cepas se crecieron en medio

mínimo hasta fase exponencial y se realizó un tratamiento de 2 horas con diferentes concentraciones de hexadecenal. Tras el tratamiento se comparó el crecimiento en medio rico sólido.

Los resultados que se obtuvieron se muestran en la figura 46. En ausencia de las proteínas Fis1 o Dnm1 de fisión no se produce una resistencia a hexadecenal en ninguno de los casos. Por lo que, la fisión mitocondrial no es la razón por la que el hexadecenal induce la muerte celular, ya que el mutante $\Delta dnm1$ era incluso más sensible a este aldehído que la cepa silvestre.

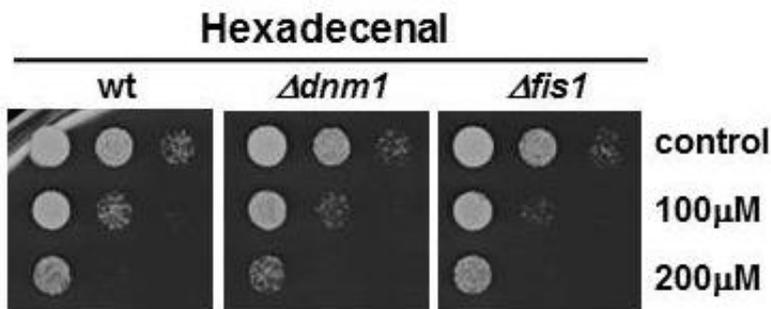


Figura 46. La supresión de la fisión mitocondrial no contrarresta la inhibición del crecimiento producida por el hexadecenal. Las cepas que se muestran en la imagen, se crecieron hasta fase exponencial en medio mínimo y se trataron durante 2 horas con hexadecenal a las concentraciones indicadas. Posteriormente, se cultivaron en medio rico sólido.

En conjunto, el hexadecenal inhibe eficientemente el crecimiento de células de levadura, lo cual no está ligado a la fragmentación mitocondrial. Aunque la fragmentación mitocondrial generalmente se asocia con la apoptosis en diferentes modelos celulares, no es un prerrequisito para la muerte celular (Sheridan and Martin, 2010). En células de mamífero, la

proteína de fisión Drp1 es la responsable de la fragmentación mitocondrial que se produce en el proceso de apoptosis, pero en comparación a lo que se ha comentado en el presente trabajo para levadura, su función en la fisión mitocondrial no es decisiva para producir el aumento de permeabilización de la membrana externa mitocondrial y como consecuencia la muerte celular (Parone et al., 2006); (Sheridan et al., 2008).

2.3. La modulación del metabolismo de esfingolípidos activa la muerte celular mitocondrial en levadura.

A continuación se quiso estudiar si la ruta de degradación de esfingolípidos y concretamente el intermediario hexadecenal, activa la muerte celular, a través de la vía mitocondrial. En eucariotas superiores, la apoptosis mitocondrial se induce irreversiblemente gracias a la permeabilización de la membrana externa mitocondrial. Este proceso está fuertemente controlado por miembros pro- y anti-apoptóticos de la familia de proteínas Bcl-2. En levadura sólo se ha identificado un ortólogo de Bcl-2, Ybh3, que tiene propiedades pro- y anti-apoptóticas (Buttner et al., 2011); (Cebulski et al., 2011). Se quiso estudiar si Ybh3 tenía algún papel en la muerte celular inducida por el hexadecenal.

En primer lugar se realizó un ensayo mediante microscopía confocal, en el que se utilizó la cepa silvestre BY4741 que expresa Ybh3 como fusión a GFP. Esta cepa se creció en medio mínimo hasta fase exponencial y se realizó un tratamiento con ácido acético a 100 μ M y hexadecenal a 50 μ M

durante una hora. Para visualizar la mitocondria en rojo se utilizó el tratamiento con MitoTracker®.

Como se muestra en la figura 47, tras el tratamiento con ácido acético, el cual induce apoptosis, se observa cómo la proteína Ybh3 pasa de una localización difusa en condiciones control (sin tratamiento) a una localización mitocondrial tras el tratamiento. Lo que indica que tras el estímulo apoptótico, la proteína Ybh3 se transloca a la mitocondria para inducir su permeabilización (Buttner et al., 2011).

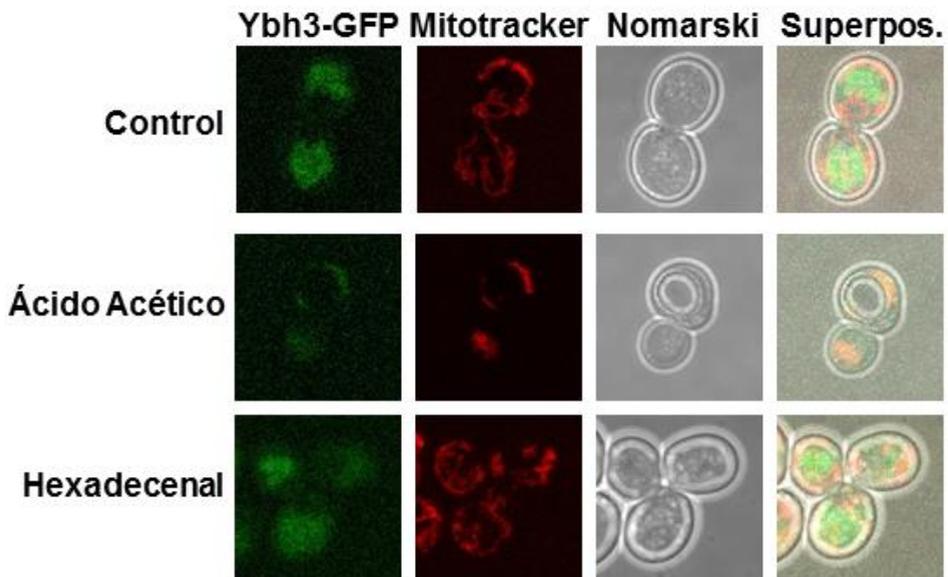


Figura 47. Ybh3 se asocia a la mitocondria tras un estímulo por ácido acético, pero no por hexadecenal. La cepa silvestre que expresaba Ybh3-GFP, translocaba esta proteína hacia la mitocondria (teñida con MitoTracker®), ante un tratamiento con ácido acético (100 μ M, 1 h). Esta translocación no ocurría con el tratamiento de 1 hora con hexadecenal (50 μ M).

Sin embargo, el tratamiento con hexadecenal no inducía una localización de Ybh3 hacia la mitocondria (figura 47).

Además, se quiso estudiar cuál era la susceptibilidad del mutante $\Delta ybh3$ a la adición externa del hexadecenal. Y para ello se realizó un ensayo de crecimiento en medio sólido de este mutante en comparación de la cepa silvestre tras un tratamiento de 2 horas con hexadecenal a diferentes concentraciones.

En la figura 48, se puede observar que la pérdida de función de Ybh3 no cambiaba la susceptibilidad de las células a la adición externa del hexadecenal.

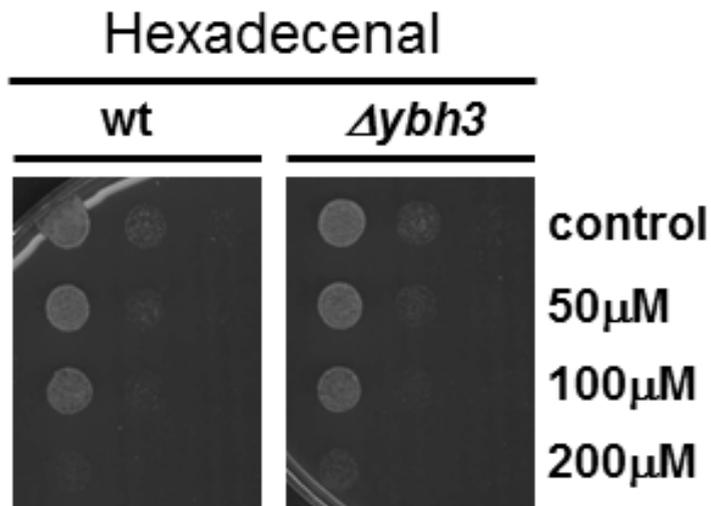


Figura 48. La sensibilidad al hexadecenal no se ve alterada en mutantes $\Delta ybh3$. Se estudió la eficiencia de crecimiento ante la adición externa del hexadecenal (2 h) en el mutante que carece de Ybh3 en comparación con la cepa silvestre.

Con estos resultados se puede decir que Ybh3 no es el ejecutor de la muerte celular inducida por el hexadecenal.

Por otro lado, se examinó la función proapoptótica de Bax en células de levadura con una alteración del metabolismo de esfingolípidos. La

proteína Bax humana se ha visto que activa la muerte celular mitocondrial en levadura (Manon et al., 1997); (Priault et al., 2003).

Se realizó un estudio de expresión del Bax humano en la cepa silvestre y en el mutante $\Delta hfd1$. Para obtener estas cepas se transformaron ambas con el plásmido pCM189-Bax-c-myc. Utilizando esta construcción, la expresión de Bax se activa en ausencia de doxiciclina en el medio. Por lo que se crecieron las células en presencia de doxiciclina y ésta se eliminó del medio en el momento en que las células estaban crecidas en fase exponencial para activar la expresión. Se realizó un tratamiento de 24 horas con hexadecenal. Lo que se observó fue que Bax induce la muerte celular de manera más eficiente en el mutante $\Delta hfd1$ que no metabolizaba el hexadecenal.

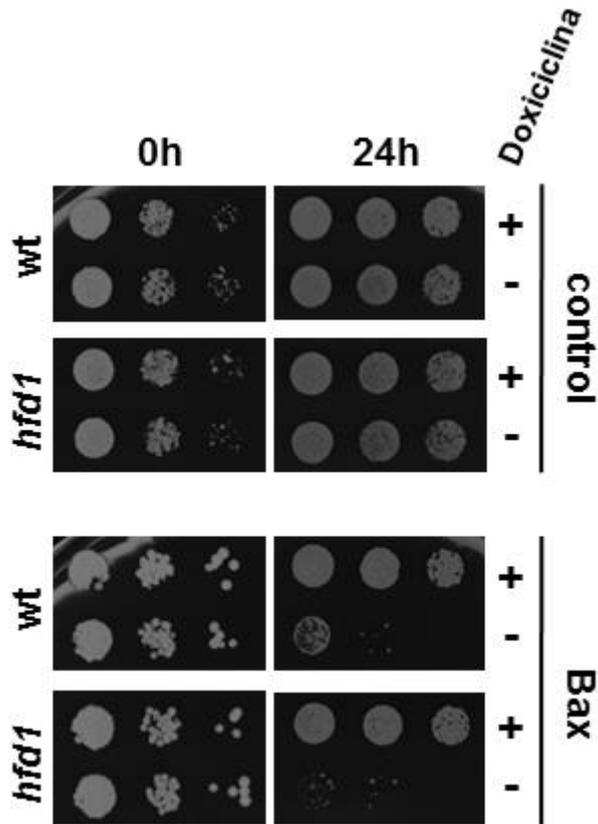


Figura 49. La inhibición de crecimiento por Bax se ve incrementada en mutantes $\Delta hfd1$. Se utilizaron la cepa silvestre y el mutante $\Delta hfd1$, que expresaban Bax humano y se trataron 24 horas con hexadecenal en medio sin doxiciclina para activar su expresión.

Según la localización de Hfd1 observada y los resultados obtenidos hasta el momento, se podría concluir que Hfd1 contrarresta la acumulación de hexadecenal en la mitocondria y previene la inducción de la muerte celular. La proteína Hfd1, como se ha comentado, se localiza en regiones específicas a lo largo de la mitocondria y el metabolismo de esfingolípidos complejos tiene lugar en el retículo endoplasmático. Por lo tanto, se quiso comprobar si los contactos entre mitocondria y retículo

endoplasmático estaban involucrados en la muerte celular inducida por el hexadecenal. El complejo ERMES (*ER-Mitochondria Encounter Structure*), que une la mitocondria al retículo endoplasmático en lugares específicos (Kornmann, 2013) se ha visto implicado en la transferencia de fosfolípidos del retículo a la mitocondria (Lahiri et al., 2014). Se quiso comprobar en primer lugar cuál era la localización de Hfd1 respecto a este complejo.

Para realizar este ensayo se utilizó la cepa silvestre BY4741 transformada con los plásmidos con las fusiones HFD1-GFP y Mmm1-mCherry. Mmm1 es el componente del ER del complejo ERMES. En la figura 50, se muestra la fluorescencia verde correspondiente a la proteína Hfd1 y la fluorescencia roja correspondiente a la proteína del complejo ERMES Mmm1. Se puede observar que Hfd1 se localiza en su mayor parte muy cerca de la subunidad Mmm1 del complejo ERMES.

