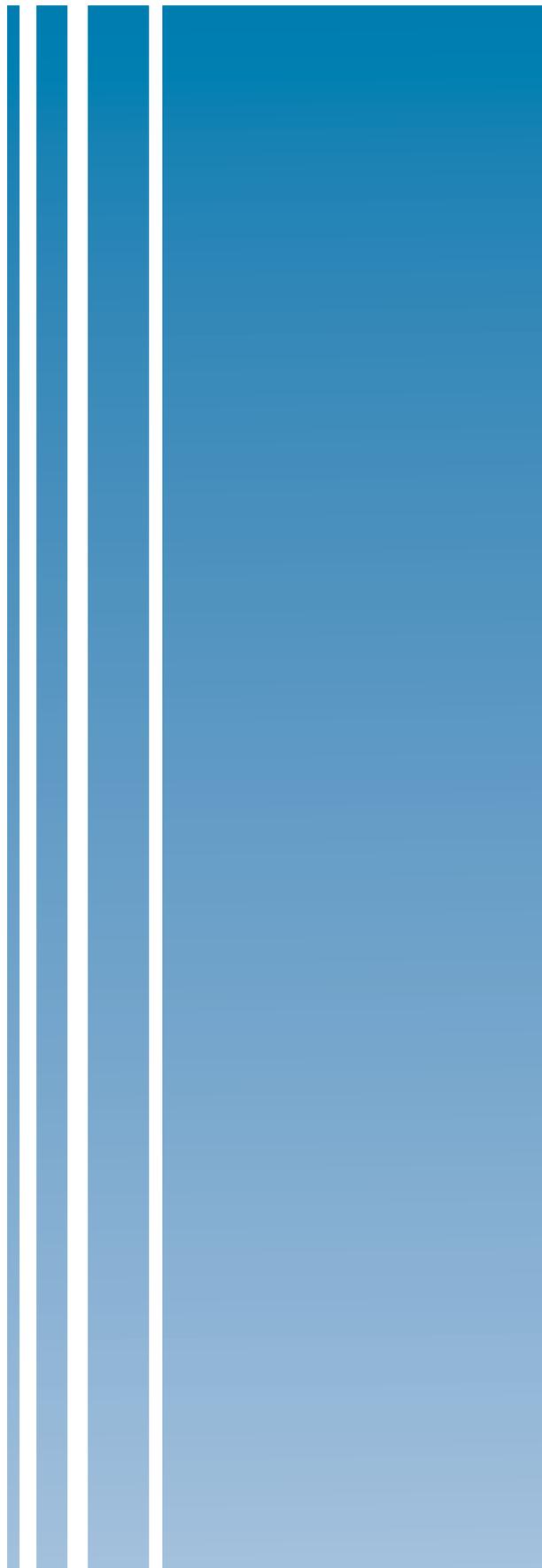


Portada
General

Coming
Soon!!





UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

**Análisis de la función y la regulación de la
MITOCONDRIA
de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en
respuesta a ESTRÉS OSMÓTICO.**

**Mar Martínez-Pastor
Valencia, 2011**

Memoria presentada para optar al título de Doctora por la Universidad Politécnica de Valencia (UPV).

Trabajo dirigido por: **Dra Amparo Pascual-Ahuir Giner (UPV)**
Dr Markus H. Proft (CSIC)

Doña **Amparo Pascual-Ahuir Giner**, Doctora en Biología y con cargo docente como profesora titular de la escuela de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia.

Don **Markus H. Proft**, Doctor en Biología y Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas,

CERTIFICAN:

Que Doña **María-Mar Martínez Pastor**, ingeniera agrónoma, ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación que lleva por título **“Análisis de la función y la regulación de la mitocondria de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en respuesta a estrés osmótico”** y presenta para optar al grado de Doctora por la Universidad Politécnica de Valencia.

Para que así conste, firman el presente documento en Valencia a 14 de febrero de 2011.

Amparo Pascual-Ahuir



Markus H. Proft



Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación, Madrid, BFU2008-00271, 01.2009-12.2011 a través del proyecto: “Respuesta a estrés osmótico en Saccharomyces y Arabidopsis: Regulación de la cromatina y de la actividad mitocondrial”. Investigador Principal: Markus Proft

Y a través de la Ayuda complementaria para proyectos de investigación: Consellería de empresa, universidad y ciencia, con el proyecto: “Análisis genómico y bioquímico de los blancos de la MAP quinasa Hog1 durante la adaptación transcripcional a estrés osmótico.” Valencia. ACOMP07-198, Investigador Principal: Markus Proft.

Als meus avis, als quatre,
per donar-me el regal més car de la història:
mon pare i ma mare.

I per fi... la llibertat! Acaba un cicle però sols serà la fi del principi, d'un futur molt llarg... Estic segura que tot el que ens queda per viure serà més fàcil amb el que he après de vosaltres, que és molt. Per això vull agrair-vos als que heu estat al meu voltant la vostra ajuda, i sols puc fer-ho emprant el valencià, que és la llengua que parla el meu cor.

Gràcies a Ramón i a Mariche. Heu estat els meus mestres, els meus mentors i els meus pares ací a l'IBMCP. De la vostra mà vaig fer els primers passos d'aquest continu aprenentatge que amb prou faenes estrene. Em vareu donar les primeres lliçons. Amb vosaltres vaig carregar el primer gel i vaig sentir parlar per primera vegada de plasmidis, vectors, epítops... però a més, compartirem noces, festes i saraus que és, amb tot, el que més pesa en la caixa màgica dels records que portaré amb mi al viatge del *postdoc*.

Gràcies a Markus i a Payo, els millors caps que podia tenir. Gràcies per ajudar-me, per ensenyar-me, per donar-me confiança. Gràcies per oferir-me aquest tema de tesi, que m'ha encantat, i per donar-me llibertat per a fer experiments que volia fer, encara que al final, sempre teníeu raó. Gràcies també per haver estat els meus amics. Sobretot a tu, Payo, per aquell "compta amb mi pel que necessites" quan tant ho necessitava.

Gràcies a Lynne. Tu ja no ho recordaràs, però m'oferires la teua ajuda quan vaig començar el treball final de carrera i no m'he soltat de la teua mà en els següents 7 anys! Gràcies per ajudar-me al labo., perquè sempre has deixat el que estigueres fent per resoldre'm dubtes, per escoltar-me, per proposar-me experiments nous. Perquè les idees que aportes sempre són les que jo voldria que alguna vegada se m'ocorregueren a mi. Gràcies pel teu entusiasme.

També moltes gràcies a tota la gent de l'institut amb la qual he compartit bancada, protocols, cafès i esperes (en la centrífuga, en la sala de revelat, etc) i que heu fet que estar ací siga un plaer. Als que encara seguiu ací i als que no: a Cinta, a Abi, a Noe, per les nits de cinema i japo, per acollir-me a Elx quan tot s'enfonsava i per recollir-me als aeroports. A Jorge P. amb qui he compartit tants secrets, a Mauri, a Guillem, a Steph (la protagonista de les millors festes d'aniversari), a Sil a la que sempre he volgut protegir per defensar la tendresa, a Mapi, a Emilio, a Edu, a Lola, Gaetano i un llarg etcètera de gent que m'ha fet riure molt. A M^a Ángeles i a la resta de "genòmicos" amb els quals vaig començar. A Vicente Conejero i a José Pío per tractar-me sempre amb absoluta camaraderia.

Moltes gràcies a la gent de "les altures de l'IBMCP", a Assumpta per compartir amb mi el caliu de la seua biblioteca. Les nostres confidències, els llibres i les postres han fet que l'any d'escriptura que tothom detesta haja sigut un "dolç" plaer. A Patricia, la secre, capaç de resoldre qualsevol problema burocràtic amb temps rècord. I a Julia per rescatar-me de la solitud d'aquests últims vespres, si no hagués estat per ella, a la caiguda dels sols d'entre setmana, m'hauria deixat seduir pel somni que es filtra a través del groc dels vidres.

I a tots els amics que he fet ací, però són per sempre. A Lozano per ser estar sempre en pau amb tot i per tota la proteòmic-ajuda prestada. A Ricardo per ser com és, per eixe somriure etern. A Laura, que és amiga i és germana, i com a tal ha patit aquest any de reclusió a la biblio. A Antonio que amb tota la seua gent (Merry, Mon, Vicky i Pedro, Nieves, Tomé, etc) em van fer una reuquenca més, em sent molt volguda per vosaltres i vos vull molt. Especialment al Sábado, per estar sempre, a les millors festes –a totes- i a l'hora de la feina. Gràcies per ajudar-me amb la tesi i per fer que tot sembla fàcil.

Al Balan, un referent en quant a ciència per la seua dedicació, la seva absoluta entrega i eixa capacitat per llegir-se articles que sols ell pot llegir. A Pedro, el primer membre del Konsejo que vaig conèixer a l'IBMCP i que quasi des del principi vaig considerar un gran amic. Gràcies a tu i a Elena per estar al meu costat en les bones estones i en les dolentes (encara que fent memòria quasi tot han estat bons moments), i amb ell, a tot el Konsejo. A Jordi i a Peio, per fer que menjar al treball es convertira en un dels millors moments de la setmana. Per les vostres crítiques, les converses sempre enriquidores i per ensenyar-me a riure'm de tot.

I a tots els de fora, els que heu estat abans, durant i després de la tesi. A les que vareu dibuixar la meua infància, Fátima, Estefania, Olga, Gloria, M^aJosé (la meua cosina no cosina), Fina i Sonia perquè feu que encara que vos veja tan poc, vos senta sempre al meu costat. A Lina i a Lorena per ajudar-me a sortir-me'n de l' institut sense seqüeles. A Saoro que va ser el que més em va recolzar quan vaig dir que volia fer la tesi i el que no va permetre mai que abandonara quan les coses no anaven bé. Tu i Jankho heu fet que perda la por a quasi tot... A Alfredo per voler-me tant i fer els deures amb mi. A Elena Zuriaga que amb les seues crisis "tésicas" va fer que les meues es quedaren en res. A Isa, per tot el que compartim. Perquè amb el temps ens hem vist créixer.

Al meu germà Pau, perquè sempre he sentit la teua mà agafada a la meua, tirant de la meua. Perquè m'has protegit, m'has animat i sobretot perquè m'has donat el nebot més bonic de la història. A ell, a Dídac, pel teu amor, per eixa rialla tan sana i per la teua contribució amb aquesta tesi. I a Virgínia per la seua dolçor, pel somriure obert que infon tanta pau, que il·lumina els dies grisos, per donar-me a Dídac i voler tant al meu germà.

Gràcies als meus pares, Àngel i Ana. A tu, papà, per estar sempre disponible per a nosaltres. Per ajudar-me a qualsevol hora i en qualsevol àmbit, per no preguntar. A tu, mamà, per ser el millor exemple del que és AMOR. Per estar al meu costat incondicionalment i per preguntar-ho tot. A vosaltres vos dec, sense dubte, el que sóc.

Finalment, gràcies a tu, Jorge.

Per ser el meu mestre. Aquesta tesi l'has corregida tu també. A tu te pregunte el que no sé, de ciència, de política i de quasi tot.

Per ser el meu millor amic, per les risses, la complicitat, per seguir acceptant que trie jo la pel·li després de errar-ne vint mil, pels arrossos dels diumenges, per compartir amb mi als teus i fer-los una mica meus també. Per cuidar-me i per deixar que jo et cuide. Per ser com eres, tan alegre, tan generós. Per cada minut que passe junt a tu.

Per ser l'amor de la meua vida...

...què tal si et dic que t'estime durant els següents trenta mil dematins...

ANÀLISI DE LA FUNCIÓ I LA REGULACIÓ DEL MITOCONDRI DEL LLEVAT
Saccharomyces cerevisiae EN RESPOSTA A ESTRES OSMÒTIC

L'estrés hiperosmòtic desencadena un gran nombre de respostes adaptatives en les cèl·lules eucariotes que afecten a moltes funcions fisiològiques diferents. En aquesta tesi, s'ha estudiat el paper del mitocòndri en la resposta a la salinitat utilitzant com a organisme model el llevat *Saccharomyces cerevisiae* per tractar-se d'un eucariota unicel·lular de metodologia accessible.

Els mitocòndris són orgànuls dinàmics que responen a estímuls externs i al nostre laboratori, hem segut capaços d'identificar una nova funció dels mitocòndris en la resposta al estrés hiperosmòtic, necessària per la supervivència de les cèl·lules en condicions d'estrés. S'ha observat que aquelles soques mutants que suporten defectes en algun component mitocondrial, són hipersensibles a elevades concentracions de KCl i NaCl. A més a més, algunes proteïnes amb funcions mitocondrials com ara Sdh2p i Cit1p, enzims del cicle de Calvin o components de la cadena de transport d'e⁻ (Cox6p), augmenten ràpidament la seva abundància després d'un xoc osmòtic de manera ràpida i selectiva, mentre que altres proteïnes mitocondrials romanen invariables en resposta a la sal, com corre amb la proteïna Atp5. D'altra banda, hem observat que la transcripció dels gens *SDH2*, *CIT1* i *COX6*, s'indueix en els primers moments després del xoc osmòtic, i que aquesta inducció depen de les MAP quinases Hog1 i Snf1. A més a més, l'activitat enzimàtica mitocondrial mesurada a través de la activitat succinat deshidrogenasa, augmenta en condicions d'estrés i és dependent de Snf1. La osmosensibilitat dels mutants mitocondrials no és només conseqüència del retard transcripcional de gens de resposta que es produeix quan la cèl·lula percep unes condicions desfavorables, ni de l'esgotament parcial de les reserves d'ATP. El fet que l'estrés hiperosmòtic causi una hiperacumulació de espècies reactives d'oxigen, i que el defecte en el creixement d'aquets mutants mitocondrials pugui ser parcialment rescatat mitjançant l'addició de glutatió, vol dir que la funció antioxidant del mitocòndri és important per a l'adaptació a medis hipersalins.

D'altra banda, emprant mètodes proteòmics, hem segut capaços de quantificar canvis en la composició proteica de les mitocòndries com a conseqüència del estrés que suposa la addició de NaCl al medi. Durant aquest treball, s'han identificat 15 proteïnes que s'acumulen al menys dues vegades en les mitocòndries d'aquelles cèl·lules que han estat tractades amb sal. Aquestes proteïnes estan principalment implicades en la defensa contra estrés oxidatiu, biosíntesi d'aminoàcids i ubiquinona i en el metabolisme del piruvat i l'acetat. No obstant això, la pèrdua de funció de la major part d'aquestes proteïnes que se sobreacumulen en condicions d'estrés, no manifestaren cap fenotip de sensibilitat en resposta a la salinitat mentre que totes elles resultaren estrictament necessàries per sobreviure a condicions d'estrés oxidatiu generat per l'addició exògena de peròxid d'hidrògen. També han estat identificades nou proteïnes que s'acumulaven almenys tres vegades menys en condicions hiperosmòtiques. Aquestes proteïnes varen resultar ser principalment proteïnes implicades amb la glicòlisi i proteïnes del reticle endoplàsmic.

Els nostres resultats mostren la complexitat de l'adaptació cel·lular a l'estrés osmòtic, identifiquen al mitocòndri com un orgànul implicat en la resposta adaptativa i destaquen grups funcionals de proteïnes amb funcions mitocondrials, el paper de les quals en l'adaptació al estrés, serà revelat en un futur proper.

ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN Y LA REGULACIÓN DE LA MITOCONDRIA DE LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae* EN RESPUESTA A ESTRÉS OSMÓTICO

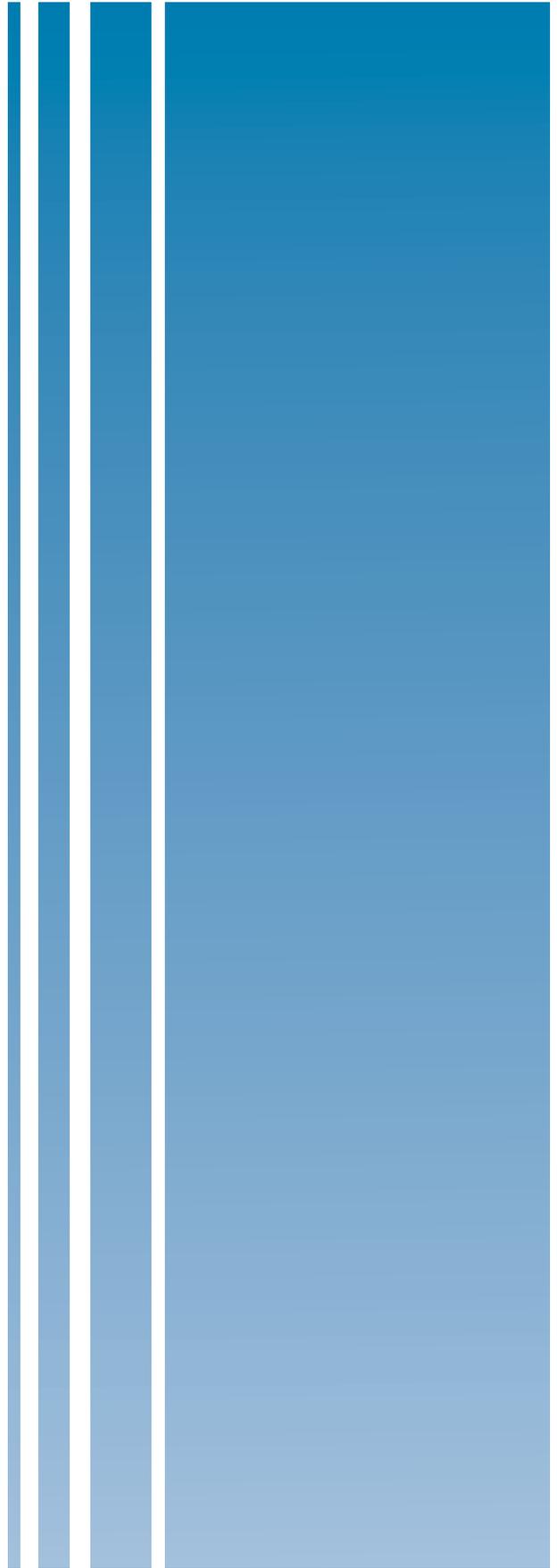
El estrés hiperosmótico desencadena un gran número de respuestas adaptativas en las células eucariotas que afectan a muchas funciones fisiológicas diferentes. A lo largo de la presente tesis, se ha investigado el papel de la mitocondria durante la adaptación a medios hiperosmóticos utilizando como organismo modelo la levadura *Saccharomyces cerevisiae* por tratarse de un organismo eucariota unicelular de metodología accesible.

Las mitocondrias son orgánulos dinámicos capaces de responder a estímulos externos y en nuestro laboratorio, hemos identificado una nueva función de las mismas en respuesta al estrés hiperosmótico, necesaria para que la supervivencia de las células en condiciones de estrés. Se ha observado que los mutantes con defectos en componentes mitocondriales son hipersensibles a elevadas concentraciones de NaCl y KCl. Además, las proteínas con funciones en la mitocondria como son algunas enzimas del ciclo de Calvin (Sdh2p y Cit1p), o componentes de la cadena de transporte de e⁻ (Cox6p), aumentan rápidamente su abundancia tras un choque osmótico de manera rápida y selectiva, mientras que otras proteínas mitocondriales permanecen estables en respuesta al choque osmótico, como ocurre con la proteína Atp5. Por otro lado hemos observado que la transcripción de los genes *SDH2*, *CIT1* y *COX6* se induce en los primeros momentos después de choque osmótico y que esta inducción es dependiente de las MAP Quinasas Hog1 y Snf1. Además, la actividad enzimática mitocondrial medida a través de la actividad de la succinato deshidrogenasa, aumenta en condiciones de estrés hiperosmótico y es dependiente de Snf1. La osmosensibilidad de los mutantes mitocondriales no es sólo consecuencia del retraso en la transcripción de genes de respuesta que se produce tras percibir el estrés, ni del agotamiento parcial de las reservas de ATP. El hecho de que el estrés hiperosmótico cause hiperacumulación de especies reactivas de oxígeno y que el defecto en el crecimiento de estos mutantes mitocondriales pueda ser parcialmente rescatado mediante la adición de glutatión, indica que la función antioxidante de la mitocondria juega un importante papel en la adaptación al estrés hipersalino.

Por otro lado, mediante métodos proteómicos, hemos sido capaces de cuantificar cambios en la composición proteica de las mitocondrias como consecuencia del estrés salino que provoca la adición de NaCl. Durante el presente trabajo se han identificado 15 proteínas que se acumulan dos o más veces en la mitocondria de aquellas células que fueron sometidas a estrés osmótico. Estas proteínas están principalmente implicadas en la defensa al estrés oxidativo, la biosíntesis de aminoácidos y la ubiquinona y en el metabolismo del piruvato y el acetato. Sin embargo, la pérdida de función de la mayor parte de estas proteínas que se sobreacumulaban en condiciones de estrés salino, no manifestaron ningún fenotipo de sensibilidad significativo mientras que todas ellas eran estrictamente necesarias para sobrevivir en condiciones de estrés oxidativo generado por la adición de peróxido de hidrógeno al medio. También hemos sido capaces de identificar un subgrupo de nueve proteínas que se acumulaban al menos tres veces menos en condiciones de estrés hiperosmótico. Estas proteínas resultaron ser principalmente proteínas implicadas en la glucólisis y proteínas del retículo endoplasmático.

Nuestros resultados subrayan la complejidad de la adaptación al estrés osmótico, identifican a la mitocondria como un orgánulo con implicaciones en la respuesta adaptativa y resaltan grupos funcionales de proteínas con funciones mitocondriales cuyo papel específico en la adaptación a medios hipersalinos será revelada en un futuro próximo.

Indice de Contenidos



INTRODUCCIÓN.....	3
1. – La respuesta al estrés en la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
1.1) Consideraciones generales.....	3
1.2) El estrés salino.....	5
1.2.1 Adaptación al estrés salino: osmorregulación.....	6
1.2.2 La ruta hog en la levadura <i>S. cerevisiae</i>	7
1.2.2.1: Sistemas de osmodetección de la ruta hog.....	9
1.2.2.2: Señalización a través de la ruta hog.....	11
1.2.2.3: Papeles fisiológicos de hog.....	11
1.3) El estrés oxidativo.....	15
1.3.1 Efectos de los radicales libres de oxígeno en las moléculas biológicas.....	15
1.3.2 Efectos biológicos de ROS a nivel celular.....	16
1.3.3 Sistemas de defensa frente a ROS.....	16
1.3.3.1: Sistemas de defensa antioxidante enzimáticos.....	16
1.3.3.2: Sistemas de defensa antioxidante no enzimáticos.....	19
1.3.4 Regulación de la respuesta a estrés oxidativo en la levadura <i>S. cerevisiae</i>	21
2.- La mitocondria como orgánulo responsable de la adaptación al estrés.....	23
2.1) Estructura, morfología y dinamismo de la mitocondria.....	23
2.2) Mitocondria y metabolismo.....	25
2.2.1 Glucólisis.....	25
2.2.2 Metabolismo anaeróbico.....	25
2.2.3 Metabolismo aeróbico.....	26
2.2.3.1: Ciclo de Krebs.....	26
2.2.3.2: Fosforilación oxidativa.....	27
2.3) Rutas de señalización que regulan la actividad mitocondrial en levadura.....	28
2.3.1 La ruta retrógrada.....	28
2.3.2 La ruta de señalización por glucosa.....	31
2.4) Funciones mitocondriales.....	32
2.4.1 La mitocondria como orgánulo generador de ATP.....	32
2.4.2 La mitocondria y la apoptosis.....	33
2.4.3 La mitocondria y el envejecimiento celular.....	34
2.4.4 La mitocondria y las enfermedades neurodegenerativas.....	36
2.4.5 La mitocondria y la homeostasis del calcio.....	37
2.4.6 La mitocondria y la adaptación al estrés.....	37
2.5) El proteoma mitocondrial.....	39

ÍNDICE GENERAL

OBJETIVOS.....	41
MATERIAELS Y MÉTODOS.....	45
1.- Materiales.....	45
2.- Métodos.....	52
2.1 Ensayos de crecimiento y sensibilidad.....	52
2.2- Técnicas de transferencia génica.....	53
2.3.- Obtención de extractos proteicos.....	55
2.4 Electroforesis y técnicas de detección de proteínas.....	59
2.5.- Análisis <i>northern</i>	68
2.6.- Otras medidas fisiológicas.....	71
RESULTADOS.....	79
1.- Búsqueda de nuevos determinantes de la tolerancia a estrés hiperosmótico y salino: identificación de la función mitocondrial.....	81
2.- Regulación selectiva de las proteínas mitocondriales bajo condiciones de estrés salino.....	87
3.- Control transcripcional de <i>sdh2</i> , <i>cox6</i> y <i>cit1</i> en respuesta a estrés salino.....	91
4.- Medida de la actividad enzimática de la succinato deshidrogenasa durante la respuesta celular al estrés osmótico.....	94
5.- Efecto de la actividad mitocondrial en la activación de la expresión génica en respuesta a estrés osmótico.....	95
6.- Medida de la acumulación de glicerol intracelular en respuesta al estrés osmótico.....	98
7.- Análisis del ratio energético en mutantes con defectos mitocondriales en condiciones de estrés osmótico.....	99
8.- Análisis de la función mitocondrial implicada en la producción/detoxificación de ros durante el estrés osmótico.....	101
9.- Estudio del efecto de la adición de antioxidantes sobre el crecimiento de cepas mutantes mitocondriales sometidas a estrés osmótico.....	103
10.- Análisis del crecimiento de las células de levadura sometidas a estrés osmótico: efecto del precultivo en galactosa o fuentes no fermentables.....	105
11.- Identificación a gran escala de las proteínas mitocondriales reguladas por estrés salino.....	106
11.1) Identificación de proteínas mitocondriales inducidas en respuesta a estrés salino.	
11.1.1 Regulación de proteínas de la mitocondria con función antioxidante en respuesta a estrés salino.....	109
11.1.2 Regulación de proteínas mitocondriales involucradas en la biosíntesis de aminoácidos en respuesta a estrés salino.....	115
11.1.3 Regulación de la expresión de proteínas de la membrana mitocondrial externa por estrés salino.....	117
11.1.4 Análisis fenotípico de mutantes en funciones mitocondriales en condiciones de estrés hiperosmótico.....	119
11.2) Proteínas reguladas negativamente en mitocondrias adaptadas a estrés salino.....	121
11.2.1 La regulación de enzimas glicolíticos por estrés salino.....	125

12. Relación mitocondria-retículo endoplasmático en respuesta a estrés salino.....	127
DISCUSIÓN.....	129
CONCLUSIONES.....	149
BIBLIOGRAFÍA.....	153
ANEJOS.....	191

Tabla M.1: Cepa silvestre y mutantes de delección (47)

Tabla M.2: Cepa silvestre y cepas etiquetadas con el epítipo –GFP (49)

Tabla M.3: Cepa silvestre y cepas etiquetadas con el epítipo –TAP (49)

Tabla M.4: Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la Inmunodetección de proteínas fusionadas a epítipos (51)

Tabla R.1: Mutantes con sensibilidad a NaCl, KCl y/o LiCl (82)

Tabla R.11.1: Lista de proteínas sobreexpresadas más de 2 veces en mitocondrias adaptadas a estrés osmótico (112)

Tabla R.12.2: Lista de proteínas subrepresentadas al menos 3 veces en mitocondrias adaptadas a estrés osmótico (123)

- Figura I.1: Rutas de MAP Quinasas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (8)
- Figura I.2: Ruta HOG de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (10)
- Figura I.3: Funciones de la MAP Quinasa Hog1 (12)
- Figura I.4: Sistema enzimático implicado en la detoxificación de ROS y en el control del estado redox de proteínas tiólicas en *S. cerevisiae* (17)
- Figura I.5: Esquema del ciclo de Krebs (26)
- Figura I.6: Modelo de regulación de la ruta retrógrada (30)
- Figura I.7: La maquinaria molecular de la apoptosis en levadura (34)
- Figura I.8: Clasificación de proteínas mitocondriales identificadas según su función (40)
- Figura R.1.1: Medida de sensibilidad al exceso de NaCl en mutantes afectados en la homeostasis de hierro y cobre cuando se suplementa el medio con un exceso de Cu²⁺ y Fe²⁺ (84)
- Figura R.1.2: Estudio de crecimiento y sensibilidad de diluciones seriadas de la cepa silvestre y las cepas mutantes que se indican en condiciones de estrés hiperosmótico (85)
- Figura R.1.3: Análisis de DNA mitocondrial de la cepas silvestre BY4741 y con defectos mitocondriales utilizadas en el presente trabajo (86)
- Figura R.2.1: Análisis de Inmunodetección de las proteínas Sdh1, Sdh2, Cox6, Cit1, Atp5 e Idp1 en respuesta a estrés (88)
- Figura R.2.2: Visualización mediante microscopía confocal de Sdh2-GFP y Cox6-GFP (89)
- Figura R.3: Regulación transcripcional de los genes *SDH2*, *COX6* y *CIT1* en respuesta a estrés salino (93)
- Figura R.4: Regulación de la actividad enzimática Succinato Deshidrogenasa (SDH) en respuesta al estrés salino (94)
- Figura R.5: Medida de la inducción de la expresión génica por estrés osmótico a las cepas de levadura silvestre y mutantes mitocondriales (97)
- Figura R.6: Medida de la acumulación de glicerol intracelular en respuesta a estrés osmótico en la levadura silvestre y las cepas mutantes en funciones mitocondriales (98)
- Figura R.7: Medida de la ratio AMP/ATP en células de levadura silvestre y mutantes con defectos mitocondriales con y sin tratamiento salino (100)
- Figura R.8: Medidas de acumulación de ROS en células de levaduras silvestre (BY4741) y mutantes *Δsnf1*, *Δaco1*, *Δsdh1* y *Δfzo* (102)
- Figura R.9: Análisis de crecimiento de la cepa silvestre y mutantes mitocondriales cuando se añaden antioxidantes al medio (104)
- Figura R.10: Efecto de la pre-activación de la mitocondria sobre la tolerancia al estrés osmótico (105)
- Figura R.11.1: Geles bidimensionales del análisis proteómico comparativo entre mitocondrias purificadas en condiciones normales (YPD) y estrés salino (1M NaCl) (107)
- Figura R.11.2: Proteínas identificadas por su expresión diferencial (YPD/YPD+1M NaCl) mediante técnica 2D-DIGE (108)
- Figura R.11.3: Perfil de expresión de una de las proteínas mitocondriales cuya acumulación aumenta en condiciones de estrés hiperosmótico (109)
- Figura R.11.4: Gel bidimensional de proteínas mitocondriales inducidas en condiciones de estrés salino (110)
- Figura R.11.5: Inmunodetección de proteínas mitocondriales con función antioxidante en presencia y ausencia de estrés salino (113)
- Figura R.11.6: Inmunodetección de proteínas mitocondriales implicadas en la biosíntesis de aminoácidos en presencia y ausencia de estrés osmótico (116)

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura R.11.7: Inmunodetección de proteínas de la membrana externa mitocondrial en respuesta a estrés hiperosmótico (118)

Figura R.11.8: Ensayo de viabilidad de mutantes en funciones mitocondriales identificadas por 2D-DIGE en condiciones de estrés salino y estrés oxidativo (120)

Figura R.11.9: Gel bidimensional de proteínas reprimidas en condiciones de estrés salino (121)

Figura R.11.10: Perfil de expresión de una de las proteínas cuya acumulación disminuye en condiciones de estrés hiperosmótico (122)

Figura R.11.11: Inmunodetección de enzimas glicolíticos en ausencia y presencia de estrés salino (125)

Figura R.12: Inmunodetección de proteínas del Retículo Endoplasmático (RE) reguladas negativamente como consecuencia del estrés hiperosmótico (127)

Figura D.1: Representación esquemática de las funciones mitocondriales inducidas por estrés osmótico

LISTA ABREVIATURAS:

- Aa:** aminoácido.
- AMP:** adenosín monofosfato.
- ADP:** adenosín difosfato.
- ATP:** adenosín trifosfato.
- AMPK:** proteína quinasa AMP dependiente (**AMP dependent Kinase**).
- bp:** pares de bases.
- BSA:** seroalbúmina bovina.
- CAC:** ciclo del ácido cítrico.
- cAMP:** AMP cíclico.
- CHAPS:** 3-[(3-Cholamidopropil) dimetilamonio]-1-propanesulfonato.
- CTAB:** bromuro de hexadeciltrimetilamonio.
- CDRE:** elemento de respuesta dependiente de la calcineurina.
- CRE:** elemento de respuesta cAMP.
- Cy3/5:** cyanina 3/5 (fluoróforos).
- Cys:** L-cisteína.
- DAPI:** diclorohidrato de 4,6-diamidino-2-fenilindol.
- DB71:** *Direct Blue 71*.
- dCTP:** deoxicitidina trifosfato.
- DIGE:** gel de electrophoresis diferencial (**Differential Gel Electrophoresis**).
- dNTP:** desoxinucleótido trifosfato.
- DTE:** 1,4-ditioeritritol.
- DTT:** 1,4- ditioneitol.
- E. coli:** *Escherichia coli*.
- ECL:** quimioluminiscencia (**Enhanced ChemiLuminescence**).
- EDTA:** ácido etileno diamino tetracético.
- GDH:** glutamato deshidrogenasa.
- GFP:** **Green Fluorescent Protein**.
- Glu:** ácido glutámico.
- Gly:** glicerol.
- GSH:** glutatión reducido.
- GTP:** guanosín trifosfato.
- h:** horas.
- HA:** hemaglutinina.
- HEPES:** ácido [4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinaetanolsulfónico].
- HOG:** Ruta de respuesta a elevada osmolaridad (**High Osmolarity Glycerol**).
- HPLC:** cromatografía líquida de alta resolución (**High Performance Liquid Chromatography**).
- HSP:** proteína de respuesta a choque térmico.
- IPTG:** isopropil- β -thiogalactopiranosido.
- Kan⁺:** gen de resistencia a la kanamicina.

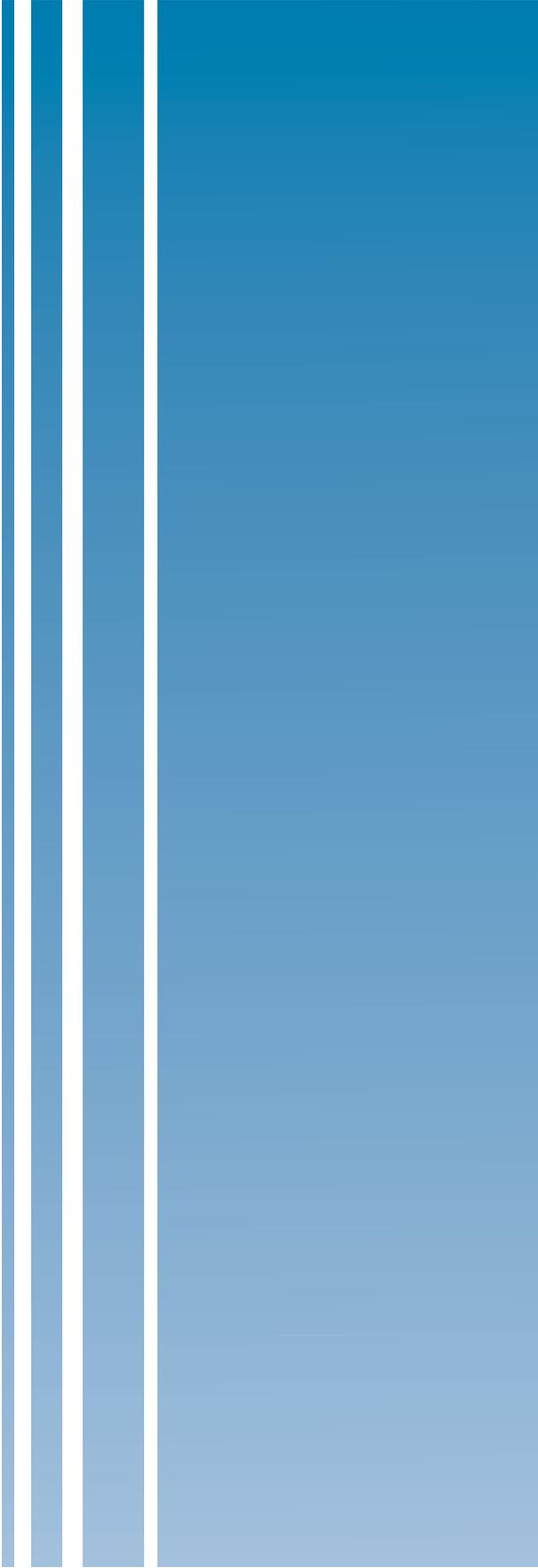
Kb: kilobase.
KDa: kilodalton.
MALDI-TOF: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight*.
MAPK: proteína quinasa mitógeno activada (*Mitogen Activated Protein Kinase*).
MAPKK: MAPK quinasa.
MAPKKK: MAPK quinasa quinasa.
MES: ácido 2,(N-morfolino) etanosulfónico.
MOPS: Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico.
mRNA: ácido ribonucleico mensajero.
NAD⁺: dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma oxidada).
NADH: dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida).
NADP⁺: fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma oxidada).
NADPH: fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida).
nm: nanómetro.
OD₆₆₀: densidad óptica a 660 nm.
OLB: tampón de marcaje *Overgo Labelling Buffer*.
ONPG: orto-nitrofenil-b-D-galactopiranosidasa.
ORF: pauta abierta de lectura (*Open Reading Frame*).
PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*).
PBS: tampón salino de fosfatos.
PEG: polietilenglicol.
Pi: fosfato inorgánico.
PKA: proteína quinasa A.
PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
PTP: poro de transición.
PVDF: difluoruro de polivinilideno.
ROS: especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*).
RTG: ruta de respuesta retrógrada.
SDH: succinato deshidrogenasa.
SDS: dodecil sulfato sódico.
SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.
SGD: *Saccharomyces Genome Database*.
SOD: superóxido dismutasa.
STRE: *Stress Response Element*.
SSC: citrato salino sódico.
TAE: Tris-acetato sódico EDTA.
TBE: Tris-borato-EDTA.
TBS: tampón salino de Tris (hidroximetil) aminometano.
TEMED: N,N,N',N' tetrametiletileno-diamino.
TOR: *Target Of Rapamycin*.
Tris: (hidroximetil) aminometano.
Tritón X100: t-octilfenoxilpolietoxietanol.
uv: ultravioleta.
Trp: triptófano.

Wt: cepa silvestre (*Wild Type*).

x-gal: 5-bromo-4-cloro-3-inodil- β -B-galactopiranósido.

YRE: *Yap1 Recognition Element*

Introducción



1. – LA RESPUESTA AL ESTRÉS EN LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*.

1.1) Consideraciones Generales.

Consideramos **estrés** a cualquier cambio que se produce en el entorno de una célula que hace que en ésta se desencadenen mecanismos de percepción y respuesta que permiten su adaptación, crecimiento y proliferación.

Los organismos unicelulares requieren condiciones internas específicas para su crecimiento óptimo. Los cambios en el medio externo en factores como la temperatura, el pH, la osmolaridad, la presencia de agentes tóxicos, la radiación, la variación en la disponibilidad de nutrientes, etc., pueden afectar a este equilibrio impidiendo o dificultando los procesos que suceden en condiciones normales. Estas perturbaciones pueden provocar alteraciones en la actividad enzimática, en los flujos metabólicos y gradientes químicos, además de desestabilizar estructuras celulares y provocar otros trastornos que al final afectan a la estabilidad global de la célula.

Para la realización de la presente tesis elegimos como organismo modelo la levadura *Saccharomyces cerevisiae* por tratarse de un organismo eucariota unicelular metodológicamente accesible, que es capaz de sobrevivir a estos cambios externos respondiendo al estrés para prevenir los posibles efectos degenerativos y reparar los daños sufridos y cuyos procesos biológicos básicos están conservados entre eucariotas superiores.

La respuesta celular al estrés se desarrolla en fases sucesivas. La primera de las fases consiste en la percepción de los cambios que se están produciendo en su entorno y la señalización a nivel intracelular para activar mecanismos de respuesta. Durante la segunda fase, la célula activa mecanismos de adaptación a estos cambios que constituyen la integración de todas las actividades celulares que permitan el crecimiento y la proliferación de la célula sometida al estrés.

En las células de levadura se han descrito, en respuesta a estrés, los fenómenos de “**protección inducida**” y “**protección cruzada**”. El primero de ellos consiste en la adquisición de una mayor capacidad para mantener el equilibrio interno durante un estrés intenso en aquellas células que ya han estado sometidas a condiciones menos severas de un estrés de la misma naturaleza. El segundo,

consiste en la adquisición de una capacidad de supervivencia a un determinado estrés, si las células han estado previamente sometidas a otro estrés diferente (Mitchel, R. E. et al. 1982), (Blomberg, A. et al. 1988), (Flattery-O'Brien, J. et al. 1993, Lewis, J. G. et al. 1995). Esto significa que la respuesta a un estrés no letal, les hace adquirir cierta resistencia frente a futuras condiciones adversas tanto de la misma naturaleza como de naturalezas distintas.

Esta observación sugiere que el estrés, a pesar de ser consecuencia de factores diferentes, desencadena respuestas celulares comunes (Kurtz, S. et al. 1986). Al mismo tiempo había sido identificada la secuencia consenso que regula en *cis* la expresión de estos genes inducidos por estrés a nivel de sus promotores, y se le denominó STRE (*Stress Response Element*), quedando entonces explicado que estos elementos estaban co-regulados por un factor común (Kobayashi, N. and McEntee, K. 1993), (Kobayashi, N. and McEntee, K. 1990), (Marchler, G. et al. 1993). Actualmente se sabe que los factores de transcripción Msn2 y Msn4 reconocen los sitios STRE y activan la expresión génica en respuesta a diferentes tipos de estrés (Martinez-Pastor, M. T. et al. 1996). Este proceso está regulado por la actividad de la proteína quinasa A de tal manera que Msn2 y Msn4 sólo se encuentran activos en el núcleo en condiciones adversas (Thevelein, J. M. and de Winde, J. H. 1999).

La adaptación al estrés en levadura tiene normalmente un impacto muy importante a nivel de la expresión génica. La caracterización de la expresión génica en levaduras sometidas a diferentes condiciones medioambientales reveló que la mayor parte de las respuestas no son específicas para un determinado tipo de estímulo, al contrario, parece que existe una respuesta genérica sin importar la naturaleza del estrés. Alrededor de 900 genes de *S. cerevisiae* muestran una expresión alterada en respuesta a diversos tipos de estrés ambiental (Gasch, A. P. et al. 2000). Se observó que la mayoría de los genes inducidos era diana de Msn2 y 4p (Martinez-Pastor, M. T. et al. 1996), (Schmitt, A. P. and McEntee, K. 1996) aunque no ocurría así en el caso de la mayoría de los genes reprimidos.

Otra característica interesante de la respuesta transcripcional a estrés es que es transitoria, esto significa que después de que se produzca un cambio en las condiciones del entorno, las células responden modificando su expresión génica y que una vez recuperado el equilibrio, estos genes recuperan los niveles de expresión inicial (Parrou, J. L. et al. 1997). Los cambios transitorios de la expresión

génica ayudan a la célula a ajustar su composición proteica a las necesidades requeridas para mantener el crecimiento en las nuevas condiciones. Generalmente, la mayoría de los cambios a nivel de transcritos se correlacionan con cambios en los niveles de síntesis de proteínas. El 90% de las alteraciones traduccionales se correlacionan con los cambios en abundancia de sus transcritos (Fuge, E. K. et al. 1994), (Norbeck, J. and Blomberg, A. 1997), (Godon, C. et al. 1998), (Norbeck, J. and Blomberg, A. 2000), (Gasch, A. P. et al. 2000). La fase de adaptación de las células al estrés, durante la cual se restablece el equilibrio interno de las mismas, se corresponde con el patrón transitorio de la expresión génica. Sólo el estrés por falta de nutrientes constituye una excepción a este comportamiento ya que las células al detectar las carencias nutricionales, activan un sistema de parada de crecimiento.

1.2) El Estrés salino.