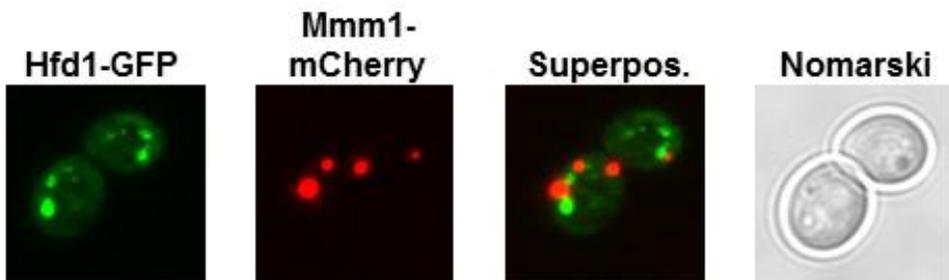


Figura 50. Estudio de colocalización de Hfd1-GFP con la subunidad Mmm1-mCherry del complejo ERMES.

Además, se quiso estudiar si esta localización de Hfd1 seguía siendo la misma en diferentes mutantes ERMES. Para ello se transformaron las cepas mutantes $\Delta mdm10$ y $\Delta mdm12$ (subunidades de ERMES) con el

Resultados

plásmido con la fusión HFD1-GFP. Se observó (figura 51) que en comparación con la cepa silvestre, la cual mostraba una localización de Hfd1 en puntos pequeños distribuidos a lo largo de la mitocondria, los mutantes mostraban una localización de Hfd1 diferente. Esta nueva distribución consistía en acumulaciones puntuales de mayor tamaño, tal y como de muestra en la figura 51. Tras estas observaciones se podría pensar que el complejo ERMES puede estar involucrado en la distribución del hexadecenal a lo largo de la mitocondria y condiciona la localización de Hfd1.

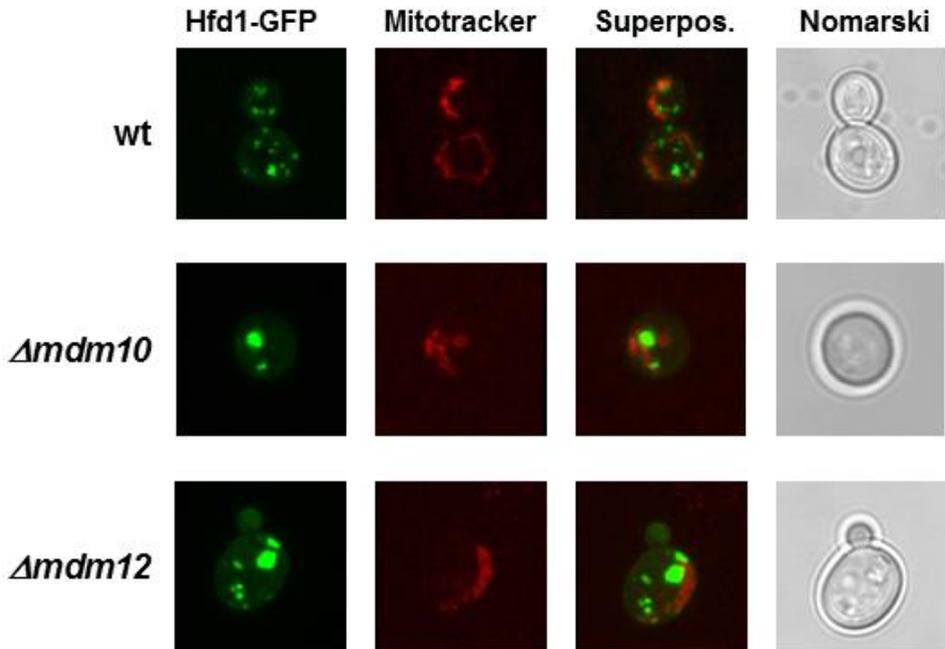


Figura 51. La localización intracelular de Hfd1 es diferente en mutantes del complejo ERMES. Las cepas mutantes $\Delta mdm10$ y $\Delta mdm12$ así como la cepa silvestre que expresan la fusión Hfd1-GFP, se crecieron hasta fase exponencial y se trataron con MitoTracker® para visualizar la mitocondria en rojo.

Y para completar este estudio, se realizó un ensayo de crecimiento de mutantes del complejo ERMES, en medio sólido y en respuesta a diferentes concentraciones de hexadecenal añadido de forma externa. Se comparó la cepa silvestre y los mismos mutantes que en el ensayo anterior, los cuales se crecieron en medio mínimo hasta fase exponencial y se realizó un tratamiento con dos concentraciones diferentes de hexadecenal durante 2 horas. De esta manera se pudo estudiar si daños en el complejo ERMES protegían o favorecían la muerte celular inducida por el hexadecenal. Los resultados que se obtuvieron con este ensayo fueron que la toxicidad del hexadecenal era mayor en los mutantes ERMES (figura 52).

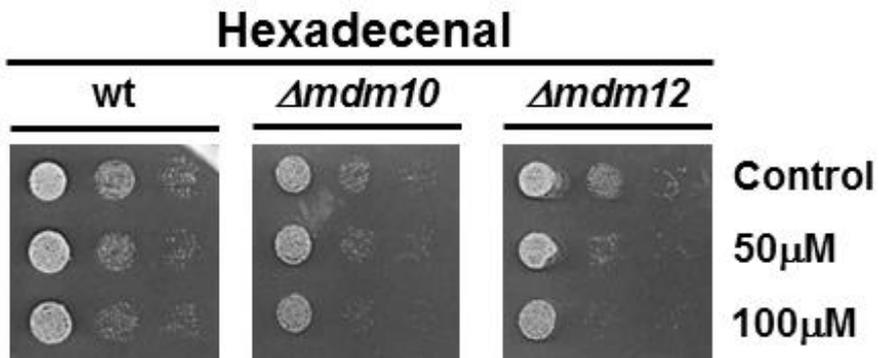


Figura 52. Los mutantes ERMES son hipersensibles a hexadecenal. Las cepas mutantes $\Delta mdm10$ y $\Delta mdm12$, así como la cepa silvestre se crecieron en medio mínimo hasta fase exponencial y se realizó un tratamiento de 2 horas con hexadecenal a las concentraciones indicadas. Se cultivaron las cepas en medio rico sólido para comparar su crecimiento.

Estos resultados sugieren que una distribución normal de Hfd1 en la mitocondria podría ser necesaria para contrarrestar de forma eficiente la muerte celular inducida por el hexadecenal.

2.4. Control genético de la ruta de degradación de esfingolípidos a través de la MAP quinasa Hog1.

La expresión del gen *HFD1* se activa por estrés salino y oxidativo. Por lo que se quiso saber si la expresión de los genes que codifican enzimas de la ruta de degradación de esfingolípidos estaba regulada por estrés de manera general. Para ello, se realizó un ensayo de comparación de la expresión génica mediante RT-PCR, de las distintas enzimas implicadas en la ruta de degradación de esfingolípidos en estudio y las cuales se muestran en la figura 53.

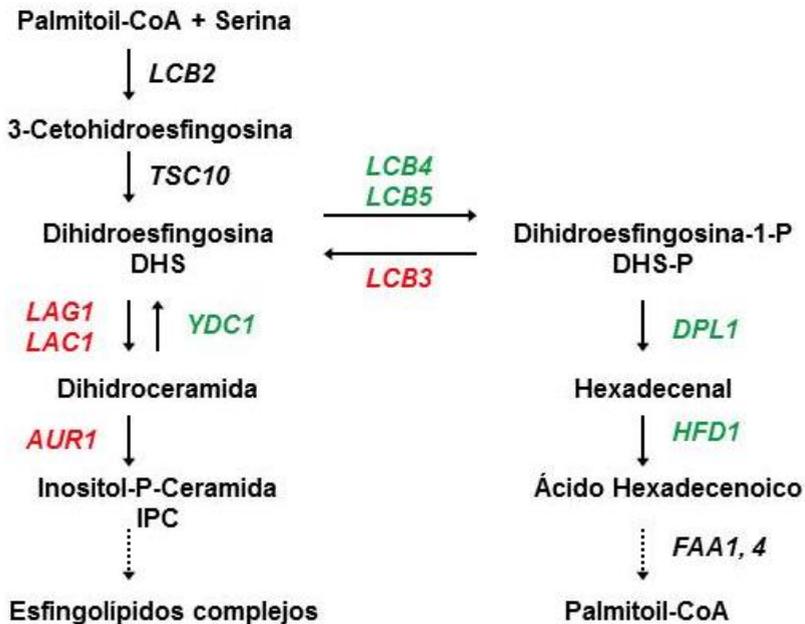
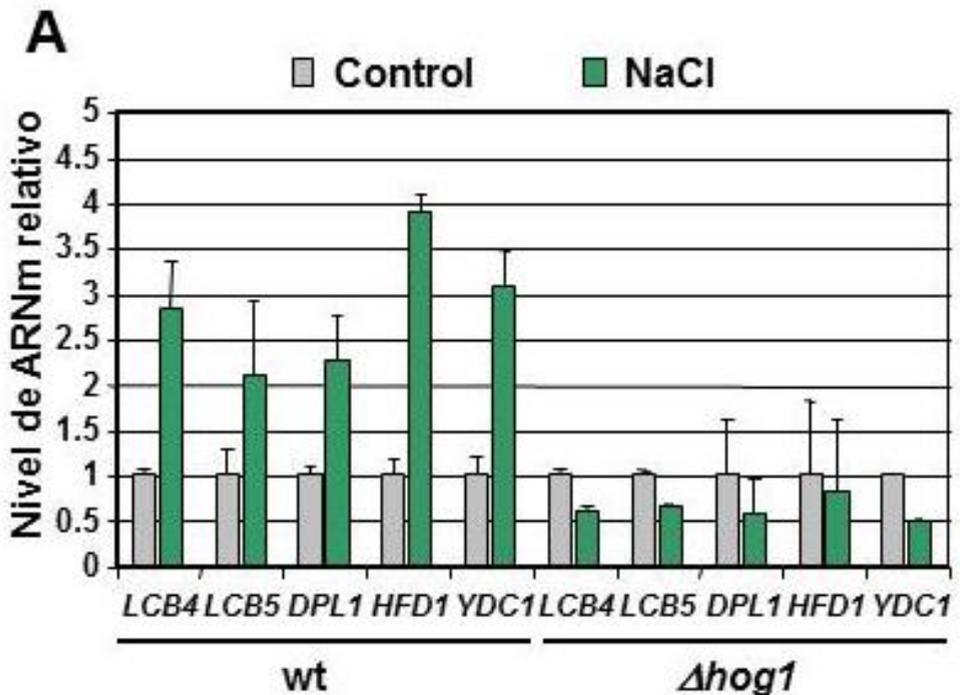


Figura 53. Esquema resumen de la biosíntesis y degradación de esfingolípidos en levadura.

Se vió que todos los pasos enzimáticos desde la ceramida al ácido hexadecenoico se inducían en respuesta a estrés salino (0,4 M de NaCl) a nivel de ARNm (figura 54 A). Además, la quinasa Hog1 que se activa por estrés y que es la principal reguladora de la respuesta adaptativa de las células de levadura a estrés osmótico (Saito and Posas, 2012), era indispensable para esta activación transcripcional. En cambio, las reacciones enzimáticas reversas desde la S1-P a la ceramida se encontraban transcripcionalmente reprimidas ante las mismas condiciones. (figura 54 B).



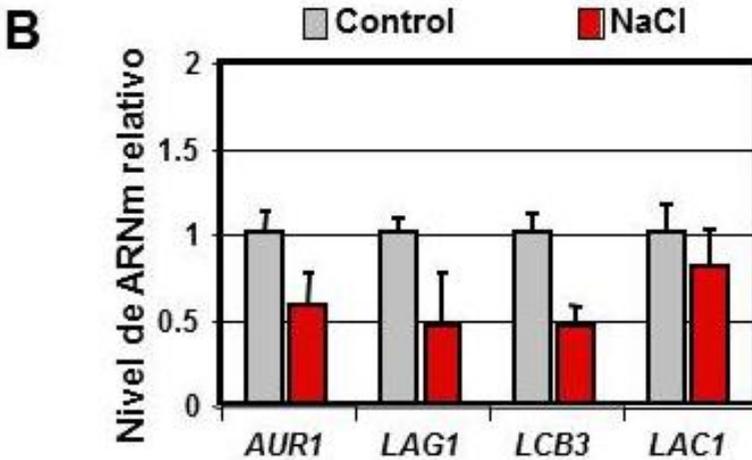


Figura 54. La expresión de los genes involucrados en la degradación de esfingolípidos se activa de manera dependiente de Hog1. La expresión de los genes mostrados en la gráfica se cuantificó mediante RT-PCR en la cepa silvestre y en el mutante $\Delta hog1$ (A). Las condiciones de estrés que se utilizaron fueron de 0,4M de NaCl y se realizó un tratamiento de 20 minutos. Los resultados observados muestran los valores medios de ARNm normalizados respecto al gen *ACT1* y de tres réplicas biológicas incluyendo la desviación estándar. Los valores iniciales de ARNm se relativizaron a 1 en cada uno de los genes y cepas.

Por ello, las células de levadura poseen una regulación genética que parece favorecer la degradación de esfingolípidos, reprimiendo su biosíntesis en respuesta a estrés salino. Esta activación está regulada por la MAP quinasa Hog1, que podría ser un modulador de los intermediarios metabólicos de esta ruta durante la exposición a estrés salino. Para determinar la función de Hog1 en el metabolismo del hexadecenal se realizó un ensayo de crecimiento en medio sólido del mutante $\Delta hog1$ en comparación con la cepa silvestre en respuesta a hexadecenal (figura 55).

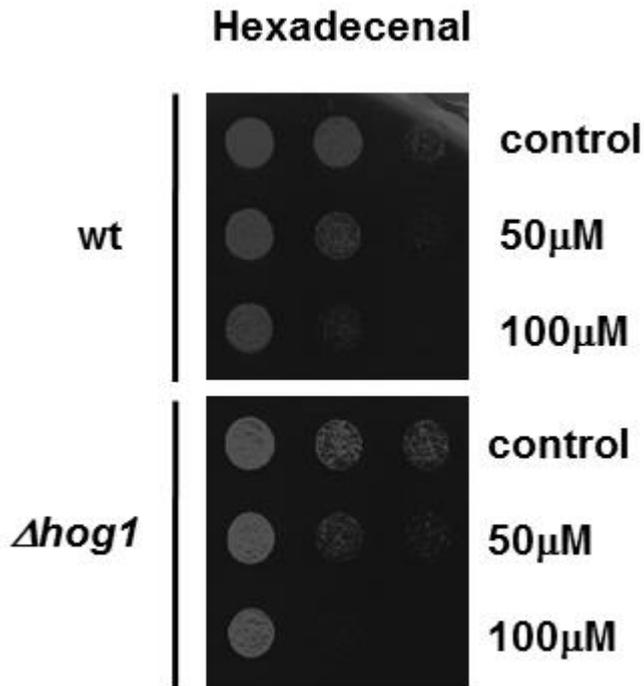


Figura 55. La pérdida de función de Hog1 provoca sensibilidad a hexadecenal. La cepa mutante *Δhog1*, así como la cepa silvestre se crecieron en medio mínimo hasta fase exponencial y se realizó un tratamiento de 2 horas con hexadecenal a las concentraciones indicadas. Se cultivaron las cepas en medio rico sólido para comparar su crecimiento.

Se observó que el mutante *Δhog1* era hipersensible a la adición externa de hexadecenal, lo que se podría explicar por un descenso en la capacidad de detoxificación de esta cepa que carece de la activación de Hfd1.

Se investigó posteriormente la correlación entre estrés salino, el metabolismo de esfingolípidos y la función mitocondrial. El estrés salino induce los genes que codifican para el metabolismo de los esfingolípidos y un bloqueo tras la formación del hexadecenal podría ser deletéreo especialmente ante estas condiciones de estrés. En este sentido, se

decidió realizar un ensayo a nivel de la morfología mitocondrial de la cepa mutante $\Delta hfd1$ al activar la ruta con estrés salino. Se utilizó la cepa silvestre y el mutante $\Delta hfd1$ transformados con el plásmido pVT100U-mtGFP, para poder visualizar por microscopía confocal la mitocondria en verde.

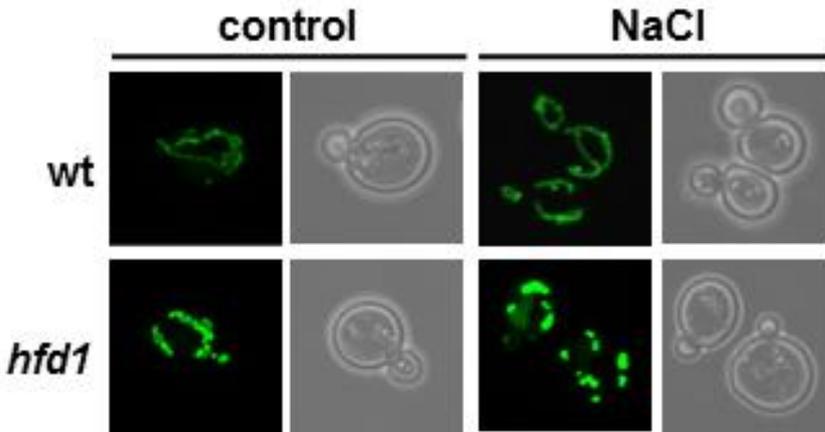


Figura 56. El estrés salino induce fragmentación mitocondrial en el mutante $\Delta hfd1$. La cepa mutante $\Delta hfd1$ y la cepa silvestre BY4741 que expresaban mt-GFP, se crecieron en medio mínimo con y sin estrés salino (1 M NaCl) hasta fase exponencial. Se visualizó la estructura mitocondrial mediante microscopía confocal.

Los resultados obtenidos se muestran la figura 56. Se puede observar como el mutante $\Delta hfd1$ muestra una fragmentación de la mitocondria completa ante el estrés salino, lo que no se observa en la cepa silvestre ni en el propio mutante en condiciones normales.

Finalmente, se quiso comprobar si la función de Hog1 era importante para la toxicidad de Bax.

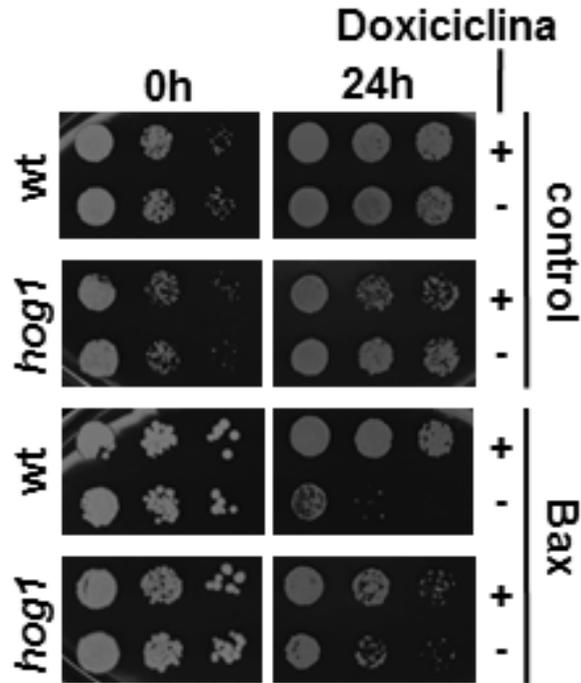


Figura 57. La pérdida de función de Hog1 contrarresta la inhibición por Bax. La expresión de Bax humano se indujo durante 24 horas como en ensayos anteriores en la cepa silvestre y en la cepa mutante $\Delta hog1$. Se comparó el crecimiento en placas YPD.

Para ello, se realizó un ensayo de crecimiento en medio sólido de la cepa silvestre y del mutante $\Delta hog1$ transformados con los plásmidos de expresión Bax (así como el plásmido vacío). Se comparó directamente el crecimiento al inducir Bax eliminando la doxiciclina del medio.

Como muestra la figura 57, el mutante $\Delta hog1$ era más resistente a la expresión de Bax que la cepa silvestre.

En definitiva, la quinasa activada por estrés está involucrada en la inducción de las enzimas del metabolismo de esfingolípidos y esta

Resultados

activación podría llevar a la acumulación de intermediarios bioactivos, especialmente el hexadecenal, en la mitocondria.

Discusión

En el presente trabajo se han identificado condiciones de que desencadena coordinada adaptación peroxisomal y se ha mostrado que esta estrategia adaptativa contribuye a la tolerancia a estrés de las células de levadura. Esto es importante ya que se muestra como la dinámica peroxisomal no está regulada exclusivamente por señales nutricionales y revela que existen señales ambientales que están conectadas a la proliferación peroxisomal, que es un campo de investigación muy poco explorado (Smith and Aitchison, 2013).

Un dato interesante es que la salinidad y otros estreses abióticos llevan a un incremento del número de peroxisomas y de su actividad también en plantas superiores y se ha postulado un rol determinado de los peroxisomas en la homeostasis de ROS (Hu et al., 2012); (Mitsuya et al., 2010); (Sandalo and Romero-Puertas, 2015). Sin embargo, los mecanismos moleculares que regulan la dinámica peroxisomal en plantas en respuesta a estrés salino, todavía se desconocen.

El estudio de los mecanismos de señalización que llevan a la regulación peroxisomal en levadura en respuesta a elevada salinidad, ha identificado diferentes niveles de control. La proteína quinasa Hog1 que se activa en respuesta a estrés, es el regulador aguas arriba, que controla la expresión de genes que están involucrados directamente en la movilización de los ácidos grasos y la β -oxidación peroxisomal. Lo que le añade una función fisiológica muy importante a esta MAP quinasa, que también se ha visto implicado en muchas adaptaciones en respuesta a estrés osmótico (Martinez-Montanes et al., 2010); (Saito and Posas, 2012).

En el caso de la expresión génica de enzimas peroxisomales, Hog1 induce la transcripción a través del factor de transcripción específico ADR1, cuya unión a los promotores de los genes peroxisomales se ve estimulada por la MAP quinasa. Los resultados de este trabajo indican que el activador peroxisomal Oaf1 no participa en la señalización por estrés salino. Esto refleja una función de Oaf1 más especializada en situaciones en que las células tienen que metabolizar los ácidos grasos presentes en el medio como única fuente de carbono. Además, Oaf1 se activa por la unión directa a los ácidos grasos como el oleato (Phelps et al., 2006).

Se sabe que Hog1 regula directamente la actividad de muchos factores de transcripción, como Sko1, Hot1, Smp1, Rtg1 o Msn2 (Alepuz et al., 2003); (de Nadal et al., 2003); (Proft et al., 2001); (Ruiz-Roig et al., 2012); (Vendrell et al., 2011). Si Hog1 regula por fosforilación directa a ADR1 todavía no se sabe. Ensayos de fosforilación in vitro podrían revelar si ADR1 es otro sustrato de la MAP quinasa, aunque no se ha podido establecer una interacción entre Hog1 y ADR1 por experimentos de copurificación. Hay que destacar que la actividad de ADR1 es modulada además por la proteína quinasa Snf1 activada por AMP ante deficiencias energéticas, concretamente mediante un mecanismo indirecto (Ratnakumar et al., 2009); (Ratnakumar and Young, 2010). Por lo tanto, la ruta HOG que responde principalmente a cambios en la osmolaridad del ambiente y la desrepresión por glucosa que activa a Snf1 principalmente ante una falta de ATP, coinciden en que es ADR1 el activador responsable de la estimulación del metabolismo de los ácidos grasos. Además, ambas rutas se ha visto que interaccionan funcionalmente. La actividad de Snf1 se incrementa ante condiciones de estrés salino, aunque no se sabe si ocurre

162

directa o indirectamente debido a la falta de energía inducida por el estrés (Hong and Carlson, 2007). Por otra parte, Hog1 se activa además por ayuno de glucosa, que parece ser que se promueve la fosforilación de Hog1 de forma indirecta a través de Snf1 (Piao et al., 2012). La activación de la ruta HOG por la limitación de glucosa podría explicar el resultado obtenido de que Hog1 juega un papel importante en el control transcripcional de los genes peroxisomales ante un cambio de la fuente de carbono de glucosa a oleato.

Otra fase del control peroxisomal ante condiciones de estrés ocurre a nivel del número de orgánulos. En este trabajo se muestra cómo se estimula la fisión de los peroxisomas existentes para doblar su número ante las primeras horas de la adaptación a estrés salino. Las dinaminas asociadas a GTP Dnm1 y Vps1 tienen un papel fundamental en esta respuesta junto con la ruta retrógrada. El hecho de que el regulador aguas arriba Rtg2 y los factores de transcripción aguas abajo Rtg1/3 se requieren para estimular la biogénesis de los peroxisomas, sugiere que esta regulación también se basa en el control de la expresión génica. La ruta retrógrada se activa ante una disfunción mitocondrial (Liu and Butow, 2006), sin embargo está funcionalmente ligada a la señalización por estrés salino, desde que Hog1 controla directamente la actividad de los activadores transcripcionales Rtg1 y Rtg3 (Ruiz-Roig et al., 2012). Además, la ruta retrógrada induce muchos genes peroxisomales ante un daño mitocondrial (Epstein et al., 2001). Los resultados del presente trabajo confirman este solape funcional y demuestran que la ruta retrógrada activa la fisión peroxisomal ante condiciones de estrés salino.