El estrés salino está producido por dos causas principales, la toxicidad de elevadas concentraciones de iones específicos como el Na^+ y la disponibilidad de agua por debajo de las exigencias celulares.

(a) La toxicidad de elevadas concentraciones de iones específicos como el Na^+ : Algunos cationes como el Na^+ pueden alterar la disponibilidad de otros como K^+ y Ca^{2+} compitiendo con los mismos por determinados sitios de unión a las proteínas. Las células responden transportando los cationes tóxicos al medio externo o compartimentalizándolos en determinados orgánulos como la vacuola.

Ante una concentración elevada de Na^+ , y para evitar la entrada masiva de iones sodio al interior de la célula, se producen cambios en los sistemas de transporte de K^+ pasando de un estado de baja afinidad (Trk2p), a uno de alta afinidad determinado por Trk1p (Rodríguez-Navarro, A. and Ramos, J. 1984), (Ko, C. H. et al. 1990). Por otro lado también se activa el bombeo de iones de sodio al exterior por la ATPasa de tipo P codificada por los genes *ENA 1-4* de los cuales, *ENA1* está inducido por sal (Garcia-deblas, B. et al. 1993).

Mientras que la presencia de Na^+ en el medio no es esencial para el crecimiento óptimo de la levadura, ésta requiere concentraciones mínimas de K^+ en

el medio que aseguren unos niveles internos de aproximadamente 250 mM. Sólo en el caso de que la disponibilidad de K^+ esté por debajo de los requerimientos mínimos limitando el crecimiento de la célula, éste puede ser sustituido por Na^+ observándose un efecto estimulador del crecimiento (Rodríguez-Navarro, A. 2000). En general, en ausencia de K^+ disponible, la célula suele tomar H^+ para mantener la electroneutralidad intracelular. En el caso de tomar Na^+ , si las concentraciones de iones sodio tomadas son elevadas, este puede llegar a ser tóxico.

(b) La disponibilidad de agua por debajo de las exigencias celulares: El estrés osmótico está causado por cambios en las concentraciones de moléculas en disolución en el entorno extracelular que, como consecuencia, alteran la disponibilidad de agua para las células puesto que disminuye el potencial hídrico y por tanto su actividad. Según el mismo principio, la reducción de la concentración de osmolitos en el medio hace que el agua atraviese las membranas celulares hacia medios con concentraciones mayores de solutos. Tanto el aumento de la osmolaridad externa o estrés hiperosmótico como la reducción de ésta o estrés hiposmótico, causan daños celulares.

Cuando las células de *S. cerevisiae* se enfrentan a condiciones de alta osmolaridad externa sufren un cambio inmediato en el volumen celular debido a la pérdida de agua del citosol. Tal deshidratación es un proceso rápido, de aproximadamente un minuto, que se compensa parcialmente por un influjo de agua de la vacuola al tiempo que ésta acumula iones tóxicos del citoplasma (Serrano, R. 1996).

1.2.1 ADAPTACIÓN AL ESTRÉS SALINO: OSMORREGULACIÓN.

La **Osmorregulación** se define como el control activo del equilibrio entre el agua del interior y el exterior de la célula y abarca todos los mecanismos para mantener la homeostasis celular.

En condiciones normales los microorganismos mantienen una presión osmótica en su interior mayor que la del medio que los rodea. Esta diferencia de presión se mantiene gracias a la resistencia de la pared celular y es la causa de lo que llamamos **turgencia**. Cuando la osmolaridad externa cambia, las células han de

adaptar la interna para mantener el equilibrio. Para ello acumulan biomoléculas específicas osmoprotectoras que las protegen de la deshidratación causada por las fluctuaciones osmóticas. Estos compuestos se llaman solutos compatibles porque no afectan física ni bioquímicamente a ningún proceso celular y actúan aumentando la osmolaridad interna de la célula y posibilitando la entrada de agua del exterior de manera más eficiente (Yancey, P. H. et al. 1982). El glicerol es el mayor osmolito producido en células de *S. cerevisiae*. En situaciones de hiperosmolaridad el canal regulado por Fps1p se cierra e impide la salida del glicerol de nueva síntesis (Folch-Mallol, J. L. et al. 2004).

El estrés osmótico también causa daños en la membrana plasmática a nivel de estructura, permeabilidad y propiedades mecánicas (Wood, J. M. 1999). El exceso de sal altera la regulación de la síntesis de los ácidos grasos modificándose la conformación lipídica de la membrana plasmática que tiene consecuencias a nivel de la distribución, síntesis y funcionalidad de las proteínas transmembrana, los transportadores y los osmosensores (Carratu, L. et al. 1996), (Laroche, C. et al. 2001).

En la levadura *S. cerevisiae* la respuesta al estrés hiperosmótico se caracteriza por la detección, señalización y el posterior y rápido reajuste de la expresión génica y proteica que tiene lugar al desencadenarse la cascada de MAP Quinasas HOG.

1.2.2 LA RUTA HOG EN LA LEVADURA *S. cerevisiae*.

Las rutas de **MAP quinasas** (*Mitogen Activated Protein Kinase*) están altamente conservadas en eucariotas. Pueden activarse mediante señales tanto intra como extracelulares y controlan procesos fundamentales como el crecimiento celular, la morfogénesis, la proliferación y la respuesta al estrés (Banuett, F. 1998), (Gustin, M. C. et al. 1998), (Ligterink, W. and Hirt, H. 2001). Consisten en cascadas de proteínas quinasas actuando unas sobre otras a través de fosforilaciones consecutivas.

Introducción

La levadura *S. cerevisiae* cuenta con cinco rutas de MAP quinasas diferentes interconectadas entre ellas (Chen, R. E. and Thorner, J. 2007):

- 1.- Ruta de respuesta a feromonas (**MAPK: Fus3p**)
- 2.- Ruta de desarrollo de hifas (**MAPK: Kss1p**)
- 3.- Ruta de respuesta a cambios osmóticos (**MAPK: Hog1**)
- 4.- Ruta de mantenimiento de la integridad celular (**MAPK: Slt2p**)
- 5.- Ruta de formación de esporas (**MAPK: Smk1p**)

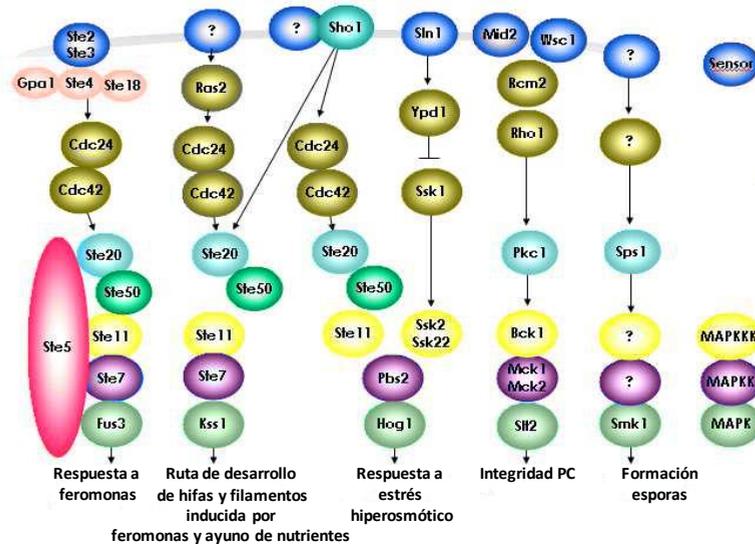


Figura I.1: Rutas de MAP Quinasas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *S. cerevisiae* cuenta con cinco rutas distintas de MAP quinasas: respuesta a feromonas, desarrollo de hifas, respuesta a estrés hiperosmótico, mantenimiento de la integridad celular y formación de esporas.

La **ruta HOG** es la ruta de MAP quinasas involucrada en la transmisión de señal en respuesta a estrés hiperosmótico en *S. cerevisiae* y es responsable de coordinar los complejos cambios adaptativos a distintos niveles: regulación metabólica, regulación de la síntesis proteica, adaptación del ciclo celular y regulación de la expresión génica.

1.2.2.1: Sistemas de osmodetección de la ruta HOG.

La ruta HOG se activa a través de dos mecanismos independientes (Sln1 y Hkr1/Msb2) que, a su vez, permiten la activación de las MAPKKs Ssk2/Ssk22 y Ste11. La transmisión de la señal a través de cualquiera de las dos ramas converge en la MAPKK común Pbs2 que es un activador específico de la MAPK Hog1 (Maeda, T. et al. 1994), (Hohmann, S. 2002) (Figura I.2).

El primer sistema de osmodetección implica la activación de un sistema osmosensor formado por las proteínas Sln1/Ypd1 y Ssk1 (Figura I.2). Sln1 es una proteína transmembrana que, en condiciones de elevada osmolaridad, actúa sobre Ypd1p permitiendo la interacción de Ssk1p con las MAPKKs Ssk2/22. A su vez, este complejo proteico activado fosforila a la MAPKK Pbs2 (Posas, F. et al. 1996). Si las condiciones externas varían, disminuyendo la osmolaridad extracelular, el osmosensor Sln1p se activa e impide la transmisión de la señal (Maeda, T. et al. 1994). La disrupción del gen *SLN1* es letal, puesto que causa la activación constitutiva de la ruta HOG (Maeda, T. et al. 1994).

Pbs2p puede ser activada a través de un segundo mecanismo también descrito en la figura I.2. La proteína Sho1 y sus potenciales osmosensores Hkr1p y Msb2p (Maeda, T. et al. 1995), (Posas, F. et al. 1998), (de, Nadal E. et al. 2007). Sho1p es una proteína transmembrana cuya activación implica la formación rápida y transitoria de un complejo de proteínas de la membrana plasmática que activa a la MAPKK Ste11. Una vez activada, Ste11p es capaz de fosforilar a Pbs2 (MAPKK) que a su vez activa a la MAPK Hog1 (Posas, F. and Saito, H. 1997).

La existencia de dos ramas distintas implicadas en la activación de Pbs2p puede estar sugiriendo la redundancia de funciones en la ruta de respuesta a estrés osmótico. Sin embargo, estos dos mecanismos se activan a través de estímulos diferentes. El hecho de que Sho1p esté localizada en lugares activos de crecimiento hace suponer que responde a situaciones de estrés osmótico durante la expansión y el crecimiento celular (Raitt, D. C. et al. 2000), (Reiser, V. et al. 2000) mientras que Sln1p responde permitiendo la adaptación de la célula a los cambios osmóticos ambientales (Hohmann, S. 2002).

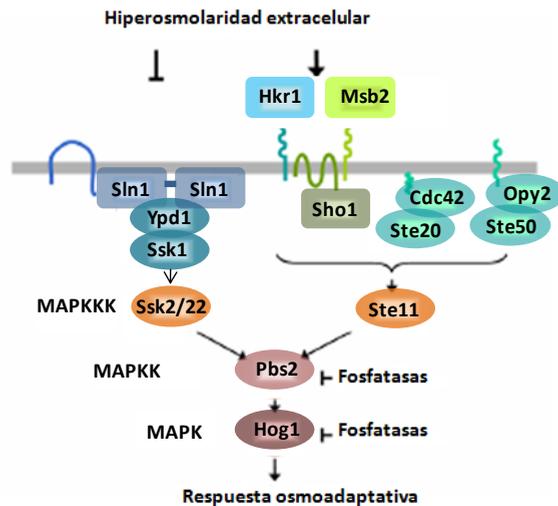


Figura I.2: Ruta HOG de la levadura *S. cerevisiae*. A partir de dos mecanismos independientes de osmodetección se activan las MAPKKK Ssk2, Ssk22 y Ste11 que transmiten la señal a una MAPKK común, Pbs2. En situaciones de estrés osmótico, Pbs2p activa por fosforilación a la MAPK Hog1 capaz de inducir respuestas adaptativas al estrés.

1.2.2.2: Señalización a través de la ruta HOG.

La activación de la MAPKK Pbs2 se produce por fosforilación en las Ser514 y Thr 518. Pbs2 es una proteína citoplasmática que transmite la señal de activación fosforilando a la MAPK Hog1 a nivel de los residuos conservados Thr174 y Tyr176 (Brewster, J. L. et al. 1993), la cual, una vez fosforilada, se acumula en el núcleo (Reiser, V. et al. 1999). La activación de Hog1p es un fenómeno transitorio (Maeda, T. et al. 1994, Jacoby, T. et al. 1997, Tamas, M. J. et al. 2000, Hohmann, S. et al. 2007) y controlado por mecanismos específicos de retroalimentación. La activación de Hog1p está regulada negativamente a través de tres proteínas fosfatasas: Ptp2 (fosfatasa fosfotirosina nuclear), Ptp3 (fosfatasa fosfotirosina citosólica) y Ptc1 (fosfatasa serina-treonina, localizada tanto en el núcleo como en el citoplasma) (Mattison, C. P. et al. 1999). Su regulación es necesaria para prevenir respuestas no deseables como consecuencia de estímulos no relevantes. Así la célula consigue modular la actividad de las MAPK sólo en condiciones de estrés, haciéndolo además de forma transitoria.

1.2.2.3: Papeles de la ruta HOG.

A pesar de que en condiciones de estrés osmótico Hog1p se acumula mayoritariamente en el núcleo, las acciones que su activación desencadena tienen lugar tanto a nivel nuclear como citoplasmático. Este programa de adaptación a través de Hog1p incluye la regulación de la expresión génica, el ciclo celular, la síntesis proteica, la homeostasis iónica y las adaptaciones metabólicas, entre otras (Figura I.3).

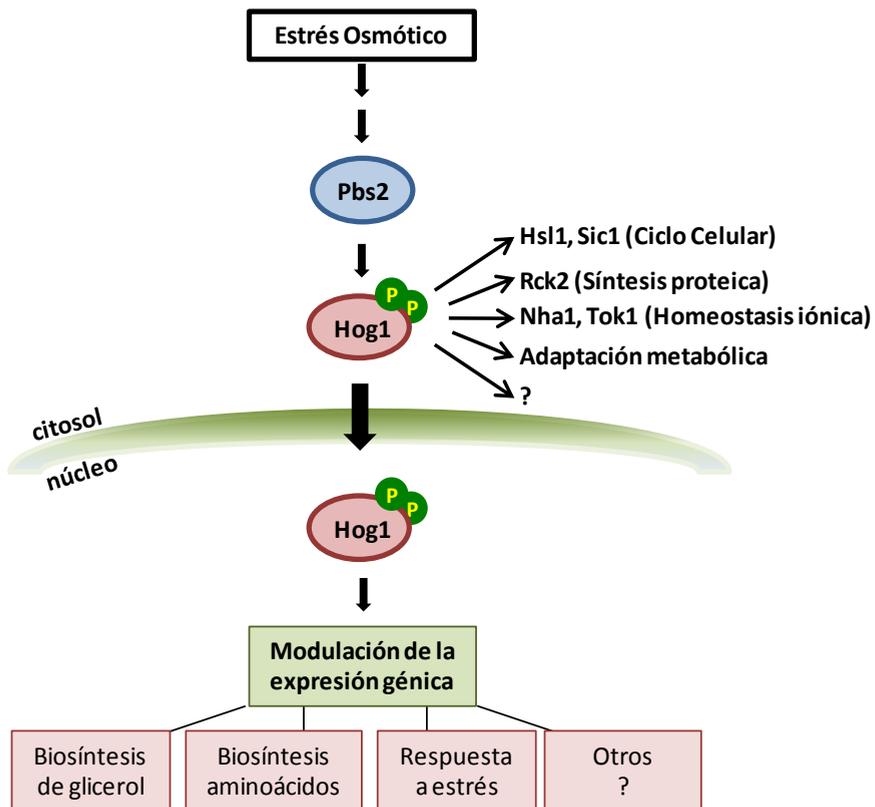


Figura I.3: Funciones de la MAP Quinasa Hog1. Una vez activado por la fosforilación de Pbs2p, Hog1p es capaz de poner en marcha varios mecanismos de adaptación a estrés osmótico como la modulación de la expresión génica, la regulación del ciclo celular, la adaptación metabólica y la regulación de la síntesis de proteínas entre otros.

A) ADAPTACIONES METABÓLICAS:

Uno de los fenómenos mejor descritos de las células de levadura en respuesta a estrés hiperosmótico, el cual ya hemos mencionado, es la acumulación de solutos compatibles para protegerse de la deshidratación y mantener la turgencia celular.

S. cerevisiae acumula glicerol como soluto compatible (Hohmann, S. 2002). El glicerol es un polihidroxialcohol que puede ser utilizado por la célula como fuente de carbono y energía. Se obtiene como subproducto de la fermentación de los azúcares sintetizándose durante la glicólisis a partir de dihidroxiacetona fosfato. Esta actividad es consecuencia de la inducción de los genes de biosíntesis de glicerol *GPD1* (glicerofosfato deshidrogenasa 1) y *GPP2* (glicerofosfato fosfatasa 2) (Albertyn, J. et al. 1994), (Pahlman, I. L. et al. 2001). Las células de levadura también pueden acumular trealosa como osmolito en condiciones de estrés a través de la activación de *TPS2* (gen que codifica trealosa fosfato-sintetasa 2) aunque el papel de la trealosa como osmoprotector no está definitivamente demostrado (Blomberg, A. 2000).

En cualquier caso, la inducción de la expresión de estos genes es consecuencia de la activación de los factores de transcripción Hot1 y Msn2/4 dependientes de la ruta HOG (Rep, M. et al. 1999).

B) REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS PROTEICA:

Como consecuencia del aumento de osmolaridad externa se produce en el interior de la célula una caída transitoria en los niveles de síntesis de proteínas (Norbeck, J. and Blomberg, A. 1998) causada por una menor toma de aminoácidos, la represión de genes de síntesis de proteínas ribosomales y la disminución de la eficiencia de la traducción.

La proteína quinasa Rck2 es una diana de Hog1p y afecta a la traducción regulando el factor de elongación EF-2 (Bilsland-Marchesan, E. et al. 2000), (Teige, M. et al. 2001).

Se sabe que durante la adaptación al estrés se activa la expresión de un gran número de genes y se estimula la traducción de proteínas codificadas por estos, lo cual parece sugerir que existe una traducción preferente de determinados mRNAs

bajo determinadas condiciones, aunque las bases moleculares de este fenómeno no están todavía esclarecidas (Warringer, J. et al. 2010), (Molin, C. et al. 2009).

C) REGULACIÓN DE LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR:

La progresión del ciclo celular es dependiente de la presencia de nutrientes y del estrés. En condiciones de estrés osmótico, las células de levadura modulan transitoriamente la progresión del ciclo celular para permitir la adaptación.

El ciclo celular de la levadura *S. cerevisiae* se compone de cuatro fases consecutivas: fase S (o de síntesis de DNA), fase M (o mitosis), y fases G1 y G2.

Hog1p controla la progresión de G2 a M mediante dos mecanismos: por un lado la regulación de los niveles de Clb2p y la fosforilación de la quinasa Hsl1 arrojando las células en fase G2 (Clotet, J. et al. 2006) y por otro, la regulación de la expresión de las ciclinas y de la proteína diana de regulación de ciclo celular Sic1 (Escote, X. et al. 2004).

D) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA:

En los últimos años se ha observado mediante análisis genómicos que, aproximadamente el 5-7% del genoma de la levadura *S. cerevisiae* muestra cambios significativos en sus patrones de expresión cuando se la somete a un choque osmótico (Posas, F. et al. 2000a), (O'Rourke, S. M. and Herskowitz, I. 2004). La mayor parte de estos genes regulados en respuesta a estrés codifican proteínas implicadas en el metabolismo de carbohidratos, protección general frente a diferentes tipos de estrés, biosíntesis de proteínas, homeostasis iónica, transducción de señal y metabolismo de aminoácidos (Posas, F. et al. 2000a), (Causton, H. C. et al. 2001).

Hog1p activa la transcripción por interacción directa con varios factores de transcripción (Hot1, Sko1, Smp1). Además, estimula el reclutamiento de complejos remodeladores de la cromatina (SWI/SNF, SAGA, Rpd3). Hog1p actúa como mediador de la respuesta transcripcional de genes inducibles por estrés osmótico (de, Nadal E. and Posas, F. 2010), (Zapater, M. et al. 2007), (de, Nadal E. et al. 2004), (Proft, M. and Struhl, K. 2002). Finalmente se ha mostrado que la MAPK Hog1 es un factor de elongación transcripcional selectivo de genes de respuesta a estrés osmótico (Proft, M. et al. 2006).

1.3) El Estrés Oxidativo

1.3.1 EFECTOS DE LOS RADICALES LIBRES DE OXÍGENO EN LAS MOLÉCULAS BIOLÓGICAS.

El oxígeno es esencial y a la vez tóxico para los organismos que viven en aerobiosis. Los organismos aerobios deben mantener un medio redox adecuado para que se produzcan las reacciones de reducción-oxidación durante el metabolismo. Sin embargo, la reducción incompleta del O₂ durante la respiración permite la formación de moléculas reactivas del oxígeno como el O₂⁻ (anión superóxido), el H₂O₂ (peróxido de hidrógeno) y el OH· (radical hidroxilo). Estas especies reactivas de oxígeno (**Reactive Oxygen Species, ROS**) también se producen durante la β-oxidación de los ácidos grasos, por exposición a radiación, luz y drogas. El equilibrio entre la producción de moléculas oxidantes y la capacidad antioxidante de los sistemas celulares determinará el grado del estrés oxidativo.

Las reacciones a través de las cuales se sintetizan estas moléculas son:

- Reacción de **Haber-Weiss**: $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{Fe}^{3+} + 2\text{OH}^-$
- Reacción de **Fenton**: $\text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^- \longrightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$
- Reacción de dismutación (**SOD**): $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$
- Reacción de dismutación **catálasa**: $2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2^-$

La exposición a ROS provoca agregación y fragmentación de proteínas bien como consecuencia de la combinación errónea de péptidos, bien como consecuencia de los daños producidos durante la peroxidación lipídica y la oxidación del DNA (Davies, M. J. 1987). Además, afecta a la síntesis de aminoácidos (Berlett, B. S. and Stadtman, E. R. 1997, Dean, R. T. et al. 1997) y produce modificaciones perjudiciales a nivel del DNA como roturas en las hebras de doble hélice y modificaciones en las bases nitrogenadas (Cadet, J. et al. 1997).

1.3.2 EFECTOS BIOLÓGICOS DE ROS A NIVEL CELULAR.

La mayor fuente de producción de ROS en la célula es la reducción incompleta de O₂ durante la respiración en la mitocondria, pero también se producen ROS durante el metabolismo de los ácidos grasos en los peroxisomas, y en menor cantidad, en el citoplasma, como consecuencia del desajuste en algunas reacciones metabólicas.

Las células de levadura en fase estacionaria presentan mayor resistencia al estrés oxidativo que aquéllas que están en fase exponencial (Jamieson, D. J. 1992). La activación de la respiración es un importante factor en la tolerancia al estrés oxidativo. Las células que crecen en medios no fermentables (glicerol o etanol) y como consecuencia están obligadas a respirar, son más resistentes a agentes que causan estrés oxidativo como la menadiona y el H₂O₂ que aquéllas que crecen en medios ricos en glucosa (Jamieson, D. J. 1992). También es cierto que el nivel basal de producción de ROS es mayor en las células que crecen en medios no fermentables, pero cuando se las somete a estrés, presentan mayor capacidad de respuesta.

Con todo, si las cantidades de ROS que se generan en la célula superan su capacidad de detoxificación, se producen daños a nivel celular como el arresto del ciclo celular, pudiendo llegar a ser suficientemente graves como para activar mecanismos apoptóticos (Ligr, M. et al. 1998), (Alexander, K. P. et al. 2000), (Matsuyama, S. and Reed, J. C. 2000).

1.3.3 SISTEMAS DE DEFENSA FRENTE A ROS.

Las células han desarrollado diferentes estrategias para protegerse de los efectos negativos de ROS.

1.3.3.1: Sistemas de defensa antioxidante enzimáticos.

El sistema de detoxificación enzimático de *S. cerevisiae* se compone de un primer grupo de enzimas que actúa directamente sobre las moléculas ROS y un segundo grupo, que actúa como regulador redox de proteínas tiólicas, cuyos

En el caso de *S. cerevisiae* las células cuentan con dos tipos de SOD, una Cu/Zn-superóxido dismutasa, **Sod1p**, localizada en el citosol, esencial para la protección celular de la toxicidad del superóxido citoplasmático y probablemente peroxisomal que presenta un importante papel fisiológico en la regulación de los niveles de cobre (Culotta, V. C. et al. 1995) y una Mn-superóxido dismutasa, **Sod2p**, localizada en la matriz mitocondrial, cuya función es proteger a la mitocondria de los aniones superóxido generados durante la respiración (Bermingham-McDonogh, O. et al. 1988), (van Loon, A. P. et al. 1986).

Las **catalasas** son enzimas homotetraméricas que integran un grupo hemo en su estructura. Actúan reduciendo H_2O_2 según la siguiente reacción de dismutación:



El compuesto I suele ser alguna de las formas oxidadas del hierro, generalmente Fe(V).

En la levadura *S. cerevisiae* conocemos dos catalasas diferentes, la catalasa A y la catalasa T, codificadas por *CTA1* y *CTT1* respectivamente (Cohen, G. et al. 1988). La catalasa A se localiza en el peroxisoma y actúa eliminando el H_2O_2 que se produce como consecuencia de la β -oxidación de los ácidos grasos. El papel fisiológico de la catalasa T no está del todo claro, aunque la expresión de *CTT1* está regulada por varios tipos de estrés además del oxidativo (Marchler, G. et al. 1993).

El papel detoxificador de ROS de dismutasas y catalasas depende de las propiedades redox del grupo metálico asociado al enzima. Sin embargo, las **peroxidasas** reducen peróxidos orgánicos e inorgánicos en sus correspondientes alcoholes utilizando sitios activos de cisteína tiólica.

Existen dos tipos de peroxidasas: la glutatión peroxidasa (Gpxs) que emplea glutatión para la detoxificación y la tiorredoxina-peroxidasa, también denominada peroxirredoxina, que emplea Trx como reductor.

A su vez, existen dos tipos de Gpxs (Brigelius-Flohe, R. 2006): las Gpxs clásicas son multiméricas y actúan contra hidroperóxidos orgánicos o inorgánicos. Las fosfolípido-hidroperoxidadas (PhGpxs) generalmente monoméricas y asociadas a membrana, son capaces de reducir lípido-hidroperóxidos favoreciendo la

reparación de las membranas lipídicas (Halliwell, B. 2007). En la levadura *S. cerevisiae* se han descrito tres Gpxs: Gpx1p, Gpx 2p y Gpx 3p (Inoue, Y. et al. 1999). Gpx3p juega un papel esencial como sensor y transmisor de la respuesta a estrés oxidativo a través del factor de transcripción Yap1, el cual es el mayor regulador de los genes implicados de respuesta a estrés (Delaunay, A. et al. 2002). *GPX2* es el único de los tres genes de levadura transcripcionalmente regulado en respuesta a estrés oxidativo dependiente de Yap1p y Skn7p (Inoue, Y. et al. 1999), (Tsuzi, D. et al. 2004) que a su vez está regulado por Ca^{2+} .

Por último, las **tioredoxinas (Trxs)** actúan como donantes de electrones para las peroxirredoxinas o tioredoxín-peroxidases que actúan reduciendo hidroperóxidos. En levadura *S. cerevisiae*, esta función depende de la actividad de Tsa1p, Tsa2p y Ahp1p (citoplásmicas), Prx1p (mitocondrial) y Dot5p (nuclear) (Wong, C. M. et al. 2004).

1.3.3.2: Sistemas de defensa antioxidante no enzimáticos.

Los sistemas de defensa no enzimáticos son generalmente moléculas pequeñas solubles tanto en agua como en lípidos que actúan uniéndose y atrapando moléculas de ROS.

La levadura *S. cerevisiae* contiene diferentes sistemas antioxidantes no enzimáticos entre ellos el tripéptido γ -L-glutamil-L-cistinilglicina o **glutatión**, sintetizado mediante la acción enzimática de los genes γ -glutamilcisteína sintetasa (*GSH1*) y glutatión sintasa (*GSH2*) cuya expresión se induce en respuesta al estrés oxidativo (Ohtake, Y. and Yabuuchi, S. 1991). El residuo de cisteína que contiene es el responsable de las propiedades redox. Esto se debe a que actúa como aceptor puesto que tiene un grupo sulfhidrilo que reacciona con los oxidantes y se produce glutatión reducido (GSSG) (Folch-Mallol, J. L. et al. 2004).

Por otro lado las **poliaminas** son derivados de los aminoácidos que actúan atrapando especialmente al radical superóxido.

También el **ácido eritroascórbico** tiene propiedades antioxidantes similares al **ácido ascórbico** y actúa como agente reductor al reaccionar con los ROS. Aunque el

ácido eritroascórbico ha sido identificado en levadura, su papel específico en la detoxificación de ROS no ha sido esclarecido (Kim, J. D. et al. 1996).

Las **metalotioneínas** son pequeñas proteínas ricas en cisteína (Hamer, D. H. 1986) cuya actividad antioxidante consiste en ser capaces de almacenar iones metálicos, generalmente Fe y Cu, de manera que son inaccesibles para ser oxidados a través de la reacción de Fenton. La función de las metalotioneínas es pues, contrarrestar la toxicidad de los iones metálicos y las radiaciones ionizantes para evitar la formación de radicales libres.

La primera metalotioneína descrita fue la codificada por el gen *CUP1*, inducido por estrés oxidativo y por la presencia de metales pesados. *CUP1* está regulado transcripcionalmente por secuencias en su promotor reconocidas por el factor Ace1p, que es dependiente de cobre (Thiele, D. J. 1988), (Thiele, D. J. 1992). El factor Ace2p se encarga de mantener los niveles basales de *CUP1* (Butler, G. and Thiele, D. J. 1991).

La **Vitamina E** actúa como radical lipídico con capacidad para unirse a radicales libres. Su forma soluble actúa disminuyendo los niveles de peróxido de hidrógeno y superóxido y aumentando la actividad enzimática de los antioxidantes en levadura (Raspor, P. et al. 2005).

Por último, se ha descrito una función antioxidante de la **ubiquinona (Coenzima Q)**, que además de participar en la transferencia de electrones desde el complejo I al complejo III de la cadena respiratoria, es capaz de proteger contra la peroxidación lipídica de las membranas celulares de forma similar a como lo hace la vitamina E (Frei, B. et al. 1990). La síntesis de ubiquinona tiene lugar en la mitocondria y en ella participan las enzimas codificadas por los genes *COQ1-10*. Así, el mutante $\Delta coq3$ de *S. cerevisiae* que carece del gen que codifica la O-metiltransferasa de la ruta de síntesis de la ubiquinona, es hipersensible a la autooxidación producida por el tratamiento con ácidos grasos poliinsaturados (Do, T. Q. et al. 1996).

1.3.4 REGULACIÓN DE LA RESPUESTA A ESTRÉS OXIDATIVO EN LA LEVADURA *S. cerevisiae*.

S. cerevisiae dispone de mecanismos de respuesta inducibles para la adaptación a la exposición a H_2O_2 o a tratamientos que provoquen la producción de O_2^- en las células. La ruta que controla la respuesta adaptativa al estrés oxidativo está activada mediante sensores redox capaces de detectar cambios en la concentración de oxidantes intracelulares.

A nivel transcripcional, hay dos factores implicados, Yap1p y Skn7p, que cooperan entre ellos regulando la respuesta al estrés oxidativo (Lee, J. et al. 1999).

La proteína **Skn7** contiene dos dominios de interés, un dominio receptor y un dominio similar al Hsf1p de respuesta a estrés por calor, que funciona como el “sistema de dos componentes” de las células procariontas. Estos sistemas de transducción de señales constan de una primera proteína, generalmente un homodímero de histidina quinasa de membrana, que detecta la señal y la transmite a través de una reacción de fosforilación a través de un residuo conservado de histidina, a una segunda proteína. El aspártico fosforilable de Skn7p es el 427, siendo esta fosforilación necesaria para su participación en los procesos de biosíntesis de la pared celular, el ciclo celular y la respuesta al estrés osmótico (Krems, B. et al. 1996), (Morgan, B. A. et al. 1997). Sin embargo, se ha demostrado que esta fosforilación no es necesaria para realizar su función en la respuesta a estrés oxidativo.

La ruta de control de estrés mediada por **Yap1p** está activada por sensores del equilibrio redox (Schnell, N. et al. 1992), (Kuge, S. and Jones, N. 1994). Estos mecanismos de captación traducen las señales a través de sus residuos de cisteína y activan la regulación de hasta 32 proteínas implicadas en la respuesta al estrés oxidativo, de las cuales 15, requieren la presencia de Skn7p (Lee, J. et al. 1999). Además de Yap1p, otras proteínas reguladoras incluyendo distintos factores de transcripción y proteínas tirosín-fosfatasa están reguladas también a través de procesos redox (Barford, D. 2004).

Yap1 es un factor de transcripción bZip que pertenece a la familia AP-1 y que actúa como el más importante de los reguladores en respuesta a estrés por oxidación en la levadura *S. cerevisiae*, controlando la expresión de genes que

codifican para la mayoría de los antioxidantes y de los componentes de las rutas de protección antioxidante (Gasch, A. P. et al. 2000), (Lee, J. et al. 1999), (Carmel-Harel, O. et al. 2001). Se une específicamente a secuencias YRE (*Yap1 Recognition Element*) localizado en la mayoría de los promotores de genes de respuesta a estrés oxidativo, aunque deben existir sitios de reconocimiento adicionales puesto que se han identificado dianas de Yap1p que carecen del sitio YRE (Kuge, S. and Jones, N. 1994), (Wu, A. L. and Moye-Rowley, W. S. 1994), (Fernandes, L. et al. 1997).

En ausencia de estrés, Yap1p se localiza en el citoplasma al ser exportada desde el núcleo por el receptor de exportación nuclear Crm1p (Yan, C. et al. 1998), (Kuge, S. et al. 2001), mientras que en presencia de oxidantes, se acumula en el núcleo como consecuencia de los cambios conformacionales que sufre, formándose puentes disulfuro entre las cadenas N y C terminales que imposibilitan su unión con Crm1p y por tanto, la exportación del complejo al citoplasma (Delaunay, A. et al. 2000).

2.- LA MITOCONDRIA COMO ORGÁNULO RESPONSABLE DE LA ADAPTACIÓN AL ESTRÉS.

2.1) Estructura, morfología y dinamismo de la mitocondria.

La mitocondria fue visualizada mediante microscopía por primera vez por Altmann en 1884. En 1897 se acuñó el término mitocondria, del griego *mitos* (hilo) y *chondros* (gránulo).

Es un orgánulo semiautónomo que dispone de su propio programa de biogénesis y que se localiza en el citoplasma de las células eucariotas. Dispone de varias copias de DNA mitocondrial circular de doble hebra, que a pesar de contener relativamente pocos genes, comprometen la biogénesis y la actividad mitocondrial (Foury, F. et al. 1998).

Desde el punto de vista estructural, la mitocondria está formada por dos membranas, la externa y la interna, cuya estructura y disposición determina la existencia de compartimentos diferentes: el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial. A lo largo de la membrana interna existen fragmentos conectados con la membrana externa y otros que se pliegan formando invaginaciones que reciben el nombre de crestas y que se disponen formando estructuras lamelares, cuya función es aumentar la superficie de la membrana.

Tanto el tamaño, la forma y la localización de la mitocondria en la célula, como el número de mitocondrias por célula, son variables y dependen del estado metabólico y energético de la célula. Algunos autores sugieren que *S. cerevisiae* contiene una única mitocondria por célula, aunque ésta puede encontrarse partida o ramificada como consecuencia de su constante modificación morfológica (Hoffmann, H. P. and Avers, C. J. 1973), (Stevens, T. H. and Chan, S. I. 1981).

Las mitocondrias son estructuras dinámicas que se mueven, se agrupan y se separan, fusionan y dividen, fluyendo libremente por el citoplasma. Estos movimientos no son triviales ni desordenados, sino que seguramente obedecen a las necesidades energéticas puntuales de la célula (Boldogh, I. R. et al. 2001). La mitocondria varía de estructura y tamaño a través de los procesos de fusión y fisión, y de posición, a través de las fuerzas impulsoras del citoesqueleto y a la estructura y presencia de otros orgánulos en el citoplasma.

La **fisión** es el mecanismo por el cual las mitocondrias proliferan en número. La inserción de nuevos componentes en la matriz y en las membranas mitocondriales hace que crezcan en tamaño hasta que reciben una señal que hace que se dividan. Este fenómeno se produce antes de la división de la célula.

S. cerevisiae requiere al menos de tres proteínas mitocondriales diferentes para llevar a cabo la fisión mitocondrial. Estas proteínas son Fis1, Mdv1 y Caf4. Fis1 es una proteína integral de membrana con un dominio C-terminal anclado a la membrana y un dominio N-terminal citosólico que se compone de seis α -hélices formando una estructura que permite la interacción con las proteínas relacionadas Mdv1 y Caf4. Fis1p se distribuye uniformemente en la mitocondria y forma un complejo activo de fisión con las proteínas Mdv1 o Caf4, que para ser funcional, ha de estar necesariamente unido a la proteína citosólica Dnm1 (Schauss, A. C. et al. 2006).

La **fusión** implica la unión coordinada y secuencial de las membranas internas y externas de mitocondrias distintas. Esta unión requiere de la presencia de un complejo proteico formado por las proteínas Fzo1, Ugo1 y Mgm1 (Okamoto, K. and Shaw, J. M. 2005). La proteína Fzo1 es una proteína integrada en la membrana externa con un dominio GTPasa citoplasmático conservado y dos segmentos transmembrana expuestos al espacio intermembrana. La proteína Mgm1 es una GTPasa de la familia de las dinaminas integrada en la membrana interna con su dominio funcional localizado en el espacio intermembrana. Por último, la proteína Ugo1 atraviesa la membrana externa y presenta un dominio en el espacio intermembrana que interactúa con Mgm1p y otro un dominio que interactúa con Fzo1p en el citosol (Hoppins, S. et al. 2009).

2.2) Mitocondria y metabolismo.

La mitocondria está implicada en un gran número de procesos metabólicos de señalización, diferenciación y muerte celular. Con todo, su función mejor caracterizada es la síntesis de ATP y por ello recibe el nombre de “fábrica de energía de la célula” (Zhang, X. N. and Qi, M. 2008).

La energía para mantener el orden biológico que las células necesitan para mantenerse vivas, deriva de la hidrólisis de los enlaces químicos y la oxidación de los azúcares, procesos metabólicos que se producen a través de mecanismos diferentes en función de la presencia o ausencia de oxígeno. Ya sea aeróbica o anaeróticamente, la célula obtiene la energía a partir del producto de la glicólisis.

2.2.1 GLICÓLISIS.

La glicólisis ocurre en el citosol, y es el proceso inicial del catabolismo de los carbohidratos. Consiste en una secuencia de reacciones que convierten una molécula de glucosa en dos moléculas de piruvato y que conlleva la producción de dos moléculas de ATP y dos moléculas de NADH.

2.2.2 METABOLISMO ANAERÓBICO.

En ausencia de oxígeno, las células de levadura realizan la fermentación para obtener energía. Es un proceso catabólico de oxidación incompleta que se produce en condiciones anaeróbicas en el que el aceptor final de los electrones del NADH producido durante la glicólisis no es el oxígeno sino un compuesto orgánico que al aceptarlos se reduce, permitiendo la reoxidación de NADH a NAD⁺.

Desde el punto de vista energético, las fermentaciones son muy poco rentables puesto que a partir de una molécula de glucosa sólo se obtienen dos moléculas de ATP. La degradación de una molécula de glucosa en condiciones aeróbicas supone la obtención de 36 moléculas de ATP.

Existen dos tipos diferentes de fermentación en *S. cerevisiae* en función del producto final obtenido, la fermentación alcohólica y la fermentación láctica. Durante la fermentación alcohólica, a partir de un carbohidrato, generalmente glucosa (también fructosa, sacarosa, almidón, etc.), se obtiene etanol y ATP. La fermentación láctica ocurre como la alcohólica en el citosol. La molécula de glucosa

se oxida parcialmente para obtener energía y como subproducto se obtiene ácido láctico.

2.2.3 METABOLISMO AERÓBICO.

En presencia de oxígeno, el piruvato producido durante la glicólisis es oxidado a CO_2 a través del ciclo de Krebs. Como resultado se obtiene NADH , que sumado al que se produce durante la glicólisis, es reoxidado en la cadena de transporte de electrones, produciéndose ATP .

2.2.3.1: Ciclo de Krebs.

El ciclo de Krebs, ciclo de los ácidos tricarbónicos o ciclo del ácido cítrico (CAC), es una ruta metabólica anfóbica responsable de la conjunción de las rutas de degradación y desasimilación de los carbohidratos, los ácidos grasos y las proteínas en CO_2 y agua, para formar energía química en forma de ATP . Cada una de las dos moléculas de piruvato generadas durante la glicólisis, reacciona con el CoA mediante la acción del enzima piruvato deshidrogenasa, generándose acetil- CoA que constituye el principal sustrato del ciclo de Krebs. Este acetil- CoA se une al oxalacetato para generar citrato. Al término del ciclo, los dos átomos de C introducidos por el acetil- CoA son oxidados a dos moléculas de CO_2 , regenerando de nuevo el oxalacetato capaz de unirse al acetil- CoA (Figura 1.5).

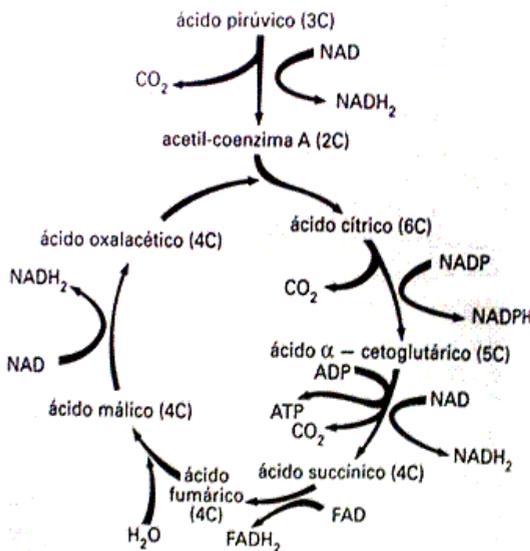


Figura 1.5: Esquema del ciclo de Krebs. El piruvato entra en la mitocondria y se oxida a Acetil-CoA. El acetil-CoA reacciona con una molécula de oxalacetato para formar citrato mediante una reacción de condensación. El citrato regenera el oxalacetato liberándose CO_2 y agua.

El balance energético de la descarboxilación oxidativa del piruvato a Acetil-CoA es: 1NADH_2 . El balance energético del ciclo de Krebs es: $3\text{NADH} + 1\text{GTP} + 1\text{FADH}_2$ (del ciclo de Krebs). Figura adaptada de themedicalbiochemistrvpage.org

El producto final desde el punto de vista energético, es de una molécula de GTP (utilizada inmediatamente para regenerar una molécula de ATP), tres moléculas de NADH y una de FADH₂. Los cofactores reducidos, NADH y FADH₂ pueden ser oxidados a NAD⁺ y FAD gracias a la acción de enzimas de la membrana interna mitocondrial durante la fosforilación oxidativa para obtener ATP.

Además de proveer a la célula de energía, el ciclo de Krebs también aporta intermediarios metabólicos para procesos biosintéticos como el α -cetoglutarato, que es un precursor del glutamato responsable del aporte de nitrógeno utilizado en reacciones biosintéticas. El oxalacetato, precursor de la síntesis de aminoácidos y el citrato que es utilizado para la síntesis de ácidos grasos y esteroides.

2.2.3.2: Fosforilación oxidativa.

La fosforilación oxidativa es el proceso por el que se forma ATP como resultado de la transferencia de electrones desde el NADH o el FADH₂ al O₂ a través de una serie de transportadores de electrones. El flujo de electrones desde el NADH o el FADH₂ al O₂ a través de complejos proteicos localizados en la membrana interna mitocondrial, provoca el bombeo de protones hacia el exterior de la matriz. Se genera una fuerza protomotriz como consecuencia del gradiente de pH y el potencial eléctrico transmembrana. Cuando los protones regresan a la matriz mitocondrial a través de complejos enzimáticos, se sintetiza el ATP. De esta forma, la oxidación y la fosforilación están acopladas por un gradiente de protones a través de la membrana interna mitocondrial.