Se sugiere que durante la defensa a estrés salino, las células de levadura adaptan su metabolismo cambiando, al menos parcialmente, de fermentación a la oxidación de los ácidos grasos para cubrir las necesidades energéticas durante el cambio ambiental. La producción eficiente de biomasa ante condiciones de estrés salino depende en gran parte de elevadas concentraciones de glucosa en el medio de crecimiento y la oxidación de los ácidos grasos en los peroxisomas se convierte en limitante al agotarse el azúcar. Por lo que el estrés salino demanda un flujo glicolítico elevado para una correcta adaptación o de lo contrario interferirá con la degradación glicolítica de los azúcares. Elevada salinidad induce la producción de glicerol como mayor osmoprotector de las células de levadura (Hohmann, 2015), lo que desvía los intermediarios glicolíticos hacia su síntesis. Como consecuencia, otras fuentes de carbono fermentables menos eficientes interfieren fuertemente con la biosíntesis de glicerol y la adaptación y resistencia al estrés salino (Vanacloig-Pedros et al., 2015).

Por otro lado, concentraciones moderadas de NaCl interfieren con la captación de glucosa en los cultivos de levadura (Wei et al., 1982), y los genes de los transportadores de azúcares están entre los genes más inducidos en respuesta a estrés salino (Posas et al., 2000); (Rep et al., 2000). Como consecuencia, el metabolismo peroxisomal debe ser rápidamente reforzado, lo que comienza con la movilización de los ácidos grasos desde las partículas lipídicas a través de la enzima inducible acil-CoA graso sintetasa Faa1. Es importante destacar que además de la inducción comentada a través de ADR1, *FAA1* también está regulado por el factor de transcripción Sko1 dependiente de Hog1 (Proft et al., 2005). Para

mantener una tasa de respiración elevada, se estimula la producción de acetil-CoA en los peroxisomas y éste se transporta a la mitocondria. El paso limitante durante la adaptación a estrés salino es la introducción de acetil-carnitina a la mitocondria, hecho que se ha demostrado debido a que la expresión del transportador de carnitina mitocondrial se induce fuertemente ante condiciones de estrés salino (Timón-Gómez et al., 2013).

Los peroxisomas pueden interactuar físicamente con la mitocondria en levadura (Mattiuzzi Usaj et al., 2015); (Shai et al., 2016) y en definitiva el porcentaje de colocalización refleja el grado en que el metabolismo peroxisomal está acoplado directamente a la respiración mitocondrial. En experimentos de colocalización entre peroxisoma y mitocondria en nuestro laboratorio (Espí-Bardisa, Manzanares-Estreder, Pascual-Ahuir, Proft; datos no publicados) se ha podido mostrar que existe una tendencia de los peroxisomas a asociarse de una manera más eficiente con la red mitocondrial ante condiciones de estrés salino, lo que en definitiva indica la necesidad de un estrecho acoplamiento de la β -oxidación peroxisomal con la mitocondria ante estas condiciones de estrés. Además, el incremento de la actividad de la respiración mitocondrial causado por estrés salino, concretamente la actividad del complejo II, depende de peroxisomas funcionales (Espí-Bardisa, Manzanares-Estreder, Pascual-Ahuir, Proft; datos no publicados. 2016).

En conjunto, este estudio demuestra que la adaptación a estrés ambiental incluye la modulación dinámica de la actividad peroxisomal y su biogénesis para adaptar el metabolismo energético celular. En la figura 58,

se muestra un esquema general de todos los resultados comentados a nivel peroxisomal en el presente trabajo y su relación con el estrés salino.

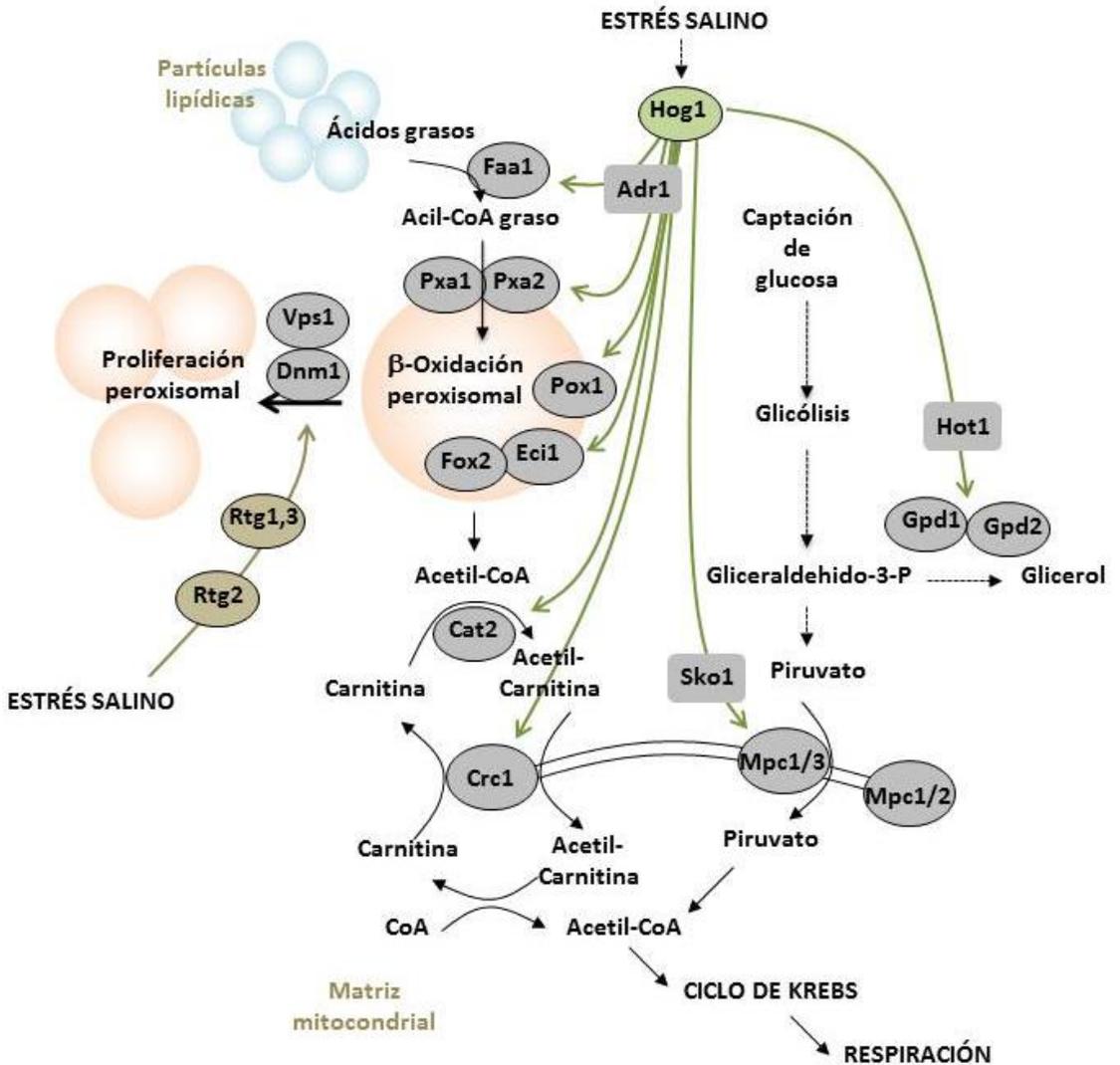


Figura 58. Modelo de la regulación del metabolismo peroxisomal en respuesta a estrés. La figura muestra como en respuesta a estrés salino, la glicólisis se desvía hacia la biosíntesis de glicerol a través de la activación de la MAP quinasa Hog1 y del factor Hot1. Esta desviación del flujo glicolítico, entre otras causas, puede contribuir a la activación de rutas alternativas para la obtención de energía. En este caso, gracias a la liberación de ácidos grasos a partir de reservas internas (partículas lipídicas), se introducen en los peroxisomas para metabolizarse y aportar el acetil-CoA a la mitocondria, necesario para suplir el defecto energético causado. Además, el estrés salino activa los genes del

metabolismo peroxisomal vía Hog1 y Atr1 y se estimula la proliferación peroxisomal a través de la ruta retrógrada y la activación de las dinaminas Vps1 y Dnm1.

Por otro lado, en cuanto al metabolismo de esfingolípidos, en nuestro grupo de investigación se había visto previamente que el estrés salino provocaba un cambio en la actividad mitocondrial (Pastor et al., 2009); (Martinez-Pastor et al., 2010). Proteínas localizadas en la membrana externa mitocondrial como Hfd1, Om14, Rdl1 o Mcr1 se acumulaban específicamente en este orgánulo ante estas condiciones de estrés (Martinez-Pastor et al., 2010). La activación de la expresión de los genes correspondientes en respuesta a estrés salino depende de la MAP quinasa Hog1, así como de los activadores Msn2 y Msn4 para los genes *OM14*, *RDL1* y *MCR1* (Ruiz P., Pascual-Ahuir, Proft; resultados no publicados. 2012). Una importante función de la modulación de la actividad mitocondrial durante el estrés salino es el mantenimiento de la homeostasis de ROS (Pastor et al., 2009). Ya se observó que la ausencia de Rdl1 o Hfd1 provocaban un aumento de las ROS en respuesta a estrés salino (Manzanares S. TFC. Resultados no publicados. 2012).

La proteína Hfd1 es una aldehído graso deshidrogenasa, que cataliza la conversión de hexadecenal a ácido hexadecenoico en la ruta de degradación de la esfingosina-1-fosfato (Nakahara et al., 2012). Algunos esfingolípidos, como la ceramida, pueden inducir la muerte celular programada en eucariotas superiores y la disfunción mitocondrial en levadura (Patwardhan et al., 2016); (Spincemaille et al., 2014).

En este trabajo se ha investigado el papel de intermediarios de la degradación de estos esfingolípidos en la respuesta a estrés y en la

inducción de la muerte celular. Los resultados de los ensayos de consumo de oxígeno y de medida de las ROS intracelulares de diferentes mutantes de la ruta de degradación en estudio, sugieren que Hfd1, que es la enzima que metaboliza el hexadecenal, tiene una importante función en la modulación de la actividad mitocondrial. Los estudios de la morfología mitocondrial y de la fragmentación producida en el mutante $\Delta hfd1$, así como de la sobreexpresión de Dpl1, indican que el hexadecenal parece regular la función mitocondrial y la viabilidad celular.

Los ensayos de adición externa de intermediarios de la ruta de degradación de la esfingosina-1-fosfato, han mostrado que la modulación del metabolismo de esfingolípidos induce la muerte celular mitocondrial en levadura. En nuestro grupo de investigación, se ha visto que la inducción de la expresión de Bax en levadura provoca muerte celular de manera sinérgica a la adición externa de hexadecenal. Y por otro lado, la expresión del antiapoptótico humano Bcl-x_L protegía de la muerte celular inducida por el hexadecenal (Calatayud, Proft, Pascual-Ahuir; datos no publicados).

Por ello, parece ser que el hexadecenal induce muerte celular a través de miembros de la familia de proteínas Bcl-2. Este resultado se ha visto reforzado por el hecho de que Bax parece ser un inductor de la muerte más eficiente en células que no metabolizaban el hexadecenal al carecer de la enzima Hfd1. Las proteínas Bcl2 como Bax promueven la muerte celular en levadura de modo que puede ser modulado por los productos de la ruta de degradación de esfingolípidos como el hexadecenal. Aunque, según los resultados mostrados, el ortólogo de Bcl-2

en levadura, Ybh3, que tiene propiedades pro- y anti-apoptóticas (Buttner et al., 2011); (Cebulski et al., 2011), no es el ejecutor de la muerte celular inducida por el hexadecenal. Por lo tanto desconocemos cuales son las propias proteínas de levadura que se encargan de la posible permeabilización mitocondrial activada por hexadecenal.

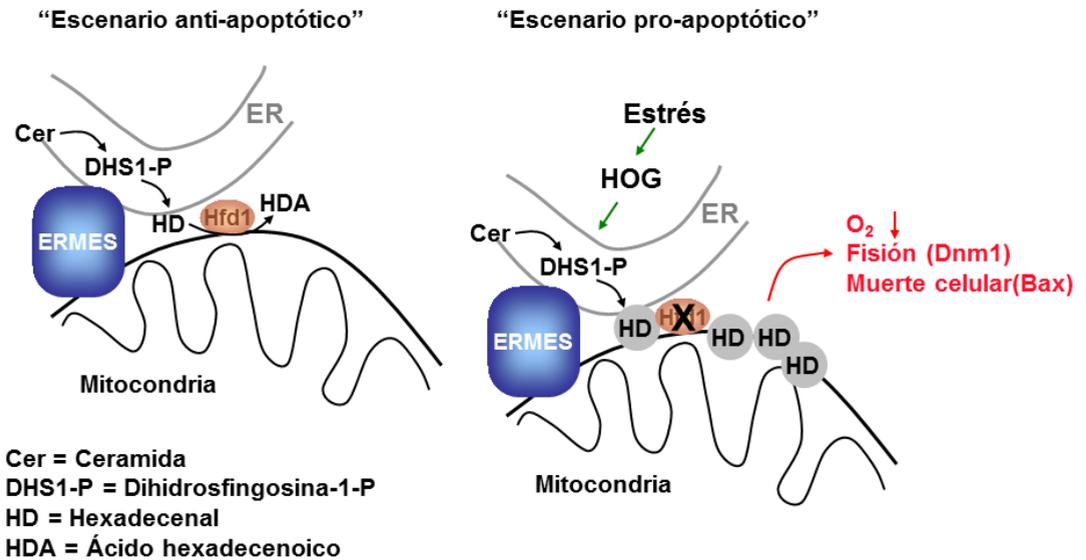


Figura 59. Modelo de la regulación del metabolismo de esfingolípidos en respuesta a estrés. La figura muestra cómo las células, en condiciones normales (escenario anti-apoptótico), la proteína Hfd1 metaboliza el hexadecenal en regiones cercanas a la mitocondria y el complejo ERMES. Ante condiciones de estrés salino, en que se induce la ruta HOG, se activa a su vez la ruta de degradación de esfingolípidos a través de Hog1. Esta activación, así como una deficiencia en Hfd1, provoca una acumulación de hexadecenal que produce un descenso en el consumo de oxígeno, la fisión mitocondrial a través de Dnm1 y la muerte celular a través de la proteína Bax humana.