La cadena de transporte consta de cuatro complejos enzimáticos que actúan como transportadores de electrones. Son proteínas integradas en la membrana interna mitocondrial con grupos prostéticos acoplados que son capaces de aceptar y ceder electrones. Los complejos I (NADH deshidrogenasa) y II (succinato deshidrogenasa) catalizan la transferencia de electrones a la ubiquinona. El complejo III (citocromo b-c1) transporta los electrones desde la ubiquinona al citocromo c. Y el complejo IV (citocromo oxidasa), completa la secuencia cediendo los electrones al O₂ para formar H₂O.

A lo largo de la cadena de transporte se producen reacciones acopladas entre sí que generan un gradiente electroquímico de protones. Este proceso tiene dos consecuencias asociadas, por un lado se genera un gradiente de concentración de H^+ que causa diferencias de pH entre la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana y por otro, se genera un potencial de membrana. Finalmente, este gradiente de H^+ es utilizado por la ATP sintasa para generar ATP a partir de ADP y fosfato.

Aunque la fosforilación oxidativa es un proceso eficiente, un pequeño porcentaje de electrones puede quedar desapareado uniéndose anticipadamente a moléculas de O_2 lo cual resulta en la generación de ROS.

2.3) Rutas de señalización que regulan la actividad mitocondrial en levadura.

2.3.1 LA RUTA RETRÓGRADA.

La respiración en la mitocondria resulta de la estrecha colaboración entre los productos génicos del genoma nuclear y del mitocondrial (Poyton, R. O. and McEwen, J. E. 1996), (Chen, X. J. and Butow, R. A. 2005). Es un proceso que implica la interacción entre la actividad mitocondrial y la expresión génica en el núcleo. El genoma nuclear puede afectar a la expresión de genes mitocondriales y el genoma mitocondrial afecta a la expresión de genes del núcleo que codifican proteínas mitocondriales (Parikh, V. S. et al. 1987). Este fenómeno por el que la actividad mitocondrial regula la expresión de determinados genes nucleares recibe el nombre de respuesta retrógrada (RTG) y engloba el conjunto de señales metabólicas que, emitidas desde la mitocondria, hacen que el núcleo cambie el patrón de expresión de los genes implicados en la biogénesis y las funciones mitocondriales.

En *S. cerevisiae* la ruta de respuesta retrógrada funciona como un mecanismo de respuesta a estrés ajustando rutas metabólicas y biosintéticas a las alteraciones sufridas (Liao, X. and Butow, R. A. 1993), (Liu, Z. and Butow, R. A. 1999). Se activa en respuesta a la disfunción mitocondrial como por ejemplo durante la respiración deficiente o ausente. Esto ocurre en el caso de las células “petit” y de las células ρ^0 . Estos tipos de células están caracterizadas por haber perdido parcial y totalmente

el DNA mitocondrial respectivamente, y por tanto muestran deficiencias respiratorias. Mediante el análisis genómico de células ρ^0 , se ha observado que en ausencia de DNA mitocondrial se inducen un gran número de genes nucleares implicados en respiración (*CYC1*, *CYC7* y *COX5b*), factores de ensamblaje (*PET111*, *PET100*, *COX14*, *COX15*, *ATP11* Y *ATP12*), síntesis de proteínas requeridas para la importación de componentes mitocondriales (*TOM6*, *TOM20* y *TIM17*), proteínas ribosomales de la mitocondria y proteínas de transporte. También se observó que las células ρ^0 sobreexpresan chaperonas mitocondriales e inducen la transcripción de genes que codifican enzimas del ciclo de Krebs (Traven, A. et al. 2001), (Epstein, C. B. et al. 2001). Este fenómeno asegura la síntesis de metabolitos intermediarios como el α -cetoglutarato para la síntesis de glutamato a través de la sobreexpresión de genes como *CIT1*, *ACO1*, *IDH1* e *IDH2*. La expresión de los genes *CIT2* y *ALD3* también está sujeta a la regulación retrógrada. La disfunción mitocondrial causa la reconfiguración de las rutas metabólicas para asegurar la síntesis de suficiente glutamato, metabolito necesario para la biosíntesis de aminoácidos, de modo que se garantice la continuidad de los procesos anabólicos esenciales (Magasanik, B. and Kaiser, C. A. 2002). Este fenómeno se ve avalado por el hecho de que la ruta RTG puede ser activada en células que crecen en medios pobres en N (Komeili, A. et al. 2000) y sin embargo no lo hace en células que crecen en medio ricos en N.

La RTG puede estar regulada positiva o negativamente. La regulación positiva depende de las proteínas Rtg1, Rtg2 y Rtg3. Las proteínas Rtg1 y Rtg3 son factores de transcripción con estructura de hélice-bucle-hélice-cremallera de leucina (bHLH/Zip) que se heterodimerizan para activar la transcripción. A diferencia de la mayoría de factores de transcripción de este grupo, no tienen afinidad por la secuencia consenso habitual caja E (CANNTG) (Massari, M. E. and Murre, C. 2000) sino por la secuencia GTCAC llamada caja R (Liao, X. and Butow, R. A. 1993), (Jia, Y. et al. 1997), (Liu, Z. and Butow, R. A. 2006).

La RTG se activa como consecuencia de alguna disfunción mitocondrial o por una disminución en la disponibilidad de nutrientes (Komeili, A. et al. 2000), (Sekito, T. et al. 2000), (Dilova, I. and Powers, T. 2006).

La proteína Rtg2 es un regulador de la ruta que tiene un motivo N-terminal de unión a ATP similar al que se encuentra en la súper familia de proteínas quinasas Hsp70 (Koonin, E. V. 1994). Aunque su función no está totalmente descrita, parece

ser que funciona como sensor de disfunciones mitocondriales promoviendo la acumulación en el núcleo del complejo Rtg1p/Rtg3p (Sekito, T. et al. 2000).

Un paso clave en la regulación RTG es la movilización al núcleo de las proteínas Rtg1/Rtg3 (Sekito, T. et al. 2000). Mientras la RTG permanece inactiva, Rtg1p y Rtg3p se localizan en el citoplasma formando un complejo. Tras la activación a través de Rtg2p, Rtg1p y Rtg3p se disocian para translocarse al núcleo. Una vez en su interior, se reasocian para unirse a secuencias de la caja R presentes en los promotores de sus genes diana (Figura I.6). En las células que no disponen de Rtg2p, el complejo proteico Rtg1/Rtg3 queda retenido en el citoplasma sugiriendo que la localización de éste depende de Rtg2p. La delección de *RTG2*, resulta en una localización nuclear constitutiva de Rtg3p (Sekito, T. et al. 2000).

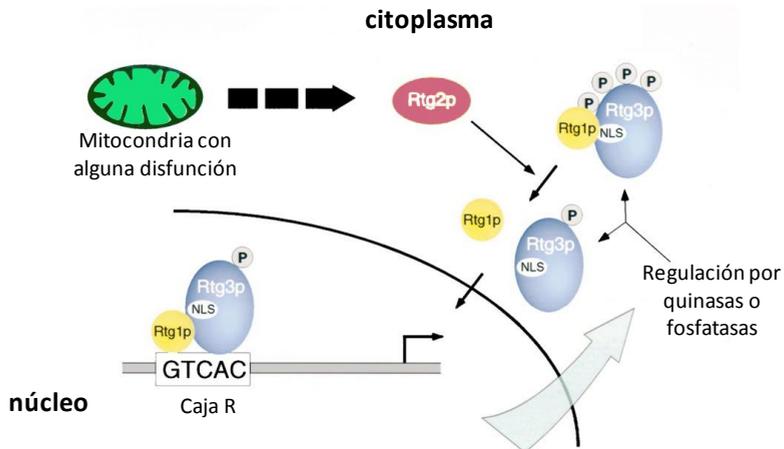


Figura I.6: Modelo de regulación de la ruta retrógrada. En células con mitocondrias dañadas se produce una señalización desde la mitocondria vía Rtg2p al complejo formado por Rtg1p/Rtg3p. Este complejo inicia un proceso de disociación además de una defosforilación de Rtg3p. Rtg1y3p se transportan al núcleo y una vez allí, se vuelven a ensamblar para activar la transcripción de sus genes diana a través de la caja R. La flecha azul muestra la regulación de Rtg3p citoplasmática desde el núcleo. No se sabe con certeza si la defosforilación de Rtg3p citoplasmática está causada por la inactivación de una quinasa o por la activación de una fosfatasa. Figura adaptada de Sekito *et al.*, 2000.

La regulación negativa de la RTG se produce a través de una fosfoproteína, Mks1, que se une a Rtg2p inhibiendo el transporte del complejo proteico Rtg1/3 al núcleo (Dilova, I. et al. 2002), (Sekito, T. et al. 2002).

2.3.2 LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN POR GLUCOSA.

La señalización de la glucosa en la levadura es otra importante ruta de regulación del metabolismo mitocondrial. A pesar de que la levadura *S. cerevisiae* puede utilizar diferentes fuentes de carbono para generar energía y biomasa (Barnett, J. A. 1976), si dispone de ellos, metaboliza preferentemente monosacáridos fermentables como la glucosa o la fructosa. Mientras consume glucosa, mantiene inactivos una serie de genes implicados en la utilización de otras fuentes de carbono (Gancedo, J. M. 1992), (Thevelein, J. M. 1994). Este mecanismo de control se conoce como ruta de represión por glucosa. Al mismo tiempo mantiene inducidos aquellos genes que codifican enzimas requeridos para el metabolismo de este azúcar (Cereghino, G. P. and Scheffler, I. E. 1996), (Muller, E. G. 1995), (Wills, C. 1990), mecanismo de control conocido como ruta de inducción por glucosa.

La glucosa regula la expresión de genes con funciones mitocondriales a través de la **ruta de represión por glucosa** modulando, a nivel transcripcional, la actividad de muchos componentes de la maquinaria de fosforilación oxidativa, tanto a nivel de la mitocondria como del núcleo (Hardie, D. G. 2007), (Hardie, D. G. et al. 1998). Snf1p y Snf4p son esenciales para la activación de sistemas metabólicos alternativos durante el cambio diáuxico. Actúan desreprimiendo genes que estaban reprimidos en presencia de glucosa y que son necesarios para la adaptación al nuevo sustrato (Schuller, H. J. 2003).

La proteína Snf1 es una serina-treonina quinasa (Celenza, J. L. and Carlson, M. 1989) altamente conservada en eucariotas con un dominio N-terminal catalítico (KD) y un dominio C-terminal regulador (RD). En condiciones de elevada disponibilidad de glucosa en el medio mantiene una estructura cerrada en donde el centro activo de la subunidad catalítica es inaccesible para sus dianas. Sin embargo, a medida que la glucosa se agota, se producen, a través de fosforilaciones consecutivas, cambios conformacionales que permiten que la

subunidad reguladora de Snf4p interaccione con la subunidad quinasa de Snf1p y ésta sea capaz de fosforilar a sus sustratos (McCartney, R. R. and Schmidt, M. C. 2001). Snf4p se localiza en el núcleo (Schuller, H. J. and Entian, K. D. 1988) y su presencia es necesaria para que Snf1p sea funcional.

Snf1p es responsable de la activación de muchos genes nucleares implicados en funciones mitocondriales como *COX6*, *CYC1*, *QCR8* y *CYT1* (Chodosh, L. A. et al. 1988, Sinha, S. et al. 1995). Actúa a través de un complejo activador heterotetramérico, Hap2p, Hap3p, Hap4p y Hap5p (DeRisi, J. L. et al. 1997), que se une al DNA a través de la secuencia 5'-CCAAT-3' de los promotores de estos genes. Este complejo, está implicado en el control de genes del CAC, en el transporte de electrones, en la biosíntesis de grupos hemo y también se ha sugerido que pueda afectar a otras funciones no relacionadas metabólicamente como la asimilación del amonio (Dang, V. D. et al. 1996).

Hap2p es una proteína de 265 aminoácidos de los cuales 60 forman un dominio conservado de unión a DNA (Olesen, J. T. and Guarente, L. 1990). Este dominio a su vez está constituido por dos subdominios, uno para la unión a DNA a través de cajas CCAAT y un dominio de interacción necesario para que Hap2p y Hap3p puedan unirse a través de Hap5p (McNabb, D. S. et al. 1995). Hap4p no es estrictamente necesaria para la unión, pero contiene un dominio de activación transcripcional (Forsburg, S. L. and Guarente, L. 1989). El contacto de Hap4p con las subunidades Swi1p, Snf2p y Snf5p del complejo SWI/SNF enfatiza la importancia del remodelamiento de la cromatina para la activación de los genes de respiración (Neely, K. E. et al. 2002).

2.4) Otras implicaciones mitocondriales.

2.4.1 LA MITOCONDRIA COMO ORGÁNULO GENERADOR DE ATP.

La mitocondria recibe el nombre de “fábrica de síntesis de energía de la célula” porque en ella se integran todos los mecanismos de síntesis de ATP que posteriormente la célula utilizará para mantenerse viva. Como hemos descrito en apartados anteriores, su principal función es la oxidación de metabolitos a través de ciclo de Krebs y la obtención de ATP mediante la fosforilación oxidativa, generando la energía necesaria para mantener vivas a las células.

2.4.2 LA MITOCONDRIA Y LA APOPTOSIS.

Las mitocondrias no sólo son importantes para mantener el estado energético de las células sino que además, integran todos los mecanismos de señalización de la muerte celular.

La apoptosis es un programa evolutivamente conservado a través del cual los organismos eliminan selectivamente aquellas células que puedan resultar peligrosas, son superfluas, o sencillamente están dañadas. El fenómeno de la apoptosis en las células de levadura ha sido controvertido en parte debido a las dudas que plantea el hecho de que la muerte celular pueda constituir una ventaja evolutiva para los organismos unicelulares. Sin embargo, desde la primera descripción de la apoptosis en *S. cerevisiae*, se han descubierto varios ortólogos en levadura de proteínas apoptóticas cruciales en mamíferos (Madeo, F. et al. 2002), (Fahrenkrog, B. et al. 2004), (Wissing, S. et al. 2004), (Qiu, J. et al. 2005), (Walther, T. C. et al. 2006a), y el hecho de que el proteoma esté conservado, la mitocondria tenga las mismas funciones y que las vías apoptóticas sean similares ha ayudado a resolver la controversia (Manon, S. et al. 1997), (Ligr, M. et al. 2001), (Ludovico, P. et al. 2002), (Fannjiang, Y. et al. 2004), (Ahn, S. H. et al. 2005), (Gourlay, C. W. and Ayscough, K. R. 2005), (Pozniakovsky, A. I. et al. 2005). Al demostrar que la sobreexpresión de Bcl-2 humano en levaduras aumenta la longevidad cronológica, (Longo, V. D. et al. 1997) conectaron el envejecimiento de la levadura a las vías apoptóticas de mamíferos.

La muerte celular programada en levadura en respuesta a la presencia de factores perjudiciales desencadena un “escenario apoptótico” que consiste en la condensación de la cromatina, la externalización de la fosfatidil serina (Madeo, F. et al. 1997), y la liberación del citocromo c (Manon, S. et al. 1997), (Ludovico, P. et al. 2002) como se observa en la figura 1.7. Estos fenómenos se dan como consecuencia de la activación de la caspasa Yca1 en *S. cerevisiae* (Madeo, F. et al. 2002), la inducción de la proteína serina apoptótica HtrA2/Omi (Fahrenkrog, B. et al. 2004), la inducción de *FIS1*, componente de la maquinaria de fisión que induce la fragmentación mitocondrial y de la proteína Ndi1 (AMID), que forma parte de la cadena respiratoria y desencadena la actividad NADH deshidrogenasa. Cuando

Ndi1p se sobreacumula, incrementa la producción de ROS induciendo la apoptosis. También existen factores antiapoptóticos como *CDC48*.

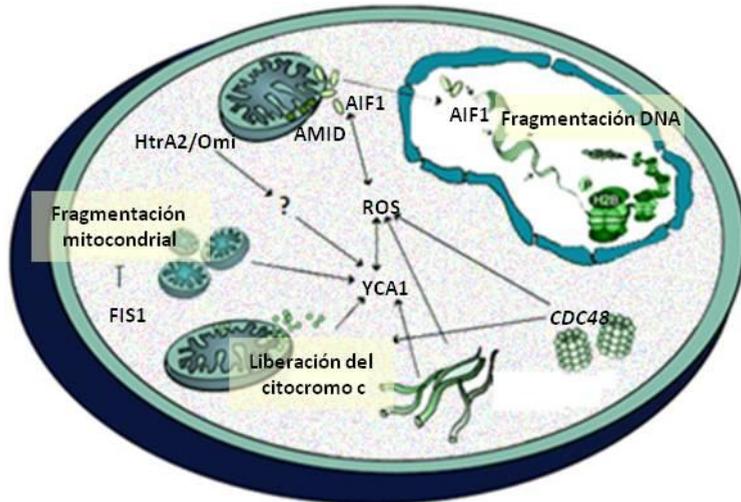


Figura I.7: La maquinaria molecular de la apoptosis en levadura: En la figura se muestran los mecanismos cruciales de ejecución de la muerte celular. Las proteínas que inducen la apoptosis son: la metacaspasa Yca1, el factor 1 (AIF1), HtrA2/Omi, (NMA111) y AMID (NDI1). También existen en las células de levadura mecanismos antiapoptóticos (CDC48). La muerte celular programada está vinculada a fenómenos como fragmentación mitocondrial, liberación de citocromo *c*, perturbaciones del citoesqueleto y fosforilación de la histona H2B. (Figura adaptada de Carmona-Gutiérrez and Madeo, 2006).

2.4.3 LA MITOCONDRIA Y EL ENVEJECIMIENTO CELULAR.

Se define como **vida media cronológica** de una colonia de levadura (*Chronological life-span*) el tiempo que una población permanece viable en fase post-diáxica y estacionaria en un medio mínimo (Fabrizio, P. and Longo, V. D. 2003). Una de las teorías establecidas respecto del envejecimiento, la teoría de los radicales libres, responsabiliza a la acumulación de ROS derivados de la mitocondria y a los daños oxidativos que éstos producen en proteínas, DNA y orgánulos, como la causa primera de la senescencia de las células. Se observa que las células de levadura que mueren por envejecimiento muestran los mismos marcadores que las células que sufren apoptosis. Esto es, acumulan radicales libres. Las superóxido dismutasas, tanto la citosólica Sod1p, como la mitocondrial Sod2p son esenciales para la supervivencia. El envejecimiento es un proceso adaptativo mediado por los superóxidos mitocondriales (Fabrizio, P. et al. 2004).

Cuando se consume la glucosa, las células han de pasar de un metabolismo fermentativo a uno respiratorio utilizando el etanol como fuente de C y su supervivencia depende de la eficiencia con que lo hagan. Las células ρ^0 muestran una menor supervivencia después de 48h de incubación en medio mínimo (Trancikova, A. et al. 2004). Después de tres o cuatro días, las células mueren. Otros mutantes mitocondriales como *Δatp1*, *Δkgd1*, *Δqcr7*, *Δrip1*, *Δsdh4* y *Δcor1* son incapaces de entrar en fase G_0 lo cual es crucial para sobrevivir en cultivos en estado estacionario (Allen, C. et al. 2006).

Se define como **vida media replicativa** al número de divisiones que una célula lleva a cabo antes de morir (Bitterman, K. J. et al. 2003). Las células que mueren después de un gran número de replications muestran acumulación de ROS y otras características en común con las células que sufrieron apoptosis. La capacidad replicativa de una célula madre decrece cronológicamente, lo cual sugiere que existe alguna conexión entre ambos mecanismos celulares (Ashrafi, K. et al. 1999).

El metabolismo mitocondrial y la respiración juegan un importante papel en la vida media replicativa aunque los efectos de la respiración suponen una controversia. Por un lado, una respiración deficiente causa una muerte celular anticipada, pero, por otro, se ha observado que la respuesta retrógrada puede activar mecanismos de activación de genes nucleares que benefician el

comportamiento de células ρ^0 de modo que su vida media es comparable a la de una célula silvestre. En conclusión, una respiración eficiente y un metabolismo energético adecuado son necesarios, pero es importante inhibir la formación de ROS para prolongar la vida media de la célula (Eisenberg, T. et al. 2007).

El “secreto de la juventud eterna” podría estar en mantener una elevada actividad metabólica de las mitocondrias con la mínima producción de ROS por parte de la cadena respiratoria (Eisenberg, T. et al. 2007).

Como el daño oxidativo aumenta como consecuencia de la proliferación de ROS causando la muerte celular, los mecanismos de resistencia a estos fenómenos ganan importancia durante el envejecimiento. Existen diferencias considerables entre los mecanismos antioxidantes desencadenados como respuesta al envejecimiento cronológico y el replicativo. Mientras que los mecanismos de resistencia al estrés oxidativo, como son la expresión de las proteínas Sod1 y Sod2, son críticos para la longevidad durante el envejecimiento cronológico, no se sobreactivan en el replicativo. En cuanto a este segundo, la restricción calórica supone un aumento en la longevidad de las células de levadura (Lin, S. S. et al. 2003).

2.4.4 LA MITOCONDRIA Y LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS.

El término “enfermedad mitocondrial” se acuña tanto para referirse a enfermedades causadas por defectos en el DNA mitocondrial (mtDNA) como por defectos en genes nucleares que codifican proteínas implicadas en la fosforilación oxidativa, en la respiración, en la biogénesis y en la replicación de la mitocondria.

Las disfunciones mitocondriales están ligadas a determinadas neuropatías tanto a nivel de mutaciones del mtDNA, como es el caso de la atrofia óptica de Leber (Carelli, V. et al. 2004), la ataxia neuropática y la retinitis pigmentosa, como a nivel de mutaciones de proteínas mitocondriales codificadas por genes nucleares, como ocurre en la ataxia de Friedreich (Durr, A. et al. 1996). Además, existen otras relacionadas con defectos en los mecanismos de fusión mitocondrial como la atrofia óptica dominante y la enfermedad de Charcot-Marie.

Por otro lado existen otras enfermedades causadas por defectos en proteínas localizadas en otros compartimentos celulares que sin embargo, están estrechamente asociadas a disfunciones mitocondriales. Algunos ejemplos importantes por su elevado índice de afección en nuestra sociedad son la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Huntington para las que se han descrito tanto causas genéticas como ambientales. En cualquier caso, se produce una excesiva acumulación de ROS que provoca una abundancia anormal de proteínas dañadas superando la capacidad de la célula para eliminarlas, sustituirlas o repararlas.

2.4.5 LA MITOCONDRIA Y LA HOMEOSTASIS DEL CALCIO.

El calcio es una llave reguladora de la función mitocondrial. La concentración de Ca^{2+} libre intramitocondrial es capaz de modificar la actividad metabólica de la mitocondria en ausencia de cambios en las concentraciones de ADP mediante la activación de tres deshidrogenasas del ciclo de Krebs, la piruvato deshidrogenasa, la isocitrato deshidrogenasa y la α -cetoglutarato deshidrogenasa (Hansford, R. G. 1985), (Jouaville, L. S. et al. 1999), a través de la activación de la cadena de transporte de electrones y de la translocasa de nucleótidos de adenina (Territo, P. R. et al. 2000).

La desregulación de la homeostasis del Ca^{2+} mitocondrial está implicada en múltiples patologías conocidas ya que tiene como consecuencia la acumulación de ROS y el incremento de la permeabilidad del poro de transición (PTP) con la consiguiente liberación del citocromo c provocando la muerte celular.

2.4.6 LA MITOCONDRIA Y LA ADAPTACIÓN AL ESTRÉS.

La mitocondria es un orgánulo altamente especializado que juega un importante papel en los aspectos fisiológicos de las células modificando sus procesos metabólicos y su morfología para permitir la adaptación al medio.

Como hemos mencionado anteriormente, está implicada en la adaptación a la disponibilidad de nutrientes a través de la quinasa Snf1p (Hedbacker, K. and Carlson, M. 2008).

A través de la señalización retrógrada influye sobre la actividad celular para reajustar el metabolismo en función de las necesidades de carbohidratos y nitrógeno (Butow, R. A. and Avadhani, N. G. 2004), (Giannattasio, M. et al. 2005).

También interviene en el metabolismo de la prolina. Las células de levadura sintetizan prolina a partir del glutamato en el citoplasma y los excesos de prolina los vuelven a convertir en glutamato en la mitocondria. Los mutantes mitocondriales que sobreactivan la síntesis de prolina son más resistentes a diferentes tipos de estrés como frío, desecación, oxidación y etanol. Sin embargo, un exceso de prolina a nivel citoplasmático tiene efectos negativos sobre el crecimiento celular (Takagi, H. 2008).

Una de las funciones más importantes y mejor descritas con respecto a la adaptación, es la actividad reguladora de especies reactivas de oxígeno para evitar los daños producidos por el estrés oxidativo (Morgan, B. A. et al. 1997), (Lee, J. et al. 1999), (Ikner, A. and Shiozaki, K. 2005), (Manoli, I. et al. 2007).

2.5) El proteoma mitocondrial.

El proteoma de cualquier sistema celular es más variable y dinámico que su genoma (Graves, P. R. and Haystead, T. A. 2002), (Anderson, N. G. and Anderson, N. L. 1996), pues su identificación ha de tener en cuenta las posibles modificaciones postraduccionales, la existencia de isoformas y las interacciones entre proteínas formando complejos (Premisler, T. et al. 2009). Además, en el caso de las mitocondrias de la levadura *S. cerevisiae* es especialmente complejo, porque tanto la morfología de la mitocondria como su número y localización en la célula es muy variable y depende de la fase del ciclo celular, de las características de la cepa, de las condiciones de crecimiento o de la disponibilidad de nutrientes, entre otros factores (Premisler, T. et al. 2009). Por ello, un análisis correcto del proteoma mitocondrial requiere de una rigurosa preparación de las muestras consistente en el lisado enzimático de las células, y el posterior subfraccionamiento y aislamiento de los orgánulos mediante centrifugación diferencial y/o gradientes consecutivos, además de combinar diferentes técnicas de separación y resolución para ser capaces de identificar el mayor número de proteínas posible.

El proteoma mitocondrial se compone aproximadamente de 900 proteínas que suponen el 15% del proteoma total de la levadura *S. cerevisiae*, estimado en unas 5000 proteínas solubles y alrededor de 1000 proteínas transmembrana (Kumar, A. et al. 2002).

Una de las fuentes de información disponibles más completas y robustas es la base de datos PROMITO publicada a partir de los ensayos de Reinders (Reinders, J. and Sickmann, A. 2007), en cuyo estudio se han combinado diferentes técnicas de separación e identificación para obtener un total de 851 proteínas mitocondriales diferentes (Premisler, T. et al. 2009). Esto supone más del 95% de las proteínas totales de la mitocondria. El 58% de las mismas son proteínas de función conocida mientras que del 29% aún se desconoce su función. Curiosamente, el 14% de las proteínas habían sido previamente identificadas por localizarse en otros compartimentos subcelulares. Esto puede ser debido a varios factores como la contaminación de fragmentos de otros orgánulos durante la purificación de la mitocondria, por el hecho de que estas proteínas se localicen en más de un orgánulo, porque la localización sea dependiente de las condiciones en las que

crece la célula o porque exista un contacto físico entre orgánulos que no permita la diferenciación en la localización de estas proteínas transmembrana (Premisler, T. et al. 2009).

Mediante las técnicas citadas se ha logrado identificar todas las subunidades conocidas de la piruvato deshidrogenasa, del Ci y de la maquinaria de la fosforilación oxidativa, incluidas las ocho proteínas codificadas por el genoma nuclear (Premisler, T. et al. 2009). Como se observa en la figura I.8, el 14% de las proteínas resultaron estar implicadas en el metabolismo energético. El 24% están implicadas en el mantenimiento y la expresión del genoma mitocondrial, incluyendo la maquinaria de síntesis proteica de la matriz. El 14% están implicadas en procesos de transporte de metabolitos y el metabolismo de aminoácidos, lípidos y hierro. El 8% en el transporte y el plegamiento de las proteínas. Éstas últimas son chaperonas, proteasas y proteínas relacionadas con el sistema de ubiquitinación. El 6% de las proteínas están implicadas en señalización y el 3% en el mantenimiento de la morfología mitocondrial a través de los fenómenos de fusión y fisión. Del resto de las proteínas identificadas todavía se desconoce su función.

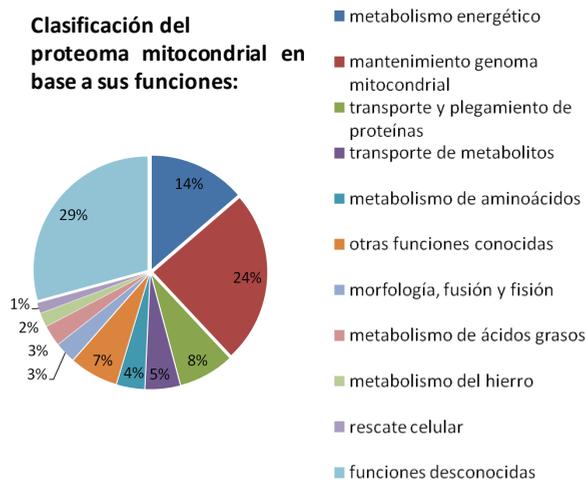


Figura I.8: Clasificación de proteínas mitocondriales identificadas según su función. Las funciones de las proteínas fueron asignadas según las bases de datos YPD (Hodges, P. E. et al. 1999), SGD (Issel-Tarver *et al.*, 2002 ; (Dwight, S. S. et al. 2002) y MITOP (Scharfe, C. et al. 1999). (Figura adaptada (Sickmann, A. et al. 2003).

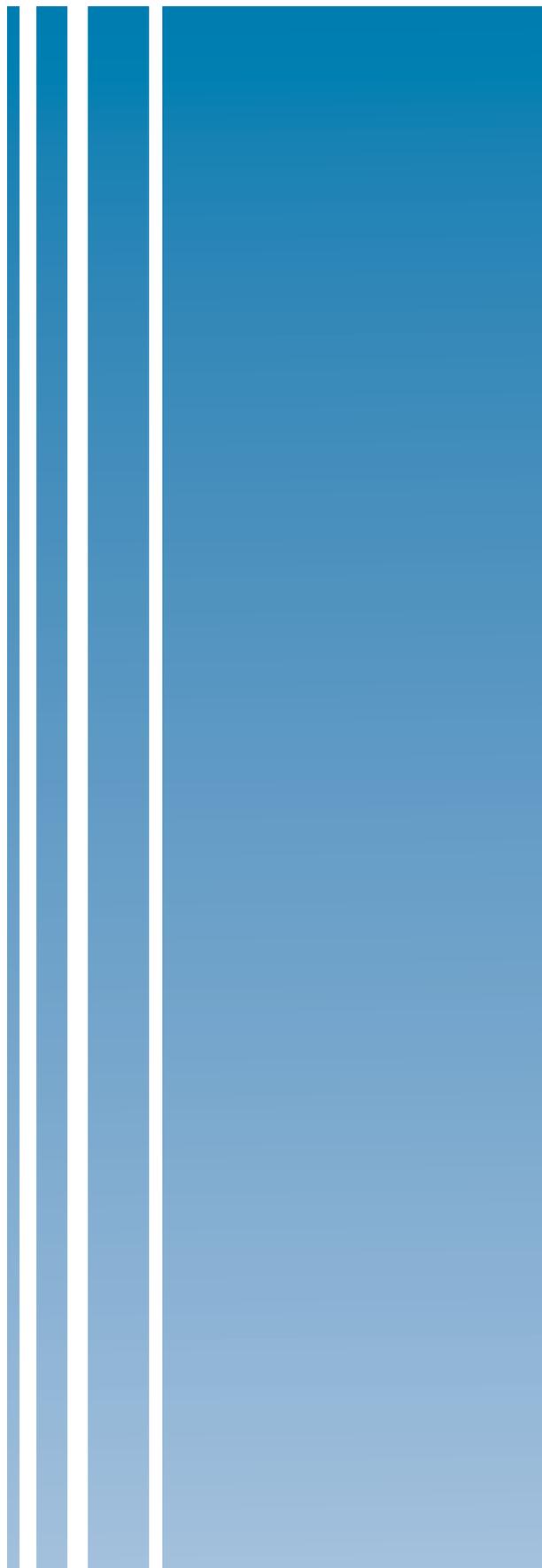
A lo largo de la introducción hemos tratado de dar una visión general de cómo responden las células de levadura a condiciones de elevada osmolaridad externa. Para sobrevivir, activan un complejo programa de defensa que afecta a muchos niveles, como la reestructuración del citoesqueleto de actina, el arresto transitorio del ciclo celular, la regulación masiva de la transcripción, la modulación de la traducción, la reprogramación del metabolismo, la producción de osmolitos y la modulación del transporte de iones en la membrana plasmática. Muchos de estos mecanismos involucrados en la resistencia al estrés, han sido identificados recientemente. En la presente tesis aportamos evidencias de una nueva y reveladora función de la mitocondria en la adaptación al estrés hiperosmótico. Por ello hemos dedicado parte de esta introducción a describir la morfología y las funciones de este orgánulo, que como muestran los resultados obtenidos, juega un importante papel en la adaptación de la célula. Mostramos cómo aquellas cepas que carecen de mitocondrias funcionales presentan hipersensibilidad a los medios salinos y sugerimos que el papel de la mitocondria en la respuesta al estrés hiperosmótico está estrechamente vinculado a la respuesta al estrés oxidativo. Por último, mediante análisis proteómicos, trataremos de demostrar que la mitocondria responde de una manera selectiva y dinámica al estrés hiperosmótico.

Objetivos

A lo largo de la presente tesis hemos querido investigar el papel de la mitocondria durante la adaptación al osmoestrés a través de los siguientes objetivos:

- Caracterización de la respuesta dinámica de la mitocondria durante la adaptación al estrés hiperosmótico en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.
- Identificación de una posible función de la mitocondria durante la adaptación al estrés hiperosmótico.
- Cuantificación de los cambios en el proteoma mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae* en respuesta al estrés hiperosmótico.

Materiales y Metodos



1.- MATERIALES

1.1 Cepas y condiciones de cultivo de BACTERIAS

La cepa DH5 α ($F'\Phi80\text{dlacZ}\Delta M15 \Delta(\text{lacZYA-argF})U169 \text{ deoRrecA1 endA1 hsdR17}(\text{rK}^m\text{K}^+)$) $\text{phoA supE44 } \lambda^{-1} \text{ thi}^{-1}$) de *Escherichia coli* fue utilizada como vehículo para la propagación y el aislamiento de plásmidos. Para su cultivo y manipulación se siguieron métodos estándar (Sambrook and Russell, 2001). El medio de cultivo utilizado fue:

Medio Luria Bertani (LB):

Extracto de levadura	0,5%
Triptona-Peptona	1%
Cloruro Sódico	1%

Se añadió un 2% de agar bacteriológico cuando se requerían medios sólidos de crecimiento, y se suplementaron con ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) para la selección de plásmidos.

En condiciones normales de crecimiento, las bacterias se incubaron toda la noche a 37°C en agitación (180-200 rpm).

1.2 Cepas y condiciones de cultivo de LEVADURAS

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en el presente trabajo se muestran en las siguientes tablas:

Tabla M.1: Cepa silvestre y mutantes de delección:

cepa	descripción	procedencia
BY4741	(<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i>)	Euroscarf
$\Delta \text{ abf2}$	BY4741 <i>abf2::KanMX4</i>	(Winzeler, E. A. et al. 1999)
$\Delta \text{ aco1}$	BY4741 <i>aco1::KanMX4</i>	(Winzeler, E. A. et al. 1999)
$\Delta \text{ ald4}$	BY4741 <i>ald4::KanMX4</i>	(Winzeler, E. A. et al. 1999)
$\Delta \text{ atp4}$	BY4741 <i>atp4::KanMX4</i>	(Winzeler, E. A. et al. 1999)
$\Delta \text{ atp5}$	BY4741 <i>atp5::KanMX4</i>	(Winzeler, E. A. et al. 1999)

cepa	descripción	procedencia
Δ <i>atp7</i>	BY4741 <i>atp7::KanMX4</i>	(Winzeler, E. A. et al. 1999)
Δ <i>atp9</i>	BY4741 <i>atp9::KanMX4</i>	(Winzeler, E. A. et al. 1999)
Δ <i>coq7</i>	BY4741 <i>coq7::KanMX4</i>	(Winzeler, E. A. et al. 1999)
Δ <i>cox6</i>	BY4741 <i>cox6::KanMX4</i>	(Winzeler, E. A. et al. 1999)
Δ <i>ecm40</i>	BY4741 <i>ecm40::KanMX4</i>	(Winzeler, E. A. et al. 1999)
Δ <i>fzo1</i>	BY4741 <i>fzo1::KanMX4</i>	(Winzeler, E. A. et al. 1999)
Δ <i>hap2</i>	BY4741 <i>hap2::KanMX4</i>	(Winzeler, E. A. et al. 1999)
Δ <i>hap3</i>	BY4741 <i>hap3::KanMX4</i>	(Winzeler, E. A. et al. 1999)
Δ <i>hog1</i>	BY4741 <i>hog1::KanMX4</i>	(Winzeler, E. A. et al. 1999)
Δ <i>hsp78</i>	BY4741 <i>hsp78::KanMX4</i>	(Winzeler, E. A. et al. 1999)
Δ <i>ilv6</i>	BY4741 <i>ilv6::KanMX4</i>	(Winzeler, E. A. et al. 1999)
Δ <i>leu4</i>	BY4741 <i>leu4::KanMX4</i>	(Winzeler, E. A. et al. 1999)
Δ <i>leu9</i>	BY4741 <i>leu9::KanMX4</i>	(Winzeler, E. A. et al. 1999)
Δ <i>lsp1</i>	BY4741 <i>lsp1::KanMX</i>	(Winzeler, E. A. et al. 1999)
Δ <i>prx1</i>	BY4741 <i>prx1::KanMX4</i>	(Winzeler, E. A. et al. 1999)
Δ <i>sdh1</i>	BY4741 <i>sdh1::KanMX4</i>	(Winzeler, E. A. et al. 1999)
Δ <i>snf1</i>	BY4741 <i>snf1::KanMX4</i>	(Winzeler, E. A. et al. 1999)
Δ <i>sod2</i>	BY4741 <i>sod2::KanMX4</i>	(Winzeler, E. A. et al. 1999)
Δ <i>rip1</i>	BY4741 <i>rip1::KanMX4</i>	(Winzeler, E. A. et al. 1999)
Δ <i>rpo41</i>	BY4741 <i>rpo41::KanMX4</i>	(Winzeler, E. A. et al. 1999)
Δ <i>rtg1</i>	BY4741 <i>rtg1::KanMX4</i>	(Winzeler, E. A. et al. 1999)
Δ <i>rtg3</i>	BY4741 <i>rtg3::KanMX4</i>	(Winzeler, E. A. et al. 1999)

Tabla M.2: Cepa silvestre y cepas etiquetadas con el epítipo -GFP:

cepa	descripción	procedencia
BY4741	(<i>MATa; his3Δ; leu2Δ; met15Δ; ura3Δ</i>)	Euroscarf
<i>SDH2-GFP</i>	BY4741 <i>SDH2-GFP(S65T)-HIS3MX</i>	(Huh, W. K. et al. 2003)
<i>COX6-GFP</i>	BY4741 <i>COX6-GFP(S65T)-HIS3MX</i>	(Huh, W. K. et al. 2003)
<i>CIT1-GFP</i>	BY4741 <i>CIT1-GFP(S65T)-HIS3MX</i>	(Huh, W. K. et al. 2003)
<i>ATP5-GFP</i>	BY4741 <i>ATP5-GFP(S65T)-HIS3MX</i>	(Huh, W. K. et al. 2003)
<i>IDP1-GFP</i>	BY4741 <i>IDP1-GFP(S65T)-HIS3MX</i>	(Huh, W. K. et al. 2003)

Tabla M.3: Cepa silvestre y cepas etiquetadas con el epítipo -TAP:

cepa	descripción	procedencia
BY4741	(<i>MATa; his3Δ; leu2Δ; met15Δ; ura3Δ</i>)	Euroscarf
<i>COQ6-TAP</i>	BY4741 <i>COQ6-TAP-HIS3MX</i>	(Ghaemmaghami, S. et al. 2003)
<i>FBA1-TAP</i>	BY4741 <i>FBA1-TAP-HIS3MX</i>	(Ghaemmaghami, S. et al. 2003)
<i>HFD1-TAP</i>	BY4741 <i>HFD1-TAP-HIS3MX</i>	(Ghaemmaghami, S. et al. 2003)
<i>ILV2-TAP</i>	BY4741 <i>ILV2-TAP-HIS3MX</i>	(Ghaemmaghami, S. et al. 2003)
<i>ILV6-TAP</i>	BY4741 <i>ILV6-TAP-HIS3MX</i>	(Ghaemmaghami, S. et al. 2003)
<i>LEU4-TAP</i>	BY4741 <i>LEU4-TAP-HIS3MX</i>	(Ghaemmaghami, S. et al. 2003)
<i>LEU9-TAP</i>	BY4741 <i>LEU9-TAP-HIS3MX</i>	(Ghaemmaghami, S. et al. 2003)
<i>LSP1-TAP</i>	BY4741 <i>LSP1-TAP-HIS3MX</i>	(Ghaemmaghami, S. et al. 2003)
<i>MCR1-TAP</i>	BY4741 <i>MCR1-TAP-HIS3MX</i>	(Ghaemmaghami, S. et al. 2003)
<i>OM14-TAP</i>	BY4741 <i>OM14-TAP-HIS3MX</i>	(Ghaemmaghami, S. et al. 2003)
<i>PGK1-TAP</i>	BY4741 <i>PGK1-TAP-HIS3MX</i>	(Ghaemmaghami, S. et al. 2003)
<i>PIL1-TAP</i>	BY4741 <i>PIL1-TAP-HIS3MX</i>	(Ghaemmaghami, S. et al. 2003)
<i>PRX1-TAP</i>	BY4741 <i>PRX1-TAP-HIS3MX</i>	(Ghaemmaghami, S. et al. 2003)
<i>RDL1-TAP</i>	BY4741 <i>RDL1-TAP-HIS3MX</i>	(Ghaemmaghami, S. et al. 2003)
<i>SOD2-TAP</i>	BY4741 <i>SOD2-TAP-HIS3MX</i>	(Ghaemmaghami, S. et al. 2003)
<i>TDH1-TAP</i>	BY4741 <i>TDH1-TAP-HIS3MX</i>	(Ghaemmaghami, S. et al. 2003)
<i>TDH2-TAP</i>	BY4741 <i>TDH2-TAP-HIS3MX</i>	(Ghaemmaghami, S. et al. 2003)

cepa	descripción	procedencia
<i>TDH3-TAP</i>	BY4741 <i>TDH3-TAP-HIS3MX</i>	(Ghaemmaghami, S. et al. 2003)
<i>TOM22-TAP</i>	BY4741 <i>TOM22-TAP-HIS3MX</i>	(Ghaemmaghami, S. et al. 2003)
<i>TOM70-TAP</i>	BY4741 <i>TOM70-TAP-HIS3MX</i>	(Ghaemmaghami, S. et al. 2003)

Las células de levadura se cultivaron y manipularon según métodos estándar (Prinz, 2003) a 28°C en agitación (180-200 rpm):

En medio rico **YPD** (2% glucosa, 2% peptona bacteriológica, 1% extracto de levadura).

En los casos en los que la fuente de C fuera otra distinta a la glucosa, ésta fue reemplazada por 2% de galactosa o 3% de etanol o glicerol.

En los casos en los que se quería estudiar el comportamiento diferencial en tratamientos salinos se añadió NaCl 0,8 M y 1 M y KCl 1M y 1,5 M.

En los casos en los que se quería estudiar el comportamiento de cepas con posibles defectos en el transporte de iones metálicos se suplementaron las placas con 150 µM de Fe (mediante la adición de FeSO₄ · 7H₂O) o 20 µM de Cu (añadiendo CuSO₄ · 5H₂O).