Estos resultados, en conjunto, sostienen la idea de que niveles elevados de hexadecenal en la mitocondria favorecen la acción proapoptótica de Bax y como consecuencia promueve la permeabilización y fragmentación de la membrana externa mitocondrial (véase modelo en la figura 59). En este modelo, la enzima Hfd1 podría contrarrestar la acumulación de hexadecenal en la mitocondria y prevenir la inducción de la muerte celular. En este sentido, sería importante en futuros estudios poder determinar los niveles intracelulares de hexadecenal y sus posibles cambios en condiciones de estrés o diferentes mutantes. No es una tarea fácil por las pequeñas concentraciones intracelulares de este tipo de metabolitos y por la reactividad del hexadecenal como aldehído graso. Sin embargo, el desarrollo de metodología analítica más sensible para cuantificar hexadecenal en extractos celulares podría permitir este tipo de estudio (Neuber et al., 2014).

El complejo ERMES, como ya se ha comentado, une a la mitocondria y al retículo endoplasmático en regiones específicas. Hfd1 parece que colocaliza con determinadas subunidades de dicho complejo. La localización puntual de Hfd1 en lugares cercanos a la mitocondria y de forma puntual, se ve modificada en mutantes del complejo ERMES. Lo que lleva a pensar, que el complejo ERMES debe estar involucrado en la distribución del hexadecenal a lo largo de la mitocondria y condiciona la localización de Hfd1. Además, debido a la toxicidad producida por el hexadecenal en mutantes ERMES, se necesita una distribución normal de Hfd1 en la mitocondria para contrarrestar la muerte celular inducida por el hexadecenal. Además, los contactos entre retículo endoplasmático y mitocondria son marcas para la fisión mitocondrial mediada por Dnm1

(Friedman et al., 2011), y ERMES se ha visto implicado en este proceso (Murley et al., 2013). Por lo que una transferencia localizada de hexadecenal desde el retículo endoplasmático a la mitocondria en regiones específicas, podría inducir la fragmentación del orgánulo.

En definitiva, la quinasa activada por estrés Hog1 está involucrada en la inducción génica de las enzimas del metabolismo de esfingolípidos. Esta activación podría llevar a la acumulación de intermediarios bioactivos, especialmente el hexadecenal, en la mitocondria. En ausencia de detoxificación por la enzima Hfd1, se induce la muerte celular mitocondrial al favorecer la actividad de proteínas proapoptóticas como Bax (figura 59). Además, el estrés hiperosmótico y salino, se sabe que inducen la apoptosis mitocondrial en levadura (Huh et al., 2002); (Silva et al., 2005). En este contexto, Hog1 activada por estrés podría llevar a una disfunción mitocondrial por la activación de la degradación de esfingolípidos. Este modelo, se relaciona con resultados anteriores en los que la activación de Hog1 afecta a la respiración mitocondrial, incrementa la producción de ROS e induce la muerte celular (Vendrell et al., 2011).

Es importante resaltar que la función (activada por estrés) del hexadecenal de inducción de la muerte celular que se muestra en el presente trabajo, se ha visto además en eucariotas superiores. La adición de hexadecenal a mitocondrias murinas induce una permeabilización de la membrana externa (Chipuk et al., 2012), lo que se ha postulado como una inducción temprana e irreversible de la muerte celular vía mitocondrial (Renault and Chipuk, 2013).

Discusión

El hexadecenal es un potente activador de apoptosis en ratón y en líneas celulares humanas (Kumar et al., 2011). Este trabajo sugiere que la modulación de la actividad mitocondrial y la inducción de la muerte celular por hexadecenal es una característica conservada de las células eucariotas. Además, rutas de señalización activadas por estrés, como HOG, están implicadas en la regulación de la degradación de esfingolípidos, lo que puede ser decisivo para la entrada en rutas de muerte celular.

Conclusiones

Las conclusiones que se extraen del presente trabajo son:

- La función peroxisomal es crucial para la adaptación a estrés salino, especialmente en condiciones de ayuno de glucosa.
- La activación de la MAP quinasa Hog1 por estrés, desencadena la inducción de genes que codifican enzimas para la activación, importe peroxisomal y β -oxidación de los ácidos grasos, a través del activador transcripcional Adr1.
- El estrés causado por los iones Na^+ y Li^+ , provoca un incremento del número de peroxisomas por célula, de manera independiente de Hog1, pero dependiente de la ruta retrógrada y de las dinaminas Dnm1 y Vps1.
- La fuerte activación de Faa1, localizada en partículas lipídicas y peroxisomas indica que la adaptación a estrés salino requiere un incremento de la movilización de los ácidos grasos de las reservas intracelulares de ácidos grasos.
- La producción de hexadecenal en la ruta de degradación de esfingolípidos de levadura, a través de Dpl1 y su degradación a través de Hfd1, es crítica para la función mitocondrial y la muerte celular.
- Intervenciones genéticas que favorecen la acumulación de hexadecenal, disminuyen el consumo de O_2 de las células e incrementan la producción de ROS y la fragmentación mitocondrial, y a la inversa.

Conclusiones

- La localización de Hfd1, es puntual en lugares cercanos a la red mitocondrial y esta localización depende de un complejo ERMES funcional, lo que indica que la modulación de los niveles de hexadecenal en lugares específicos de contacto entre el retículo endoplasmático y la mitocondria podría ser un importante desencadenante de la muerte celular.
- La ausencia de Hfd1, favorece la muerte celular inducida por la proteína Bax humana.
- La inducción de la ruta de degradación de esfingolípidos en condiciones de estrés, está controlada por la MAP quinasa Hog1.
- La modulación de la degradación de esfingolípidos regulada por estrés, podría ser una vía conservada para inducir la muerte celular en organismos eucariotas.

Bibliografía

- Alberti, S., Gitler, A.D., and Lindquist, S. (2007). A suite of Gateway cloning vectors for high-throughput genetic analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 24, 913–919.
- Alepuz, P.M., de Nadal, E., Zapater, M., Ammerer, G., and Posas, F. (2003). Osmostress-induced transcription by Hot1 depends on a Hog1-mediated recruitment of the RNA Pol II. *EMBO J* 22, 2433–2442.
- Alvarez, S.E., Harikumar, K.B., Hait, N.C., Allegood, J., Strub, G.M., Kim, E.Y., Maceyka, M., Jiang, H., Luo, C., Kordula, T., et al. (2010). Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. *Nature* 465, 1084–1088.
- Anelli, V., Gault, C.R., Snider, A.J., and Obeid, L.M. (2010). Role of sphingosine kinase-1 in paracrine/transcellular angiogenesis and lymphangiogenesis in vitro. *FASEB J* 24, 2727–2738.
- Artal-Sanz, M., and Tavernarakis, N. (2009). Prohibitin and mitochondrial biology. *Trends Endocrinol Metab* 20, 394–401.
- Barenholz, Y. (1984). Sphingomyelin-lecithin balance in membranes: composition, structure, and function relationships. *Physiology of Membrane Fluidity* 1, 131–174.
- Bender, T., Pena, G., and Martinou, J.-C. (2015). Regulation of mitochondrial pyruvate uptake by alternative pyruvate carrier complexes. *EMBO J* 34, 911–924.
- Berman, S.B., Pineda, F.J., and Hardwick, J.M. (2008). Mitochondrial fission and fusion dynamics: the long and short of it. *Cell Death Differ* 15, 1147–1152.
- Beve, J., Hu, G.-Z., Myers, L.C., Balciunas, D., Werngren, O., Hultenby, K., Wibom, R., Ronne, H., and Gustafsson, C.M. (2005). The structural and functional role of Med5 in the yeast Mediator tail module. *J Biol Chem* 280, 41366–41372.
- Bieber, L.L. (1988). Carnitine. *Annu Rev Biochem* 57, 261–283.
- Böckler, S., and Westermann, B. (2014). Mitochondrial ER contacts are crucial for mitophagy in yeast. *Dev Cell* 28, 450–458.
- Boore, J.L. (1999). Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res* 27, 1767–1780.

Bibliografía

- Bratton, S.B., and Salvesen, G.S. (2010). Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome. *J Cell Sci* 123, 3209–3214.
- Bricker, D.K., Taylor, E.B., Schell, J.C., Orsak, T., Boutron, A., Chen, Y.-C., Cox, J.E., Cardon, C.M., Van Vranken, J.G., Dephoure, N., et al. (2012). A mitochondrial pyruvate carrier required for pyruvate uptake in yeast, *Drosophila*, and humans. *Science* 337, 96–100.
- Brigelius-Flohe, R. (2006). Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. *Biol Chem* 387, 1329–1335.
- Burke D., Dawson D., and T. S. (2000). *Methods in yeast genetics (ACold Spring Harbor course manual)* (Cold Spring Harbor Laboratory Press (2000).).
- Buttner, S., Ruli, D., Vogtle, F.-N., Galluzzi, L., Moitzi, B., Eisenberg, T., Kepp, O., Habernig, L., Carmona-Gutierrez, D., Rockenfeller, P., et al. (2011). A yeast BH3-only protein mediates the mitochondrial pathway of apoptosis. *EMBO J* 30, 2779–2792.
- Camougrand, N., Grelaud-Coq, A., Marza, E., Priault, M., Bessoule, J.-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. *Mol Microbiol* 47, 495–506.
- Cebulski, J., Malouin, J., Pinches, N., Cascio, V., and Austriaco, N. (2011). Yeast Bax inhibitor, Bxi1p, is an ER-localized protein that links the unfolded protein response and programmed cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 6, e20882.
- Chakraborty, M., and Jiang, X.-C. (2013). Sphingomyelin and its role in cellular signaling. *Adv Exp Med Biol* 991, 1–14.
- Chalfant, C.E., and Spiegel, S. (2005). Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling. *J Cell Sci* 118, 4605–4612.
- Chipuk, J.E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M.J., and Green, D.R. (2010). The BCL-2 family reunion. *Mol Cell* 37, 299–310.
- Chipuk, J.E., McStay, G.P., Bharti, A., Kuwana, T., Clarke, C.J., Siskind, L.J., Obeid, L.M., and Green, D.R. (2012). Sphingolipid metabolism cooperates with BAK and BAX to promote the mitochondrial pathway of apoptosis. *Cell* 148, 988–1000.

- Culotta, V.C., Joh, H.D., Lin, S.J., Slekar, K.H., and Strain, J. (1995). A physiological role for *Saccharomyces cerevisiae* copper/zinc superoxide dismutase in copper buffering. *J Biol Chem* *270*, 29991–29997.
- da Cunha, F.M., Torelli, N.Q., and Kowaltowski, A.J. (2015). Mitochondrial Retrograde Signaling: Triggers, Pathways, and Outcomes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* *2015*, 10.
- Daum, G., Grabski, A., and Reidy, M.A. (2009). Sphingosine 1-phosphate: a regulator of arterial lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *29*, 1439–1443.
- Davies, M.J. (1987). Applications of electron spin resonance spectroscopy to the identification of radicals produced during lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids* *44*, 149–173.
- De Antoni, A., and Gallwitz, D. (2000). A novel multi-purpose cassette for repeated integrative epitope tagging of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* *246*, 179–185.
- De Duve, C., and Baudhuin, P. (1966). Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev* *46*, 323–357.
- Detmer, S.A., and Chan, D.C. (2007). Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* *8*, 870–879.
- Dewson, G., and Kluck, R.M. (2009). Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis. *J Cell Sci* *122*, 2801–2808.
- Dickson, R.C. (2008). Thematic review series: sphingolipids. New insights into sphingolipid metabolism and function in budding yeast. *J Lipid Res* *49*, 909–921.
- Duch, A., de Nadal, E., and Posas, F. (2012). The p38 and Hog1 SAPKs control cell cycle progression in response to environmental stresses. *FEBS Lett* *586*, 2925–2931.
- Eckelman, B.P., Salvesen, G.S., and Scott, F.L. (2006). Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep* *7*, 988–994.
- El Alwani, M., Wu, B.X., Obeid, L.M., and Hannun, Y.A. (2006). Bioactive sphingolipids in the modulation of the inflammatory response. *Pharmacol Ther* *112*, 171–183.