Para seleccionar cepas transformantes con marcador de resistencia a kanamicina se suplementó el medio YPD con 200 µg/ml de geneticina G418.

O en medio mínimo **SD** (2% glucosa, 0,7% *Yeast Nitrogen Base*, 50 mM ácido succínico cuyo pH fue ajustado a 5,5 con Tris Base).

Para el crecimiento de las cepas auxótrofas, los medios de cultivo fueron suplementados con aminoácidos y bases nitrogenadas (30 µg/ml adenina, 100 µg/ml triptófano, 30 µg/ml histidina, 100 µg/ml leucina, 30 µg/ml metionina, 30 µg/ml uracilo).

Se añadió un 2% de agar bacteriológico cuando se requerían medios sólidos de crecimiento.

1.3 Anticuerpos empleados para la Inmunodetección de Proteínas.

Los anticuerpos utilizados y el organismo del cual proceden fueron:

Tabla M.4: Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la Inmunodetección de proteínas fusionadas a epítomos.

Anticuerpo Primario	Dilución	Inmunoglobulina	Anticuerpo Secundario	Dilución
α-GFP	1:5000	IgG	α -HRP-mouse	1:10000
α-HA	1:10000	IgG2b	α -HRP-mouse	1:10000
α-TAP	1:10000	IgG	α -HRP-mouse	1:10000
α-PAP	1:10000	IgG	α -HRP-mouse	1:10000

* α -PAP reconoce el epítomo -TAP.

2.- MÉTODOS

2.1 ENSAYOS DE CRECIMIENTO Y SENSIBILIDAD.

2.1.1 Ensayo de crecimiento en medio sólido (GOTEOS).

Se obtuvieron diluciones seriadas de cultivos líquidos de las distintas cepas de levadura y fueron transferidas (3 µl de cada dilución) con la ayuda de un replicador (Sigma) a placas de medio sólido con las diferentes condiciones a estudiar. Las placas fueron incubadas de 1 a 3 días a 28°C o en el caso de los tratamientos con altas concentraciones de sales u otras condiciones restrictivas, hasta que las colonias de levadura fueron visibles. En el análisis del crecimiento se tuvo en cuenta tanto la mayor dilución a la cual aún se observaba crecimiento como el tamaño de la colonia.

2.1.2 Ensayo de crecimiento en medio líquido (BIOSCREEN).

La capacidad de crecimiento de cultivos de levadura en medio líquido se cuantificó a lo largo del tiempo registrando el crecimiento de los cultivos en placas multipocillo mediante un analizador Bioscreen C (Thermo LabSystems). Se calculó la densidad óptica con un filtro de banda ancha (420-580 nm) para reducir la contribución del medio a la lectura de la absorbancia. La temperatura de crecimiento fue de 28,5°C y los cultivos fueron sometidos a agitación durante los 40 segundos previos a la lectura. Esta lectura se llevó a cabo en intervalos de 15 minutos durante las 48 ó 72 horas que duraba cada experimento en función de las dificultades que presentaban las cepas para crecer.

En todos los casos se utilizaron cultivos en fase exponencial de crecimiento (OD_{660} entre 0,5 y 1) diluidos 200 veces desde el cultivo inicial al cultivo en cada pocillo de la placa de crecimiento y análisis, y cada cultivo se analizó por triplicado para reducir en lo posible los errores de carga.

Los datos fueron corregidos para hacer comparables las lecturas del analizador con absorbancias reales a 660 nm de cultivos crecidos en condiciones óptimas corrigiendo la pérdida de linealidad de las absorbancias a partir de ciertos valores (Warringer, J. and Blomberg, A. 2003).

2.2- TÉCNICAS DE TRANSFERENCIA GÉNICA.

2.2.1 Preparación de células competentes de bacteria.

Las células bacterianas utilizadas corresponden a la cepa *Escherichia coli* DH5 α . Para la preparación de células competentes se utilizó el método de cationes divalentes (Hanahan, D. J. 1986) que otorga una eficiencia de 10^3 - 10^4 transformantes por nanogramo de plásmido. Para ello enfriamos durante unos minutos un cultivo de 300 ml de células bacterianas en fase exponencial en hielo, éste fue centrifugado durante 10 minutos a 5000 rpm en una centrífuga refrigerada y resuspendido en 60 ml de medio RF1 frío. Se dejó reposar en hielo durante 30 minutos y se sometió a una segunda centrifugación en las mismas condiciones 10 minutos más. De nuevo las células fueron resuspendidas con ayuda del vórtex, en 10 ml de medio RF2 frío. Por último, quedaron en reposo en hielo durante 15 minutos y se distribuyeron en alícuotas de 50 μ l en tubos *ependorf* estériles. Inmediatamente los tubos fueron congelados con nitrógeno líquido y los conservamos a -80°C hasta el momento de su uso.

Medio RF1:

RbCl	0,1 M
MnCl ₂ · H ₂ O	50 mM
CaCl ₂ · H ₂ O	10 mM
Glicerol	15 %
Acetato Potásico	30 mM (pH 7,5)
Ajustar pH a 5,8 con CH ₃ COOH 0,2 M.	

Medio RF2:

RbCl	10 mM
CaCl ₂	75 mM
Glicerol	15 %
MOPS	10 mM (pH 6,8)
Ajustar pH a 6,8 con NaOH 1M.	

2.2.2 Transformación en levadura.

Para las transformaciones de levadura se utilizó un protocolo estándar de transformación con acetato de litio (Gietz, R. D. et al. 1995). Se obtuvo un cultivo de 100 ml de levadura crecido durante toda la noche a 28°C en agitación en medio YPD hasta una OD₆₆₀ óptima de entre 0,8-1. Se centrifugó a 3000 rpm durante 3 minutos y se lavó con agua estéril. El precipitado obtenido se resuspendió con 1 ml de acetato de litio 100 mM y se incubó durante 15 minutos a 30°C. Después se mezclaron 50 µl de estas células con entre 0,1 y 10 µg del DNA de interés (producto de PCR purificado y resuspendido en agua) y 5 µl de una solución de DNA sonicada de esperma de salmón (0,1%) en 500 µl de solución PLATE. La mezcla se incubó 30 minutos a 30°C y posteriormente se incubó a 42°C durante 15 minutos. Se recogieron las células por centrifugación (1 minuto, 13000 rpm). Finalmente las células se resuspendieron en agua estéril y se sembraron sobre placas de medio selectivo incubando éstas a 30°C hasta que se observaron colonias.

Medio PLATE:

PEG-4000	40%
Acetato de Litio	100 mM
Tris pH 7,5	10 mM
EDTA	0,4 mM

2.3.- OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS.

2.3.1 Obtención de extractos proteicos de células completas.

Método de obtención de extractos proteicos de células enteras mediante hervido en Laemmli:

Para la obtención de extractos proteicos, las células fueron cultivadas hasta fase logarítmica y se recogieron 50 ml de cultivo por centrifugación (3000 rpm, 5 minutos). A continuación el sobrenadante fue desechado y se lavaron las células con agua estéril fría. Se centrifugaron y recogieron los precipitados que fueron resuspendidos en 500 µl de tampón de carga Laemmli 5X. Las muestras se hirvieron durante 10 minutos y se congelaron a -80°C hasta el momento de su utilización.

Tampón Laemmli 5X:

SDS	3,8%
Dithioeritritol	0,05 M
Tris-HCl	0,15 mM
EDTA	5 mM
Sacarosa	15%
Azul de bromofenol	0,125 mg/ml
Ajustar pH a 6,8.	

Método de obtención de extractos proteicos a partir de células enteras mediante agitación *Bead-Beater*:

Para la obtención de extractos proteicos, las células fueron cultivadas hasta fase logarítmica y se recogieron 50 ml de cultivo por centrifugación (3000 rpm, 5 minutos). Se desechó el sobrenadante y se lavaron las células con agua fría estéril; posteriormente fueron resuspendidas en 500 µl de tampón de extracción al que se le añadieron inhibidores de proteasas para evitar la degradación. La muestra se recogió en tubos *ependorf* y en ellos se añadió un volumen equivalente de bolas

de vidrio. Se agitaron los tubos mediante Mini *Bead-Beater* (Biospec Products) a velocidad máxima durante 1 minuto repitiendo el proceso cinco veces y manteniendo los tubos en hielo entre sucesivas agitaciones al menos 1 minuto para romper las células. Después se centrifugó la mezcla de muestra y bolas durante 5 minutos a 10000 rpm para precipitar y descartar las bolas de vidrio y se transfirió el sobrenadante lisado a tubos *ependorf* mantenidos en hielo para evitar la degradación. El tampón Laemmli 5X fue añadido en relación 4 volúmenes de muestra:1 volumen de tampón de carga. Las muestras se calentaron a 95°C durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas y posteriormente se cargaron en los geles de acrilamida.

Tampón extracción:

Tris-HCl pH 7,5	50 mM
EDTA	15 mM
NaCl	150 mM
Tritón X100	0,1%
DTE	2mM

2.3.2 Obtención de extractos proteicos mitocondriales.

El método consistió en someter a las células (50 ml de cultivo) al protocolo de purificación de extractos proteicos de mitocondrias purificadas que se describe a continuación, sin llegar a separar las mitocondrias purificadas mediante gradiente de sacarosa.

2.3.3 Obtención de extractos proteicos de mitocondrias purificadas.

Purificación de mitocondrias de levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Utilizamos el protocolo descrito por Gregg C. (Gregg, C. et al. 2009) por tratarse de un método rápido y efectivo de purificación y aislamiento de mitocondrias libres de contaminaciones de otros orgánulos.

Para la obtención de una cantidad de proteína suficiente para los posteriores análisis nos vimos obligados a partir de grandes volúmenes de cultivo, de al menos 2 l de células $OD_{660} = 0,8-1$, creciendo bien en YPD o bien en YPD + 1M NaCl. Esta cantidad inicial de células resultaba aproximadamente en 5-10 gr de células (peso fresco).

Las células fueron recogidas por centrifugación a 5000 rpm (2500 g) durante 5 minutos en centrífuga Beckman, rotor JA-14 y lavadas dos veces con 200 ml de agua MilliQ fría. Una vez descartado el sobrenadante, y determinado el peso fresco del precipitado, éste fue resuspendido en 30 ml de Tampón TD e incubado 5 minutos a 30°C en agitación. Las células fueron recuperadas por centrifugación de 5 minutos en las mismas condiciones que en el paso anterior y posteriormente resuspendidas de nuevo en 40 ml de Tampón SP. Una vez equilibradas, las células fueron incubadas con 5 mg/ml (750 ud zymoliasa/g) en 10 ml de tampón SP durante 40 minutos a 30°C en agitación para romper las paredes celulares y convertirlas en esferoplastos.

La homogenización fue llevada a cabo mediante 15 golpes con un homogenizador *potter* de vidrio-Teflón en 6,5 ml/g de Tampón de Homogenización (SH). Una vez homogenizado, se añadió un volumen idéntico de tampón SH a la muestra y se sometió a centrifugación durante 5 minutos a 3500 rpm (1500 g) en rotor J-14 de centrífuga Beckman. Las mitocondrias quedaban retenidas en el sobrenadante que fue centrifugado de nuevo a 5000 rpm (3000 g) durante 5 minutos en centrífuga refrigerada Beckman con rotor JA20 y posteriormente se sometieron a una nueva centrifugación a 18000 rpm (12000 g) durante 15 minutos y resuspendidas al final con 1ml de Tampón SEM. La fracción mitocondrial fue sometida a 10 golpes más en el homogenizador de vidrio-Teflón y cargado posteriormente en un gradiente de sacarosa en tampón EM (60%/32%/23%/15%).

Después de la centrifugación (45000 rpm ó 134000 g, 1h, 2°C) la mitocondria quedaba retenida entre las fases 32% y 60%. La recuperamos (aproximadamente 1 ml), diluimos en 2 volúmenes de SEM y centrifugamos 10 minutos a 10000 g. El precipitado fue resuspendido en 100 µl de Tampón SEM y se determinó la cantidad de proteína mediante análisis Bradford. Por último se precipitó con acetona.

Tampón TD:

Tris-HCl pH 9,4	100 mM
DTE	10 mM

Tampón SP o zymoliasa:

Sorbitol	1,2 M
Fosfato Potásico pH7,4	20 mM

Tampón SEM:

Sacarosa	250 mM
EDTA	1 mM
MOPS pH7,2	10 mM

Tampón de Homogenización SH:

Sorbitol	0,6 M
HEPES-KOH pH 7,4	40 mM

Tampón EM:

Sacarosa	250 mM
EDTA	1 mM
MOPS pH7,2	10 mM

Gradiente de sacarosa:

1,5 ml 60% (w/ sacarosa en tampón EM)
4 ml 32%
1,5 ml 23%
1,5 ml 15%

Precipitación con acetona

Se añadieron 4 volúmenes de acetona pura fría dejando incubar la mezcla durante 15 minutos en hielo. Posteriormente se centrifugó 10 minutos a 12000 g a 4°C en centrífuga de mesa para descartar sobrenadante. El precipitado fue lavado con acetona 80%, se repitió la centrifugación y dejamos secar la muestra precipitada a temperatura ambiente.

2.3.4 Cuantificación de proteína mediante método *Bradford*.

Es un método rápido y de sensibilidad media para cuantificar la cantidad de proteína presente en la muestra por colorimetría a $\lambda=595$ nm.

La determinación de la concentración de proteína total en cada muestra se hizo por comparación de intensidad colorimétrica con una muestra conocida de BSA (seroalbúmina bovina) con la que se realizó una recta de calibrado. El reactivo utilizado capaz de cambiar de color en función de la concentración de proteína fue 5X Bio-Rad Assay Kit (BioRad) diluido 5 veces en agua. Se utilizaron 200 μ l de BioRad diluido y en cada pocillo de la placa multipocillo se cargaron cantidades crecientes y conocidas de proteína (BSA) para hacer la recta de calibrado; después se cargaron diluciones de la muestra extraída y se llevaron a cabo los cálculos de regresión para determinar la concentración de nuestra muestra.

2.4 ELECTROFORESIS Y TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE PROTEÍNAS.

2.4.1 Electroforesis de proteínas.

La separación de proteínas mediante electroforesis se llevó a cabo en condiciones desnaturizantes en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) utilizando el sistema MiniProtean 3 (BioRad). Estos geles constan de una zona superior de empaquetamiento (acrilamida:bisacrilamida 30:0,8 al 3%, SDS 0,1%, 125 mM Tris-HCl, 1% APDS, 0,1% TEMED a pH 6,8) y una zona inferior de separación (acrilamida:bisacrilamida 30:0,8 al 8%, SDS 0,1%, Tris-HCl 375 mM, 1% APDS y 0,1% TEMED a pH 8,8). Mientras la muestra proteica recorría la primera fase de los geles (empaquetamiento) fue sometida a una corriente eléctrica de 80 V mientras que una vez alcanzó la zona de separación podíamos aumentar la tensión eléctrica hasta 110 V.

Tampón de electroforesis SDS-PAGE 1X:

Glicina	0,19 M
SDS	0,1%
Ajustando pH a 8,3 mediante Tris Base.	

2.4.2 Transferencia a membrana.

Una vez separadas por electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membrana PVDF previamente activada con metanol por su naturaleza hidrofóbica utilizando el set Mini-trans Blot (BioRad) y tampón de transferencia (tampón de electroforesis SDS-PAGE 1X, metanol 20%). La transferencia se realizó a intensidad constante de 170-190 mA durante aproximadamente 1 hora en refrigeración.

2.4.3 Tinción de membranas con *DirectBlue 71* (DB71).

Esta técnica se utilizó para comprobar la eficiencia de la transferencia a la membrana y para visualizar tanto la localización de las bandas como que la carga entre diferentes carriles estuviera equilibrada (Hong, H. Y. et al. 2000). Se sumergieron las membranas en 10 ml de la solución I (colorante) durante un par de minutos en constante agitación. A continuación se retiró el exceso de colorante lavando con la solución II (lavado). Una vez comprobada la correcta transferencia, las membranas fueron desteñidas sumergiéndolas en 10ml de solución III (desteñido).

<u>Solución I (colorante):</u>		<u>Solución II (lavado):</u>		<u>Solución III (desteñido):</u>	
DB71	0,008%	Etanol	40%	Etanol	50%
Etanol	40%	Ácido acético	10%	NaHCO ₃	1 M
Ácido acético	10%	Agua	50%	Agua	35%
Agua	50%				

2.4.4 Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana.

Cada membrana se sometió a bloqueo de todos aquellos sitios de unión no específicos siendo sumergida en una solución de bloqueo en agitación durante al menos 30 minutos. Una vez bloqueada, se sustituyó la solución de bloqueo utilizada por 10 ml de solución de bloqueo nueva a la que se le añadió el anticuerpo primario en una dilución distinta dependiendo de cada caso (Tabla M.4) y se dejó incubando desde 2 horas a toda la noche en función de la especificidad del anticuerpo, a 4°C y en continua agitación. Posteriormente se lavó la membrana tres veces cambiando el tampón de lavado cada vez y después se sustituyó la solución de lavado usada por 10 ml de solución de lavado nueva, a la que se le añadió el anticuerpo secundario, dejando incubar la membrana entre 30 y 60 minutos a temperatura ambiente en continua agitación. El exceso de anticuerpo se retiró con lavados consecutivos (3 lavados de 10 minutos cada uno) con el tampón de lavado.

Solución de bloqueo:

Leche desnatada	2%
Tween 20	0,1%
NaCl	150 mM
Tris-HCl (pH 7,6)	20 mM

Tampón de lavado:

Tween 20	0,1%
NaCl	150 mM
Tris-HCl (pH 7,6)	20 mM

La detección se realizó usando un sistema de quimioluminiscencia (ECL Plus Western Blotting Detection System, Amersham Biosciences) según las recomendaciones del fabricante. La señal se detectó mediante el revelado de películas de autorradiografía (Biomax Light-1, Kodak) expuestas a la quimioluminiscencia en tiempos variables en función de la intensidad de la misma.

2.4.5 Electroforesis 2D-DIGE.

Marcaje de proteínas con CyDye DIGE fluor Minimal Dyes

Para la realización del estudio de proteómica cuantitativa se utilizaron tres réplicas biológicas de cada una de las dos condiciones sometidas a comparación (crecimiento en YPD vs crecimiento en medio hiperosmótico) con concentraciones aproximadas 1-10 µg/µl de acuerdo con las recomendaciones de la empresa.

El marcaje de las proteínas con los fluoróforos se llevó a cabo mediante incubación de la muestra con el Dye correspondiente durante 30 minutos en hielo y oscuridad. La reacción se paró mediante la adición de 1 µl de una solución de lisina 10 mM.

Finalmente cada muestra marcada con Cy3 se mezcló con otra marcada Cy5.

Primera y Segunda dimensión de geles Analíticos:

Se añadió a la mezcla un volumen igual de una solución compuesta por urea 8 M, tiourea 2 M, CHAPS 2% (p/v), DTE 20 mM, anfólitos (*Pharmalyte* pH 3-10, Amersham, Pharmacia Biotech) al 4% (v/v) y trazas de azul de bromofenol y se incubó en hielo al menos 10 minutos.

El isoelectroenfoco fue llevado a cabo en un dispositivo *Ettan IPGphor Focusin System* (Amersham), utilizando un gradiente de pH inmovilizado (Bjellqvist et al, 1993 (Bjellqvist, B. et al. 1993). Los gradientes empleados fueron de pH 3-10 no lineal (*Inmobiline DyStrip*, 18 cm; Amersham Pharmacia Biotech, tiras IPG).

La rehidratación de las tiras se llevó a cabo pipeteando un volumen adecuado de tampón de rehidratación (urea 8 M, tiourea 2 M, CHAPS 2% (p/v), DTE 10 mM, anfólitos (*Pharmalyte* pH 3-10, Amersham, Pharmacia Biotech) al 2% (v/v) y trazas de azul de bromofenol, en cada hueco reservorio del dispositivo empleado (*Inmobiline DyStrip Reswelling Tray*) y se eliminaron las burbujas. Se colocó la tira IPG y se cubrió con líquido de cobertura *PlusOne™ Dry Trip Cover Fluid* para prevenir la evaporación y la cristalización de la urea, y se permitió la rehidratación de dicha tira IPG a temperatura ambiente durante al menos 10 horas. Transcurrido este tiempo las tiras fueron transferidas al *IPGphor Cup Loading Strip Holder*

eliminando el exceso de líquido de cobertura. Se colocaron almohadillas de electrodo húmedas tanto en el extremo ácido como en el básico de cada tira de gel, se sujetaron firmemente los electrodos a las almohadillas asegurándonos que la tita IPG quedara bien sellada.

Finalmente se mezclaron las muestras proteicas marcadas y se añadió un volumen igual de tampón de muestra 2X cargándose para la primera separación del gel entre 25y 30 µl de muestra proteica por gel (gel analítico). El isoelectroenfoco se llevó a cabo a 15°C con el siguiente programa: 30 v 6h (voltaje constante, **c**), 50 v 6h (**c**), 150 v 30' (gradiente, **g**), 300 v 30' (**g**), 500 v 30' (**g**), 1000 v 30' (**g**), 5000 v 1,5 h (**g**), 5000 v 45' (**c**), 50 v 4 h (**c**). Tras el isoelectroenfoco se realizó el equilibrado de las tiras con el fin de solubilizar las proteínas y reducir los puentes disulfuro. Este re-equilibrado consistió en, en primer lugar, incubar las tiras durante 12 minutos en agitación en una solución compuesta por Tris-HCl 0,1 M a pH 6,8, urea 6 M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (p/v), DTE 0,5% (p/v) para reducir los puentes disulfuro y después, 5 minutos en agitación orbital en una solución compuesta por Tris-HCl 0,1 M pH 6,8, urea 6 M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (p/v), iodoacetamida 4,5% (p/v) para bloquear y estabilizar los grupos SH.

La segunda dimensión se realizó en geles de poliacrilamida al 12% de 1,5 mm de grosor sin gel concentrador y utilizando PDA (piperacin diacrilamida) como agente polimerizante, ya que consigue mejor resolución y menor bloqueo N-terminal de las proteínas (Hochstrasser, M. 1991). Para la separación de las proteínas por su masa utilizamos sistemas verticales de electroforesis (*Ettan-Dalt Six*, Amersham Biosciences) a una potencia constante de 2 W/gel a 15°C durante 30 minutos y de 20 W/gel a 15°C durante 4 h.

Electroforesis bidimensional preparativa en gel de poliacrilamida (2D-PAGE)

La diferencia entre este tipo de electroforesis y el anterior es que en los geles preparativos se cargaron entre 250 y 300 µg de proteína no marcada. De este gel serán seleccionadas las manchas proteicas para posteriormente ser identificadas mediante espectrometría de masas.

Los geles fueron resueltos y las muestras proteicas seleccionadas y analizadas por la empresa *Applied Biomics*.

Tinción ultrasensible de Proteínas con Nitrato de Plata

Los geles se fijaron y se eliminaron los restos de SDS incubando durante 3 h con una solución 30% etanol + 10% acético. A continuación se eliminaron los restos de ácido acético que inhiben la unión de la plata a la proteína incubando primero con una solución 10% etanol durante 1 h cambiando una vez la solución, y otra vez sólo con agua MilliQ durante otra hora, con un cambio a los 30 minutos.

Posteriormente se dispusieron los geles en una cubeta limpia y se incubaron con una dilución 0,1% de NO_3Ag aproximadamente 30 minutos.

Se sometieron a un rápido lavado con agua (15 ó 30 segundos) y se revelaron con 3% CO_3Na_2 + 0,02% formaldehído incubando 5-10 minutos.

Después se paró la reacción incubando el gel con 1% ácido acético durante 5 minutos y se lavó para eliminar los excesos mediante dos incubaciones consecutivas de 30 minutos con agua.

Análisis informático de los geles:

a) Visualización de los geles:

Los geles DIGE fueron visualizados mediante escáner *Typhoon 9400TM* (GE Healthcare) con los filtros CyDye con los fluorocromos Cy3 longitud de onda excitación/emisión 532/580 nm y Cy5 longitud de excitación/emisión 633/670 nm.

b) Análisis de la imagen:

El programa *DeCyder 2D Software* permitió realizar un análisis estadístico de los geles bidimensionales obtenidos mediante el sistema DIGE mediante cuatro pasos:

DIA (*Differential In gel Analysis*), donde las manchas proteicas son detectadas y cuantificadas por comparación entre dos geles en condiciones distintas. Este

programa es capaz por un lado, de eliminar el ruido de fondo, normalizando “en gel” las señales correspondientes a la relación Cy3/Cy5 y por otro, eliminar artefactos que pudiera haber en el gel.

Los algoritmos del DIA detectan las manchas proteicas en una imagen acumulada derivada de la unión de las múltiples imágenes de un mismo gel. Este método de codetección asegura que todas las manchas estén representadas en todas las imágenes.

DIA expresa los valores de la cuantificación como una relación entre la abundancia proteica e intensidad de las manchas correspondientes. Estos datos se utilizan en el siguiente módulo de cuantificación inter-gel.

BVA (*Biological Variation Analysis*), donde se emparejan las múltiples imágenes de los geles bidimensionales para proporcionar datos estadísticos de los diferentes niveles de abundancia proteica entre los grupos considerados. Cada imagen es emparejada con una única imagen máster (imagen considerada como de referencia), identificando manchas comunes entre los geles.

Batch Processor, Ejecuta los módulos anteriores (DIA y BVA) realizando la codetección automática de manchas proteicas y el emparejamiento inter-gel de las múltiples imágenes.

Una vez detectadas las manchas de expresión diferencial, se recortaron de un gel teñido con *Coomassie* y se identificaron por espectrofotometría de masas tipo MALDI-TOF y MALDI-TOF/TOF.

Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas:

La digestión e identificación de proteínas fue realizada por la empresa *Applied Biomics*:

a) Preparación de la muestra:

Las manchas proteicas fueron cortadas de los geles y transferidas a una placa multipocillo en cada uno de los pocillos de la cual se había añadido un volumen de 50 μ l de agua MilliQ. Las manchas proteicas fueron desteñidas (Gharahdaghi, F. et al. 1999). Los trozos de gel fueron deshidratados con acetonitrilo al 100% durante 5 minutos y secados mediante *Speed-Vac*. A continuación se añadieron 20 μ l de una

solución 10 mM DTT en bicarbonato amónico 25 mM y se incubaron las muestras a 56°C durante 30 minutos en agitación suave. A continuación, para alquilar los grupos previamente reducidos, se añadieron 20 µl de iodoacetamida 55 mM en bicarbonato amónico 25 mM durante 15 minutos en oscuridad. Después se realizaron dos lavados con acetonitrilo (ACN) y posteriormente se incubaron las muestras 5 minutos en bicarbonato amónico 25 mM, se añadió un volumen igual de ACN y se dejó 15 minutos más a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante de los pocillos y se secó en *Speed-Vac* (Savant) durante 25-30 minutos.

La digestión proteolítica se realizó con tripsina (Roche). Se añadió a cada pocillo 10 µl de una solución de tripsina de concentración 12,5 ng/µl en bicarbonato amónico 25 mM. La incubación se llevó a cabo durante 45 minutos en hielo. Se retiró el sobrenadante, se añadió bicarbonato amónico 25 mM hasta cubrir el gel y se incubó toda la noche a 37°C. Tras la digestión se agitó con vórtex y se dio un pulso de centrifuga para pasar el sobrenadante a una nueva placa. La extracción de los péptidos se realizó cubriendo el gel con una solución de ACN al 50% (v/v) y TFA (ácido trifluoroacético) al 0,5% (v/v) y sonicando 10 minutos. Tras esta etapa se pasó el sobrenadante a otra placa. Esta operación se repitió tres veces y se juntaron los sobrenadantes de cada extracción. Posteriormente se realizaron otras tres extracciones con ACN de 10 minutos cada una, se juntaron todos los sobrenadantes, secándolos a vacío en la *Speed-Vac* y se resuspendieron en 5 ml de una solución de ACN al 50% (v/v) y TFA al 0,1% (v/v).

b) Identificación mediante espectrometría de masas tipo MALDI-TOF y MALDI- TOF/TOF :

Las muestras se dispusieron en una placa de acero inoxidable de 96 pocillos recubierta de teflón. En primer lugar se aplicó el sobrenadante de la digestión peptídica (1 µl por pocillo), que tras dejarlo secar forma una película sobre la placa.

Sobre la muestra se añadió la matriz (0,5 µl por pocillo), compuesta por ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (Sigma) a una concentración de 3 mg/ml en ACN: agua al 50% (v/v) (acidificado con TFA al 0,1% (v/v)). La matriz co-cristaliza con la muestra

formando unos cristales pequeños, compactos y redondeados. Las muestras así cargadas se analizaron mediante espectrometría de masas de tipo *MALDI-TOF* (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of Flight*) en un espectrómetro de masas *Voyager STR-MALDI-TOF* (Perseptive Biosystem). La adquisición de los espectros, así como el procesamiento de los mismos, se realizó en modo reflector de forma manual. Mediante un análisis bioinformático, esta huella peptídica se comparó con las huellas peptídicas teóricas de las proteínas existentes en las bases de datos.

En los casos en los que la huella peptídica no conducía a una determinación clara de la proteína, fue necesario recurrir para su identificación al análisis parcial de la secuencia proteica mediante fragmentación de péptidos utilizando un espectrómetro de masas tipo *MALDI-TOF/TOF* (*MALDI-tandem time-of-flight mass spectrometer 4700 Proteomics Analyzer*) (Applied Biosystems, Framingham, MA).

Las identificaciones de las proteínas se llevaron a cabo utilizando programas de dominio público disponibles en la red como (*Protein Prospector 4.0.4* (MS-Fit), *MatrixScience* (MASCOT) y *Prowl* (ProFound) en una base de datos no redundante que contenía entradas de *SwissProt*, *TrEMBL* y *NCBI* así como en *SGD* donde se encuentra anotado el genoma completo de *S. cerevisiae*. Los parámetros utilizados en la búsqueda fueron los siguientes: intervalo de exactitud en la masa (error) de +/- 50/100 ppm, modificaciones tales como cisteínas carbamidometiladas y oxidación de la metionina, como mínimo 4 péptidos coincidentes, permitir un corte parcial, peso molecular restringido (desde 1 hasta 100 kDa), punto isoeléctrico restringido (3-10) y especie no restringida. Para verificar que los resultados obtenidos en las búsquedas realizadas con las bases de datos anteriores eran concluyentes, se consideraron una serie de parámetros, como son el porcentaje de cobertura de la secuencia teórica de la proteína (mínimo un 20%), el número de péptidos experimentales coincidentes con los teóricos y el grado de confianza/fiabilidad en el resultado (probabilidad de que la identificación de la proteína sea correcta).

2.5.- ANÁLISIS *Northern*.

2.5.1 Extracción de RNA de levadura.

Se obtuvieron cultivos de levadura de 50 ml YPD en fase exponencial $OD_{660}=0,8-1$ con y sin tratamiento hiperosmótico (10 min, 20 min, 1 M NaCl). Las células fueron recogidas por centrifugación (3000 rpm, 5 minutos) y lavadas con H₂O MilliQ. Posteriormente se resuspendieron en 700 μ l de tampón TCES. Se añadieron 700 μ l de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) y aproximadamente 1 ml de bolas de vidrio de 0,5 mm de diámetro. Las células se rompieron al ser sometidas a agitación vigorosa mediante Mini *BeadBeater* en ciclos de 1 minuto, a través de tres repeticiones entre las cuales se mantuvo a los tubos en hielo al menos 2 minutos. Después los tubos fueron sometidos a centrifugación durante 10 minutos a 13000 rpm para separar las bolas de vidrio y se recuperó la fase superior donde se añadieron 600 μ l de cloroformo:isoamílico (24:1) a cada microtubo. Los tubos se agitaron manualmente y volvieron a centrifugarse 1 minuto a 13000 rpm. La fase superior se recuperó y se pasó a tubos nuevos en los que se añadió 600 μ l de isopropanol. Se centrifugó durante 15 minutos a 13000 rpm y se desechó el sobrenadante. El precipitado se lavó con etanol 70% y se dejó secar en bancada. Una vez seca, la muestra fue resuspendida en 30 μ l de agua MilliQ estéril.

Tanto la calidad como la cantidad de RNA de las muestras obtenidas se verificaron mediante geles de agarosa (1 g agarosa, 10 ml tampón MAE 10X, 84 ml agua MilliQ, 6 ml formaldehído 37%). Se cargaron 5 μ l de RNA diluidos en 20 μ l de tampón de carga 1,25X y 1 μ l de bromuro de etidio (0,1%) que permitía la visualización mediante la luz ultravioleta con el objetivo de comprobar que los geles tuvieran equilibradas las cargas entre muestras para poder ser comparables entre sí.

Tampón TCES:

Tris-HCl pH 8;	0,2 M
NaCl	0,2 M
EDTA	50 mM
SDS	2%

Solución de MAE 10X:

MOPS	0,2 M pH 7
NaAc	50 mM
EDTA	10 mM

Tampón de carga 1,25x:

Formamida desionizada	2,2 ml
Formaldehído 37%	0,8 ml
MAE 10X	0,5 ml
Glicerol 80%	0,4 ml
Azul de bromofenol 2%	0,1 ml

Las muestras se calentaron 10 minutos a 56°C para romper las estructuras secundarias del RNA antes de ser cargadas en geles de agarosa. Se llevó a cabo la electroforesis sometiendo a los geles a una corriente eléctrica de 120 v durante 2 horas. La visualización mediante luz ultravioleta permitió detectar dos bandas de 3,5 y 1,8 kb que se corresponden con los RNA ribosomales (subunidades mayor y menor respectivamente).

2.5.2 Transferencia de RNA a membrana.

Una vez llevada a cabo la electroforesis de RNA, se hizo la transferencia de éste a una membrana de *nylon* según el método descrito por Sambrook and Russell, 2001.

El gel de RNA fue preincubado en tampón de incubación SSC 10X durante al menos 20 minutos (dos veces, cambiando el tampón para eliminar los restos de formaldehído) y sobre él se dispuso la membrana de *nylon* Hybond-N (Amersham) y dos papeles Whatman 3 MM, evitando la formación de burbujas; se añadieron trozos de papel de filtro con el fin de absorber el exceso de humedad y se aplicó una placa que ejerciera peso sobre el gel para favorecer la capilaridad.

Tras 12-16 horas de transferencia se secaron las membranas ligeramente entre papel de filtro y se procedió al entrecruzamiento mediante luz UV de 254 nm (0,120 J/minuto) utilizando UV Stratalinker (Stratagene) durante 1 minuto, para asegurar una mejor unión covalente entre las moléculas de RNA y la membrana.

2.5.3 Obtención y marcaje radiactivo de sondas de DNA.

Para la obtención de las sondas se amplificaron los fragmentos de DNA correspondientes a los genes de interés mediante PCR según el siguiente programa: un primer paso de iniciación de 3 minutos a 95°C seguidos de 40 ciclos en los que se repiten 30 segundos a 95°C para desnaturalizar el DNA, 30 segundos a 55°C para permitir el alineamiento entre el cebador y el molde y 2,5 minutos a 72°C durante los cuales se produce la síntesis de nuevas hebras de DNA (fase de

extensión); por último se añade un último paso no repetido de 10 minutos a 72°C que asegura la amplificación de cualquier hebra de DNA de cadena simple.

Cada reacción de PCR contenía 10 µl de tampón PCR 10X (*BioTools*), 10 µl dNTPs 2 mM, 1 µl del cebador 5'-100 µM, 1 µl del cebador 3'-100 µM, 1 µl de DNA (molde, DNA genómico de la cepa silvestre) y 1 µl de TaqDNAPolimerasa (5 Ud/ µl, *BioTools*).

Tabla M.5: Sondas utilizadas para los diferentes análisis *Northern*.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Descripción
ACT-1	ATTGAACACGGTATTGTCACCAAC	+518 pb en el ORF de <i>ACT1</i>
ACT-2	CCTTACGGACATCGACATCACAC	+1182 pb en el ORF de <i>ACT1</i>
SDH2-1	CACAACAGCTGCAGCTACGCATACC	+66 pb en el ORF de <i>SDH2</i>
SDH2-2	GGACAAGTTCTAGTACAGTTCATGA	+740 pb en el ORF de <i>SDH2</i>
COX6-1	CCAGACCTGGTGCTTATCATGCAAC	+56 pb en el ORF de <i>COX6</i>
COX6-2	GAAGAGCTTGAAATAGCTCTTCC	+443 pb en el ORF de <i>COX6</i>
CIT1-1	GAATGCTCGCCACTATAGTAGCGCC	+96 pb en el ORF de <i>CIT1</i>
CIT1-2	TGGCCTTTCGATTGGAGACCAACA	+1380 pb en el ORF de <i>CIT1</i>

Una vez obtenida la sonda amplificada se comprobó la concentración y el tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,7%. Se purificó mediante “*DNA gel extraction kit*”, se resuspendió en tampón 10 mM Tris-HCl pH 8, se cuantificó y se procedió a su marcaje radioactivo.

El marcaje radiactivo de las sondas de DNA se realizó mediante la técnica de cebado aleatorio empleando el sistema *High Prime* (Roche) que contiene oligonucleótidos al azar, dATP, dGTP y dTTP y el fragmento Klenow de la DNA-polimerasa. Se marcaron los fragmentos (25-50 ng) con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP según las instrucciones del fabricante.

2.5.4 Hibridación de las membranas con la sonda radiactiva y cuantificación de la señal.

Previamente a la hibridación, se sometió a las membranas a una pre-hibridación de 10 minutos a 65°C con el tampón de hibridación para evitar posteriores hibridaciones inespecíficas. Después se procedió a la hibridación que consistió en incubar las membranas con la sonda marcada en 10 ml del tampón de hibridación (PSE) a 65°C durante toda la noche. Posteriormente se lavaron las membranas con tampón de lavado SSC4X/SDS 0,1% dos veces, 10 minutos cada vez cambiando el tampón y una última vez con SSC 0,4X/0,1% SDS durante otros 10 minutos. Una vez limpias, las membranas se sellaron con *Saran Wrap* y se dispusieron en Hypercassete™ (Amersham) para su exposición por autorradiografía. El tiempo de exposición dependió de la intensidad de la señal. La señal radiactiva se detectó mediante películas Fuji RX.

<u>Tampón de hibridación (PSE):</u>		<u>Tampón SSC 10X:</u>	
NaPO ₃ 1 M pH 7,2	3 ml	NaCl	1,5 M
10% SDS	7 ml	Citrato trisódico	0,15 M
EDTA 0,5 M	20 µl	Ajustar pH7 con HCl.	

La señal se cuantificó mediante pantalla Fujifilm BAS-1500 Phosphoimager. La imagen obtenida se cuantificó mediante lector Fujifilm FLA5100™, mediante software Image Gauge v4.0 (Fujifilm) obtuvimos los valores de cantidad de señal.

2.6.- OTRAS MEDIDAS BIOQUÍMICAS.

2.6.1 Ensayos de actividad enzimática SDH.

Utilizamos como medida de actividad mitocondrial el enzima Succinato Deshidrogenasa (SDH) que cataliza la oxidación de succinato a fumarato en el ciclo de Krebs según la ecuación: Succinato + FAD --> Fumarato + FADH₂

Materiales y Métodos

Se lleva a cabo un ensayo colorimétrico que utiliza p-iodonitrotetrazodium chloride (INT) como agente oxidante y aceptor artificial de electrones, según la ecuación:



Se obtuvo un extracto proteico partiendo de 10 ml de cultivos líquidos de levaduras a $\text{OD}_{660}=0,8-1$ según el protocolo que se detalla en el apartado 2.3.1 mediante agitación *Beadbeater*. El extracto obtenido de mitocondrias enteras y funcionales fue resuspendido en 200 μl TBS + PMSF y se utilizó una alícuota para cuantificar la cantidad de proteína. Del resto de muestra se utilizaron 20 μl que se añadieron a un tubo que contenía 300 μl de Tampón Succinato. La mezcla fue incubada 10 minutos a 37° C y posteriormente se añadieron 100 μl de solución INT. Se dejaron incubar 20 minutos a 37° C y después se paró la reacción añadiendo 700 μl de Reacción de Parada. Se centrifugaron y se midió la absorbancia de formazan del sobrenadante a 490 nm.

La actividad (M/min x mg) se calculó según la ecuación: $a = (V_T \cdot A_{490}) / (V_S \cdot \xi \cdot l \cdot t \cdot C_p)$ donde:

V_T volumen total de reacción,

V_S volumen de la muestra,

ξ coeficiente de extinción molar $19300\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$,

l hace referencia a la longitud de la cubeta,

t el tiempo medido en minutos desde que se añade el reactivo colorimétrico hasta que se para la reacción,

C_p es la concentración obtenida de proteína.

Tampón Succinato: 10 mM de ácido succínico diluido en tampón fosfato a pH 7,4.

Tampón Fosfato:

Preparar Na_2HPO_4 50 mM

Preparar KH_2PO_4 50 mM

Añadir KH_2PO_4 poco a poco a Na_2HPO_4 hasta obtener solución a pH 7,4.

Tampón INT:

2,5 mg p-Iodonitrotetrazolium violet (INT)/ml tampón fosfato pH 7,4.

Solución de Parada:

10 gr Tricloroacético

50 ml Etilacetato

50 ml Etanol 100%

2.6.2 Cuantificación de AMP y ATP.

2.6.2.1 Extracción de nucleótidos

El método utilizado se basa en parar el metabolismo celular mediante el rápido tratamiento con metanol como describieron (de, Koning W. and van, Dam K. 1992).

En nuestro caso partimos de 7,5 ml de cultivos de levaduras silvestres y mutantes que habían crecido en YPD o en YPD + 1M NaCl hasta una OD_{660} aproximada de 0,6. Las muestras fueron añadidas con rapidez a una solución que contenía 60% de metanol/agua a -20°C resultando una concentración final de metanol del 50%. Inmediatamente se centrifugaron en una centrifuga refrigerada a 1600 g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado con 1 ml de de metanol 100% a -20°C . Se transfirieron a tubos *ependorf* y se congelaron mediante nitrógeno líquido. Se centrifugaron de nuevo a 3000 rpm en centrifuga de mesa refrigerada pre-enfriada a 0°C , se descartó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en 1 ml de metanol 100%. Las muestras fueron secadas en *Speed-Vac* y fueron almacenados a -20°C hasta el momento de su análisis. Justo en el momento previo de ser analizadas, las

muestras fueron resuspendidas en 100 μ l de agua MilliQ, filtradas mediante filtros Millipore HV de 0,45 μ m de diámetro de poro e inyectadas al C₁₈-HPLC para su identificación.

2.6.2.2 Medidas HPLC

La cromatografía líquida de alta resolución o *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) fue la técnica utilizada para separar y cuantificar los nucleótidos en función del retraso diferencial que se producía como consecuencia de las interacciones químicas con la fase estacionaria a medida que atravesaban la columna (tiempo de retención). En nuestro caso utilizamos columnas C18 de fase reversa (LiChrosfere 100, 4 x 250 nm, 5 μ m tamaño de partícula, Merck) en solución acuosa acidificada con acetonitrilo para mejorar la solubilidad. La fase móvil utilizada estaba formada por metanol 83,3 mM TEAP (trietil amonio fosfato) pH 6 (4:96 v/v).

Los picos obtenidos se detectaron mediante un detector de uv de longitud de onda $\lambda=254$ nm y se relacionaron con estándares previamente analizados e identificados según su tiempo de retención. Las cantidades relativas de cada uno de ellos se determinaron calculando el área de su pico correspondiente.

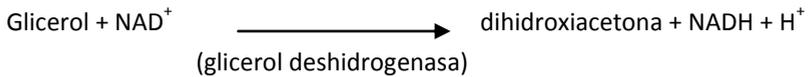
2.6.3 Microscopía.

2.6.3.1 Microscopía Confocal de fusiones GFP

Las imágenes de fluorescencia de células de levadura con fusiones GFP que habían crecido en medio SD hasta fase exponencial, fueron obtenidas utilizando un microscopio Confocal invertido Leica TCS SL con un objetivo 40X/1,25 con $\lambda_{Ex}=488$ y $\lambda_{Em}=500-530$ nm.

2.6.4 Medidas de glicerol intracelular

Para la determinación de glicerol intracelular seguimos el protocolo descrito en (Masoom-Yaszai and Yagoob, 1985) con algunas modificaciones usando la oxidación de glicerol a dihidroxiacetona por glicerol deshidrogenasa según la siguiente reacción:



En condiciones de exceso de NAD^+ y de glicerol deshidrogenasa, la formación de NADH es proporcional a la concentración de glicerol y puede ser monitorizada mediante espectrofotómetro midiendo la absorbancia a 340 nm.

Estándares y Reactivos:

Se utilizó glicerol deshidrogenasa 2 ud/ml; cloruro amónico $8 \cdot 10^{-3}$ M y NAD (0,012 M) en tampón Tris pH 8 (0,05 M).

Se llevó a cabo una toma de medidas de glicerol disuelto en agua (desde 0,5 mM hasta 10 mM) para establecer los parámetros en los que las cantidades detectadas aumentaban linealmente en función del tiempo.

Tomando como tiempo de medida después de añadir los reactivos a la muestra, 2 h y 4 h.

La obtención de la muestra se realizó según (Rios, G. et al. 1997):

Partimos de cultivos de células de levaduras de 25 ml en fase logarítmica de crecimiento que fueron filtrados en papeles de filtro de 45 μm (Whatman GF/C). Lavamos dos veces con 5 ml de 20 mM MgCl_2 con concentraciones isosmóticas de sorbitol. Para recuperar las células que habían quedado retenidas en el papel de filtro, incubamos éstos a 95°C durante 12 minutos en 1 ml de 0,5 M Tris-HCl pH 7,6. Centrifugamos a 2000 rpm durante 5 minutos y utilizamos el sobrenadante para medir el contenido en glicerol interno de las células.

2.6.5 Medidas de nivel de oxidación.

2.6.5.1 Determinación de peróxido mediante fluorescencia (DCFH-DA):

La cuantificación de la producción de H_2O_2 se llevó a cabo utilizando el fluoróforo 2',7' diclorodihidrofluoresceína (DCFHDA). DCFHDA es un compuesto apolar que se incorpora a las células donde se convierte en DCFH por acción de unas esterasas intracelulares sólo en células vivas. DCFHDA no emite fluorescencia pero, al ser oxidado por el peróxido de hidrógeno, sí lo hace.

Se obtuvieron cultivos de células de levadura en YPD hasta una concentración aproximada de $0,5 \cdot 10^7$ células/ml y se añadió DCFHDA hasta una concentración final de 10 μ M incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente para permitir la deacetilación intracelular.

Posteriormente añadimos NaCl hasta la concentración final 1 M e incubamos el tiempo requerido (en nuestro caso 2 h) hasta recoger las muestras de 3 ml en triplicado en tubos falcon de 15 ml mediante centrifugación de 3 minutos a 3000 rpm. Lavamos las células con idéntico volumen de agua MilliQ y resuspendimos cada muestra en 3 ml de Tampón 50 mM Tris-HCl pH 7,5. Utilizamos 100 μ l para medir el número exacto de células y al resto lo tratamos con 10 μ l de cloroformo y 5 μ l de SDS 1%. Sometimos las muestras a 30 segundos de agitación mediante *Beadbeater* y dejamos reposar las muestras en la bancada 10 minutos para permitir que la fluoresceína difundiera. Centrifugamos 3 minutos a 3000 rpm para precipitar las células y medimos la fluorescencia del sobrenadante en fluorímetro $\lambda_{Ex}=502$, $\lambda_{Em}=521$ nm. Como referencia se midió la fluorescencia en la misma cantidad de células a las que no habíamos añadido DCFHDA.

2.6.5.2 Medidas cualitativas HE:

El dihidroetidio (HE), también conocido como hidroetidina, se utiliza para analizar el estrés oxidativo de las células como consecuencia del desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. Su fluorescencia depende de la cantidad de anión superóxido producido por la NADPH oxidasa ligada a la membrana interna mitocondrial.

El ensayo se realizó según el siguiente protocolo:

Se obtuvieron cultivos de 10 ml de células de levadura en YPD hasta una $OD_{660}=0,6-0,8$ que fueron centrifugados para posteriormente ser resuspendidos en 3 ml de tampón 1X KPGE con y sin estrés (1M NaCl). Añadimos 12 μ l de 5 mM dihidroetidio (HE), agitamos e incubamos 10 minutos. Después lavamos con Tampón 1X KPGE a pH7, 100 mM y sometimos a observación las células mediante un microscopio óptico a 100X aumentos mediante filtros $\lambda_{ex}=518nm$; $\lambda_{em}=605nm$.

Tampón 1X KPGE:

KH_2/K_2HPO_4 pH7	100 mM
Glucosa	0,1%
EDTA	1 mM

2.6.6 Ensayos de actividad β -galactosidasa.

Para monitorizar la activación de la transcripción durante la exposición a estrés osmótico utilizamos el gen reportero (delator) *lacZ* que codifica la enzima β -galactosidasa.

Las células de levadura fueron transformadas con el plásmido pMP224 (*CYCprom-(2xCRE_{ENA1})- lacZ; 2 μ ; URA*) que contiene una inserción en tándem del sitio de unión para el factor de transcripción Sko1 (CRE) en el promotor de *CYC1* fusionado a *lacZ*, que le confiere unos bajos niveles de expresión en condiciones normales y una alta inducción bajo condiciones de estrés hiperosmótico.

Los transformantes fueron cultivados en medio YPD e YPD 1 M NaCl hasta fase logarítmica y se recogió el precipitado producto de la centrifugación de 1 ml de cultivo. Las células se resuspendieron en 110 μ l de tampón GTED. Se utilizaron 10 μ l de la muestra para medir la densidad óptica a 660 nm, y el resto de muestra se trató con 6 μ l de TET (1 volumen de tolueno, 1 volumen de Triton X-100 10%, 4 volúmenes de etanol) para permeabilizar las membranas celulares y permitir la entrada del sustrato. 10 μ l de células permeabilizadas se mezclaron con 190 μ l de tampón Z, se añadió 40 μ l de ONPG (4 mg/ml o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido en fostato sódico 0,1 M pH 7) y se dejó la reacción a 28°C hasta que las muestras adoptaron una coloración amarillenta. Para parar la reacción se añadieron 100 μ l de Na₂CO₃ 1 M. Finalmente se midió la absorbancia a 415 nm de las muestras y se calculó la actividad β -galactosidasa en función de la absorbancia a 415 nm, el tiempo de reacción y la absorbancia a 660 nm (Miller, A. L. and Atkinson, D. E. 1972), (Serrano, R. et al. 1973).

Tampón GTED:

Tris-HCl pH 7,6	10 mM
EDTA pH 8	1 mM
DTE	1 mM
Glicerol	20%

Tampón Z:

Na ₃ PO ₄ pH 7	0,1 M
KCl	10 mM
MgSO ₄	1 mM
β -mercaptoetanol	50 mM

2.6.7 Extracción DNA mitocondrial

Para la extracción del DNA mitocondrial de las células de levadura, utilizamos un método adaptado a partir de (Defontaine, A. et al. 1991) con el que combinamos métodos de extracción químicos y mecánicos.

Partimos de 20 ml de cultivo en fase exponencial de crecimiento ($OD_{660}=0,8-1$) que centrifugamos a 3000 rpm (2000 g) durante 5 minutos. Lavamos las células con agua y repetimos la centrifugación. Resuspendimos las células precipitadas en 1 ml de Tampón de Desintegración al que se le había añadido 0,4% de CTAB y dejamos la mezcla incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después centrifugamos a 2200 g durante 10 minutos, descartamos el sobrenadante y resuspendimos las células en 1 ml de Tampón de Desintegración con 0,4% de CTAB fresco en un tubo especial de Mini *Beadbeater* donde añadimos 1 ml de bolas de vidrio rompiendo las células por agitación máxima 1 minuto, 5 veces, dejando los tubos en hielo al menos un minuto entre agitaciones consecutivas. Centrifugamos a 1000 g durante 10 minutos para descartar las bolas de vidrio y los restos celulares. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo donde fue sometido a centrifugaciones consecutivas para enriquecer la fracción mitocondrial. La primera centrifugación consistió en 20 minutos a 16000 g durante 20 minutos en una centrífuga refrigerada a 4°C. Descartamos el sobrenadante y lavamos con 1 ml de Tampón de Desintegración tres veces consecutivas para asegurarnos que nos deshacíamos del DNA cromosómico que pudiera quedar en la muestra. Después de cada lavado, recuperamos el material precipitado tras someterlo a 20 minutos de centrifugación a 16000 g cada vez. Después del último lavado y precipitación, añadimos 400 µl de Tampón de Lisis Mitocondrial para romper la membrana mitocondrial y así liberar su DNA e incubamos la mezcla en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después añadimos 200 µl de acetato potásico 5 M e incubamos 10 minutos más en hielo para que precipitaran las proteínas. Centrifugamos a 16000 g 10 minutos, que permite al DNA quedar retenido en el sobrenadante mientras las moléculas más pesadas (proteínas, restos de tejidos, etc.) caen al fondo de tubo. El sobrenadante, que contenía el DNA mitocondrial, fue recuperado y transferido a un nuevo tubo donde se le añadió el mismo volumen de isopropanol, se mezcló bien y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugó 10 minutos más a

Materiales y Métodos

11000 g y se descartó el sobrenadante quedando el DNA en forma de precipitado que se lavó añadiendo 1 ml de EtOH 96%.

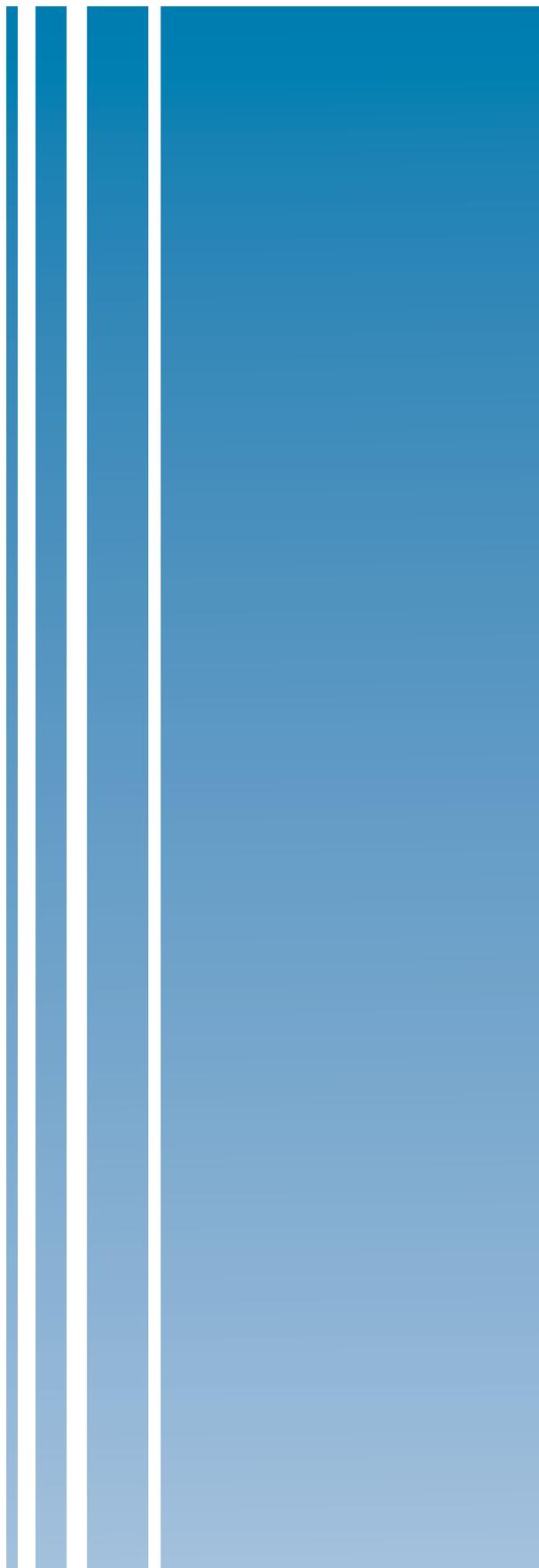
Tampón de Desintegración:

Sorbitol	0,5 M
EDTA pH 8	10 mM
Tris-HCl pH 7,5	50 mM

Tampón de Lisis Mitocondrial:

Tris-HCl pH 7,8	50 mM
EDTA pH 8	10 mM
NaCl	100 mM
Sarkosyl	1%

Resultados



1.- BÚSQUEDA DE NUEVOS DETERMINANTES DE LA TOLERANCIA A ESTRÉS HIPEROSMÓTICO Y SALINO: IDENTIFICACIÓN DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL.

Se planteó, en primer lugar, la búsqueda de nuevos determinantes de la tolerancia a la salinidad a través, en primer lugar, del rastreo de una colección de mutantes cuyos genes mutados pertenecían a la categoría “transporte de iones”. La elección de los mutantes se llevó a cabo haciendo uso de la base de datos pública *Saccharomyces Genome Database* (SGD) que facilita información acerca de la función de cada uno de los genes delecionados además de, en ocasiones, contener datos fenotípicos de ensayos de sensibilidad. Suponían un total de 52 cepas incluidas en el anejo R.1 que fueron inoculadas en medio YPD para obtener cultivos en fase logarítmica de crecimiento con una densidad de células comparable entre las distintas cepas. Se utilizaron placas de medio YPD como control de crecimiento para verificar que el crecimiento de las cepas mutantes no era defectivo en ausencia de estrés y otras con YPD suplementado con diferentes concentraciones de sales (0,4 M y 1 M NaCl; 0,8 M y 1,5 M KCl; 100 mM y 300 mM LiCl) para determinar si la sensibilidad detectada en las cepas mutantes era consecuencia del estrés salino o era consecuencia de la toxicidad de un determinado ión. De todas las cepas estudiadas, se obtuvieron un subgrupo de doce que presentaban hipersensibilidad a elevadas concentraciones de NaCl y KCl y en algunos casos, también a LiCl (Tabla R.1).

NOMBRE	NOMBRE SISTEMÁTICO	LOCALIZACIÓN	FUNCIÓN	FENOTIPO					
				NaCl		KCl		LiCl	
				0,4M	1M	0,8M	1,5M	100 mm	300 mm
CCS1	YMR038C	Mitocondria; citosol; núcleo	Chaperona Cu ²⁺ .	+	-	-	-	-	--
COX19	YLL018C-A	Citosol; espacio mitocondrial intermembrana	Metalochaperona que libera cobre al citocromo c.	+	-	-	-	+	+
FET3	YMR058W	Membrana plasmática	Responsable del importe de Fe ²⁺ de alta afinidad.	+	-	-	-	+	-
FTR1	YER145C	Membrana plasmática	Transporte de Fe ²⁺ de alta afinidad.	+	-	-	-	+	-
ISA1	YLL027W	Matriz mitocondrial	Involucrado en la biogénesis de proteínas Fe/S mitocondriales y en el transporte de Fe ²⁺ al interior de la mitocondria.	-	-	--	--	-	+
ISA2	YPR067W	Espacio intermembrana mitocondrial	Proteína requerida para la maduración de proteínas Fe/S tanto mitocondriales como citosólicas.	+	-	+	--	+	+
MRS4	YKR052C	Mitocondria	Transporte de hierro a través de la membrana interna mitocondrial.	-	-	-	-	+	+
MTM1	YGR257C	Membrana interna mitocondrial; mitocondria	Implicada en la activación de Sod2p facilitando la inserción al cofactor manganeso.	+	-	+	-	+	-
RCS1 (AFT1)	YGL071W	Núcleo y citoplasma	Factor de transcripción implicado en la utilización del hierro y su homeostasis.	-	-	-	-	--	--
SCO1 (PET161)	YBR037C	Membrana interna mitocondrial	Libera Cu ²⁺ al citocromo c oxidasa.	+	-	-	-	-	-
SMF1 (SBS1)	YOL122C	Vacuola y membrana plasmática	Transportador de iones metálicos di y trivalentes.	+	-	+	-	-	-
TRK1	YIL129C	membrana plasmática	Transportador de potasio.	+	-	+	+	--	--

Tabla R.1: Mutantes con sensibilidad a NaCl, KCl y/o LiCl. Mutantes afectados en la categoría funcional “transporte de iones” se inocularon en placas con diferentes concentraciones de NaCl, KCl y LiCl y se comparó su crecimiento con una cepa BY4741. El símbolo (+) indica que la cepa es resistente mientras que (-) indica sensibilidad leve y (- -) sensibilidad aguda. Los datos NOMBRE SISTEMÁTICO, LOCALIZACIÓN y FUNCIÓN fueron obtenidos a partir de www.yeastgenome.org/ (SGD).

Las cepas que presentaban sensibilidad fueron agrupadas en familias según la función del gen mutado. Se obtuvo un primer grupo formado por *FET3*, *FTR1*, *ISA1,2*, *MRS4* y *RCS1* cuyos genes codifican chaperonas y proteínas implicadas en el transporte de Fe^{2+} . Fet3p y Ftr1p se localizan en la membrana plasmática mientras que Isa1p y 2p y Mrs4p son proteínas mitocondriales. *RCS1* codifica a un factor transcripcional que activa el sistema de transporte de Fe^{2+} .

En segundo lugar, se identificó un grupo de genes formado por *CCS1*, *COX19* y *SCO1* que codifican chaperonas y proteínas implicadas en el transporte del Cu^{2+} . Las proteínas codificadas por estos genes se localizan en la mitocondria. Ccs1p está involucrada en la incorporación de Cu^{2+} a Sod1p en condiciones de baja disponibilidad de cobre y por tanto ejerce una función protectora frente a estrés oxidativo. Las proteínas Cox19 y Sco1 actúan uniendo Cu^{2+} al citocromo c permitiendo la respiración.

Mtm1p es una proteína mitocondrial involucrada en el transporte de Mn^{2+} . *SMF1* codifica un transportador de varios iones metálicos y *TRK1* codifica el mayor transportador de K^+ en las células de levadura.

Según se observa en la Tabla R.1, los mutantes estudiados con defectos en el transporte de Fe^{2+} , Cu^{2+} y Mn^{2+} eran sensibles al estrés hiperosmótico. Por otro lado, el hecho de que muchas de las proteínas cuya ausencia se manifestaba en un fenotipo sensible fueran proteínas mitocondriales y/o proteínas necesarias para la biogénesis de componentes de la mitocondria -como pueden ser el citocromo c, las superóxido dismutasas, proteínas Fe/S o citocromo c oxidasa- planteaba dos posibles explicaciones. O bien el estrés salino/osmótico causaba ayuno de iones metálicos como Fe^{2+} o Cu^{2+} como se sabe que ocurre en el caso de estrés por pH alcalino (Serrano, R. et al. 2004) o bien, la función mitocondrial estaba involucrada en la tolerancia de la célula al estrés hiperosmótico.

Para comprobar si la causa del retraso en el crecimiento se explicaba por una menor disponibilidad de iones metálicos, se suplementaron las placas de medio sólido con y sin estrés salino con diferentes concentraciones de cobre y hierro (10 y 20 μM de Cu y con 100 y 150 μM de Fe). No se observó ninguna mejora de crecimiento de los mutantes que mostraban sensibilidad a estrés por NaCl (Figura R.1.1) lo cual permitía descartar la primera hipótesis.

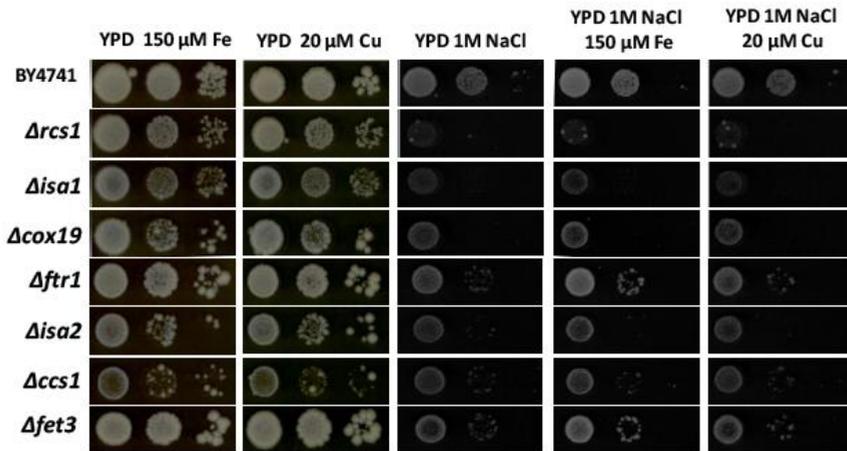


Figura R.1.1: Medida de sensibilidad al exceso de NaCl en mutantes afectados en la homeostasis de hierro y cobre cuando se suplementa el medio con un exceso de Cu^{2+} y Fe^{2+} . Todas las cepas que se observan en la figura fueron precultivadas durante 16 h en medio YPD, después fueron inoculadas en placas YPD + 1 M NaCl y en placas sin estrés (YPD) suplementadas con iones metálicos (150 μM Fe; 20 μM Cu) en todos los casos y se comparó su crecimiento con los diferentes tratamientos.

Para comprobar si la causa del retraso en el crecimiento se explicaba como consecuencia de la necesidad por parte de las células de tener una mitocondria funcional para adaptarse a la salinidad, se seleccionaron un grupo de mutantes con defectos en diversas funciones mitocondriales (Figura R.1.2.A): mutantes con deleciones en enzimas del ciclo del ácido cítrico como *ACO1* que codifica la aconitasa, proteína esencial del CAC y para el mantenimiento del genoma mitocondrial; mutantes en subunidades de la ATP sintasa como *ATP 5,7*, esenciales para la síntesis de ATP; mutantes en enzimas de la cadena de transporte de electrones como *COX6* que codifica la subunidad 6 de la citocromo c oxidasa; mutantes con deleciones en la RNA polimerasa mitocondrial, *RPO41*; o mutantes en factores implicados en la replicación y recombinación del DNA mitocondrial (*ABF2*). Observamos que mostraban una severa sensibilidad a altas concentraciones de Na^+ y en menor grado, a las elevadas concentraciones de K^+ . Estos resultados sugerían que la función mitocondrial en general era importante para la correcta adaptación al estrés salino/osmótico.

Una prueba más que avalaba esta segunda hipótesis era el hecho de que los mutantes $\Delta fzo1$ eran sensibles a estrés hiperosmótico como se muestra en la Figura R.1.2.B. *FZO1* codifica la única proteína mitofusina de la levadura, esencial para la fusión entre mitocondrias. En consecuencia, mutantes $\Delta fzo1$ manifiestan una morfología mitocondrial alterada donde estos orgánulos son pequeñas estructuras en forma de puntos que no fusionan entre ellos..

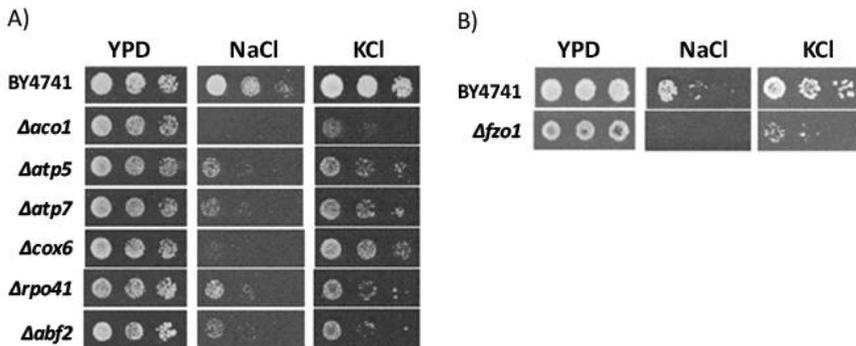


Figura R.1.2: Estudio de crecimiento y sensibilidad de diluciones seriadas de la cepa silvestre y las cepas mutantes que se indican en condiciones de estrés hiperosmótico. (Los mutantes con defectos en la actividad mitocondrial son sensibles a NaCl y KCl). (A) La cepa silvestre (BY4741) y las cepas mutantes mutantes ($\Delta aco1$, $\Delta atp5$ y $\Delta atp7$, $\Delta cox6$, $\Delta rpo41$ y $\Delta abf2$) fueron precultivadas durante 16 h en medio YPD y posteriormente incubadas en placas YPD o YPD suplementadas con 1 M NaCl o 1,5 M KCl. (B) BY4741 y $\Delta fzo1$ crecieron en placas sin estrés (YPD) y con estrés hiperosmótico (1 M NaCl o 1,5 M KCl).

Por otro lado, cabía la posibilidad que la peor adaptación de las cepas mutantes sometidas a estudio fuera consecuencia de la pérdida espontánea de DNA mitocondrial (mtDNA) de las mismas, convirtiéndose en células ρ^0 . Por ello se quiso comprobar el estado del mtDNA de las cepas mutantes para descartar que su pérdida fuera la causa de la sensibilidad observada al estrés osmótico.

Para el estudio se incluyeron todas las cepas con defectos en la mitocondria que iban a ser utilizadas en este trabajo. Algunos de estos defectos afectaban a funciones elementales de la mitocondria como era el caso de las mutaciones en los

Resultados

genes *ACO1*, *ATP5y7*, *COX6*, *RPO41* y *ABF2*. También se incluyó el estudio de la cepa $\Delta fzo1$ cuya mutación afectaba a la adecuada biogénesis de la mitocondria, cepas descritas con anterioridad. Pero además fueron incluidas otras cepas con mutaciones en distintas funciones mitocondriales de modo que el estudio incluyera el máximo de las implicaciones de la mitocondria a nivel celular como *HAP2,3* que codifican las subunidades 2 y 3 del complejo Hap2,3,4 y 5p, y que son activadores transcripcionales de la expresión de genes implicados en la respiración; *RTG1,3* codifican factores de transcripción implicados en la comunicación entre la mitocondria y el núcleo a través de la ruta retrógrada; *SDH2*, que codifica una proteína Fe-S subunidad del complejo succinato deshidrogenasa formado por Sdh1,2,3 y 4p, los cuales acoplan la oxidación del succinato a la transferencia de electrones a la ubiquitina como parte del CAC y de la cadena respiratoria mitocondrial; *SNF1*, que codifica una serina/treonina proteína quinasa que forma un complejo al asociarse con Snf4p, Sip1y2p y Gal83p, requerido para la transcripción de genes reprimidos por glucosa y activados por el metabolismo no fermentativo. La Figura R.1.3 muestra los resultados de la extracción demostrando que ninguna de estas cepas perdía el mtDNA al menos durante el estado logarítmico de crecimiento para el que se realizó este análisis.

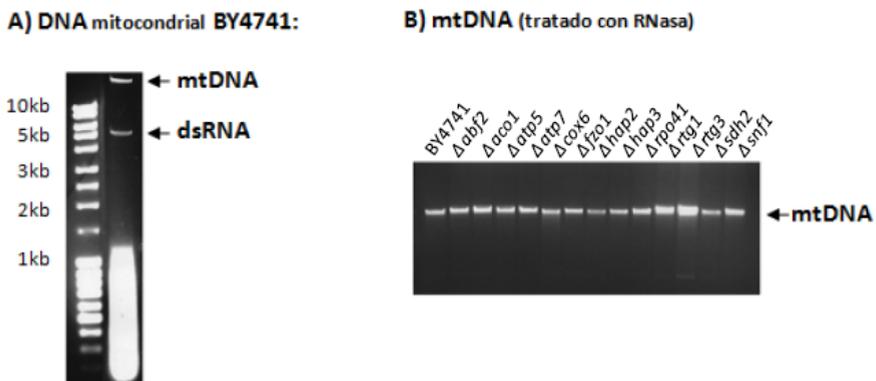


Figura R.1.3: Análisis de DNA mitocondrial de la cepas silvestre BY4741 y con defectos mitocondriales utilizadas en el presente trabajo. Para la extracción del DNA mitocondrial se aplicó el método descrito por Defontaine (1991) (A) La banda primera representa el genoma mitocondrial de la levadura *S. cerevisiae* que tiene un tamaño aproximado de 75 kb; la segunda banda que aparece en el gel representa (dsRNA) RNA vírico de doble hebra, integrado en el genoma mitocondrial que se replica con él de forma estable, cuyo tamaño es aproximadamente 4,6 kb. (B) Visualización del DNA mitocondrial de las cepas que se indican después de ser sometidas a un tratamiento con RNasa.

2.- REGULACIÓN SELECTIVA DE LAS PROTEÍNAS MITOCONDRIALES BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO.

Una vez demostrado que muchas cepas con disfunciones mitocondriales mostraban osmosensibilidad y que esta sensibilidad no era consecuencia de una pérdida del mtDNA, se quiso averiguar si la mitocondria respondía de una manera adaptativa al estrés salino. Para ello se llevó a cabo como primer abordaje experimental la cuantificación de los niveles de varias proteínas mitocondriales antes y durante un choque osmótico (0,4 M NaCl) mediante ensayos de inmunodetección. Para determinar si la actividad de la mitocondria variaba en condiciones de estrés a través de su composición proteica se eligieron las proteínas Sdh2, Cox6, Cit1 (citrato sintasa mitocondrial, que cataliza la formación de citrato a partir de Acetil-CoA y oxalacetato), Atp5 e Idp1 (isocitrato deshidrogenasa, que cataliza la oxidación del isocitrato a α -cetoglutarato) puesto que se trataba de proteínas que participan en funciones elementales de la mitocondria, tales como el ciclo de Krebs, la cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa, y por tanto, los cambios en su expresión podían indicar cambios en la actividad mitocondrial. Para el análisis se utilizaron cepas cuyas proteínas habían sido etiquetadas con el epítipo GFP (*Green Fluorescent Protein*) bajo el control de su propio promotor. Los resultados mostraron que los niveles de Sdh2p, Cox6p y Cit1p aumentaban como consecuencia del estrés osmótico a partir de la segunda hora de tratamiento mientras que Atp5p e Idp1p no experimentaron cambios en su acumulación a lo largo del choque salino (Figura R.2.1A).

Utilizamos como control la cuantificación de los cambios en la acumulación de este mismo grupo de proteínas como consecuencia de un cambio diáuxico. Este fenómeno consiste en sustituir la fuente disponible de carbono fermentable (YPD 2% glucosa) por una no fermentable (YP EtOH3%), obligando a las células de *S. cerevisiae* a inducir la respiración y por tanto a activar la mitocondria (Ohlmeier, S. et al. 2004). Como se observa en la Figura R.2.1B, los niveles de las proteínas Sdh2, Cox6, Cit1, Atp5 e Idp1, aumentan en todos los casos.

Los niveles de Sdh2p, Cit1p y Cox6p cuando las células crecían en un medio rico en glucosa y sin estrés salino eran tan bajos que resultaban casi indetectables. Para visualizar las modificaciones en la acumulación de estas proteínas en los

Resultados

primeros momentos de estrés, utilizamos cepas cuyos genes *SDH1*, *SDH2* y *ATP5* estaban fusionados al epítipo TAP, detectable con mayor facilidad. La mayor sensibilidad del ensayo permitió visualizar la inducción en los casos de Sdh1p y Sdh2p después de los primeros 30 minutos de tratamiento como se observa en la Figura R.2.1C. Además confirmamos que Atp5p no se regula por estrés salino.

Tomados en conjunto, estos datos sugerían que el estrés causado por NaCl causa una regulación **parcial y selectiva** de las proteínas mitocondriales, la cual ocurre rápidamente después del tratamiento salino.

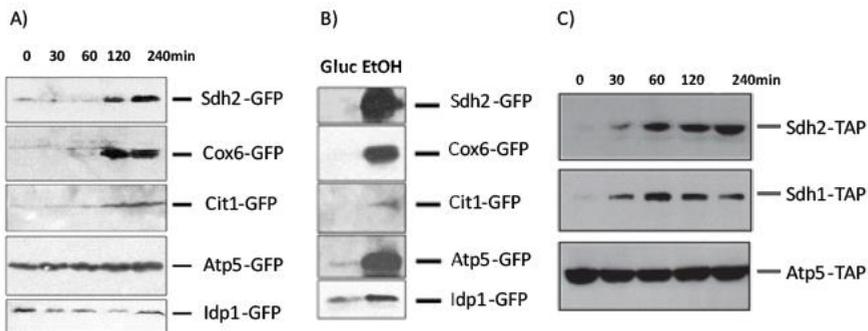


Figura R.2.1: Análisis de Inmunodetección de las proteínas Sdh1, Sdh2, Cox6, Cit1, Atp5 e Idp1 en respuesta a estrés. (A) Las cepas indicadas en la figura expresan *SDH2*, *COX6*, *CIT1*, *ATP5* e *IDP1* con fusiones GFP C-terminal bajo el control de su propio promotor. Los cultivos fueron incubados en medio YPD y posteriormente tratados con 0,4 M NaCl de donde fueron recogidos a diferentes tiempos de exposición al estrés (tiempo 0 = cultivo sin sal). Cantidades equivalentes de proteína total fueron resueltas en geles SDS-PAGE y las proteínas etiquetadas con GFP fueron visualizadas utilizando el anticuerpo α -GFP. (B) Las mismas cepas de levadura crecieron en medio YPD2% glucosa (Gluc) o YPEtOH (3% etanol) hasta fase logarítmica y cantidades equivalentes de proteína total fueron resueltas y analizadas por *western-blot* como en (A). (C) Las cepas de levadura que expresan *SDH1*, *SDH2* y *ATP5* fusionados al epítipo C-terminal TAP bajo el control de su propio promotor fueron sometidas a idénticas condiciones que (A) y analizadas por *western-blot* utilizando el anticuerpo α -PAP*.

* α -PAP reconoce el epítipo -TAP.

Con el objetivo de visualizar posibles cambios en la acumulación de las proteínas con funciones mitocondriales como consecuencia del estrés hiperosmótico a nivel del orgánulo *in vivo*, se utilizaron las cepas Sdh2p-GFP y Cox6p-GFP para la detección de la fluorescencia mediante microscopía confocal.

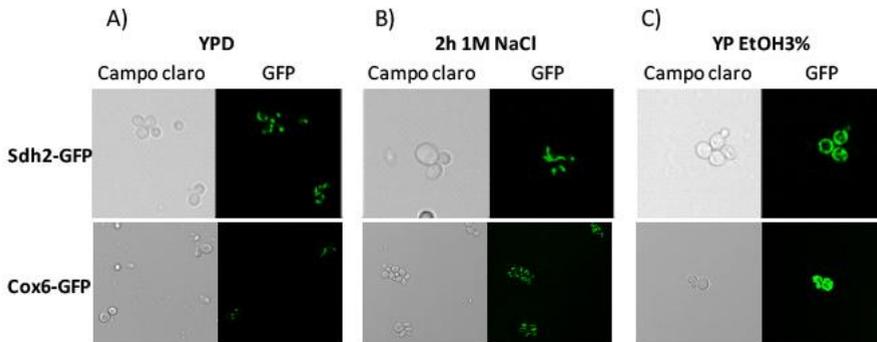


Figura R.2.2: Microscopía confocal de Sdh2-GFP y Cox6-GFP. Las células de levadura que expresan Sdh2p y Cox6p con fusiones C-terminales GFP bajo el control de su propio promotor, crecieron en medios fermentables (YPD), no fermentables (YPEtOH3%) o hiperosmóticos (2h YPD + 1 M NaCl). (A) Las mitocondrias de las células que disponían de fuentes de C fermentables para su crecimiento muestran menor intensidad de fluorescencia. (B) Aquéllas sometidas a estrés hiperosmótico muestran un aumento sutil de la fluorescencia, lo cual significa que estas proteínas se acumulan durante la adaptación al estrés. (C) Las mitocondrias de las que crecieron en medio YPEtOH3% forman una extensa red ocupando gran parte del citosol como consecuencia de la inducción de la respiración.

Como se observa en la Figura R.2.2, se detectó menor intensidad de fluorescencia cuando las células crecían en YPD. Esta situación se corresponde a la represión de la actividad mitocondrial durante el metabolismo fermentativo y la ausencia de estrés. Cuando las células crecen en medio YPEtOH3%, obtienen la energía a partir de la respiración, y la mitocondria forma extensas redes tubulares. El caso de las células creciendo en YPD + 1 M NaCl (2h) parece mostrar una situación intermedia (R.2.2B). Se observa un aumento sutil de la fluorescencia visualizada a través de Sdh2p-GFP o Cox6p-GFP y la mitocondria se percibe elongada. Estos resultados avalan los obtenidos mediante inmunodetección de proteínas. Se puede afirmar que el estrés salino induce una respuesta mitocondrial selectiva a través de algunas proteínas, no de todas, y que esta inducción es discreta en comparación con la que se produce durante la respiración.

3.- CONTROL TRANSCRIPCIONAL DE *SDH2*, *COX6* Y *CIT1* EN RESPUESTA A ESTRÉS SALINO.

Según se ha visto, el estrés salino causa la acumulación de algunas proteínas mitocondriales como Sdh2, Cox6 y Cit1. Dado que el proceso de biosíntesis de proteínas está regulado y coordinado como consecuencia del reajuste de la expresión génica, el siguiente paso consistió en comprobar si la activación de las funciones mitocondriales en las que están implicadas estas proteínas por estrés salino tenía un componente transcripcional. Para ello se cuantificó la expresión de los genes *SDH2*, *COX6* y *CIT1* mediante análisis *Northern* en una cepa silvestre monitorizando la respuesta transcripcional durante los 20 primeros minutos de un choque osmótico a 0,4 M NaCl (Figura R.3.1). Se observó, por comparación con la expresión del gen constitutivo de actina (*ACT1*), una fuerte inducción de 5 a 12 veces de la transcripción de los genes sometidos a estudio, rápida y, en el caso de *SDH2* y *COX6*, transitoria, ya que los niveles de expresión caían después de los diez primeros minutos del tratamiento osmótico. Con estos resultados podíamos afirmar además, que la inducción de la expresión de los genes *SDH2*, *CIT1* y *COX6* coincidía con el comportamiento típico de genes que se activan en respuesta a estrés osmótico.

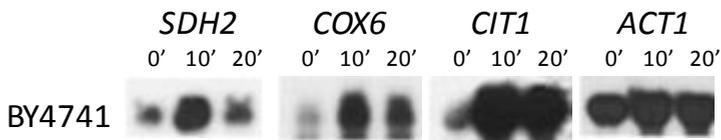


Figura R.3.1: Regulación transcripcional de los genes *SDH2*, *COX6* y *CIT1* en respuesta a estrés salino. La cepa silvestre (BY4741) fue sometida a un choque osmótico (0,4 M NaCl). Análisis cualitativo de los niveles de mRNA de los genes *SDH2*, *COX6*, *CIT1* y *ACT1* (actina) (sondas descritas en MM Tabla M.5) en la cepa silvestre. En todos los casos los valores han sido normalizados por comparación con el gen constitutivo de actina (*ACT1*).

Por otro lado se quiso analizar en qué grado estaban involucradas las quinasas de señalización Hog1 y Snf1 en la activación transcripcional de *SDH2*, *COX6* y *CIT1*. La MAP quinasa Hog1 es un regulador central del programa transcripcional en respuesta a estrés osmótico mientras que la proteína quinasa Snf1 es un activador del metabolismo respiratorio en respuesta al ayuno de

glucosa. Se comprobó, en primer lugar, que las cepas mutantes en cualquiera de estas dos rutas de señalización presentaban un fuerte fenotipo de sensibilidad cuando se las sometía a condiciones de estrés osmótico (Figura R.3.2).

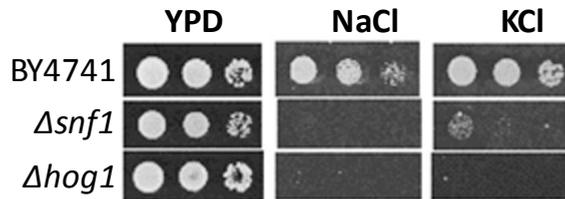


Figura R.3.2: Estudio de crecimiento y sensibilidad de diluciones seriadas de las cepas silvestre (BY4741) y mutantes $\Delta hog1$ y $\Delta snf1$. Las cepas con mutaciones en las rutas de señalización HOG y SNF son sensibles al estrés hiperosmótico.

Posteriormente, mediante el análisis *Northern* de los mutantes $\Delta hog1$ y $\Delta snf1$, se vio que la delección de *HOG1* impedía por completo la activación de la transcripción de *COX6* por estrés y disminuían parcialmente las de *SDH2* y *CIT1* mientras que la delección del gen *SNF1* impedía la inducción de *COX6* y disminuía parcialmente la de *SDH2* en condiciones de estrés salino (Figura R.3.3). Esto significaba que la inducción de la transcripción de estos genes en respuesta a sal era dependiente de las rutas HOG y SNF.

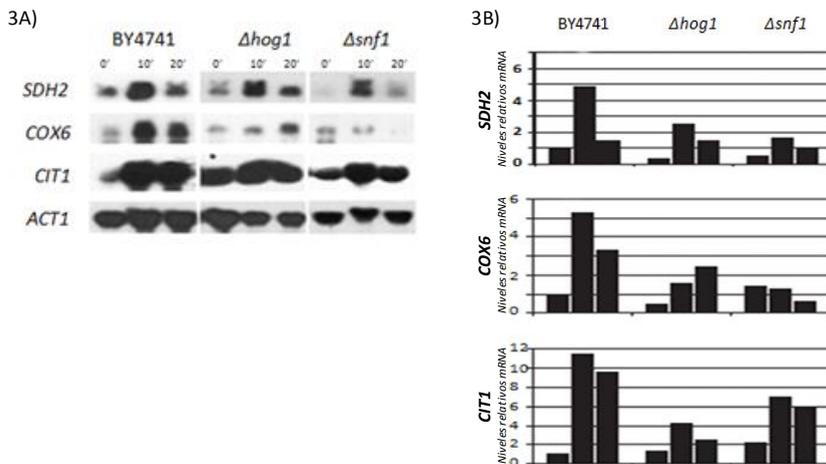


Figura R.3.3: Regulación transcripcional de los genes *SDH2*, *COX6* y *CIT1* en respuesta a estrés salino en las cepas silvestre (BY4741) y mutantes $\Delta hog1$ y $\Delta snf1$. Tanto la cepa silvestre (BY4741) como los mutantes $\Delta hog1$ y $\Delta snf1$, fueron sometidas a un choque osmótico (0,4 M NaCl) durante los tiempos que se indican. (3A) Análisis cualitativo de los niveles de mRNA de los genes *SDH2*, *COX6*, *CIT1* y *ACT1* (actina) en la cepa silvestre y mutantes en rutas de señalización HOG y SNF; (3B) Análisis cuantitativo de los niveles de mRNA de los genes *SDH2*, *COX6* y *CIT1* en la cepa silvestre y mutantes en rutas de señalización HOG y SNF. En todos los casos los valores han sido normalizados por comparación con el gen constitutivo de actina (*ACT1*).

Por último, se quiso comprobar cómo afectaba a la respuesta transcripcional de estos tres genes, la delección de alguno de los complejos de activación transcripcional RTG y HAP (Figura R.3.4). Rtg1p y 3p forman un complejo activador de la transcripción dependiente de la ruta retrógrada en respuesta a la disfunción mitocondrial. Hap2p, 3p y 4p forman un complejo activador transcripcional responsable de la activación de la respiración en condiciones de ayuno de glucosa. En condiciones de estrés, se observó que las mutaciones en *HAP2* y *3* tenían como consecuencia la pérdida completa de la inducción de *COX6*, mientras que la inducción de *SDH2* y *CIT1* sólo se veía afectada de manera sutil. En cuanto a la pérdida de función de *RTG1* y *3* afectaba sobre todo a la inducción de *CIT1* que, aunque seguía produciéndose, era al menos dos veces menor que la inducción del mismo gen en una cepa silvestre. *SDH2* y *COX6* parecían ser independientes de *RTG1* y *3*. Podemos concluir diciendo que la expresión de *COX6* es totalmente dependiente de la activación a través de Hap2p, 3p y 4p; que la expresión de *SDH2*

sólo depende parcialmente de la ruta Hap2p, 3p y 4p y que la expresión de *CIT1* depende de Rtg1p, 3p.