Bibliografía

- Elgersma, Y., van Roermund, C.W., Wanders, R.J., and Tabak, H.F. (1995). Peroxisomal and mitochondrial carnitine acetyltransferases of *Saccharomyces cerevisiae* are encoded by a single gene. *EMBO J* 14, 3472–3479.
- Epstein, C.B., Waddle, J.A., Hale, W. 4th, Dave, V., Thornton, J., Macatee, T.L., Garner, H.R., and Butow, R.A. (2001). Genome-wide responses to mitochondrial dysfunction. *Mol Biol Cell* 12, 297–308.
- Fabien Llambi, D.R.G. (2015). Cell death signaling. Cold Spring Harbor Laboratory Press 7.
- Folch-Mallol, J.L., Garay-Arroyo, A., Lledias, F., and Covarrubias Robles, A.A. (2004). [The stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*]. *Rev Latinoam Microbiol* 46, 24–46.
- Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N., and Purnelle, B. (1998). The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 440, 325–331.
- Frei, B., Kim, M.C., and Ames, B.N. (1990). Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4879–4883.
- Friedman, J.R., Lackner, L.L., West, M., DiBenedetto, J.R., Nunnari, J., and Voeltz, G.K. (2011). ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* 334, 358–362.
- Gabaldon, T. (2010). Peroxisome diversity and evolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365, 765–773.
- Giannattasio, S., Liu, Z., Thornton, J., and Butow, R.A. (2005). Retrograde response to mitochondrial dysfunction is separable from TOR1/2 regulation of retrograde gene expression. *J Biol Chem* 280, 42528–42535.
- Gietz, R.D., and Schiestl, R.H. (2007). Large-scale high-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc* 2, 38–41.
- Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R., and Woods, R.A. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* 11, 355–360.

- Guldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J., and Hegemann, J.H. (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* 24, 2519–2524.
- Guldener, U., Heinisch, J., Koehler, G.J., Voss, D., and Hegemann, J.H. (2002). A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Res* 30, e23.
- Hait, N.C., Allegood, J., Maceyka, M., Strub, G.M., Harikumar, K.B., Singh, S.K., Luo, C., Marmorstein, R., Kordula, T., Milstien, S., et al. (2009). Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. *Science* 325, 1254–1257.
- Hakomori, S. (2003). Structure, organization, and function of glycosphingolipids in membrane. *Curr Opin Hematol* 10, 16–24.
- Hamer, D.H. (1986). Metallothionein. *Annu Rev Biochem* 55, 913–951.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557–580.
- Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. (1995). Ceramide: an intracellular signal for apoptosis. *Trends Biochem Sci* 20, 73–77.
- Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. (2008). Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 139–150.
- Herzig, S., Raemy, E., Montessuit, S., Veuthey, J.-L., Zamboni, N., Westermann, B., Kunji, E.R.S., and Martinou, J.-C. (2012). Identification and functional expression of the mitochondrial pyruvate carrier. *Science* 337, 93–96.
- Hettema, E.H., Erdmann, R., van der Klei, I., and Veenhuis, M. (2014). Evolving models for peroxisome biogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 29, 25–30.
- Hiltunen, J.K., Mursula, A.M., Rottensteiner, H., Wierenga, R.K., Kastaniotis, A.J., and Gurvitz, A. (2003). The biochemistry of peroxisomal beta-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 27, 35–64.
- Hoffmann, H.P., and Avers, C.J. (1973). Mitochondrion of yeast: ultrastructural evidence for one giant, branched organelle per cell. *Science* 181, 749–751.
- Hohmann, S. (2009). Control of high osmolarity signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 583, 4025–4029.

Bibliografía

- Hohmann, S. (2015). An integrated view on a eukaryotic osmoregulation system. *Curr Genet* 61, 373–382.
- Holz, C., Prinz, B., Bolotina, N., Sievert, V., Bussow, K., Simon, B., Stahl, U., and Lang, C. (2003). Establishing the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a system for expression of human proteins on a proteome-scale. *J Struct Funct Genomics* 4, 97–108.
- Hong, S.-P., and Carlson, M. (2007). Regulation of snf1 protein kinase in response to environmental stress. *J Biol Chem* 282, 16838–16845.
- Hoppins, S., Horner, J., Song, C., McCaffery, J.M., and Nunnari, J. (2009). Mitochondrial outer and inner membrane fusion requires a modified carrier protein. *J Cell Biol* 184, 569–581.
- Hu, J., Baker, A., Bartel, B., Linka, N., Mullen, R.T., Reumann, S., and Zolman, B.K. (2012). Plant peroxisomes: biogenesis and function. *Plant Cell* 24, 2279–2303.
- Huh, G.-H., Damsz, B., Matsumoto, T.K., Reddy, M.P., Rus, A.M., Ibeas, J.I., Narasimhan, M.L., Bressan, R.A., and Hasegawa, P.M. (2002). Salt causes ion disequilibrium-induced programmed cell death in yeast and plants. *Plant J* 29, 649–659.
- Ishii, M., Egen, J.G., Klauschen, F., Meier-Schellersheim, M., Saeki, Y., Vacher, J., Proia, R.L., and Germain, R.N. (2009). Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature* 458, 524–528.
- Ishii, M., Kikuta, J., Shimazu, Y., Meier-Schellersheim, M., and Germain, R.N. (2010). Chemorepulsion by blood S1P regulates osteoclast precursor mobilization and bone remodeling in vivo. *J Exp Med* 207, 2793–2798.
- Janmey, P.A., and Kinnunen, P.K.J. (2006). Biophysical properties of lipids and dynamic membranes. *Trends Cell Biol* 16, 538–546.
- Jia, Y., Rothermel, B., Thornton, J., and Butow, R.A. (1997). A basic helix-loop-helix-leucine zipper transcription complex in yeast functions in a signaling pathway from mitochondria to the nucleus. *Mol Cell Biol* 17, 1110–1117.
- Jonannes A G Rhodin (1954). Correlation of ultrastructural organization: and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney: an electron microscopic study. thesis. Stockholm: Dept. of Anatomy, Karolinska Institutet.

- Katzen, F. (2007). Gateway((R)) recombinational cloning: a biological operating system. *Expert Opin Drug Discov* 2, 571–589.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239–257.
- Kim, J.D., McCarter, R.J., and Yu, B.P. (1996). Influence of age, exercise, and dietary restriction on oxidative stress in rats. *Aging (Milano)* 8, 123–129.
- Kispal, G., Sumegi, B., Dietmeier, K., Bock, I., Gajdos, G., Tomcsanyi, T., and Sandor, A. (1993). Cloning and sequencing of a cDNA encoding *Saccharomyces cerevisiae* carnitine acetyltransferase. Use of the cDNA in gene disruption studies. *J Biol Chem* 268, 1824–1829.
- Kohlhaw, G.B. (2003). Leucine biosynthesis in fungi: entering metabolism through the back door. *Microbiol Mol Biol Rev* 67, 1–15, table of contents.
- Kornmann, B. (2013). The molecular hug between the ER and the mitochondria. *Curr Opin Cell Biol* 25, 443–448.
- Kornmann, B., and Walter, P. (2010). ERMES-mediated ER-mitochondria contacts: molecular hubs for the regulation of mitochondrial biology. *J Cell Sci* 123, 1389–1393.
- Kornmann, B., Currie, E., Collins, S.R., Schuldiner, M., Nunnari, J., Weissman, J.S., and Walter, P. (2009). An ER-Mitochondria Tethering Complex Revealed by a Synthetic Biology Screen. *Science* 325, 477–481.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., and Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87, 99–163.
- Kumar, A., Byun, H.-S., Bittman, R., and Saba, J.D. (2011). The sphingolipid degradation product trans-2-hexadecenal induces cytoskeletal reorganization and apoptosis in a JNK-dependent manner. *Cell Signal* 23, 1144–1152.
- Kuras, L., and Struhl, K. (1999). Binding of TBP to promoters in vivo is stimulated by activators and requires Pol II holoenzyme. *Nature* 399, 609–613.
- Lahiri, S., Chao, J.T., Tavassoli, S., Wong, A.K.O., Choudhary, V., Young, B.P., Loewen, C.J.R., and Prinz, W.A. (2014). A conserved endoplasmic reticulum membrane protein complex (EMC) facilitates phospholipid transfer from the ER to mitochondria. *PLoS Biol* 12, e1001969.

- Lang, A., John Peter, A.T., and Kornmann, B. (2015). ER-mitochondria contact sites in yeast: beyond the myths of ERMES. *Curr Opin Cell Biol* 35, 7–12.
- Lasserre, J.-P., Dautant, A., Aiyar, R.S., Kucharczyk, R., Glatigny, A., Tribouillard-Tanvier, D., Rytka, J., Blondel, M., Skoczen, N., Reynier, P., et al. (2015). Yeast as a system for modeling mitochondrial disease mechanisms and discovering therapies. *Dis Model Mech* 8, 509–526.
- Lee, J., Godon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garin, J., Labarre, J., and Toledano, M.B. (1999). Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J Biol Chem* 274, 16040–16046.
- Liao, X., and Butow, R.A. (1993). RTG1 and RTG2: two yeast genes required for a novel path of communication from mitochondria to the nucleus. *Cell* 72, 61–71.
- Lington, C., and Rumsby, M.G. (1978). On the accessibility and localisation of cerebroside in central nervous system myelin. *Adv Exp Med Biol* 100, 263–273.
- Liu, Z., and Butow, R.A. (2006). Mitochondrial retrograde signaling. *Annu Rev Genet* 40, 159–185.
- Maceyka, M., Harikumar, K.B., Milstien, S., and Spiegel, S. (2012). Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends Cell Biol* 22, 50–60.
- Madeo, F., Herker, E., Wissing, S., Jungwirth, H., Eisenberg, T., and Frohlich, K.-U. (2004). Apoptosis in yeast. *Curr Opin Microbiol* 7, 655–660.
- Manoli, I., Alesci, S., Blackman, M.R., Su, Y.A., Rennert, O.M., and Chrousos, G.P. (2007). Mitochondria as key components of the stress response. *Trends Endocrinol Metab* 18, 190–198.
- Manon, S., Chaudhuri, B., and Guerin, 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-xL. *FEBS Lett* 415, 29–32.
- Marchler, G., Schuller, C., Adam, G., and Ruis, H. (1993). A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO J* 12, 1997–2003.
- Martinez-Montanes, F., Pascual-Ahuir, A., and Proft, M. (2010). Toward a genomic view of the gene expression program regulated by osmostress in yeast. *OMICS* 14, 619–627.

- Martinez-Pastor, M., Proft, M., and Pascual-Ahuir, A. (2010). Adaptive changes of the yeast mitochondrial proteome in response to salt stress. *OMICS* *14*, 541–552.
- Mattiazzi Usaj, M., Brloznic, M., Kaferle, P., Zitnik, M., Wolinski, H., Leitner, F., Kohlwein, S.D., Zupan, B., and Petrovic, U. (2015). Genome-Wide Localization Study of Yeast Pex11 Identifies Peroxisome-Mitochondria Interactions through the ERMES Complex. *J Mol Biol* *427*, 2072–2087.
- McCommis, K.S., and Finck, B.N. (2015). Mitochondrial pyruvate transport: a historical perspective and future research directions. *Biochem J* *466*, 443–454.
- Merz, S., and Westermann, B. (2009). Genome-wide deletion mutant analysis reveals genes required for respiratory growth, mitochondrial genome maintenance and mitochondrial protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biol* *10*, R95.
- Mitsuya, S., El-Shami, M., Sparkes, I.A., Charlton, W.L., Lousa, C.D.M., Johnson, B., and Baker, A. (2010). Salt stress causes peroxisome proliferation, but inducing peroxisome proliferation does not improve NaCl tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* *5*, e9408.
- Mohamadynejad, P., Ghaedi, K., Shafeghati, Y., Salamian, A., Tanhaie, S., Karamali, F., Rabiee, F., Parivar, K., Baharvand, H., and Nasr-Esfahani, M.H. (2013). Identification of a novel missense mutation of PEX7 gene in an Iranian patient with rhizomelic chondrodysplasia punctata type 1. *Gene* *518*, 461–466.
- Montanes, F.M., Pascual-Ahuir, A., and Proft, M. (2011). Repression of ergosterol biosynthesis is essential for stress resistance and is mediated by the Hog1 MAP kinase and the Mot3 and Rox1 transcription factors. *Mol Microbiol* *79*, 1008–1023.
- Morgan, B.A., Banks, G.R., Toone, W.M., Raitt, D., Kuge, S., and Johnston, L.H. (1997). The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* *16*, 1035–1044.
- Murley, A., Lackner, L.L., Osman, C., West, M., Voeltz, G.K., Walter, P., and Nunnari, J. (2013). ER-associated mitochondrial division links the distribution of mitochondria and mitochondrial DNA in yeast. (England).