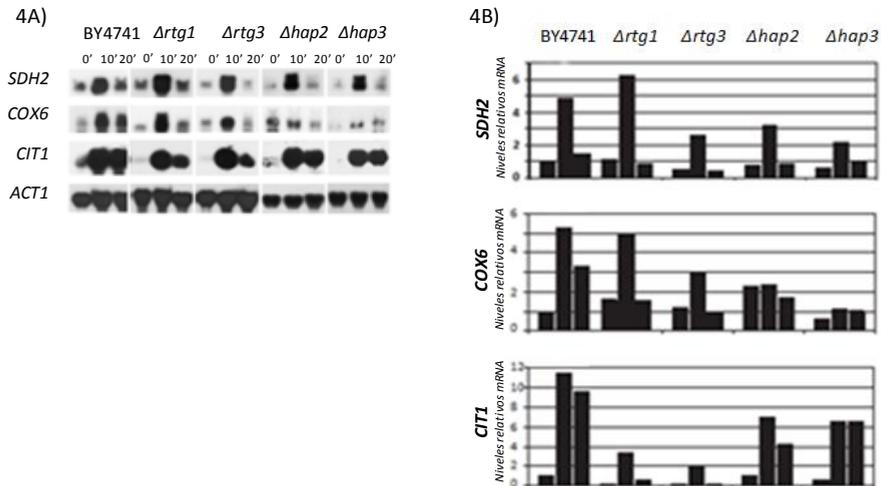


Figura R.3.4: Regulación transcripcional de los genes *SDH2*, *COX6* y *CIT1* en respuesta a estrés salino en las cepas silvestre (BY4741) y mutantes en los complejos de activación transcripcional RTG y HAP. Tanto la cepa silvestre (BY4741) como los mutantes $\Delta rtg1$ y $\Delta hap2$ y $\Delta hap3$ fueron sometidas a un choque osmótico (0,4 M NaCl) durante los tiempos que se indican. (4 A) Análisis cualitativo de los niveles de mRNA de los genes *SDH2*, *COX6*, *CIT1* y *ACT1* en las cepas silvestre y mutantes para activadores de la transcripción $\Delta hap2$ y $\Delta hap3$ y $\Delta rtg1$ y $\Delta rtg3$. (4 B) Análisis cuantitativo de los niveles de mRNA de los genes *SDH2*, *COX6* y *CIT1* en las cepas silvestre y mutantes para activadores de la transcripción $\Delta hap2$ y $\Delta hap3$ y $\Delta rtg1$ y $\Delta rtg3$. En todos los casos los valores han sido normalizados por comparación con el gen constitutivo de actina (*ACT1*).

Las Figuras R.3.1, R.3.3 y R.3.4 muestran que se produce una rápida activación de la transcripción de los genes *SDH2*, *COX6* y *CIT1* como respuesta al tratamiento hiperosmótico y que este incremento de la expresión es parcialmente dependiente de las quinasas de señalización (Snf1 y Hog1) y de los activadores transcripcionales (Hap2, 3 y 4 y Rtg1 y 3).

4.- MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA SUCCINATO DESHIDROGENASA DURANTE LA RESPUESTA CELULAR AL ESTRÉS OSMÓTICO.

Dado que existía una regulación de la mitocondria a nivel transcripcional, quisimos saber si el estrés hiperosmótico causaba cambios en la funcionalidad de la mitocondria. Para ello medimos los niveles de actividad enzimática de la succinato deshidrogenasa (SDH) que cataliza la oxidación de succinato a fumarato en el ciclo de Krebs. El ensayo fue llevado a cabo con la cepa silvestre BY4741 y los mutantes $\Delta hog1$, $\Delta snf1$, $\Delta rtg1$, $\Delta rtg3$ y $\Delta hap2$ cultivados en YPD y después del tratamiento de 2 horas con 0,4M NaCl (Figura R.4). Observamos que, en el caso de la cepa silvestre, la adición de sal al medio provocaba un aumento de la actividad enzimática de 2,5 veces mientras que los mutantes mostraban diferentes comportamientos en función del gen delecionado. La pérdida de la MAP quinasa Hog1 ($\Delta hog1$), no alteraba la inducción de la actividad SDH, así como tampoco el mutante $\Delta hap2$ afectaba a la regulación de esta actividad enzimática. En cambio la inducción de la actividad mitocondrial SDH como respuesta al choque salino, desaparecía en $\Delta snf1$. En los mutantes $\Delta rtg1$ y $\Delta rtg3$ también se redujo significativamente el aumento de la actividad SDH.

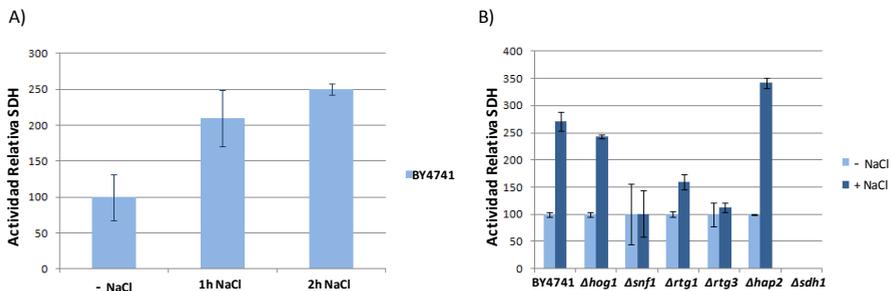


Figura R.4: Regulación de la actividad enzimática Succinato Deshidrogenasa (SDH) en respuesta al estrés salino. (A) Representación de la actividad SDH medida en una cepa silvestre (BY4741) en medio YPD sin estrés y después de 1 y 2 horas de tratamiento hipersalino (YPD+0,4 M NaCl). (B) Representación de la actividad enzimática de las células BY4741 y los mutantes $\Delta hog1$, $\Delta snf1$, $\Delta rtg1$, $\Delta rtg3$ y $\Delta hap2$ antes y después del tratamiento con 0,4M NaCl durante 2h. Las barras de la figura representan la media de los valores obtenidos de tres cultivos independientes por duplicado. Al valor basal de actividad de cada una de las cepas cultivadas en YPD se le dio un valor de 100, obteniendo para las cepas tratadas con sal valores relativos respecto del valor de actividad de la misma cepa sin estrés.

5.- PAPEL DE LA MITOCONDRIA EN LA ACTIVACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN RESPUESTA A ESTRÉS OSMÓTICO.

Los resultados obtenidos en apartados anteriores sugerían que la mitocondria era un componente importante para la adaptación de las células de levadura al estrés osmótico. El siguiente paso consistía en la identificación de una posible función protectora de este orgánulo durante la adaptación.

La capacidad de las células de levadura para sobrevivir en medios hiperosmóticos depende en primer grado de la ruta de señalización HOG. A través de ella se controlan varios factores de transcripción responsables de la activación de un complejo programa transcripcional nuclear que involucra la activación masiva de la transcripción de un gran número de genes. Por lo tanto, una adaptación eficiente al estrés osmótico debe depender de una correcta regulación transcripcional.

Se quiso dilucidar si los defectos mitocondriales estudiados podían tener como consecuencia una insuficiente activación transcripcional durante la adaptación de las células al estrés hiperosmótico y ser por tanto la causa de la acusada sensibilidad. Para ello se monitorizó la activación de la transcripción durante la exposición al estrés utilizando la construcción (*CYC1*-(2xCRE)-*lacZ*; pMP224) (Figura R.5.A) por ser altamente inducible en condiciones hiperosmóticas y permitir la cuantificación de la expresión inducida a través de la actividad β -galactosidasa. La construcción está formada por la región promotora del gen *CYC1*, cuyos elementos reguladores han sido sustituidos por dos repeticiones de CRE (*Cyclic AMP Response Elements*) y el gen *lacZ* que codifica para la β -galactosidasa.

En el estudio de la respuesta transcripcional al estrés se incluyeron la cepa silvestre (Wt) y los mutantes con defectos mitocondriales que habían mostrado sensibilidad a estrés salino en anteriores análisis como *Δatp5*, *Δcox6*, *Δfzo1* y *Δsdh1*. Además, se usó la cepa *Δhog1* como control negativo incapaz de estimular la transcripción en respuesta al estrés osmótico. En el caso de la exposición a 1 M KCl, la máxima inducción en la cepa silvestre ocurría después de 60 minutos de tratamiento observándose un ligero retraso en la inducción de algunos mutantes, sobre todo durante los primeros 30 minutos de tratamiento, aunque después eran capaces de recuperar los niveles de expresión de la cepa silvestre (Figura R.5.B).

Resultados

Para verificar estos resultados se escogieron condiciones de estrés más severas, 1 M NaCl. El perfil de la curva de inducción era distinto. Por un lado la inducción era más lenta, como consecuencia de la mayor toxicidad del Na⁺, siendo la máxima inducción a los 120 minutos tras el tratamiento. Los mutantes mostraron una ligera disminución de la inducción de la expresión génica en relación a la cepa salvaje, sin embargo esta menor inducción era casi insignificante si la comparamos con el comportamiento de la cepa *Δhog1*. Esto significaba que aunque la función mitocondrial estaba relacionada con la respuesta transcripcional al estrés, el retraso en la expresión de los genes estudiados observado era suficientemente sutil como para no poder ser la única explicación de la sensibilidad que los mutantes con defectos mitocondriales experimentaban.

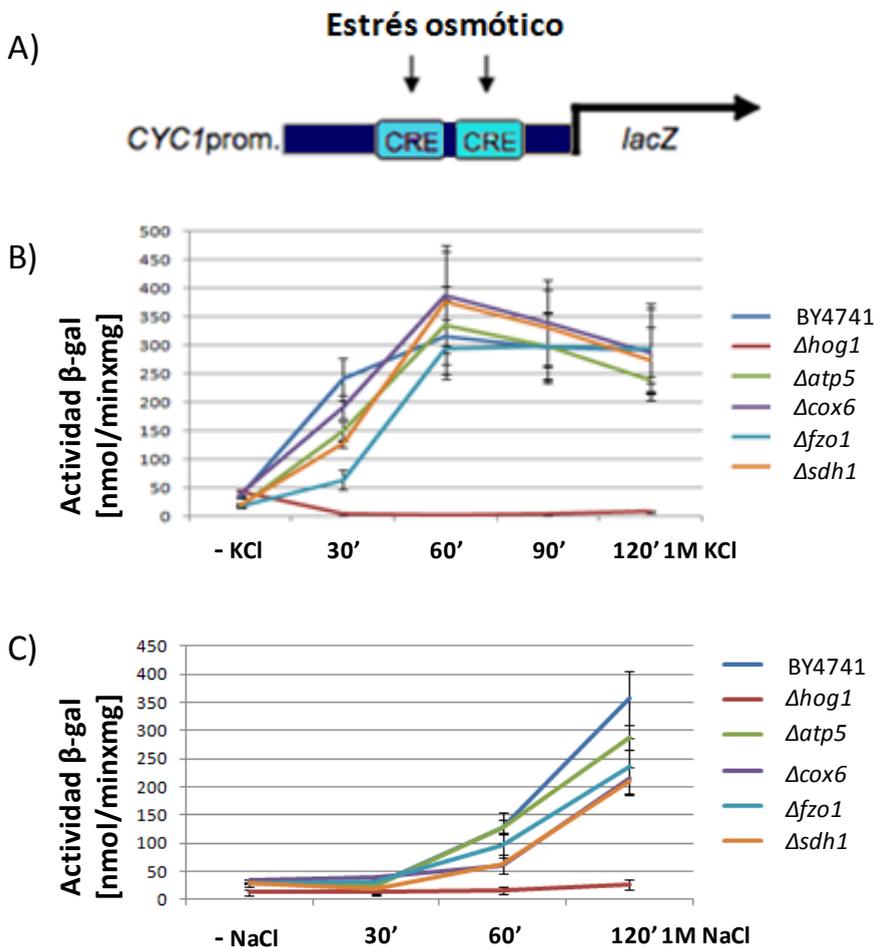


Figura R.5: Medida de la inducción de la expresión génica por estrés osmótico a las cepas de levadura silvestre y mutantes mitocondriales ($\Delta hog1$, $\Delta atp5$, $\Delta cox6$, $\Delta fzo1$ y $\Delta sdh1$). (A) Plásmido delador usado en el estudio. La construcción contiene el promotor basal del gen *CYC1* fusionado con el gen *lacZ* que codifica la β -galactosidasa. En el promotor de *CYC1* fueron insertados dos elementos CRE (*cAMP Responsive Element*) que confieren alta inducibilidad por estrés osmótico (pMP224, Proft and Serrano, 1999). (B) Las cepas indicadas transformadas con pMP224 fueron sometidas a estrés osmótico (1 M KCl). La actividad β -galactosidasa fue determinada mediante ensayo colorimétrico y los resultados representados corresponden a la media de tres experimentos independientes por duplicado. (C) Las cepas indicadas transformadas con pMP224 fueron sometidas a estrés osmótico por 1M NaCl. La actividad β -galactosidasa fue determinada como en

6.- MEDIDA DE LA ACUMULACIÓN DE GLICEROL INTRACELULAR EN RESPUESTA AL ESTRÉS OSMÓTICO.

La ruta HOG regula la síntesis de glicerol, osmolito compatible que se acumula en la célula para contrarrestar los efectos negativos de la deshidratación causada por el estrés osmótico además de poder ser utilizado por las células como fuente de C y energía (Folch-Mallol, J. L. et al. 2004). Las cepas mutantes con defectos en la biosíntesis de glicerol son osmosensibles (Zhuge, J. and Wang, Z. 1999). La acumulación de glicerol es esencial para la osmotolerancia por lo que para comprobar si el defecto en la tolerancia al estrés era consecuencia de una menor síntesis de glicerol se cuantificaron las concentraciones de glicerol en las cepas silvestre (Wt) y mutantes con defectos en funciones mitocondriales (Δaco1 , Δcox6 , Δsnf1 y Δfzo1).

Se observó, en primer lugar, que se producía una fuerte inducción de la síntesis del osmolito durante las 2 primeras horas de estrés, y que el glicerol sintetizado se acumulaba en la célula mientras duraban las condiciones adversas (después de 4 h de tratamiento). Por otro lado los mutantes eran capaces de acumular y de mantener cantidades comparables a las de las células silvestres, por lo que se descartaba que el defecto en la concentración de glicerol en mutantes mitocondriales fuera la causa de la sensibilidad al estrés osmótico.

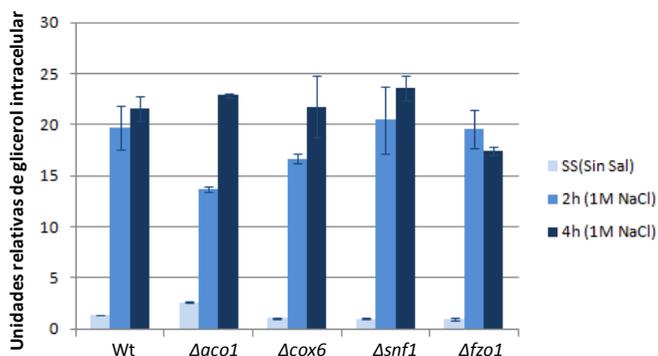


Figura R.6: Medida de la acumulación de glicerol intracelular en respuesta a estrés osmótico en la levadura silvestre y las cepas mutantes en funciones mitocondriales Δaco1 , Δcox6 y Δfzo1 o en su regulación, Δsnf1 . Cuantificación del glicerol intracelular de células silvestres cepa BY4741 (Wt) y mutantes Δaco1 , Δcox6 , Δsnf1 y Δfzo1 , creciendo en YPD (SS) y en YPD + 1 M NaCl durante 2 h o 4 h. Los valores representados son el resultado de la media obtenida de dos experimentos independientes con tres réplicas de cada muestra.

7.- ANÁLISIS DE LA RATIO ENERGÉTICA EN MUTANTES CON DEFECTOS MITOCONDRIALES EN CONDICIONES DE ESTRÉS OSMÓTICO.

La mitocondria es el orgánulo responsable de la síntesis de ATP a través del ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa. El crecimiento de las células de levadura en medios hiperosmóticos tiene mayores exigencias energéticas. Esto se debe a la necesidad de mantener una concentración iónica intracelular menor que en el exterior, lo que supone mantener muy activos los sistemas de transporte de iones a través de las membranas, al mayor consumo energético que supone la síntesis de glicerol para mantener la turgencia y el lumen celular (Olz, R. et al. 1993) y a la inducción de la expresión de genes de defensa.

El siguiente objetivo consistió en estudiar en qué medida los defectos en la síntesis de ATP podían ser la causa de los retrasos en el crecimiento en las cepas con disfunciones mitocondriales cuando éstas crecían bajo condiciones de estrés salino. Para ello se cuantificaron los niveles intracelulares de ATP y AMP y se compararon las ratios energéticas de las células silvestres y los mutantes *Δaco1*, *Δcox6*, *Δsdh1*, *Δfzo1* y *Δsnf1* en condiciones óptimas de crecimiento (YPD) y en presencia de estrés hiperosmótico. Cada una de las cepas analizadas fue cultivada en medio YPD hasta una OD₆₆₀ aproximada de 0,6 de donde se separó un volumen de muestra para ser analizada como condición control. El resto del cultivo fue sometido a un choque osmótico con 1 M NaCl durante 2 h. Las células fueron inmediatamente fijadas con metanol para mantener inalteradas las condiciones fisiológicas y se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) para separar los nucleótidos en función de las diferencias en su composición química.

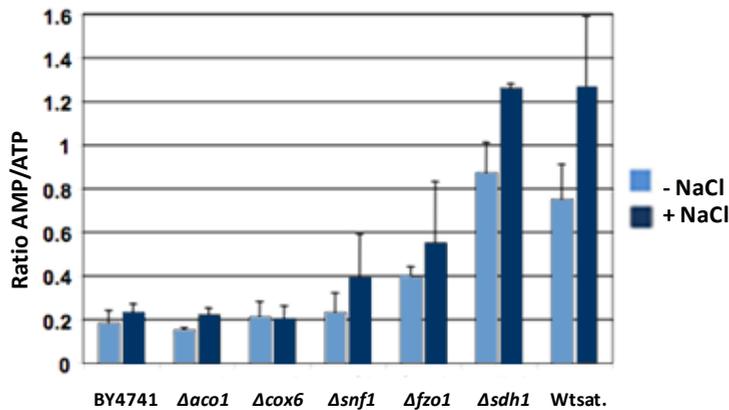


Figura R.7: Medida de la ratio AMP/ATP en células de levadura silvestre y mutantes con defectos mitocondriales con y sin tratamiento salino (2 h 1 M NaCl). Las células BY4741 y los mutantes indicados crecieron en medio YPD o fueron sometidos a un choque osmótico de 2 h, 1 M NaCl. De cada uno de los cultivos se extrajeron los nucleótidos (MM 2.6.2) y se cuantificaron mediante HPLC. La relación AMP/ATP se calculó para cada cultivo por triplicado. Se utilizó como control una cepa de levadura BY4741 en fase estacionaria de crecimiento (Wtsat.).

Como se muestra en la Figura R.7, las células de levadura silvestre mantenían un nivel bajo de AMP respecto de ATP aun después del choque salino. Las cepas $\Deltaaco1$ y $\Deltacox6$ no mostraron diferencias significativas respecto de la cepa silvestre, lo cual significa que eran capaces de mantener un balance energético positivo durante el estrés a pesar de sus deficiencias mitocondriales. La ratio AMP/ATP fue ligeramente superior en el caso de $\Deltasnf1$ y $\Deltafzo1$. La cepa que mayores dificultades mostró en mantener un ratio energético positivo fue $\Deltasdh1$, comparable al de una cepa silvestre en estado estacionario. En ningún caso se observó una caída significativa de los niveles de ATP, por lo que concluimos que la severa osmosensibilidad de los mutantes no viene determinada únicamente por el incremento en el ratio AMP/ATP o al menos, éste no explica completamente la sensibilidad de los mutantes defectivos para las funciones mitocondriales.

8.- ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL IMPLICADA EN LA PRODUCCIÓN/DETOXIFICACIÓN DE ROS DURANTE EL ESTRÉS OSMÓTICO.

Las células de levadura son organismos aerobios facultativos que en determinadas condiciones, son capaces de utilizar el O_2 para respirar obteniendo un mayor rendimiento energético que durante la fermentación. Pero la vida en condiciones aeróbicas tiene como consecuencia inevitable la producción de formas parcialmente reducidas de O_2 , que debido a su elevada reactividad y su poder oxidante, son nocivas para la célula. Estas ROS incluyen al superóxido ($O_2^{\cdot -}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y al radical hidroxilo (OH^{\cdot}) que reaccionan con biomoléculas inactivando su función. La mitocondria es el orgánulo donde se sintetizan mayoritariamente estas especies reactivas de oxígeno debido a que es en la membrana interna de este orgánulo donde se localiza la cadena de transporte electrónico. Por ello, se creyó necesario conocer cómo afectaba el estrés salino a la mitocondria en cuanto a la síntesis y la detoxificación de ROS

Se midieron los niveles de ROS en diferentes mutantes con disfunciones mitocondriales y en una cepa silvestre de levadura antes y después de un tratamiento salino. Las células de levadura Wt (BY4741) y las cepas isogénicas *Δsnf1*, *Δaco1*, *Δsdh1* y *Δfzo1* crecieron en YPD y posteriormente fueron sometidas a un choque osmótico de 1 M NaCl durante 2h. La cuantificación se realizó midiendo la fluorescencia emitida por la oxidación de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H_2DCF) a su forma fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) que detecta el peróxido de hidrógeno intracelular mediante la acción de las peroxidasas, citocromo c o Fe^{2+} . El H_2DCF -DA es un compuesto apolar que se incorpora a las células donde se convierte en H_2DCF por acción de unas esterasas intracelulares. El H_2DCF no emite fluorescencia pero, al ser oxidado por el peróxido de hidrógeno, se convierte en fluoresceína (DCF) altamente fluorescente que puede ser detectada y cuantificada mediante un fluorímetro. Se observó que el estrés salino causado por el tratamiento 1 M NaCl durante 2h provocaba un aumento de la acumulación de ROS en todos los casos. En las células silvestres (Wt), los niveles de ROS se duplicaban cuando se las sometía al tratamiento hiperosmótico. En los mutantes *Δsnf1*, *Δaco1*, *Δsdh1* y *Δfzo1*, defectivos en el metabolismo y la biogénesis mitocondrial respectivamente, se observaron niveles basales de ROS cuando crecía en medio

Resultados

YPD comparables a los niveles de las células Wt con sal, y este aumento de ROS se disparaba en condiciones de osmoestrés (Figura R.8.1).

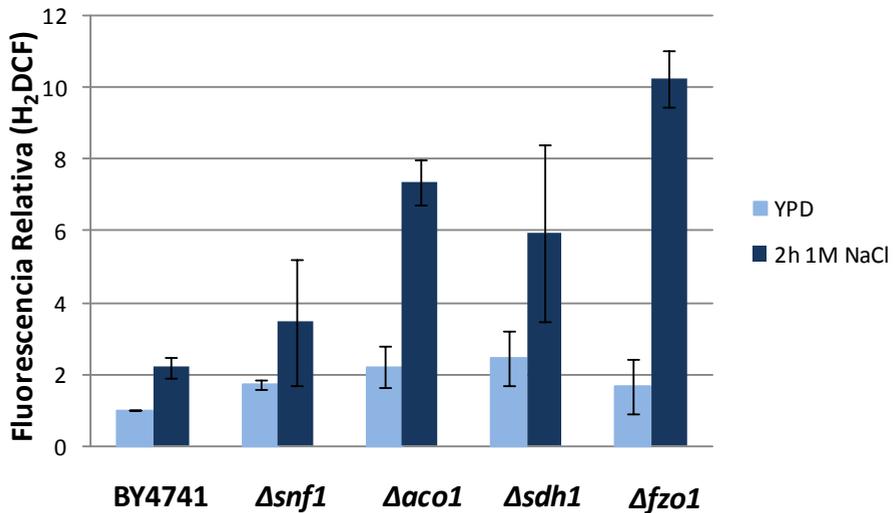


Figura R.8.1: Cuantificación de ROS en células de levaduras silvestre (BY4741) y mutantes $\Delta snf1$, $\Delta aco1$, $\Delta sdh1$ y $\Delta fzo1$ mediante fluorescencia. (Los defectos mitocondriales y la pérdida de función Snf1 causan hiperacumulación de ROS bajo condiciones de estrés). Todos los cultivos fueron cultivados en medio YPD y posteriormente separados en dos subcultivos, uno de los cuales se mantuvo en YPD mientras que el otro fue sometido a tratamiento osmótico 2h 1 M NaCl. Se cuantificaron los niveles de ROS por oxidación de dicloro-dihidro-fluoresceína. Los valores medios se representaron en relación a la fluorescencia de la cepa silvestre (YPD) y son el resultado de la media de tres cultivos independientes por duplicado.

Dado que la vida media de estas especies ROS es relativamente corta y por tanto su cuantificación resultaba compleja y que además sabemos que en las células coexisten diferentes formas de oxígeno reactivo y el análisis DCF podía estar dando una visión parcial de los hechos, consideramos necesario confirmar estos resultados utilizando microscopía de fluorescencia que permitía su visualización mediante ensayos *in vivo*. Para ello se utilizó el agente hidroxietidio (HE) capaz de reaccionar con el radical superóxido producido por la NADPH oxidasa ligada a la membrana interna mitocondrial, dando lugar al subproducto fluorescente etidio.

El HE se utilizó para analizar cualitativamente el estrés oxidativo que sufrían las células de levaduras antes y después del estrés hiperosmótico como consecuencia del desacoplamiento en la fosforilación oxidativa y se confirmó que los mutantes $\Delta snf1$, $\Delta aco1$ y $\Delta fzo1$ mostraban una sobreproducción de ROS bajo condiciones de estrés salino (R.8.2).

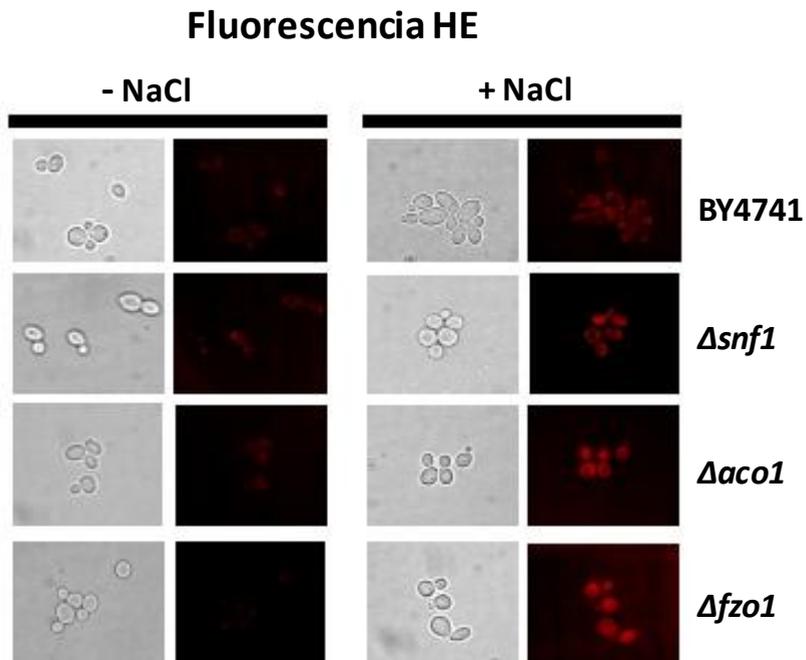


Figura R.8.2: Medida cualitativa de ROS en células de levaduras *in vivo* silvestres (BY4741) y mutantes $\Delta snf1$, $\Delta aco1$, y $\Delta fzo1$ mediante fluorescencia HE. Los cultivos fueron cultivados en medio YPD y posteriormente sometidos o no a tratamiento osmótico 2h 1 M NaCl. Se cuantificaron los niveles de ROS por visualización de la oxidación de HE.

9.- ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ADICIÓN DE ANTIOXIDANTES SOBRE EL CRECIMIENTO DE CEPAS MUTANTES MITOCONDRIALES SOMETIDAS A ESTRÉS OSMÓTICO.

Las células de levadura mantienen en relativo equilibrio las concentraciones de ROS regulando tanto su producción como su detoxificación. Estos procesos de síntesis-detoxificación de ROS se producen mayoritariamente en la mitocondria y una perturbación en este frágil equilibrio genera el estrés oxidativo en la célula que puede derivar en la muerte celular. Para determinar el papel que ejerce la mitocondria durante la formación y la degradación de estas especies bajo condiciones de estrés salino, fueron investigados los efectos de la suplementación con antioxidantes en la cinética de crecimiento de cepas de levadura tratadas con NaCl. El objetivo de este análisis era comprobar en qué medida el estrés oxidativo que se desencadena como consecuencia del estrés osmótico era el causante de la sensibilidad de los mutantes mitocondriales.

Se utilizó glutatión (GSH, γ -L-glutamyl-L-cistinilglicina) añadido a las placas de YPD e YPD + 1 M NaCl para evitar los daños oxidativos. Este tripéptido protege a la célula frente a las diferentes especies oxidantes puesto que es capaz de ceder electrones a las ROS, disminuyendo así su reactividad. Actúa como un agente reductor que en condiciones normales se encuentra en la célula en forma reducida, GSH, pero que pasa a la forma oxidada, GSSG, sin que esta forma de la molécula suponga ningún daño oxidativo para la célula.

Para el ensayo se monitorizó el crecimiento de las células de levadura Wt y mutantes mitocondriales en microplacas con YPD / YPD + 1 M NaCl / YPD + 5 mM glutatión / YPD + 1 M NaCl + 5 mM glutatión. Como muestra la figura R.9 los mutantes de metabolismo mitocondrial (*Δaco1*, *Δsdh1*), de biogénesis (*Δfzo1*) y de regulación (*Δsnf1*) mostraban un importante retraso y una peor eficiencia de crecimiento bajo condiciones de estrés salino. Los mutantes del complejo ATP sintasa mitocondrial (*Δatp7*) mostraron un defecto del crecimiento sutil. La adición de glutatión al medio mejoró significativamente el crecimiento de todas las cepas deficientes en funciones mitocondriales, rescatándose parcialmente la sensibilidad. Este resultado indica que los daños oxidativos causados por la disfunción mitocondrial son fisiológicamente importantes en condiciones de estrés salino.

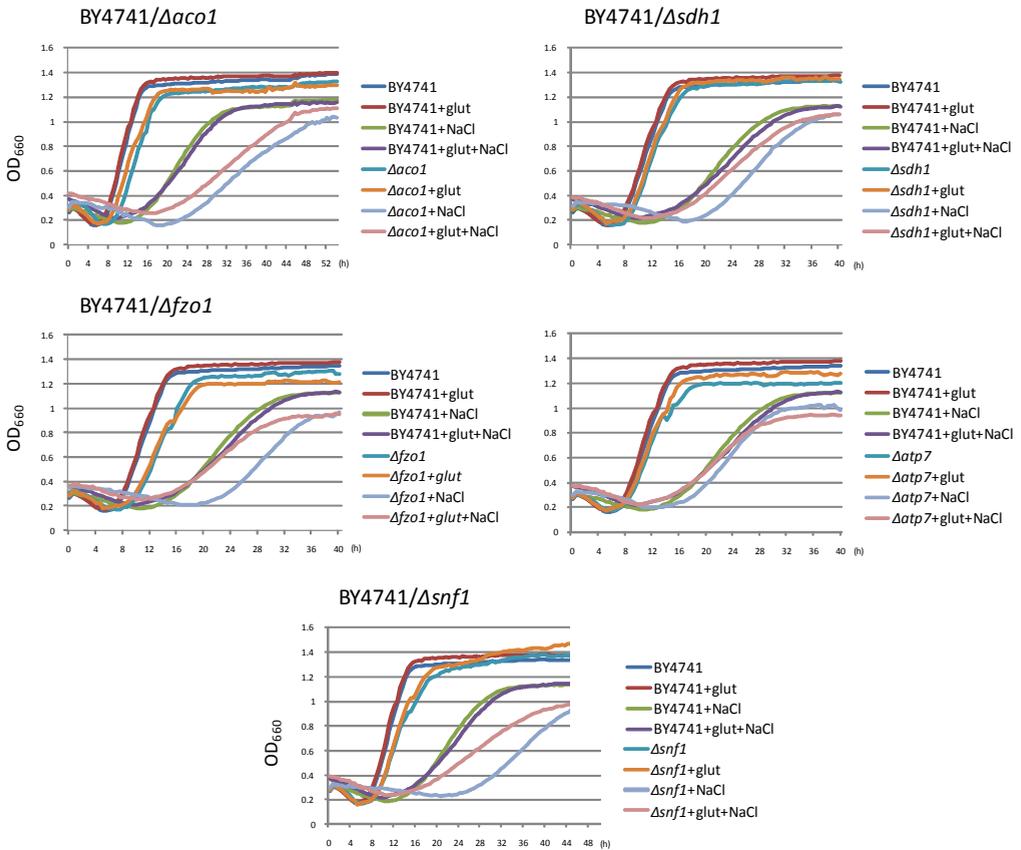


Figura R.9: Análisis de crecimiento de la cepa silvestre y mutantes mitocondriales cuando se añaden antioxidantes al medio. (La adición del antioxidante glutatión rescata parcialmente el crecimiento de mutantes con defectos mitocondriales en medio hipersalino). Se monitorizó mediante Bioscreen el crecimiento de las cepas BY4741 y *Δsdh1*, *Δfzo1*, *Δsnf1*, *Δaco1* y *Δatp7* en medios YPD, YPD + 1 M NaCl, YPD + 5 mM glutatión e YPD + 1 M NaCl + 5 mM glutatión a lo largo de 48h de incubación a 28°C. Las curvas de la figura representan los valores medios de tres repeticiones independientes.

10.- ANÁLISIS DEL EFECTO DEL PRECULTIVO DE CÉLULAS DE LEVADURA SOMETIDAS A ESTRÉS OSMÓTICO EN FUENTES DE CARBONO NO FERMENTABLES.

La supervivencia de una célula depende de su capacidad para adaptarse con rapidez a los cambios en el ambiente que le rodea. Esto es especialmente importante en los organismos unicelulares que han de sobrevivir en ambientes cambiantes enfrentándose frecuentemente a situaciones nuevas. Por ello, una vez demostrada la importancia de disponer de una mitocondria funcional en la adaptación al estrés salino, se propuso la posibilidad de que la pre-activación de la mitocondria a través de la inducción de la respiración fuera ventajosa para la supervivencia en estrés hiperosmótico.

Para inducir la activación de la mitocondria se incubaron las células en medios que obligan a la célula a obtener la energía a través de la respiración. Se comparó el crecimiento de células de levadura silvestre creciendo en medios con diferentes fuentes de carbono. Se utilizó YPD, rico en glucosa, que reprime el metabolismo mitocondrial, YPGalactosa, en el que el metabolismo mitocondrial está parcialmente activado, y YP glicerol y etanol, que activan el metabolismo mitocondrial, en placas con altas concentraciones de sales (1 M NaCl o 1,5 M KCl). El objetivo de este análisis comparativo era descubrir si las células que contaban con mitocondrias más, eran capaces de adaptarse mejor a condiciones hiperosmóticas. Como se muestra en la Figura R.10, el precultivo de la cepa silvestre (BY4741), tanto en galactosa como en glicerol y etanol, confirieron resistencia a estrés salino en comparación con las células crecidas en glucosa. Este resultado confirmaba que la pre-activación de la respiración era ventajosa para la tolerancia a la salinidad de las células de levadura.

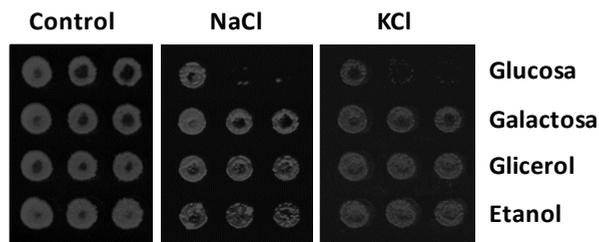


Figura R.10: Efecto de la preactivación de la mitocondria sobre la tolerancia al estrés osmótico. Estudio de crecimiento y sensibilidad de las diluciones seriadas de células de levadura BY4741 en medio YPD, YPD+1M NaCl, YPD + 1,5M KCl tras ser cultivadas en medios que permiten la pre-activación de la mitocondria en diferentes grados: YPD (2% glucosa), YPGal (2% galactosa), YPGli (3% glicerol) o YPE (3% etanol) hasta alcanzar la fase logarítmica.

11.- IDENTIFICACIÓN A GRAN ESCALA DE LAS PROTEÍNAS MITOCONDRIALES REGULADAS POR ESTRÉS SALINO.

El análisis de proteínas es una herramienta fundamental para el estudio de la respuesta al estrés puesto que la observación a nivel de expresión génica comporta ciertas limitaciones debido a que muchas veces existe poca correlación entre los cambios en la abundancia de un RNA mensajero (mRNA) y la proteína que codifica (Rose, A. et al. 2004). Además, los cambios post-traduccionales pueden suponer cambios dramáticos en las proteínas aumentando significativamente la complejidad del proteoma celular (Wilkins, M. R. et al. 1996).

Dado que ha quedado demostrado que la actividad mitocondrial está regulada de manera selectiva por el estrés osmótico, el siguiente objetivo consistió en cuantificar los cambios en la composición de proteínas de la mitocondria inducidos por osmoestrés. Se decidió determinar estos cambios proteómicos durante la adaptación de la mitocondria al estrés causado por 1 M NaCl mediante la tecnología 2D-DIGE. La elección de esta técnica suponía varias ventajas. Es reproducible, muy sensible, cuantificable y permite separar distintas isoformas de la misma proteína no sólo por su tamaño sino por su punto isoelectrico (Reinders, J. et al. 2006). El uso de muestras estándar internas favorecía la obtención de resultados de alto nivel de confianza y permitía la normalización de las muestras expuestas a estudio (Tonge, R. et al. 2001).

Para el análisis, se obtuvieron extractos de proteína mitocondrial altamente purificada mediante el método de ultra centrifugación en gradiente de sacarosa descrito en el apartado 2.3.3 de MM (Meisinger, C. et al. 2000). Estos extractos fueron obtenidos a partir de cultivos de células BY4741 en medio YPD y cultivos de células BY4741 sometidas a estrés osmótico (YPD + 1 M NaCl) creciendo ambos hasta fase logarítmica.

La cantidad de proteína total de los extractos fue estimada mediante cuantificación Bradford y concentraciones equivalentes de proteína total (30 µg) fueron analizadas por separación electroforética bidimensional mediante una primera dimensión en la que se separan las proteínas por su punto isoelectrico acoplada a una segunda, en las que las proteínas se distribuyen en función de su masa molecular.

Las muestras fueron marcadas con los fluoróforos CyDye DIGE : Cy5, fluoróforo rojo para el marcaje de muestra sometida a estrés salino y Cy3, fluoróforo verde

Resultados

para el marcaje de el extracto obtenido a partir de células que habían crecido en YPD. Se cargaron tres réplicas en gel y se resolvieron mediante enfoque isoelectrico primero y después mediante gel desnaturante SDS/PAGE para la separación de proteínas por su masa molecular (Figura R.11.1).

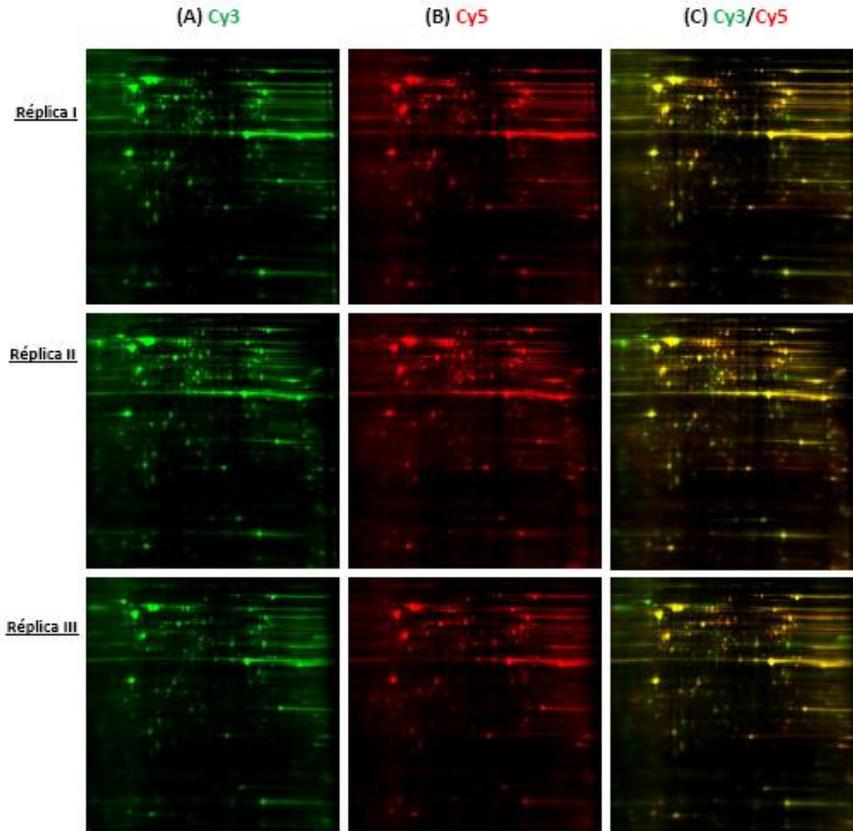


Figura R.11.1: Geles bidimensionales del análisis proteómico comparativo entre mitocondrias purificadas en condiciones normales (YPD) y estrés salino (1M NaCl).

Cantidades equivalentes de proteína mitocondrial de las dos condiciones estudiadas fueron resueltas para tres réplicas biológicas. Las proteínas extraídas a partir del cultivo en YPD habían sido marcadas con Cy3 mientras que aquellas extraídas a partir de un cultivo sometido a estrés hiperosmótico fueron marcadas con Cy5. Las columnas (A) y (B) muestran la visualización de las proteínas marcadas con Cy3 y Cy5 respectivamente. La columna (C) corresponde a la superposición de las imágenes (A) y (B) para cada réplica.

De todas las proteínas que mostraron un comportamiento diferencial (Figura R.11.2), se seleccionaron aquéllas que mostraban una inducción de al menos dos veces o una disminución en su expresión de tres o más veces durante la adaptación al estrés salino. Además se descartaron especies proteicas poco abundantes o posibles duplicaciones en los geles bidimensionales.

Antes de continuar con los resultados conviene describir qué entendemos por proteínas “inducidas” o “reprimidas”. Decimos que una proteína está sobre-expresada, sobre-representada o inducida cuando se acumula más en las mitocondrias de aquellas células adaptadas a estrés osmótico que en aquéllas que han crecido en YPD, bien sea porque el gen responsable de su síntesis se expresa más o bien porque la proteína se degrada menos. También incluimos todas aquellas proteínas que en condiciones normales se localizan citosólica o nuclearmente pero que en condiciones de estrés osmótico se acumulan a nivel mitocondrial. Las proteínas infra o sub representadas o reprimidas son aquéllas que se acumulan menos en las mitocondrias de células tratadas con NaCl. Esta menor acumulación puede deberse a que el gen responsable de su síntesis se expresa menos, a que la proteína se degrada con mayor facilidad o a que la localización subcelular varía, detectándose menos cantidad a nivel mitocondrial en condiciones de estrés hiperosmótico.

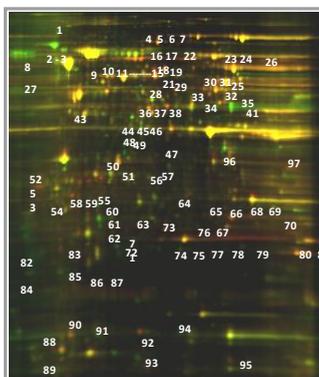


Figura R.11.2: Proteínas identificadas por su expresión diferencial (YPD/YPD+1M NaCl) mediante técnica 2D-DIGE. La figura representa la superposición de las señales Cy3 (YPD) y Cy5 (YPD+ 1 M NaCl) obtenidas por 2D- DIGE. Las manchas rojas, verdes y amarillas corresponden a las proteínas inducidas, reprimidas y constitutivas respectivamente.

Resultados

Las proteínas con un comportamiento diferencial, inducidas o reprimidas, fueron sometidas posteriormente a espectrometría de masas para su identificación.

11.1) Identificación de proteínas mitocondriales inducidas en respuesta a estrés salino.

Se analizaron aquellas manchas proteicas cuyo patrón de expresión se inducía en condiciones de estrés osmótico (Figura R.11.3).

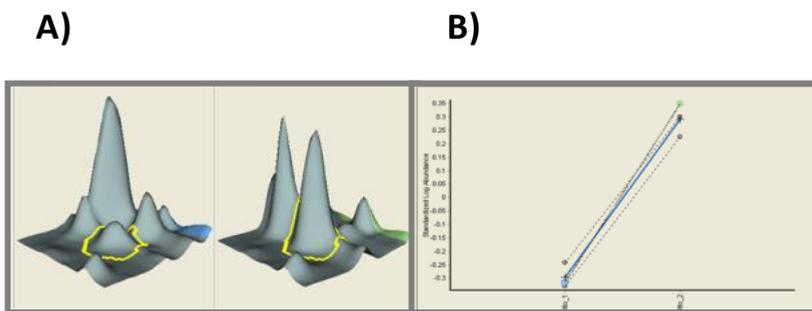


Figura R.11.3: Perfil de expresión de una de las proteínas mitocondriales cuya acumulación aumenta en condiciones de estrés hiperosmótico. (A) El área delimitada por la línea amarilla representa la abundancia de una proteína que se induce en condiciones de estrés osmótico, en este caso corresponde a la proteína Leu4. (B) La gráfica representa la cuantificación de Leu4p en las tres réplicas del análisis 2D-DIGE en respuesta a estrés salino. La línea azul representa el valor medio de las tres réplicas.

De las 28 manchas proteicas que se sobreexpresaban dos o más veces en condiciones de estrés hiperosmótico, se identificaron las 16 proteínas referidas en la Figura R.11.4 mediante espectrometría de masas en tándem (MALDI-TOF/TOF). En este tipo de análisis las proteínas son digeridas mediante una proteasa específica, generalmente tripsina, obteniéndose un espectro de fragmentos tripsídicos. La huella que deja cada péptido en función de su masa y el mapa de fraccionamiento peptídico que genera se comparan con las proteínas conocidas descritas en las bases de datos.

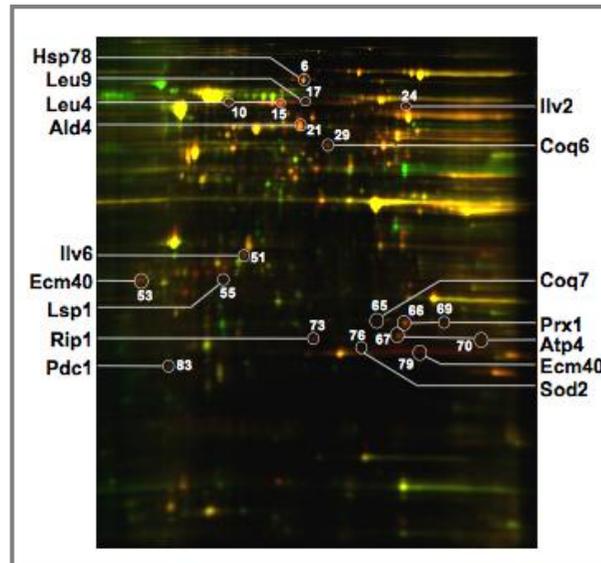


Figura R.11.4: Gel bidimensional de proteínas mitocondriales inducidas en condiciones de estrés salino. Las proteínas enmarcadas en círculos blancos son aquellas proteínas identificadas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF que se acumulan dos o más veces en condiciones de estrés causado por 1M NaCl. En los gels 2D-DIGE aparecen marcadas en rojo como consecuencia de la mayor abundancia de proteína marcada con el fluoróforo Cy5 (rojo) que con el Cy3 (verde).

Las proteínas identificadas fueron clasificadas en familias según su función. Se obtuvo un primer grupo de **proteínas con función antioxidante**: Prx1, peroxirredoxina; Sod2, superóxido dismutasa; Coq6 y 7, enzimas de la biosíntesis de la ubiquinona. Un grupo de **proteínas implicadas en la biosíntesis de los aminoácidos** leucina, isoleucina, valina y arginina que incluía las proteínas Leu 4 y 9, enzimas implicadas en la biosíntesis de leucina; Ilv 2 y 6, enzimas que participan en la biosíntesis de los aminoácidos isoleucina y valina, y Ecm40, enzima implicado en la biosíntesis de arginina. Un tercer grupo de **proteínas que catalizan la conversión del piruvato a acetato** que integraba a Ald4, aldehído deshidrogenasa requerida para el crecimiento en fuentes de carbono no fermentables, y Pdc1, piruvato descarboxilasa necesaria en la fermentación alcohólica. La **chaperona** Hsp78 que previene la agregación de proteínas malformadas a la pared interna de

la matriz mitocondrial. Otro grupo que incluía a los **componentes de la cadena de transporte electrónico y la fosforilación oxidativa** como Rip1, implicada en la transferencia de electrones en la cadena de transporte electrónico y Atp4, requerida para la síntesis de ATP. Y un último grupo de proteínas **componentes del eisosoma** como Lsp1, que es una proteína estructural relacionada con la endocitosis (Tabla R.11.1)

Tabla R.11.1: Lista de proteínas sobreexpresadas más de 2 veces en mitocondrias adaptadas a estrés osmótico.

Número mancha	Nombre ^a	Gen	MW	PI	Péptidos identific.	Función	Ratio ^b	p-value ^c
79	Ecm40 ^{as}	YMR062C	47,8	6,77	15	Orritina acetil transferasa que cataliza la biosíntesis de arginina.	-5,7	0,0026
15	Leu4 ^e	YNLI04C	68,4	5,7	30	2-Isopropilmalato sintasa. Isoenzima de la biosíntesis de leudina.	+3,88	0,0002
83	Pdc1 ^d	YLR044C	61,5	5,8	4	Isoenzima piruvato descarboxilasa con actividad durante la fermentación alcohólica.	-2,97	0,036
66	Pxd1 ^e	YBL064C	29,5	8,97	10	Peroxióxido con actividad tioredoxina peroxidasa.	-2,68	0,0045
29	Coq6	YGR255C	53,5	6,52	13	Monooxigenasa implicada en la biosíntesis de la ubiquinona (Coenzima Q).	-2,65	0,0004
76	Sod2	YHR008C	26	8,5	4	Superóxido dismutasa que protege a las células de los daños producidos por O ₂ .	+2,65	0,0092
21	Ald4	YOR374W	56,7	6,31	24	Aldehído deshidrogenasa.	+2,62	0,0016
70	Atp4 ^e	YPL078C	27	9,16	15	Subunidad b del complejo ATP sintasa.	+2,51	0,009
17	Leu9	YOR108W	67,2	6,31	24	2-Isopropilmalato sintasa. Partícpa en la biosíntesis de leudina.	-2,49	0,0002
55	Lsp1	YPL004C	38	4,62	14	Componente de eisosomas.	-2,49	0,03
53	Ecm40 ^{as}	YMR062C	47,8	6,77	10	Orritina acetil transferasa que partícpa en la biosíntesis de arginina.	+2,43	0,04
69	Pxd1 ^e	YBL064C	29,5	8,97	7	Peroxióxido con actividad tioredoxina peroxidasa.	-2,37	0,0032
6	Hsp78	YDR258C	91,3	8,17	38	Chaperona oligomérfica implicada en la termotolerancia.	+2,33	0,0048
73	Rip1	YEL024W	20,1	5,94	12	Ubiquinol-dicromoc reductasa que transfiere e ⁻ desde el ubiquinol al citocromo c1 durante la respiración.	-2,25	0,0052
67	Atp4 ^e	YPL078C	27	9,16	13	Subunidad b del complejo ATP sintasa.	+2,19	0,009
24	Iiv2	YMR108W	68,3	6,36	15	Acetato sintasa que partícpa en la biosíntesis de isoleudina y valina.	+2,11	0,0069
65	Coq7	YOR125C	30,9	8,79	11	Proteína esencial para la síntesis de la ubiquinona (Coenzima Q).	-2,08	0,0013
51	Iiv6	YCL009C	34	6,51	10	Subunidad reguladora de la acetolactato sintasa implicada en la biosíntesis de isoleudina y valina.	+2,04	0,0009
10	Leu4 ^e	YNLI04C	68,4	5,7	20	2-Isopropilmalato sintasa. Isoenzima de la biosíntesis de leudina.	+2,02	0,0027

^a Proteínas identificadas mediante MALDI-TOF/TOF con un 100% de confianza.

^b Número medio de veces que cambia la intensidad de la mancha de los geles 2-DIGE de tres análisis independientes.

^c Nivel de significación empírico de contraste de los cambios observados en las manchas observados a partir de la distribución tStudent.

^d Proteínas que no estaban entre las en los geles.

^e Proteínas identificadas en más de una mancha.

Resultados

11.1.1 ESTUDIO DE LA ACUMULACIÓN DE PROTEÍNAS DE LA MITOCONDRIA CON FUNCIÓN ANTIOXIDANTE EN RESPUESTA A ESTRÉS SALINO.

A continuación se procedió a la confirmación de los datos obtenidos por el análisis proteómico. Se llevaron a cabo análisis de inmunodetección para el estudio del comportamiento de algunos de los grupos funcionales identificados. Utilizamos una colección de cepas de levadura con el fondo genético BY4741 etiquetadas con el epítipo TAP. En primer lugar se llevaron a cabo ensayos *western* para las proteínas mitocondriales Coq6, Prx1 y Sod2 en condiciones normales y después de la adaptación a estrés salino (1 M NaCl). Como se observa en la Figura R.11.5 estas proteínas se acumulaban en los cultivos tratados con NaCl. Estos resultados avalaban los obtenidos en el análisis 2D-DIGE.

Se quiso probar si la respuesta era específica del tipo de ión por lo que se repitieron los experimentos sometiendo a las células a estrés con 1,5 M KCl. Coq6 y Prx1 se sobreacumulaban también en respuesta a potasio, aunque en el caso de la proteína Coq6, la respuesta era mucho más específica en respuesta Na^+ . En cambio Sod2 sólo respondía al estímulo por Na^+ manteniéndose constante su expresión en respuesta al estrés causado por K^+ .

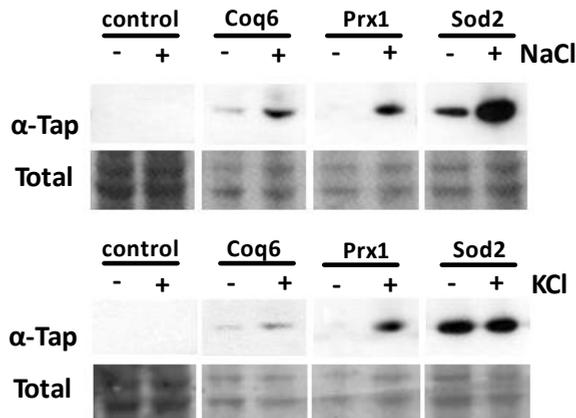


Figura R.11.5. Inmunodetección de proteínas mitocondriales con función antioxidante en presencia y ausencia de estrés salino. Se analizaron mediante *Western blot* extractos totales de células de levadura que expresaban las proteínas Coq6, Prx1 y Sod2 etiquetadas con el epítipo Tap bajo el control de sus promotores naturales. Se utilizó para su detección el anticuerpo α -PAP. Las células fueron cultivadas en ausencia (-) o presencia (+) de 1 M NaCl y 1 M KCl. Se utilizó como control negativo de detección una cepa silvestre sin etiquetar con ningún epítipo. Se utilizó como control de carga la tinción de membranas con DB71.

Podemos concluir diciendo que el estrés osmótico induce la función antioxidante de la mitocondria a través de las proteínas Coq6, Prx1 y Sod2. En los casos de Coq6 y Sod2, la inducción es en gran parte, específica para el catión Na^+ .

11.1.2 ESTUDIO DE LA ACUMULACIÓN DE PROTEÍNAS MITOCONDRIALES INVOLUCRADAS EN LA BIOSÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS EN RESPUESTA A ESTRÉS SALINO.

Mediante el abordaje proteómico se identificaron algunas enzimas que participan en diversas rutas de biosíntesis de aminoácidos, reguladas positivamente durante la adaptación a estrés por NaCl.

Los niveles de proteína Ilv2 y 6, Leu 4 y 9 fueron cuantificados primero en extractos totales en ausencia y presencia de 1 M NaCl y se verificó que las proteínas Ilv2 y Leu4 se inducían en respuesta a estrés salino provocado por NaCl. La inducción de Ilv2 y Leu4 resultó ser específica para Na^+ y no se observó en respuesta a estrés por K (Figura R.11.6A).

Las rutas catabólicas de biosíntesis de aminoácidos se localizan mayoritariamente, pero no exclusivamente, en la mitocondria. Por ello se quiso comprobar si la inducción observada de este grupo de proteínas era detectable por fraccionamiento celular. Se obtuvieron extractos proteicos a partir de las fracciones citosólicas y enriquecidas en mitocondria y se visualizaron los niveles de Ilv2,6 y Leu4,9 por *western blot*.

Como se muestra en la Figura R.11.6B, la acumulación de la proteína Ilv2 fue mayor en respuesta a sal tanto a nivel de mitocondria como a nivel citosólico. Las proteínas Ilv6, Leu4 y Leu9 se localizaban preferentemente en la fracción mitocondrial y se inducían en condiciones de estrés salino.

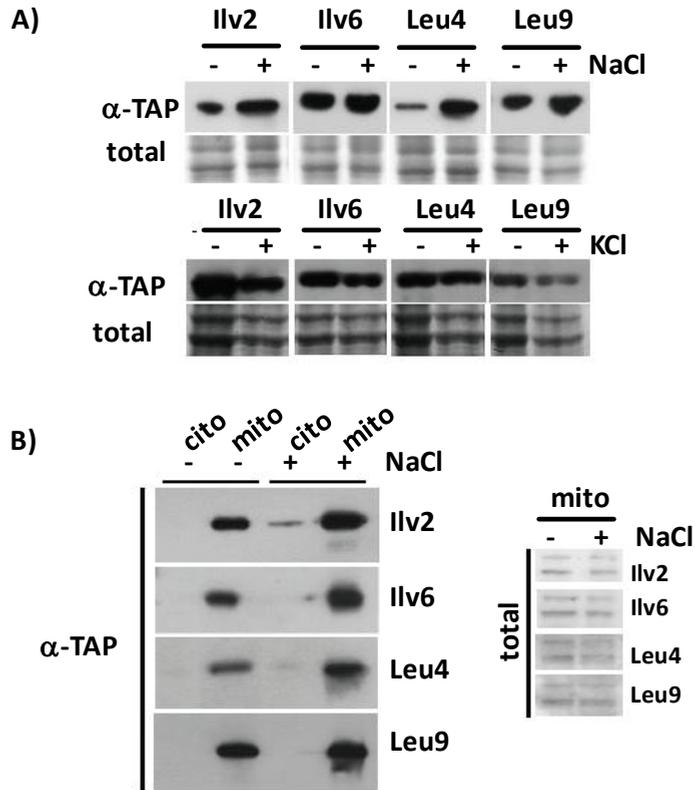


Figura R.11.6: Inmunodetección de proteínas mitocondriales implicadas en la biosíntesis de aminoácidos en presencia y ausencia de estrés osmótico. Los enzimas Ilv2, Ilv6, Leu4 y Leu9, implicados en la biosíntesis de aminoácidos, se acumulan en respuesta a situaciones de estrés salino. (A) Análisis *western* de extractos celulares de levadura que expresan, fusionado a las proteínas de interés, el epítipo TAP bajo el control de sus propios promotores. Para la detección se utilizó el anticuerpo α -PAP. La cantidad de proteína total fue visualizada mediante la tinción de la membrana con DB71. Las células fueron cultivadas en ausencia o presencia de sal (YPD/YPD+1 M NaCl) según se observa en la figura. (B) Análisis *western* de las proteínas indicadas a partir de extractos citosólicos y mitocondriales de células de levadura. La cantidad total de proteína de la fracción mitocondrial fue visualizada mediante la tinción de la membrana con DB71. Para la detección inmunológica se utilizó el anticuerpo α -PAP.

11.1.3 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL EXTERNA EN CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO.

Entre las proteínas que se inducían en la mitocondria por estrés osmótico fue identificada Lsp1. Esta proteína, junto a su homóloga Pil1, está descrita como una proteína estructural abundante que se encuentra en la superficie interna de la membrana plasmática formando un complejo que recibe el nombre de EISOSOMA (Walther, T. C. et al. 2006b). Sin embargo, otros autores como (Zahedi, R. P. et al. 2006a), habían identificado estas mismas proteínas como componentes de la membrana externa mitocondrial.

Se sometió a estudio el comportamiento de Lsp1 bajo diferentes condiciones para establecer la relación entre su función y su localización mitocondrial. En primer lugar se estudió el nivel de regulación en respuesta al crecimiento en fuentes de C no fermentables que indujeran la biogénesis de la mitocondria. Tal y como muestra la figura R.11.7A, la abundancia de Lsp1p aumentaba cuando las células crecían en medio YP glicerol, lo que significaba que en condiciones de mayor actividad respiratoria, se acumula más proteína Lsp1 del mismo modo que lo hace su homóloga Pil1p. Posteriormente se midió la inducción en respuesta a estrés salino (1 M NaCl), comprobándose que la inducción se producía en la misma medida. Estos resultados sugieren que la proteína Lsp1 puede tener funciones que afecten a los cambios que se producen a nivel de la membrana externa de la mitocondria en respuesta a estrés salino (Figura R.11.7A).

Para profundizar en el estudio del comportamiento de las proteínas estructurales se eligieron proteínas de la membrana mitocondrial externa con patrones de expresión similar a Lsp1p en respuesta a otros tipos de (Gasch, A. P. et al. 2000). Cuatro proteínas Om14, Rdl1, Mcr1 y Hfd1 fueron identificadas en las bases de datos con estas características y se quiso comprobar si se regulaban como Lsp1p en respuesta a estrés salino. Como control, se incluyeron en el estudio dos subunidades del complejo proteico mitocondrial TOM responsable de la importación de proteínas citosólicas con funciones mitocondriales a través de la membrana externa mitocondrial, Tom 22p y 70p, cuya expresión es independiente del nivel de actividad de la mitocondria.

Como se muestra en la Figura R.11.7B, Om14p, Rdl1p, Mcr1p y Hfd1p aumentaban considerablemente su abundancia en respuesta a estrés por 1 M NaCl

mientras que las proteínas Tom 22 y Tom 70 no mostraron ningún cambio. Estos datos sugieren que la adaptación de la mitocondria al estrés hiperosmótico implica un cambio en la composición de la membrana externa con un enriquecimiento específico de Lsp1p, Om14p, Rdl1p, Mcr1p y Hfd1p.

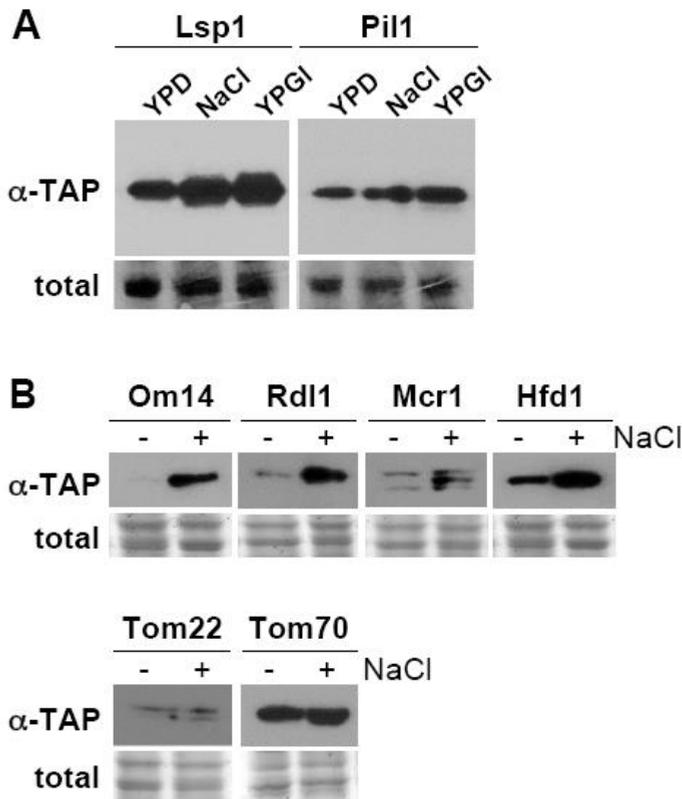


Figura R.11.7: Inmunodetección de proteínas de la membrana externa mitocondrial en respuesta a estrés hiperosmótico. Se analizaron mediante *Western blot* extractos totales de células de levadura que expresaban las proteínas que se muestran, etiquetadas con el epítipo TAP bajo el control de sus promotores naturales. Se utilizó para su detección el anticuerpo α -PAP. Las células crecieron en glucosa (YPD), glicerol (YPGIy3%) o estrés salino (YPD + 1 M NaCl) respectivamente. La cantidad de proteína total fue visualizada mediante tinción de membrana con DB71. (A) Se observó un aumento en la acumulación de Lsp1p y Pil1p tanto en respuesta a estrés salino como durante la inducción de la respiración. (B) Las proteínas de la membrana externa mitocondrial Om14, Rdl1, Mcr1 y Hfd1 se inducían en presencia de sal mientras que Tom22p y Tom70p, no se acumulaban más en condiciones de estrés.

11.1.4 ANÁLISIS FENOTÍPICO DE MUTANTES EN FUNCIONES MITOCONDRIALES EN CONDICIONES DE ESTRÉS HIPEROSMÓTICO.

A continuación se abordó la cuestión de si las proteínas mitocondriales inducibles por sal identificadas por 2D-DIGE eran importantes y por lo tanto, factores determinantes y limitadores del crecimiento en la presencia de estrés salino. Se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento de doce de las quince cepas mutantes en funciones mitocondriales de la Tabla 11.1. Como se muestra en la Figura R.11.8.A, la pérdida de la mayoría de las proteínas (Sod2, Prx1, Leu4, Leu9, Ilv6, Ecm40, Ald4, Hsp78 y Lsp1) no causó retrasos significativos del crecimiento ni una disminución en el rendimiento del mismo. Tampoco después de la exposición a 1 M NaCl se observaron diferencias en el crecimiento de la mayoría de las cepas mutantes y las células de levadura silvestre. Todas ellas sufrieron un drástico retraso en el crecimiento como consecuencia del estrés. Sólo en los casos en que la cadena de transporte mitocondrial de electrones ($\Delta rip1$ y $\Delta coq7$) o la fosforilación oxidativa ($\Delta atp5$) se interrumpían, se detectaba un crecimiento defectivo en condiciones de estrés salino (Figura R.11.8B).

Dado que las condiciones hipertónicas causan estrés oxidativo en la levadura (Koziol, S. et al. 2005), y que la mitocondria es la responsable de la reducción de ROS en condiciones de estrés salino, se sometió a las mismas cepas mutantes a estudio de su cinética de crecimiento en respuesta al estrés oxidativo causado por el peróxido de hidrógeno. Como se muestra en la Figura R.11.8C, las 12 cepas presentaron una considerable sensibilidad al tratamiento con 5mM de H_2O_2 . La pérdida de las funciones antioxidantes $\Delta prx1$, $\Delta sod2$ y $\Delta coq7$ causaban una sensibilidad dramática a estrés oxidativo, igualmente observado en $\Delta rip1$, $\Delta hsp78$ o $\Delta atp4$. Un fenotipo más moderado, se observó en los mutantes que afectan a la biosíntesis de aminoácidos y en la cepa $\Delta lsp1$.

Resultados

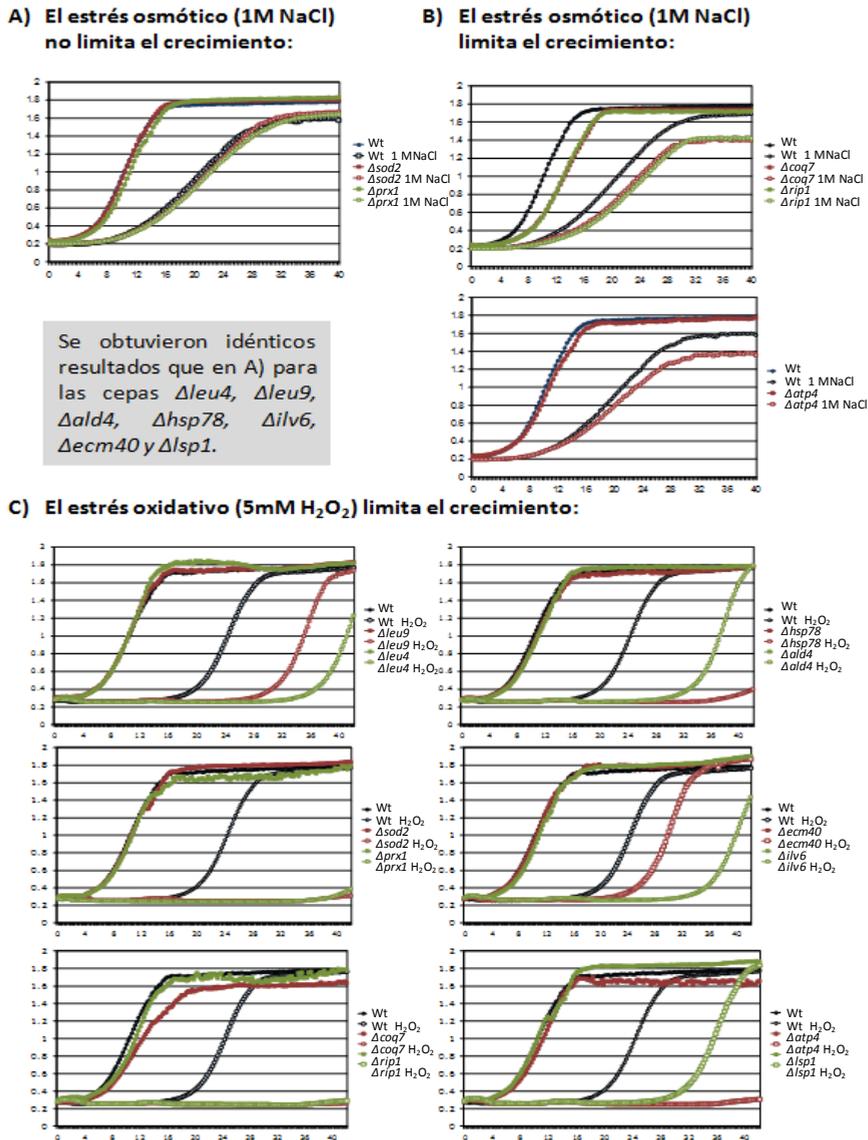


Figura R.11.8: Ensayo de crecimiento de mutantes en funciones mitocondriales identificadas por 2D-DIGE en condiciones de estrés salino y estrés oxidativo.

El crecimiento de las cepas de levadura sometidas a estudio fue monitorizado en ausencia de estrés (YPD) y en condiciones de estrés hiperosmótico (1 M NaCl) y oxidativo (5 mM H₂O₂) mediante bioscreen. (A) La pérdida de la mayoría de aquellas funciones mitocondriales que descritas por activarse en respuesta a sal, no mostraron una limitación de crecimiento en condiciones de estrés salino. (B) Las cepas mutantes para los genes *COQ7*, *RIP1* o *ATP4* mostraron defectos en el crecimiento bajo condiciones de estrés salino. (C) Las pérdidas de función mitocondrial que se activaba en condiciones de estrés salino presentan mayores limitaciones en el crecimiento bajo estrés oxidativo (5 mM H₂O₂).

11.2) Proteínas reguladas negativamente en mitocondrias adaptadas a estrés salino.

El siguiente objetivo consistió en identificar las proteínas mitocondriales reguladas negativamente en condiciones de estrés que por tanto, aparecían menos representadas en los extractos mitocondriales de células tratadas con 1 M NaCl. Como se ha descrito anteriormente, los proteomas de mitocondrias de células tratadas con 1 M NaCl o creciendo en YPD fueron comparados cuantitativamente por 2D-DIGE usando tres réplicas biológicas.

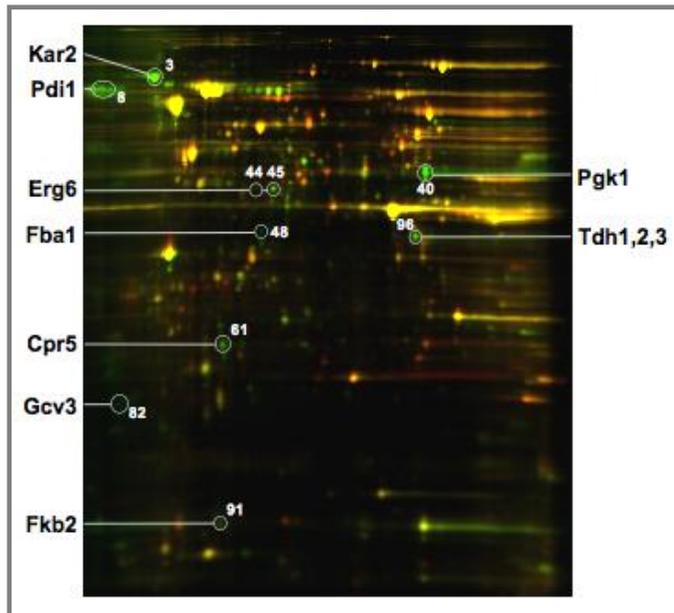


Figura R.11.9: Gel bidimensional de proteínas reprimidas en condiciones de estrés salino. Las proteínas señaladas son aquellas cuya acumulación mitocondrial es al menos 3 veces menor cuando las células de las que se extrajeron fueron sometidas a estrés salino (1 M NaCl). En los geles 2D-DIGE aparecen marcadas en verde como consecuencia de la menor abundancia de proteína marcada con el fluoróforo Cy5 (rojo) respecto de aquéllas marcadas con Cy3 (verde).

Se identificaron 19 manchas proteicas que mostraban una reducción en su abundancia (Figura no incluida). De esas 19 proteínas, se analizaron mediante MALDI/TOF-TOF sólo aquellas cuya expresión se reducía al menos tres veces en condiciones de estrés respecto de la misma proteína derivada de cultivos que habían crecido en YPD (Figura R.11.10).

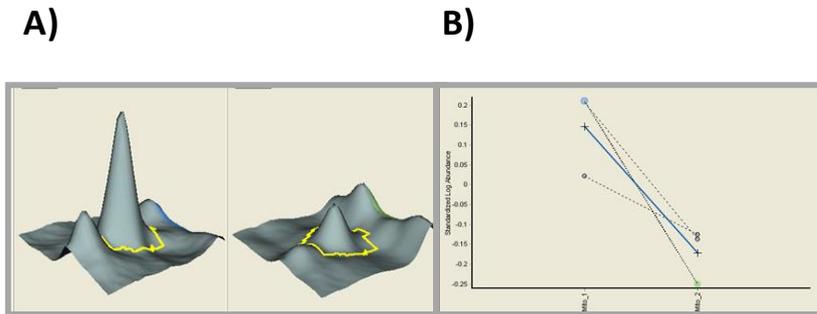


Figura R.11.10: Perfil de expresión de una de las proteínas cuya acumulación disminuye en condiciones de estrés hiperosmótico. (A) El área delimitada por la línea amarilla representa la abundancia de una proteína que se reprime en condiciones de estrés osmótico, en este caso corresponde a la proteína Tdh3. (B) La gráfica representa la cuantificación de Tdh3p en las tres réplicas del análisis 2D-DIGE en respuesta a estrés salino. La línea azul representa el valor medio de las tres réplicas.

De estas proteínas, 11 fueron identificadas mediante espectrometría de masas (Tabla R.11.2) y se clasificaron según su función. Se obtuvo un primer grupo de **proteínas del retículo endoplasmático que participan en la importación y el plegamiento de proteínas** como Kar2p, que es una ATPasa implicada en la importación de proteínas al RE. También actúa como chaperona mediando el plegamiento de proteínas en el RE; Cpr5p, isomerasa del RE que cataliza la isomerización de enlaces peptidil-prolil; Pdi1p, isomerasa esencial para la formación de puentes disulfuro y Fkb2p, isomerasa posiblemente implicada en el tráfico de proteínas al RE. Un segundo grupo de **enzimas glicolíticos** como Fba1p, fructosa 1,6-bis fosfato aldolasa que cataliza el paso de fructosa a gliceraldehído durante la glicólisis; Tdh1-3p, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa que cataliza la reacción gliceraldehído a fosfoglicérico; y Pgc1p, 3-fosfato glicerato quinasa. Un tercer grupo implicado en la **biosíntesis de ergosterol** como Erg6p. Y un último grupo involucrado en el **catabolismo de la glicina** que incluye a Gcv3p, subunidad del complejo mitocondrial glicina descarboxilasa.

De todas estas proteínas identificadas como reprimidas por el tratamiento osmótico, sólo Erg6p y Gcv3p se localizan exclusivamente en la mitocondria.

Tabla R.11.2: Lista de proteínas subrepresentadas al menos 3 veces en mitocondrias adaptadas a estrés osmótico.

Número mancha	Nombre ^a	Gen	MW	PI	Péptidos identific.	Función	Ratio ^b	P-value ^c
40	Pgk1	YCR012W	44,7	7,11	21	3-fosfoglicerato quinasa de glicólisis y gluconeogénesis.	-7,44	0,0009
48	Fba1	YKL060C	39,6	5,51	8	Fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa requerida para glicólisis y gluconeogénesis.	-7,29	0,0056
3	Kar2	YIL034W	74,4	4,79	36	ATPasa implicada en la importación de proteínas al REtambién actúa como chaperona mediando el plegamiento de proteínas del RE.	-4,56	0,0008
61	Cpr5	YDR304C	25,3	5,35	11	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa del RE.	-4,43	0,0013
82	Gcv3	YAL044C	19,6	4,85	5	Subunidad H del complejoglicina descarboxilasa requerido para el catabolismo de la glicina.	-4,16	0,0009
8	Pdi1	YCL043C	58,2	4,38	26	Proteína disulfuro isomerasa esencial para la formación de puentes disulfuro en el RE.	-4,11	0,032
44	Erg6*	YML008C	43,5	5,46	18	$\Delta(24)$ -esterol-C-metiltransferasa implicada en la síntesis de ergosterol	-3,97	0,0026
96**	Tdh3	YGR192C	35,7	6,46	15	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa isoenzima III, implicada en glicólisis y gluconeogénesis.	-3,9	0,0015
96**	Tdh2	YJR009C	35,8	6,46	13	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa isoenzima II, implicada en glicólisis y gluconeogénesis.	-3,9	0,0015
96**	Tdh1	YIL052W	35,7	8,29	7	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa isoenzima I, implicada en glicólisis y gluconeogénesis.	-3,9	0,0015
45	Erg6*	YML008C	43,5	5,46	19	$\Delta(24)$ -esterol-C-metiltransferasa implicada en la síntesis de ergosterol	-3,45	0,0032
91	Fkb2	YDR519W	14,5	5,34	8	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa del RE.	-3,1	0,0099

^a Proteínas identificadas mediante MALDI-TOF/TOF con un 100% de confianza.

^b Número medio de veces que cambia la intensidad de la mancha de los genes 2-DIGE de tres análisis independientes.

^c Nivel de significación empírico de contraste de los cambios observados en las manchas proteicas a partir de la distribución tStudent.

*. Proteínas identificadas en más de una mancha.

** Los tres isoenzimas Tdh1-3 fueron identificados mediante espectrometría de masas con un 100% de confianza y se transcribieron a la lista en función del número de péptidos coincidentes con la base de datos en sentido decreciente.

11.2.1 ESTUDIO DE LA ACUMULACIÓN DE ENZIMAS GLICOLÍTICOS POR ESTRÉS SALINO.

Las proteínas reguladas negativamente identificadas en el análisis proteómico de la mitocondria en respuesta a estrés por 1 M NaCl, Fba1p, Tdh1p, 2p y 3p y Pgk1p son enzimas glicolíticas localizadas principalmente en el citoplasma. Son intermediarios esenciales de la biosíntesis del osmolito glicerol que, como ya hemos mencionado, tiene una función protectora. Fba1p cataliza la conversión de fructosa 1,6 bifosfato a dihidroxiacetona fosfato. Tdh1,2,3p catalizan la reacción de síntesis de 1,3 bifosfoglicerato y Pgk1p cataliza la transferencia de grupos fosforilo al 1,3 bifosfoglicerato. Las cinco proteínas fueron analizadas mediante ensayos de detección inmunológica de la fracción citoplasmática y la fracción enriquecida en mitocondrias, en presencia o en ausencia de 1M de NaCl. Con este estudio se pretendía determinar si la menor acumulación aparente en la mitocondria adaptada a estrés salino era consecuencia de una represión de la expresión génica en respuesta a sal o si por el contrario, se mantenía la expresión pero variaba la localización de las proteínas. Tal como se muestra en la Figura R.11.11, se observó que los isoenzimas Tdh2 y Tdh3 se acumulan menos en la fracción mitocondrial en respuesta a la presencia de sal en el medio. La expresión de Tdh2 está fuertemente reprimida en respuesta a estrés salino, mientras la disminución de Tdh3 parece deberse más a una menor localización en la mitocondria que a una menor inducción de la proteína.

Tdh1p en cambio mostraba una inequívoca inducción tanto a nivel citosólico como mitocondrial. El comportamiento de Tdh1p que, como se observa en la figura, se induce en presencia de sal al contrario de lo que ocurre con las isoformas Tdh2p y 3p, hace pensar que la mancha proteica #96 corresponde a Tdh2p o Tdh3p o incluso a una mezcla de ambas y no a Tdh1p. Esta hipótesis está avalada por el hecho de que, como se observa en la Tabla R.11.2, Tdh1p presenta un punto isoelectrónico bastante diferente al de Tdh2p y Tdh3p. Además, se detectaron un número inferior de péptidos coincidentes con Tdh1p por espectrometría de masas.

En el caso de Fba1p la causa de la menor detección en el extracto mitocondrial después del tratamiento hiperosmótico parecía deberse a un cambio de la sublocalización de la proteína. Fba1p en respuesta al estrés, parece acumularse

más en el citosol y menos en la mitocondria mientras que Pgc1p mostraba sólo cambios muy sutiles de su distribución citosólica/mitocondrial.

En conjunto, estos resultados indican que la actividad enzimática glicolítica, especialmente la actividad Tdh1-3 gliceraldehído-3-fosfato, está regulada por el estrés de NaCl bien por una menor acumulación de la proteína, bien por cambios en la distribución subcelular de la misma.

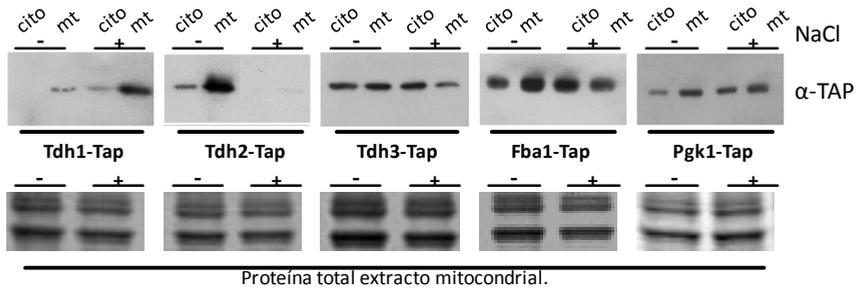


Figura R.11.11: Inmunodetección de enzimas glicolíticas en ausencia y presencia de estrés salino. Se analizaron mediante *Western blot* extractos citosólicos (cito) y extractos enriquecidos en mitocondria (mt) de células de levadura que expresaban las proteínas Tdh1-3, Fba1 y Pgc1 etiquetadas con el epítopo TAP bajo el control de sus promotores naturales utilizando para su detección el anticuerpo α -PAP. Las células fueron cultivadas en ausencia (-) o presencia (+) de 1 M NaCl. Se utilizó como control de carga la tinción de las membranas con DB71.

12. RELACIÓN MITOCONDRIA-RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EN RESPUESTA A ESTRÉS SALINO.

Algunas de las proteínas identificadas mediante tecnología 2D-DIGE, reguladas negativamente en presencia de estrés por NaCl, eran proteínas localizadas en el RE (Retículo Endoplasmático). Se quiso discernir si este fenómeno era consecuencia de una posible contaminación de las muestras fruto del método de purificación de mitocondrias como consecuencia de las características similares de las membranas de ambos orgánulos, o por el contrario se trataba de una posible relación física entre éstos que pudiera estar regulada por la presencia de estrés osmótico. Para determinar si la co-purificación de proteínas del RE con la mitocondria dependían del estrés salino, se repitieron las extracciones de proteína mitocondrial mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa utilizando cepas de levadura con proteínas del retículo endoplasmático fusionadas al epítipo TAP; posteriormente se analizó el comportamiento de las mismas mediante inmunodetección. Las cepas utilizadas fueron **Fkb2-TAP**, como representante del grupo de proteínas de retículo que aparecían reprimidas en el análisis 2D-DIGE, y la cepa **Atp5-TAP** como control comparativo puesto que esta subunidad de la ATP sintasa mitocondrial no está regulada por estrés osmótico. Además incluimos el análisis de **Sec6-TAP** como proteína residente en el RE, pero no identificada en el experimento 2D-DIGE.

Como se observa en la Figura R.12, Atp5-TAP se detectaba claramente en los extractos de mitocondria purificada y sus niveles de expresión se mantenían constantes a pesar del tratamiento con NaCl.

En cuanto a los análisis de la proteína Fkb2-TAP, seguía siendo detectable en las nuevas extracciones mitocondriales a pesar de tratarse de una proteína del RE y además, mediante *western-blot* se verificaba la menor acumulación de esta proteína en condiciones de estrés salino.

El hecho de co-purificar proteínas del Retículo Endoplasmático durante el uso de métodos específicos de aislamiento mitocondrial, que además se comportaban de manera diferencial en condiciones de estrés osmótico, podía ser consecuencia de dos fenómenos distintos. Por un lado podía estar ocurriendo que en medios con concentraciones elevadas de NaCl, la contaminación de tejidos distintos a los

mitocondriales fuera menor durante la purificación de proteínas o por otro, podía estar reflejando la existencia de una conexión física entre ambos orgánulos que, en condiciones de estrés, disminuyera.

Para dilucidar la causa última se estudió qué ocurría con proteínas del Retículo Endoplasmático que no habían sido detectadas en los geles 2D. Se eligió una proteína que se distribuyera uniformemente a lo largo de todo el orgánulo puesto que las proteínas Fkb2 y Kar2 eran proteínas de membrana y podían estar indicando la existencia de un posible contacto físico entre las membranas de ambos orgánulos. Se llevaron a cabo ensayos de detección inmunológica de la proteína Sec6 fusionada al epítipo TAP y se vio que esta proteína podía ser recuperada a partir de extractos mitocondriales y que además, se comportaba como las dos anteriores: parecía disminuir su abundancia asociada a la mitocondria en condiciones de estrés por NaCl.

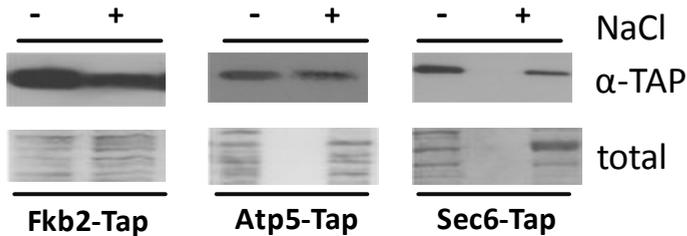


Figura R.12: Inmunodetección de proteínas del Retículo Endoplasmático (RE) reguladas negativamente como consecuencia del estrés hiperosmótico (1M NaCl). Se analizaron mediante *Western blot* extractos purificados de mitocondrias de células de levadura que expresaban las proteínas Fkb2, Atp5 y Sec6, etiquetadas con el epítipo TAP bajo el control de sus propios promotores naturales utilizando para su detección el anticuerpo α -PAP. Se utilizó como control de carga la tinción de las membranas con DB71.