Bibliografía

- de Nadal, E., Casadome, L., and Posas, F. (2003). Targeting the MEF2-like transcription factor Smp1 by the stress-activated Hog1 mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* 23, 229–237.
- Nakahara, K., Ohkuni, A., Kitamura, T., Abe, K., Naganuma, T., Ohno, Y., Zoeller, R.A., and Kihara, A. (2012). The Sjogren-Larsson syndrome gene encodes a hexadecenal dehydrogenase of the sphingosine 1-phosphate degradation pathway. *Mol Cell* 46, 461–471.
- Neuber, C., Schumacher, F., Gulbins, E., and Kleuser, B. (2014). Method to simultaneously determine the sphingosine 1-phosphate breakdown product (2E)-hexadecenal and its fatty acid derivatives using isotope-dilution. *Anal Chem* 86, 9065–9073.
- Ni, L., Bruce, C., Hart, C., Leigh-Bell, J., Gelperin, D., Umansky, L., Gerstein, M.B., and Snyder, M. (2009). Dynamic and complex transcription factor binding during an inducible response in yeast. *Genes Dev* 23, 1351–1363.
- Obeid, L.M., Linardic, C.M., Karolak, L.A., and Hannun, Y.A. (1993). Programmed cell death induced by ceramide. *Science* 259, 1769–1771.
- Palmieri, L., Lasorsa, F.M., Iacobazzi, V., Runswick, M.J., Palmieri, F., and Walker, J.E. (1999). Identification of the mitochondrial carnitine carrier in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 462, 472–476.
- Pandey, A., Golla, R., Yoon, H., Dancis, A., and Pain, D. (2012). Persulfide formation on mitochondrial cysteine desulfurase: enzyme activation by a eukaryote-specific interacting protein and Fe-S cluster synthesis. *Biochem J* 448, 171–187.
- Parone, P.A., James, D.I., Da Cruz, S., Mattenberger, Y., Donze, O., Barja, F., and Martinou, J.-C. (2006). Inhibiting the mitochondrial fission machinery does not prevent Bax/Bak-dependent apoptosis. *Mol Cell Biol* 26, 7397–7408.
- Pastor, M.M., Proft, M., and Pascual-Ahuir, A. (2009). Mitochondrial function is an inducible determinant of osmotic stress adaptation in yeast. *J Biol Chem* 284, 30307–30317.
- Patwardhan, G.A., Beverly, L.J., and Siskind, L.J. (2016). Sphingolipids and mitochondrial apoptosis. *J Bioenerg Biomembr* 48, 153–168.
- Phelps, C., Gburcik, V., Suslova, E., Dudek, P., Forafonov, F., Bot, N., MacLean, M., Fagan, R.J., and Picard, D. (2006). Fungi and animals may share a

- common ancestor to nuclear receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7077–7081.
- Piao, H., MacLean Freed, J., and Mayinger, P. (2012). Metabolic activation of the HOG MAP kinase pathway by Snf1/AMPK regulates lipid signaling at the Golgi. *Traffic* 13, 1522–1531.
- Pitson, S.M., and Pebay, A. (2009). Regulation of stem cell pluripotency and neural differentiation by lysophospholipids. *Neurosignals* 17, 242–254.
- Posas, F., Chambers, J.R., Heyman, J.A., Hoeffler, J.P., de Nadal, E., and Arino, J. (2000). The transcriptional response of yeast to saline stress. *J Biol Chem* 275, 17249–17255.
- Powers, S.K., Wiggs, M.P., Duarte, J.A., Zergeroglu, A.M., and Demirel, H.A. (2012). Mitochondrial signaling contributes to disuse muscle atrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303, E31-39.
- Priault, M., Chaudhuri, B., Clow, A., Camougrand, N., and Manon, S. (1999). Investigation of bax-induced release of cytochrome c from yeast mitochondria permeability of mitochondrial membranes, role of VDAC and ATP requirement. *Eur J Biochem* 260, 684–691.
- Priault, M., Camougrand, N., Kinnally, K.W., Vallette, F.M., and Manon, S. (2003). Yeast as a tool to study Bax/mitochondrial interactions in cell death. *FEMS Yeast Res* 4, 15–27.
- Proft, M., and Struhl, K. (2004). MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction. *Cell* 118, 351–361.
- Proft, M., Pascual-Ahuir, A., de Nadal, E., Arino, J., Serrano, R., and Posas, F. (2001). Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress. *EMBO J* 20, 1123–1133.
- Proft, M., Gibbons, F.D., Copeland, M., Roth, F.P., and Struhl, K. (2005). Genomewide identification of Sko1 target promoters reveals a regulatory network that operates in response to osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 4, 1343–1352.
- Puneet, P., Yap, C.T., Wong, L., Lam, Y., Koh, D.R., Moochhala, S., Pfeilschifter, J., Huwiler, A., and Melendez, A.J. (2010). SphK1 regulates proinflammatory responses associated with endotoxin and polymicrobial sepsis. *Science* 328, 1290–1294.

Bibliografía

- Rao, R.P., and Acharya, J.K. (2008). Sphingolipids and membrane biology as determined from genetic models. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 85, 1–16.
- Raspor, P., Plesnicar, S., Gazdag, Z., Pesti, M., Miklavcic, M., Lah, B., Logar-Marinsek, R., and Poljsak, B. (2005). Prevention of intracellular oxidation in yeast: the role of vitamin E analogue, Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylkroman-2-carboxyl acid). *Cell Biol Int* 29, 57–63.
- Ratnakumar, S., and Young, E.T. (2010). Snf1 dependence of peroxisomal gene expression is mediated by Adr1. *J Biol Chem* 285, 10703–10714.
- Ratnakumar, S., Kacherovsky, N., Arms, E., and Young, E.T. (2009). Snf1 controls the activity of adr1 through dephosphorylation of Ser230. *Genetics* 182, 735–745.
- Renault, T.T., and Chipuk, J.E. (2013). Inter-organellar communication with mitochondria regulates both the intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis. *Commun Integr Biol* 6, e22872.
- Rep, M., Krantz, M., Thevelein, J.M., and Hohmann, S. (2000). The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J Biol Chem* 275, 8290–8300.
- Rizzo, W.B. (2007). Sjogren-Larsson syndrome: molecular genetics and biochemical pathogenesis of fatty aldehyde dehydrogenase deficiency. *Mol Genet Metab* 90, 1–9.
- van Roermund, C.W., Elgersma, Y., Singh, N., Wanders, R.J., and Tabak, H.F. (1995). The membrane of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae* is impermeable to NAD(H) and acetyl-CoA under in vivo conditions. *EMBO J* 14, 3480–3486.
- van Roermund, C.W.T., Waterham, H.R., Ijlst, L., and Wanders, R.J.A. (2003). Fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol Life Sci* 60, 1838–1851.
- van Rossum, H.M., Kozak, B.U., Niemeijer, M.S., Duine, H.J., Luttk, M.A.H., Boer, V.M., Kotter, P., Daran, J.-M.G., van Maris, A.J.A., and Pronk, J.T. (2016). Alternative reactions at the interface of glycolysis and citric acid cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 16.

- Rottensteiner, H., Kal, A.J., Hamilton, B., Ruis, H., and Tabak, H.F. (1997). A Heterodimer of the Zn₂Cys₆ Transcription Factors Pip2p and Oaf1p Controls Induction of Genes Encoding Peroxisomal Proteins in *Saccharomyces Cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry* 247, 776–783.
- Ruiz-Roig, C., Noriega, N., Duch, A., Posas, F., and de Nadal, E. (2012). The Hog1 SAPK controls the Rtg1/Rtg3 transcriptional complex activity by multiple regulatory mechanisms. *Mol Biol Cell* 23, 4286–4296.
- Rutter, J., and Hughes, A.L. (2015). Power(2): the power of yeast genetics applied to the powerhouse of the cell. *Trends Endocrinol Metab* 26, 59–68.
- Saba, J.D., Nara, F., Bielawska, A., Garrett, S., and Hannun, Y.A. (1997). The BST1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is the sphingosine-1-phosphate lyase. *J Biol Chem* 272, 26087–26090.
- Saito, H., and Posas, F. (2012). Response to hyperosmotic stress. *Genetics* 192, 289–318.
- Salas, A., Ponnusamy, S., Senkal, C.E., Meyers-Needham, M., Selvam, S.P., Saddoughi, S.A., Apohan, E., Sentelle, R.D., Smith, C., Gault, C.R., et al. (2011). Sphingosine kinase-1 and sphingosine 1-phosphate receptor 2 mediate Bcr-Abl1 stability and drug resistance by modulation of protein phosphatase 2A. *Blood* 117, 5941–5952.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2006). Preparation and Transformation of Competent *E. coli* Using Calcium Chloride. *CSH Protoc* 2006.
- Sanchez A, and Díaz-Laviada I. (2006). Papel de los esfingolípidos en la señalización celular. *Revista de molecular cell biology*. 1:1.
- Sandalio, L.M., and Romero-Puertas, M.C. (2015). Peroxisomes sense and respond to environmental cues by regulating ROS and RNS signalling networks. *Ann Bot* 116, 475–485.
- Schmalix, W., and Bandlow, W. (1993). The ethanol-inducible YAT1 gene from yeast encodes a presumptive mitochondrial outer carnitine acetyltransferase. *J Biol Chem* 268, 27428–27439.
- Schmidt, O., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2010). Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 655–667.

Bibliografía

- Scorrano, L., Oakes, S.A., Opferman, J.T., Cheng, E.H., Sorcinelli, M.D., Pozzan, T., and Korsmeyer, S.J. (2003). BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science* *300*, 135–139.
- Setchell, K.D., Bragetti, P., Zimmer-Nechemias, L., Daugherty, C., Pelli, M.A., Vaccaro, R., Gentili, G., Distrutti, E., Dozzini, G., and Morelli, A. (1992). Oral bile acid treatment and the patient with Zellweger syndrome. *Hepatology* *15*, 198–207.
- Shadyro, O., Lisovskaya, A., Semenkova, G., Edimecheva, I., and Amaegberi, N. (2015). Free-radical Destruction of Sphingolipids Resulting in 2-hexadecenal Formation. *Lipid Insights* *8*, 1–9.
- Shai, N., Schuldiner, M., and Zalckvar, E. (2016). No peroxisome is an island - Peroxisome contact sites. *Biochim Biophys Acta* *1863*, 1061–1069.
- Sheridan, C., and Martin, S.J. (2010). Mitochondrial fission/fusion dynamics and apoptosis. *Mitochondrion* *10*, 640–648.
- Sheridan, C., Delivani, P., Cullen, S.P., and Martin, S.J. (2008). Bax- or Bak-induced mitochondrial fission can be uncoupled from cytochrome C release. *Mol Cell* *31*, 570–585.
- Sibirny, A.A. (2016). Yeast peroxisomes: structure, functions and biotechnological opportunities. *FEMS Yeast Res* *16*.
- Silva, R.D., Sotoca, R., Johansson, B., Ludovico, P., Sansonetty, F., Silva, M.T., Peinado, J.M., and Corte-Real, M. (2005). Hyperosmotic stress induces metacaspase- and mitochondria-dependent apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* *58*, 824–834.
- da Silva, T.F., Sousa, V.F., Malheiro, A.R., and Brites, P. (2012). The importance of ether-phospholipids: a view from the perspective of mouse models. *Biochim Biophys Acta* *1822*, 1501–1508.
- Simon, H.U., Haj-Yehia, A., and Levi-Schaffer, F. (2000). Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* *5*, 415–418.
- Singh, M.V., and Weil, P.A. (2002). A method for plasmid purification directly from yeast. *Anal Biochem* *307*, 13–17.
- Smith, J.J., and Aitchison, J.D. (2013). Peroxisomes take shape. *Nat Rev Mol Cell Biol* *14*, 803–817.

- Spiegel, S., and Milstien, S. (2003). Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 397–407.
- Spincemaille, P., Matmati, N., Hannun, Y.A., Cammue, B.P.A., and Thevissen, K. (2014). Sphingolipids and mitochondrial function in budding yeast. *Biochim Biophys Acta* 1840, 3131–3137.
- Steinberg, S.J., Dodt, G., Raymond, G.V., Braverman, N.E., Moser, A.B., and Moser, H.W. (2006). Peroxisome biogenesis disorders. *Biochim Biophys Acta* 1763, 1733–1748.
- Summers, S.A. (2010). Sphingolipids and insulin resistance: the five Ws. *Curr Opin Lipidol* 21, 128–135.
- Svennerholm, L. (1980). Ganglioside designation. *Adv Exp Med Biol* 125, 11.
- Swiegers, J.H., Dippenaar, N., Pretorius, I.S., and Bauer, F.F. (2001). Carnitine-dependent metabolic activities in *Saccharomyces cerevisiae*: three carnitine acetyltransferases are essential in a carnitine-dependent strain. *Yeast* 18, 585–595.
- Tait, S.W.G., and Green, D.R. (2013). Mitochondrial regulation of cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5.
- Tanigawa, M., Kihara, A., Terashima, M., Takahara, T., and Maeda, T. (2012). Sphingolipids regulate the yeast high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol Cell Biol* 32, 2861–2870.
- Taylor, R.G., Walker, D.C., and McInnes, R.R. (1993). *E. coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Res* 21, 1677–1678.
- Till, A., Ronak Lakhani, Sarah F. Burnett, and Suresh Subramani (2012). Pexophagy: The Selective Degradation of Peroxisomes. *International Journal of Cell Biology* 2012, 18.
- Timón-Gómez, A., Proft, M., and Pascual-Ahuir, A. (2013). Differential Regulation of Mitochondrial Pyruvate Carrier Genes Modulates Respiratory Capacity and Stress Tolerance in Yeast. *PLoS One* 8.
- de la Torre-Ruiz, M.A., Pujol, N., and Sundaran, V. (2015). Coping with oxidative stress. The yeast model. *Curr Drug Targets* 16, 2–12.

Bibliografía

- Trotter, P.J. (2001). The genetics of fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Nutr* 21, 97–119.
- Turcotte, B., Liang, X.B., Robert, F., and Soontorngun, N. (2010). Transcriptional regulation of nonfermentable carbon utilization in budding yeast. *FEMS Yeast Res* 10, 2–13.
- Upadhyaya, P., Kumar, A., Byun, H.-S., Bittman, R., Saba, J.D., and Hecht, S.S. (2012). The sphingolipid degradation product trans-2-hexadecenal forms adducts with DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 424, 18–21.
- Vanacloig-Pedros, E., Bets-Plasencia, C., Pascual-Ahuir, A., and Proft, M. (2015). Coordinated gene regulation in the initial phase of salt stress adaptation. *J Biol Chem* 290, 10163–10175.
- Vanderperre, B., Bender, T., Kunji, E.R.S., and Martinou, J.-C. (2015). Mitochondrial pyruvate import and its effects on homeostasis. *Curr Opin Cell Biol* 33, 35–41.
- Vendrell, A., Martinez-Pastor, M., Gonzalez-Novo, A., Pascual-Ahuir, A., Sinclair, D.A., Proft, M., and Posas, F. (2011). Sir2 histone deacetylase prevents programmed cell death caused by sustained activation of the Hog1 stress-activated protein kinase. *EMBO Rep* 12, 1062–1068.
- Vogel, F., Bornhovd, C., Neupert, W., and Reichert, A.S. (2006). Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol* 175, 237–247.
- Walter, L., and Hajnoczky, G. (2005). Mitochondria and endoplasmic reticulum: the lethal interorganelle cross-talk. *J Bioenerg Biomembr* 37, 191–206.
- Wanders, R.J.A. (2014). Metabolic functions of peroxisomes in health and disease. *Biochimie* 98, 36–44.
- Warringer, J., and Blomberg, A. (2003). Automated screening in environmental arrays allows analysis of quantitative phenotypic profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 20, 53–67.
- Warringer, J., Hult, M., Regot, S., Posas, F., and Sunnerhagen, P. (2010). The HOG pathway dictates the short-term translational response after hyperosmotic shock. *Mol Biol Cell* 21, 3080–3092.
- Wei, C.J., Tanner, R.D., and Malaney, G.W. (1982). Effect of sodium chloride on bakers' yeast growing in gelatin. *Appl Environ Microbiol* 43, 757–763.

- Willems, P.H.G.M., Rossignol, R., Dieteren, C.E.J., Murphy, M.P., and Koopman, W.J.H. (2015). Redox Homeostasis and Mitochondrial Dynamics. *Cell Metab* 22, 207–218.
- Wolinski, H., and Kohlwein, S.D. (2008). Microscopic analysis of lipid droplet metabolism and dynamics in yeast. *Methods Mol Biol* 457, 151–163.
- Zahedi, R.P., Sickmann, A., Boehm, A.M., Winkler, C., Zufall, N., Schonfisch, B., Guiard, B., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2006). Proteomic analysis of the yeast mitochondrial outer membrane reveals accumulation of a subclass of preproteins. *Mol Biol Cell* 17, 1436–1450.
- Zhang, X., and Qi, M. (2008). Mitochondrion and its related disorders: making a comeback. *J Zhejiang Univ Sci B* 9, 90–92.
- Zhao, J., Lendahl, U., and Nister, M. (2013). Regulation of mitochondrial dynamics: convergences and divergences between yeast and vertebrates. *Cell Mol Life Sci* 70, 951–976.

*Tablas
suplementarias*

Tabla 1:

GEN	Secuencia de oligonucleótido 5'-3'	Descripción
<i>RT-PCR y ChIP</i>		
ACT1	AAGGAAATCACCGCTTTGG	Cebador directo para RT-PCR
ACT1	GGACCACTTTCGTCGTATTCT	Cebador reverso para RT-PCR
PXA1	GGCAATTACAGGCAGTTGGT	Cebador directo para RT-PCR
PXA1	CCCCTAGCTTCGTCCTCTC	Cebador reverso para RT-PCR
PXA2	ACCGTTAAACCCGAAGGAAA	Cebador directo para RT-PCR
PXA2	TCAACTTCGGCTCCAAA	Cebador reverso para RT-PCR
FAA1	TTGGGAATTATGGAACAAAAGA	Cebador directo para RT-PCR
FAA1	AATTCATGCCAACCAAACC	Cebador reverso para RT-PCR
POX1	AAGTTTGCCGCAATAATCCA	Cebador directo para RT-PCR
POX1	TTCGAAACCTCTACCGAGCA	Cebador reverso para RT-PCR
CAT2	TTGACGGTTATGGTTGGTCTC	Cebador directo para RT-PCR
CAT2	CCACTCTGGCTGGTTTGTT	Cebador reverso para RT-PCR
ECI1	TGCTGAAATCGAACCACATC	Cebador directo para RT-PCR
ECI1	GAGCCAGCTGCCTAAATC	Cebador reverso para RT-PCR
GRE2	GCCTTCCAAAAGAGGGAAAC	Cebador directo para RT-PCR
GRE2	TTATGGGTAGCACCAGAACC	Cebador reverso para RT-PCR
FOX2	AAGGCTCGGTTGTCGTTTT	Cebador directo para RT-PCR
FOX2	GATTTTGCCTGCGATAGTTTT	Cebador reverso para RT-PCR
FAA1	TTGGGAATTATGGAACAAAAGA	Cebador directo para RT-PCR
FAA1	AATTCATGCCAACCAAACC	Cebador reverso para RT-PCR
FAA2	AAAGCACCCAGAGGTGAAAA	Cebador directo para RT-PCR
FAA2	TCGAATCCTTGATGCCATC	Cebador reverso para RT-PCR
FAA3	TAAACCGTGGGTATTGTGG	Cebador directo para RT-PCR
FAA3	GCTGTTGCGATCATCTTTTG	Cebador reverso para RT-PCR
FAA4	CTTTAATTTTTGGGCGGATG	Cebador directo para RT-PCR
FAA4	CTTTAATTTTTGGGCGGATG	Cebador reverso para RT-PCR
FAT1	GCCCTATTTGTTAAATTTGTTG	Cebador directo para RT-PCR
FAT1	TTCATAGCGCTTGTAAATCTTG	Cebador reverso para RT-PCR
PEX3	AAATGGCAGTTTTCGCTATGT	Cebador directo para RT-PCR
PEX3	GAGTGGCCAGGTATTCGTTC	Cebador reverso para RT-PCR
LCB4	CCAGTGACAAGAATGACACCA	Cebador directo para RT-PCR
LCB4	AGGAAACTTTTCACCATCCA	Cebador reverso para RT-PCR
LCB5	AAAGTAGGGAACGGCTTGT	Cebador directo para RT-PCR
LCB5	GCCATTTCTCAGTAACGTCTTG	Cebador reverso para RT-PCR
DPL1	CAAATTCTAAACCATCCCCAGA	Cebador directo para RT-PCR
DPL1	CGTCTAGGAATCCCAATCAA	Cebador reverso para RT-PCR
HFD1	ATTGGAATGATTTTACCCTTTT	Cebador directo para RT-PCR
HFD1	CCCCTGTTATTGCAATTTCT	Cebador reverso para RT-PCR
YDC1	TTTTGACCGGTAAGTGTCT	Cebador directo para RT-PCR
YDC1	AGGGAAAAATCCCCACCTC	Cebador reverso para RT-PCR
AUR1	TGGCTGCAGATTCAAACGA	Cebador directo para RT-PCR
AUR1	CGGACGAACGAGAAACAGA	Cebador reverso para RT-PCR
LAG1	AATACAAATGTTGGATTTGTTG	Cebador directo para RT-PCR
LAG1	TCACTTCTTCGCTCTTTGG	Cebador reverso para RT-PCR

Tablas suplementarias

LCB3	GGTGCAAGCAAGTACGAATG	Cebador directo para RT-PCR
LCB3	GAATGGAACGCCAGCATAGA	Cebador reverso para RT-PCR
LAC1	TTTGTATTGATAGGCGCTTTG	Cebador directo para RT-PCR
LAC1	GGAACCTTCATCACTTTCTTCGT	Cebador reverso para RT-PCR
GAL1	ATTCATTTGTGCCGTTGCTT	Cebador directo para ChIP
GAL1	AGGCAGCCTGATCCATACC	Cebador reverso para ChIP
POX1	AGGCAGCCTGATCCATACC	Cebador directo para ChIP
POX1	AACGTTCTCTTGTGACTTGCTTG	Cebador reverso para ChIP
FAA1	CCCATCGCATATCAGGAGAA	Cebador directo para ChIP
FAA1	ATACGATATCCGCGAAAGGA	Cebador reverso para ChIP
PXA2	TGCAATTAATGTCTTTCGTCTTT	Cebador directo para ChIP
PXA2	ATTGCCGCCCTTAATCTTTC	Cebador reverso para ChIP
ECI1	TCGTCATCTGCAACTGTTCTTT	Cebador directo para ChIP
ECI1	CTTCGTGCCGATTATTTT	Cebador reverso para ChIP
POL1	CTGACTGGCAAACAGAAA	Cebador directo para ChIP
POL1	GACGGCCAATAGAGCTGAAC	Cebador reverso para ChIP
Diseño de construcciones:		
HOG1	TGACCACTAACGAGGAATTCATTAGGACACAGATATTC GGTACAGCAGCTGAAGCTTCGTACGC	Cebador directo para la disrupción de Hog1
HOG1	GTTGGAATCATTAGCGTACTGTATGGCCTGGTTACCGT AGTCCGGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	Cebador reverso para la disrupción de Hog1
HOG1	GGACACTTTGACATCTCAGCC	Control negativo disrupción Hog1 (directo)
HOG1	GTCTACGGCATCAGGTTTCGAC	Control negativo disrupción Hog1 (reverso)
KAN1	GTTGGAATTTAATCGCGCCTC	Verificación disrupción KAN
HOG1	GGGAGGATCTTCGAAGGGAA	Cebador directo comprobación cassette disrupción Hog1
ADR1	GCAAGTGATTTCCACACTTTGGAAAATCATCTAAAGGG AAACAGTTCACCACCATCATCATCAC	Cebador directo para el marcaje con HA o myc de ADR1
ADR1	AATGAGATATTTCAAATCTCATCAGAAAGATTGAGTA CTGGGACACTATAGGGAGACCGGCAGAT	Cebador reverso para el marcaje con HA o myc de ADR1
ADR1	AAGGATTTGCCGAAAAGTACC	Cebador comprobación ADR1-tag
FAA1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGGTTGCT CAATATACCGTTCC	Cebador directo Faa1 Gateway
FAA1	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAAGACGAA CTATAAACGGCGTC	Cebador reverso Faa1 Gateway
M13	GTA AACGACGGCCAG	Cebador directo clon de entrada pDONR
M13	CAGGAAACAGCTATGAC	Cebador reverso clon de entrada pDONR
DPL1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGAGTGA GTATCAAATAAAACAG	Cebador directo clonaje Dpl1
DPL1	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGTACTTGGTG GCGGTATCCTCTC	Cebador reverso clonaje Dpl1
RTG1	CAAAAAACTAGATAGTGAACAAAAGAAAGCACAAC ACCAAACAGCTGAAGCTTCGTACGC	Cebador directo para la disrupción de Rtg1
RTG1	GGTTATCACAACATAGCAATAGTGAGAGTCAGAAGTAC TTGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	Cebador reverso para la disrupción de Rtg1

RTG1	CGAGGAGGAGTGCACCATC	Verificación disrupción Rtg1
RTG2	CTTTACTAAGGATTGTTTTGAACGAAAAGTGTAGGCGT GCCACAACAGCTGAAGCTTCGTACGC	Cebador directo para la disrupción de Rtg2
RTG2	AAGGATTCGTATTTATTGTTCAAGTATTTAAAGACTAG ATGTCTGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	Cebador reverso para la disrupción de Rtg2
RTG2	TCACATGACCGCGATAAGCG	Verificación disrupción Rtg2

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo.