Discusión

A lo largo de este trabajo hemos investigado la regulación y la función de la mitocondria de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* durante la adaptación al estrés hiperosmótico. Describimos una función positiva de la mitocondria durante la adaptación al osmoestrés en base al fenotipo sensible de los mutantes en diversas funciones mitocondriales, a la regulación selectiva de algunas proteínas mitocondriales como consecuencia del estrés, a la inducción de la transcripción de genes que codifican enzimas mitocondriales después de la exposición a medios hipersalinos, al aumento de la actividad enzimática de la mitocondria en respuesta a estrés y a los cambios que se producen a nivel del proteoma mitocondrial durante la adaptación. Para profundizar en el conocimiento de la tolerancia al estrés de las células de levadura, es necesario a partir de ahora, considerar el metabolismo mitocondrial como un parámetro fisiológico importante que depende del propio estrés.

La activación de las funciones mitocondriales como estrategia de adaptación al estrés:

Un amplio rango de cepas con defectos mitocondriales eran sensibles al estrés hiperosmótico. Este fenómeno no afectaba a una única función mitocondrial en concreto, de hecho se observó sensibilidad al estrés hiperosmótico tanto en mutantes afectados en el ciclo de Krebs, en la cadena de transporte de electrones, en subunidades de ATPsintasa e incluso en mutantes mitocondriales con defectos en la biogénesis (Figura R.1.2). Este fenómeno identificaba una función determinante de la mitocondria en la adaptación a estrés osmótico y sugería que las células de levadura regulan este orgánulo eficientemente para asegurar la adaptación.

También observamos que la adaptación al estrés hiperosomótico afectaba a la acumulación de ciertas proteínas con funciones mitocondriales y que lo hacía de una manera selectiva y específica. Las

células de *S. cerevisiae* en condiciones normales, en ausencia de estrés y en presencia de azúcares, obtienen la energía requerida para la realización de todos sus procesos metabólicos a través de la fermentación. Cuando sometemos a las células a condiciones aeróbicas en ausencia de sustratos fermentables, las células obtienen la energía a través de la respiración, y entonces se produce una inducción de la mitocondria y en consecuencia una acumulación de las proteínas mitocondriales (Figura R.2.1B). Utilizando este fenómeno como control positivo de activación mitocondrial se comprobó que el estrés salino era capaz de promover un efecto parecido sobre la mitocondria puesto que como se demuestra en la Figura R.2.1, las proteínas Sdh2, Cox6 y Cit1 con funciones mitocondriales se acumulaban más en condiciones de estrés. Fue interesante comprobar que este aumento de la acumulación de las proteínas no era generalizado a nivel de orgánulo como ocurre en respuesta a un cambio diáuxico sino que se producía de manera selectiva, ya que se vio que por ejemplo Atp5p e Idp1p se mantenían a niveles constitutivos (Figura R.2.1).

Esta activación tiene una importante componente transcripcional como mostramos por la inducción de los genes *SDH2*, *COX6* o *CIT1* como consecuencia del estrés. La activación transcripcional (de 5 a 12 veces) ocurre de manera rápida después del tratamiento (0,4M NaCl) y presenta una cinética transitoria típica del comportamiento de los genes que se activan en defensa a diferentes tipos de estrés (Proft, M. and Serrano, R. 1999), (Nakai, T. et al. 1995). Esto es, la activación mitocondrial a nivel de la expresión de genes nucleares se activa inmediatamente después del choque osmótico, pero la expresión de estos genes decae después de cierto tiempo, generalmente corto.

La mitocondria no había sido descrita previamente como orgánulo implicado en la adaptación al estrés a pesar de haberse realizado experimentos genómicos con las mismas condiciones ,(Rep, M. et al. 2000a), (Yale, J. and Bohnert, H. J. 2001). Esto puede haberse debido a que

las ratios que presenta la inducción de los marcadores mitocondriales en respuesta a osmoestrés son moderadas y no son comparables a los niveles de inducción de los mismos cuando se somete a las células a cambios diáxicos (Figura R.2.1A y 1B). Esto nos permite concluir diciendo que, aunque necesaria para la correcta adaptación al estrés, la regulación de la mitocondria en condiciones de hipersalinidad, es menos intensa que la que produce el ayuno de glucosa.

Hemos estudiado la función de dos quinasas de señalización, Hog1 y Snf1, en la transcripción de genes activados por osmoestrés que codifican para funciones mitocondriales. La MAPK Hog1 es el regulador más importante de la transcripción del programa de respuesta a osmoestrés de las células de levadura. La delección de *HOG1* inhibía totalmente la expresión activada de *COX6* y reducía parcialmente la de *SDH2* y *CIT1* (Figura R.3B.2 y 3B.3). Esto sugiere que la inducción de la transcripción de estos tres genes en respuesta a sal es dependiente de la ruta HOG.

La MAPK Snf1 es un activador del metabolismo respiratorio en respuesta al ayuno de glucosa (Hardie, D. G. 2007), (Hedbacker, K. and Carlson, M. 2008) que además está relacionado con la respuesta a estrés salino (Hong, S. P. and Carlson, M. 2007). Se observó que la delección de *SNF1* impedía la inducción de *COX6* y disminuía parcialmente la de *SDH2*. Lo que significa que la inducción de la transcripción de estos genes en respuesta a sal, es dependiente de *SNF1* (Figura R.3B.2 y 3B.3). Además, la ruta SNF1 forma parte de la regulación de la respuesta retrógrada. Esta ruta de respuesta génica integra a las proteínas Rtg1 y3 que forman parte del complejo activador de la transcripción de otros genes que se activan en respuesta a disfunciones mitocondriales, y a las proteínas Hap2 y3p que forman parte de un complejo responsable de la activación de genes que responden al ayuno de glucosa. En concreto la activación de la transcripción de *COX6* dejó de producirse en los mutantes $\Delta snf1$, $\Delta hap2$ y 3. Se sabe que *COX6* está positivamente regulado por los activadores transcripcionales

Snf1p y Hap2p,3p,4p y 5p en condiciones de ayuno de glucosa (Trawick, J. D. et al. 1989), (Wright, R. M. and Poyton, R. O. 1990). Nuestros resultados sugieren que la quinasa Snf1 activa la expresión de *COX6* a través del complejo factor de transcripción Hap2,3,4 y 5 en condiciones de estrés osmótico (Figura R.3C.1 y 3C.2).

La mitocondria como fábrica generadora de ATP en condiciones de estrés.

Una de las principales funciones de la mitocondria es la producción de energía en forma de ATP cuya hidrólisis enzimática se utiliza para llevar a cabo reacciones endergónicas: síntesis de biomoléculas y transporte activo de iones en contra de gradiente, principalmente.

En condiciones de estrés osmótico, las necesidades energéticas de un cultivo de levadura son superiores a los de las mismas células creciendo en YPD (Olz, R. et al. 1993). Esta mayor demanda es la consecuencia de la necesidad de la célula de mantener los iones de Na^+ en el interior de la célula a una concentración inferior a la del exterior (fenómeno de exclusión) y al aumento de la síntesis y la acumulación de glicerol y/o trealosa intracelular en las células (Figura R.6) para mantener el lumen celular adecuado y prevenir los probables daños que causa por la sobreacumulación de iones. La tolerancia a la salinidad en las células de levadura depende por tanto de la presencia de mecanismos capaces de mantener el Na^+ a bajas concentraciones en el interior de la célula sean cuales sean los niveles externos del mismo y de la habilidad de los enzimas para seguir funcionando en presencia de Na^+ .

Quisimos comprobar si el aumento de las necesidades energéticas durante la adaptación al estrés regulaba la mitocondria de manera que estas mayores exigencias energéticas fueran la razón de la peor adaptación de los mutantes menos eficientes en la síntesis de ATP. En particular, quisimos estudiar en qué grado estaba involucrada Snf1p, porque aunque la

función más conocida de esta proteína quinasa es la de activar la expresión de genes cuando disminuye la disponibilidad de glucosa en el medio, existe además una correlación directa entre el aumento del ratio AMP/ATP y la actividad Snf1p *in vivo* lo cual convierte a los nucleótidos de adenina en candidatos de señalización metabólica (Wilson, W. A. et al. 1996).

Los resultados obtenidos en nuestros análisis verificaron que la causa de la sensibilidad de los mutantes de funciones mitocondriales no era una disminución de la disponibilidad de energía puesto que, a pesar de que el consumo energético es mayor en condiciones de estrés osmótico en todos los casos (células silvestres y células mutantes), seguía habiendo más ATP que AMP en las células (Figura R.7). Los mutantes Δaco1 y Δcox6 , a pesar de manifestar un severo fenotipo en medios salinos, mantenían un ratio energético similar al de las células silvestres y algunos mutantes como Δsdh1 , Δfzo1 o Δsnf1 , que sí mostraban un aumento del ratio AMP/ATP, seguían siendo capaces de sintetizar más ATP del que se consumía durante la adaptación, por lo que puede afirmarse que esta caída energética no explicaba la sensibilidad fenotípica observada, al menos no totalmente. Otra prueba que hacía excluir la posibilidad de que la fosforilación oxidativa fuese el mayor determinante de la tolerancia a la salinidad fue la comprobación de que las células se adaptaban mejor y más rápidamente al estrés salino bajo condiciones anaeróbicas, lo cual impide la generación de ATP vía fosforilación oxidativa (Krantz, M. et al. 2004).

En cambio, este mayor consumo energético y posiblemente la peor eficacia en la síntesis de ATP que se observa en los mutantes de funciones mitocondriales sí podría ser la explicación del retraso del aparato transcripcional de los mutantes (Figura R.5), puesto que la actividad transcripcional que se desencadena como respuesta a un estrés, supone uno de los mayores consumos energéticos en las células de levadura.

La proteína quinasa Snf1 como potencial conexión entre la regulación de la mitocondria y la respuesta al estrés salino:

Además de la inducción de la actividad SNF1 como consecuencia de la detección de fluctuaciones en el ratio AMP/ATP, en este texto presentamos otras evidencias en cuanto a la implicación de la quinasa Snf1 en la adaptación de la célula al osmoestrés a través de la activación del metabolismo mitocondrial.

Por un lado, la sensibilidad de los mutantes $\Delta snf1$ al estrés salino había sido descrita (Alepuz, P. M. et al. 1997), (Ganster, R. W. et al. 1998) aunque la relación directa entre la actividad de Snf1p y la actividad adaptativa al estrés sólo se había estudiado en situaciones de cambio a fuentes no fermentables de carbono a través de la regulación del gen (Alepuz, P. M. et al. 1997), (Platara, M. et al. 2006), (Ye, T. et al. 2006) que codifica para una ATPasa de exclusión de Na^+ en levadura (Haro, R. et al. 1991).

Nuestros resultados sugieren a una mayor contribución de Snf1p a la adaptación a medios salinos a través de la activación de la mitocondria. La delección de *SNF1* causaba sensibilidad a elevadas concentraciones de Na^+ y K^+ (Figura R.3B.1), el desacoplamiento del control transcripcional de genes marcadores mitocondriales (Figura R.3B.2) y la pérdida de la actividad del enzima SDH (Figura R.3B.3) durante el estrés salino.

En cualquier caso parece ser que el papel de Snf1p en la activación transcripcional bajo condiciones de estrés salino es menos severo que durante un cambio diáxico (Vincent, O. et al. 2001) y esto está respaldado por el hecho de que durante la inducción de *SNF1* por represión de glucosa o pH alcalino se observa una localización subcelular a nivel del núcleo (Norbeck, J. and Blomberg, A. 1998) mientras que en respuesta a estrés osmótico Snf1p se acumula a nivel citoplasmático (Hong, S. P. and Carlson, M. 2007).

La relación entre estrés hiperosmótico y ayuno de aminoácidos:

El ayuno de aminoácidos era otra posible conexión entre la adaptación al estrés hiperosmótico y las funciones mitocondriales. El estrés hiperosmótico provoca una situación de ayuno de aminoácidos siendo el metabolismo mitocondrial esencial para la biosíntesis de la mayor parte de los aminoácidos (Pandey, G. et al. 2007), (Pascual-Ahuir, A. et al. 2001).

Según (Pandey, G. et al. 2007), la suplementación con un exceso de aminoácidos rescata la sensibilidad de las células al estrés osmótico. Sin embargo, según nuestros resultados, este rescate no se produjo en el caso de las cepas con disfunciones mitocondriales.

La función mitocondrial como principal responsable para mantener los niveles adecuados de ROS intracelular en condiciones de estrés salino:

Presentamos varios resultados que apoyan un modelo en el que la actividad de la mitocondria es esencial para mantener niveles adecuados de producción-detoxificación de ROS. Se observó que la adición externa de antioxidantes como glutatión rescataba los defectos en el crecimiento de mutantes afectados en la función mitocondrial en presencia de concentraciones elevadas de NaCl (Figura R.9). Además, demostramos que las cepas con disfunciones mitocondriales acumulaban mayores concentraciones de ROS, especialmente bajo exposiciones a sal (Figura R.8).

Hasta ahora había sido descrito que el estrés salino provocaba un aumento de la producción de ROS (Koziol, S. et al. 2005) y la activación transcripcional de genes de resistencia a estrés oxidativo (Posas, F. et al. 2000a), (Rep, M. et al. 2000a), (Rep, M. et al. 2001) pero todavía se desconoce cómo se forman estos ROS bajo condiciones de estrés por elevadas concentraciones de NaCl. El desapareamiento de los electrones en la cadena de transporte electrónico es uno de los candidatos más importantes para explicar este fenómeno, pero no el único (Perrone, G. G. et al. 2008). La disfunción mitocondrial puede causar tanto un aumento

como una disminución de la producción de ROS (Sedensky, M. M. and Morgan, P. G. 2006). En *Saccharomyces cerevisiae*, la función mitocondrial es necesaria para la resistencia al estrés oxidativo (Grant *et al.*, 1997 (Grant, C. M. et al. 1997). En *Schizosaccharomyces pombe* la disfunción mitocondrial causa estrés oxidativo (Zuin, A. et al. 2008).

Por otro lado, aunque como hemos mencionado la respiración es la mayor fuente de generación de ROS bajo condiciones fisiológicas (Andreyev, A. Y. et al. 2005), (Cadenas, E. and Davies, K. J. 2000), la estimulación controlada de la capacidad respiratoria mediante restricción calórica, disminuye la síntesis de ROS. Según (Barros, M. H. et al. 2003), la respiración eficiente previene la generación de ROS porque evita la acumulación de electrones desapareados, protegiendo a la célula contra el estrés oxidativo al sobreactivar la actividad enzimática responsable de la detoxificación y por tanto prolongando la vida media celular. Este fenómeno ha podido ser demostrado también en otro tipo de células distinto de las células de levadura, como por ejemplo en fibroblastos (Passos, J. F. et al. 2007). En definitiva, apoyándonos en nuestros resultados y en los resultados publicados por otros autores, parece que la combinación de hechos que favorece la longevidad de una célula es la eficiente actividad mitocondrial junto con una respiración controlada que produzca la mínima cantidad posible de electrones desapareados, sumado a la existencia de un eficiente sistema de detoxificación de ROS.

Los cambios en el proteoma mitocondrial durante la adaptación al estrés hiperosmótico:

Llevamos a cabo un estudio proteómico para cuantificar los cambios que sufría la mitocondria durante la adaptación de la levadura a estrés salino. Identificamos varias proteínas con función antioxidante que se sobreacumulan durante la adaptación al exceso de NaCl (Figura R.11.1). Esto avalaba los resultados que demostraban que la sal causa a la vez estrés hiperosmótico y estrés oxidativo en las células de levadura (Koziol, S. et al. 2005), (Pastor, M. M. et al. 2009) y

explica que las funciones de defensa a estrés oxidativo se encuentren entre los factores determinantes a nivel transcripcional en respuesta a estrés hiperosmótico (Posas, F. et al. 2000b), (Rep, M. et al. 2000a). Por otra parte demuestra la importancia de la función mitocondrial tanto para la resistencia al estrés oxidativo como para la adaptación a la salinidad (Pastor, M. M. et al. 2009), (Thorpe, G. W. et al. 2004). Así pues, y junto con la constatación de que el tratamiento con antioxidantes mejora el crecimiento de mutantes con defectos mitocondriales bajo estrés salino (Pastor, M. M. et al. 2009), apuntamos a la mitocondria como enclave biológico decisivo para la defensa antioxidante durante el estrés.

Proteínas con función antioxidantes cuya sobreacumulación favorece la adaptación al estrés hiperosmótico:

Sod2p es una superóxido dismutasa mitocondrial que cataliza la conversión de los radicales superóxido en peróxido de hidrógeno (Steinman, H. M. 1980). La cepa de deleción de esta superóxido dismutasa no presenta sensibilidad al estrés hiperosmótico y en cambio se acumula 2,65 veces más en condiciones de estrés.

La enzima **Prx1** es una peroxirredoxina mitocondrial que cataliza la reducción y la detoxificación de hidroperóxidos (Pedrajas, J. R. et al. 2000). Como la anterior está involucrada en la reducción de los radicales superóxido a agua durante el estrés hiperosmótico. La función antioxidante de Prx1p necesita de Trr2p (tioredoxina reductasa) y glutatión para ser reactivada en los continuos ciclos redox (Greetham, D. and Grant, C. M. 2009). Sin embargo, la expresión de *TRR2* no se induce durante el estrés salino (Ni, L. et al. 2009a) y mediante los análisis proteómicos no hemos sido capaces de detectar sobreacumulación de Trr2p. Nuestros resultados indican que Prx1p y Sod2p son las principales proteínas con funciones antioxidantes inducibles por sal en la mitocondria. Esta teoría se veía avalada por la fuerte activación transcripcional observada para *PRX1* y *SOD2* en perfiles genómicos de estudios sobre la adaptación al estrés salino (Ni, L. et al. 2009a), (Posas, F. et al. 2000a), (Rep, M. et al. 2000b).

Las proteínas **Coq6 y Coq7**, participan en la síntesis de la coenzima Q (*CoQ*) (ubiquinona, *CoQ*) (Tran, U. C. and Clarke, C. F. 2007). Aparte de ser portadores de electrones esenciales en la cadena de transporte, *CoQ* es un antioxidante soluble

en lípidos que se encuentra en todas las membranas intracelulares (Bentinger, M. et al. 2007). La coenzima Q reducida es un antioxidante eficiente para la prevención de la peroxidación de lípidos y proteínas. La activación de su biosíntesis podría ser una manera de prevenir el daño oxidativo de los lípidos por estrés salino que se producen en las mitocondrias y otras membranas. Nuestros resultados se ven avalados por la observación de la expresión fuertemente inducida de la mayoría de los genes de biosíntesis *CoQ* (*COQ1-COQ10*). Los mutantes Δ *coq6*, 7 son sensibles al estrés hiperosmótico y por supuesto, también a estrés oxidativo. El hecho de que muestren sensibilidad al exceso de sal en el medio podría ser una consecuencia de la despolarización de las membranas de las que forman parte. Resultó interesante que también se identificara en el estudio proteómico a **Rip1p** como una de las proteínas enriquecidas en mitocondrias de células sometidas a estrés hiperosmótico. Rip1 es una subunidad del complejo del citocromo bc1, que transfiere electrones de la ubiquinona al citocromo c1 durante la respiración.

Los sistemas antioxidantes como Prx1p y la coenzima Q requieren equivalentes redox en forma de NADPH para ser reciclados a su estado reducido. Las mitocondrias en levadura tienen dos fuentes de NADPH, el NAD y NADH, que forman NADPH mediante la actividad quinasa de Pos5p y la Ald4p acetaldehído deshidrogenasa (Miyagi, H. et al. 2009). Sólo Ald4p ha podido ser identificada como una componente mitocondrial inducida por la presencia del exceso de NaCl, lo que coincide con los datos publicados en los que se describe la activación de la transcripción masiva de *ALD4* por estrés salino y la ausencia de regulación transcripcional en el caso de *POS5* (Ni, L. et al. 2009a), (Posas, F. et al. 2000a), (Rep, M. et al. 2000a).

Además también fuimos capaces de detectar enriquecimiento de **Pdc1p** después del estrés. Pdc1 es una piruvato descarboxilasa que podría proporcionar acetaldehído como sustrato para la reacción de Ald4p. Estos resultados proponen que la sal regula funciones principales antioxidantes de las mitocondrias a través de Sod2 superóxido dismutasa, Prx1 peroxirredoxina y la coenzima Q, y más que regular la oxidación del acetaldehído a través de la enzima Ald4, compensa la demanda de NADPH durante la detoxificación de ROS generados durante el estrés salino. Como era de esperar, la pérdida de función de las proteínas de respuesta antioxidante hacía que la célula fuera sensible a peróxido de hidrógeno. Sin

embargo, aún en ausencia de esta función, las células podían sobrevivir en condiciones de estrés severo por NaCl. Esta preponderancia en la respuesta sensitiva de un tipo de estrés sobre el otro podría deberse a que el estrés oxidativo generado como consecuencia del estrés hiperosmótico puede ser contrarrestado en ausencia de este sistema de defensa antioxidante por ser menos agresivo, mientras que las células no pueden sobrevivir al estrés oxidativo que supone la adición directa de H₂O₂.

Sólo los mutantes con la cadena de transporte de electrones dañada mostraron un fenotipo sensible cuando crecían en medio hipersalino. Esto refuerza la idea de que la cadena de transporte de electrones tiene un papel fundamental en la mitocondria para la adaptación a condiciones tanto de estrés hiperosmótico como oxidativo (Pastor, M. M. et al. 2009), (Thorpe, G. W. et al. 2004).

Proteínas implicadas en la biosíntesis de aminoácidos cuya sobreacumulación favorece la adaptación al estrés hiperosmótico:

Las proteínas **Leu4, 9, Ilv2, 6 y Ecm40**, implicadas en la biosíntesis de aminoácidos, fueron identificadas como proteínas cuya abundancia aumentaba en la mitocondria durante la adaptación al estrés hiperosmótico. El hecho de que el estrés salino estimule la acumulación de proteínas involucradas en la biosíntesis de aminoácidos podría explicarse como consecuencia de la inhibición de la toma y/o de la biosíntesis de aminoácidos específicos en presencia de elevadas concentraciones de Na⁺, puesto que se sabía que el estrés hiperosmótico provoca el agotamiento de los aminoácidos (Norbeck, J. and Blomberg, A. 1998), (Pascual-Ahuir, A. et al. 2001). La relación entre el ayuno de aminoácidos y la respuesta a estrés hiperosmótico ya había sido descrita a través de la sensibilidad a la salinidad de los mutantes *Δgcn4*, que no disponen del activador transcripcional central de la vía de control general de la biosíntesis de aminoácidos (Pascual-Ahuir, A. et al. 2001). Esto, junto con el hecho de que la suplementación con aminoácidos rescata la sensibilidad de las células de levadura restituyendo la tasa de crecimiento normal en condiciones de estrés salino (Pandey, G. et al. 2007), apoya que la biosíntesis de aminoácidos se activa en respuesta al estrés salino como consecuencia de la

sobreacumulación de enzimas y reguladores biológicos implicados en la síntesis de leucina, isoleucina, valina, arginina.

Además, los enzimas metabólicos, incluyendo aquéllos involucrados en la síntesis de aminoácidos, juegan un importante papel estructural y protector porque se agrupan formando complejos con el genoma mitocondrial y forman estructuras denominadas nucleoides (Chen, X. J. and Butow, R. A. 2005). Esta estructura es importante para mantener la estabilidad y la heredabilidad del genoma de la mitocondria ya que se trata de un complejo proteico dinámico, capaz de cambiar su composición proteica en respuesta a determinadas alteraciones metabólicas (Kucej, M. et al. 2008).

Los enzimas metabólicos en el nucleoide son generalmente bifuncionales puesto que su actividad enzimática no se requiere para la organización y función del propio nucleoide. Ilv6p es uno de los componentes del nucleoide de levadura y ha sido identificada como una de las proteínas cuya acumulación aumenta en respuesta a la salinidad. Probablemente, los enzimas de biosíntesis de aminoácidos identificados por sobreacumularse en la mitocondria durante la adaptación (Leu4p y 9p, Ilv2p y Ecm40p), tuviesen una función protectora además de la función metabólica conocida. Esto explicaría la hipersensibilidad al estrés oxidativo que supone la pérdida de función de estos enzimas.

Proteínas identificadas por tener funciones estructurales cuya sobreacumulación favorece la adaptación al estrés hiperosmótico:

Identificamos a la proteína **Lsp1** como un componente mitocondrial inducido por sal. Lsp1p, junto con la proteína homóloga Pil1p constituyen estructuras estables denominadas eisomas, que se disponen formando parches en la zona cortical de la membrana plasmática (Walther, T. C. et al. 2006b) y cuya función es la endocitosis y el control del volumen de moléculas transportadas a través de la membrana (Grossmann, G. et al. 2008), (Walther, T. C. et al. 2006b). Ha sido demostrado que varias proteínas integrales de membrana y otras proteínas solubles co-localizan con Lsp1/Pil1; esto sugiere que estas estructuras en forma de parches representan dominios especializados dentro de la membrana plasmática (Grossmann, G. et al. 2008). Aunque Lsp1p y Pil1p han sido identificadas en la

membrana externa mitocondrial altamente purificada (Zahedi, R. P. et al. 2006b), todavía queda mucho por decir acerca de sus posibles funciones. Nuestros resultados muestran que Lsp1p y Pil1p en menor grado, se inducen tanto como consecuencia de un cambio diáuxico como por estrés salino (Figura R.11.7A). También se ha demostrado que además de Lsp1p, al menos otras cuatro proteínas de la membrana externa mitocondrial (Om14p, Rdl1p, Mcr1p y Hfd1p) están específicamente inducidas en respuesta a estrés por NaCl (Figura R.11.7B) lo que podría estar apuntando una posible modificación en la composición proteica de la membrana mitocondrial en respuesta al osmoestrés. Con la excepción de Mcr1p, que tiene actividad citocromo b5-reductasa de NADH (Lamb, D. C. et al. 1999), las funciones de las proteínas de membrana externa mitocondrial están aún por determinar. Todavía desconocemos el impacto que supone el estrés por NaCl en la homeostasis iónica mitocondrial y en el control del volumen de este orgánulo. Sin embargo, podemos anticipar que cualquier choque hiperosmótico interferirá en el equilibrio osmótico de la mitocondria, regulada a través de los flujos de K^+ (Kaasik, A. et al. 2007), (Nowikovsky, K. et al. 2009), para activar respuestas adaptativas a nivel de permeabilidad de membrana.

Chaperonas cuya sobreacumulación favorece la adaptación al estrés hiperosmótico:

La chaperona **Hsp78** fue identificada como inducible por osmoestrés. Nuestros resultados mostraron que la pérdida de función Hsp78p causaba una severa sensibilidad al estrés oxidativo (Figura R.11.8). Hsp78p y Ssc1p cooperan en la matriz mitocondrial para estabilizar proteínas después de un choque térmico (Leonhardt, S. A. et al. 1993), (Schmitt, M. et al. 1995). Los datos que facilitan los perfiles genómicos muestran que la expresión de *HSP78* se induce más en condiciones de estrés hiperosmótico que *SSC1* (Ni, L. et al. 2009b), lo cual indica que la actividad inducida de Hsp78 protege a la mitocondria de la desnaturalización de las proteínas que causa el estrés salino.

Proteínas de localización exclusivamente mitocondrial cuya abundancia disminuye en condiciones de estrés:

Además se identificaron varias proteínas del extracto mitocondrial cuya abundancia disminuye en respuesta a estrés hiperosmótico. Sólo dos de ellas (Erg6p y Gcv3p) se localizan exclusivamente en la mitocondria.

La proteína **Erg6** es una enzima de la membrana externa mitocondrial que participa específicamente en la biosíntesis de ergosterol (Gaber, R. F. et al. 1989), (Zahedi, R. P. et al. 2006c). En nuestro laboratorio ha sido demostrado que los niveles de ergosterol descienden en respuesta al estrés como consecuencia de la represión de la transcripción de varios genes de biosíntesis de ergosterol. Estas observaciones están en consonancia con la conclusión de que las mitocondrias de células adaptadas al estrés contienen niveles reducidos de Erg6p.

Gcv3p es una subunidad del complejo mitocondrial involucrado en el catabolismo de la glicina (Nagarajan, L. and Storms, R. K. 1997). Desconocemos por ahora cuál es la conexión entre la regulación de *GCV3* y la adaptación a la salinidad. Sin embargo, nuestros resultados están avalados por los perfiles de expresión genómica que identifican a *GCV1-3* como genes reprimidos en presencia de NaCl (Ni, L. et al. 2009a).

Enzimas glicolíticos cuya acumulación disminuye durante la adaptación al estrés hiperosmótico:

Las proteínas **Fba1**, **Tdh1-3** y **Pgk1** fueron identificadas por disminuir su abundancia en mitocondrias purificadas en condiciones de estrés hiperosmótico. Estos enzimas están involucrados en la glicólisis y la gluconeogénesis y se localizan mayoritariamente en el citosol, aunque algunos de ellos como Tdh3p y Pgk1p han sido purificados a partir de extractos mitocondriales (Reinders, J. et al. 2006).

La posible relación entre la respuesta al estrés hiperosmótico y la glicólisis puede ser como consecuencia del aumento de producción de glicerol utilizado como osmolito protector cuando se somete a las células de levadura a estrés osmótico (Hohmann, S. 2002). La biosíntesis de glicerol se inicia con el intermediario glicolítico dihidroxiacetona fosfato, por lo que compete directamente

con la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (Tdh1-3) por su sustrato para obtener 1,3 bifosfoglicerato. Por lo tanto, la biosíntesis del glicerol durante el estrés salino podría verse favorecida por la reducción de los enzimas que participan en pasos glucolíticos por debajo de la dihidroxiacetona fosfato. El hecho de que las dos isoformas Tdh2 y 3, responsables del 75-90% del total de la actividad enzimática intracelular (McAlister, L. and Holland, M. J. 1985), estén reprimidas en fracciones mitocondriales bajo condiciones de estrés, refuerza la hipótesis de que la mayor síntesis de glicerol se lleva a término a costa de la menor actividad glicolítica.

Investigaciones posteriores deberán determinar si el ajuste de la actividad enzimática glicolítica y la asociación de enzimas glicolíticas con la mitocondria es una característica relevante para la adaptación al osmoestrés.

Enzimas del Retículo Endoplasmático recuperados durante la purificación de la mitocondria cuya acumulación disminuye durante la adaptación al estrés hiperosmótico:

Las proteínas **Kar2**, **Cpr5**, **Pdi1** y **Fkb2** se identificaron por acumularse en menores cantidades en los extractos de mitocondrias de células adaptadas a estrés por NaCl que en las que crecían en medio YPD. Se trata de enzimas implicadas en el plegamiento e importación de proteínas al retículo endoplasmático y que se localizan en él.

Por un lado, este fenómeno podía deberse a una co-purificación residual de componentes del RE junto con las mitocondrias, como consecuencia de la similitud entre las características estructurales y de composición de las membranas de ambos orgánulos. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que las mitocondrias y RE están interactuando y que el contacto entre ellos es importante tanto a nivel de señalización como para la transferencia de lípidos (Giorgi, C. et al. 2009), (Pizzo, P. and Pozzan, T. 2007).

La mitocondria es un orgánulo con muchísimas funciones y en cambio, sólo una pequeña fracción de los biopolímeros que necesita para realizarlas se sintetizan en su interior, el resto se importa. La mitocondria por ejemplo, importa

casi todos los lípidos que necesita para la biosíntesis de sus membranas pero en cambio, exporta fosfatidil etanolamina al retículo endoplasmático donde es metilado para obtener fosfatidilcolina (Voelker, D. R. 2003) y este fenómeno tiene lugar necesariamente como consecuencia de la existencia de contacto físico entre ambos orgánulos (Achleitner, G. et al. 1999), (Gaigg, B. et al. 1995). La arquitectura de la estructura molecular que forman, ha sido determinada recientemente y recibe el nombre de ERMES (Kornmann, B. et al. 2009). Lo cierto es que hoy por hoy se desconoce si este complejo es sólo un punto de contacto entre los orgánulos o es responsable de la interacción y del intercambio de biomoléculas de un modo más activo (Kopec, K. O. et al. 2010).

En la figura D.1 mostramos un esquema de los resultados proteómicos obtenidos. En ella se representan las proteínas mitocondriales inducidas durante la adaptación de las células al estrés hiperosmótico.

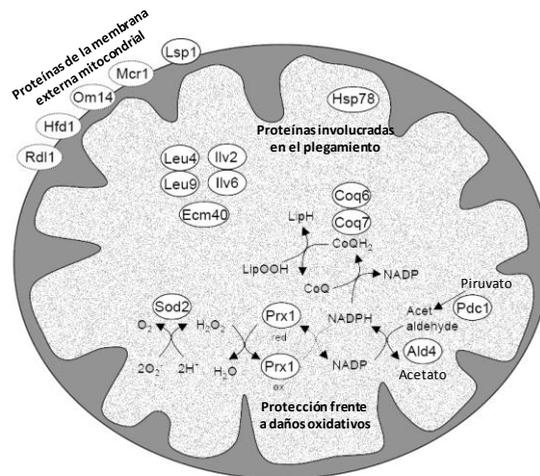


Figura D.1: Representación esquemática de las funciones mitocondriales inducidas por estrés osmótico. Las proteínas se agrupan según su función durante la adaptación al estrés hiperosmótico o según su localización. Las proteínas representadas entre líneas discontinuas Mcr1, Om14, Hfd1 y Rdl1, no fueron identificadas en el análisis proteómico, sin embargo, se incluyen porque su regulación es similar a Lsp1p. CoQ y CoQH₂ representan la forma oxidada y reducida de CoQ respectivamente. LipOOH representa los hidroperóxidos lipídicos.

En resumen, el análisis proteómico de la mitocondria en respuesta al estrés hiperosmótico revela la naturaleza dinámica y compleja de la adaptación al estrés de este orgánulo y descubre grupos funcionales de proteínas cuya repercusión ha de continuar estudiándose.

Conclusiones

Las conclusiones extraídas en el presente trabajo se pueden resumir:

Muchos mutantes de levadura con defectos mitocondriales son sensibles al estrés hiperosmótico.

La expresión de algunos genes nucleares que codifican funciones mitocondriales se inducen rápidamente en respuesta a tratamientos salinos, comportándose como genes de defensa al estrés osmótico. La activación de la transcripción depende parcialmente de las quinasas Hog1 y Snf1.

La actividad enzimática mitocondrial de succinato deshidrogenasa aumenta en respuesta al NaCl de manera dependiente del Snf1.

Las células de levadura con defectos mitocondriales acumulan mayores cantidades de ROS en condiciones de estrés osmótico. Además, la adición exógena de sustancias antioxidantes, como el glutatión, rescata en parte su fenotipo de sensibilidad.

La mitocondria de las células de levadura modifica su composición proteica de manera dinámica y compleja durante la adaptación al estrés salino.

Gran parte de las proteínas mitocondriales que incrementan su acumulación durante la adaptación al estrés hipersalino tienen funciones antioxidantes, lo cual evidencia que el estrés osmótico desencadena respuestas antioxidantes.

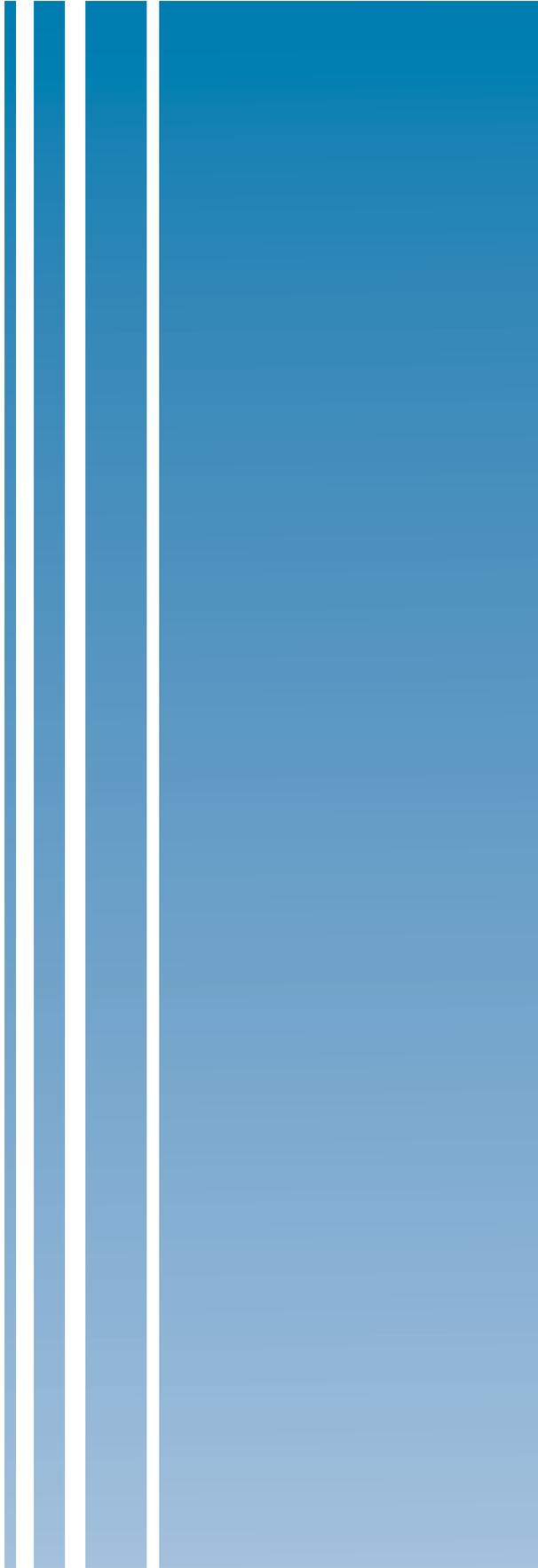
Algunas proteínas mitocondriales involucradas en la biosíntesis de aminoácidos se inducen por estrés salino.

La membrana mitocondrial sufre un cambio en la composición proteica durante la adaptación al osmoestrés.

Algunas proteínas que disminuyen en la fracción mitocondrial durante la adaptación al estrés salino pertenecen al retículo endoplasmático, lo que podría indicar que la conexión entre este orgánulo y la mitocondria varía en condiciones de estrés hiperosmótico.

En resumen, podemos decir que, durante la presente tesis, hemos identificado la función mitocondrial como crucial para la adaptación de las células de levadura al estrés hiperosmótico y que la actividad antioxidante de la mitocondria es un factor determinante para la adaptación.

Bibliografía



Reference List

Achleitner,G., Gaigg,B., Krasser,A., Kainersdorfer,E., Kohlwein,S.D., Perktold,A., Zellnig,G., and Daum,G. (1999) Association between the endoplasmic reticulum and mitochondria of yeast facilitates interorganelle transport of phospholipids through membrane contact. *Eur.J.Biochem.* **264**:545-553.

Ahn,S.H., Cheung,W.L., Hsu,J.Y., Diaz,R.L., Smith,M.M., and Allis,C.D. (2005) Sterile 20 kinase phosphorylates histone H2B at serine 10 during hydrogen peroxide-induced apoptosis in *S. cerevisiae*. *Cell* **120**:25-36.

Albertyn,J., Hohmann,S., Thevelein,J.M., and Prior,B.A. (1994) GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol.Cell Biol.* **14**:4135-4144.

Alepuz,P.M., Cunningham,K.W., and Estruch,F. (1997) Glucose repression affects ion homeostasis in yeast through the regulation of the stress-activated ENA1 gene. *Mol.Microbiol.* **26**:91-98.

Alexander,K.P., Anstrom,K.J., Muhlbaier,L.H., Grosswald,R.D., Smith,P.K., Jones,R.H., and Peterson,E.D. (2000) Outcomes of cardiac surgery in patients > or = 80 years: results from the National Cardiovascular Network. *J.Am.Coll.Cardiol.* **35**:731-738.

Allen,C., Buttner,S., Aragon,A.D., Thomas,J.A., Meirelles,O., Jaetao,J.E., Benn,D., Ruby,S.W., Veenhuis,M., Madeo,F., and Werner-Washburne,M. (2006) Isolation of quiescent and nonquiescent cells from yeast stationary-phase cultures. *J.Cell Biol.* **174**:89-100.

Anderson,N.G. and Anderson,N.L. (1996) Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future. *Electrophoresis* **17**:443-453.

Andreyev,A.Y., Kushnareva,Y.E., and Starkov,A.A. (2005) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc.)* **70**:200-214.

Ashrafi,K., Sinclair,D., Gordon,J.I., and Guarente,L. (1999) Passage through stationary phase advances replicative aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**:9100-9105.

Banuett,F. (1998) Signalling in the yeasts: an informational cascade with links to the filamentous fungi. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **62**:249-274.

Barford,D. (2004) The role of cysteine residues as redox-sensitive regulatory switches. *Curr.Opin.Struct.Biol.* **14**:679-686.

Barnett,J.A. (1976) The utilization of sugars by yeasts. *Adv.Carbohydr.Chem.Biochem.* **32**:125-234.

Barros,M.H., Netto,L.E., and Kowaltowski,A.J. (2003) H₂O₂ generation in *Saccharomyces cerevisiae* respiratory pet mutants: effect of cytochrome c. *Free Radic.Biol.Med.* **35**:179-188.

Bentinger,M., Brismar,K., and Dallner,G. (2007) The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion.* **7 Suppl**:S41-S50.

Berlett,B.S. and Stadtman,E.R. (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J.Biol.Chem.* **272**:20313-20316.

Bermingham-McDonogh,O., Gralla,E.B., and Valentine,J.S. (1988) The copper, zinc-superoxide dismutase gene of *Saccharomyces cerevisiae*: cloning, sequencing, and biological activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **85**:4789-4793.

Bilsland-Marchesan,E., Arino,J., Saito,H., Sunnerhagen,P., and Posas,F. (2000) Rck2 kinase is a substrate for the osmotic stress-activated mitogen-activated protein kinase Hog1. *Mol.Cell Biol.* **20**:3887-3895.

Bitterman,K.J., Medvedik,O., and Sinclair,D.A. (2003) Longevity regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: linking metabolism, genome stability, and heterochromatin. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **67**:376-99, table.

Bjellqvist,B., Sanchez,J.C., Pasquali,C., Ravier,F., Paquet,N., Frutiger,S., Hughes,G.J., and Hochstrasser,D. (1993) Micropreparative two-dimensional electrophoresis allowing the separation of samples containing milligram amounts of proteins. *Electrophoresis* **14**:1375-1378.

Blomberg,A. (2000) Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model. *FEMS Microbiol.Lett.* **182**:1-8.

Blomberg,A., Larsson,C., and Gustafsson,L. (1988) Microcalorimetric monitoring of growth of *Saccharomyces cerevisiae*: osmotolerance in relation to physiological state. *J.Bacteriol.* **170**:4562-4568.

- Boldogh,I.R., Yang,H.C., and Pon,L.A.** (2001) Mitochondrial inheritance in budding yeast. *Traffic*. **2**:368-374.
- Brewster,J.L., de,V.T., Dwyer,N.D., Winter,E., and Gustin,M.C.** (1993) An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* **259**:1760-1763.
- Brigelius-Flohe,R.** (2006) Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. *Biol.Chem.* **387**:1329-1335.
- Butler,G. and Thiele,D.J.** (1991) ACE2, an activator of yeast metallothionein expression which is homologous to SWI5. *Mol.Cell Biol.* **11**:476-485.
- Butow,R.A. and Avadhani,N.G.** (2004) Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Mol.Cell* **14**:1-15.
- Cadenas,E. and Davies,K.J.** (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic.Biol.Med.* **29**:222-230.
- Cadet,J., Berger,M., Douki,T., and Ravanat,J.L.** (1997) Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.* **131**:1-87.
- Celli,V., Rugolo,M., Sgarbi,G., Ghelli,A., Zanna,C., Baracca,A., Lenaz,G., Napoli,E., Martinuzzi,A., and Solaini,G.** (2004) Bioenergetics shapes cellular death pathways in Leber's hereditary optic neuropathy: a model of mitochondrial neurodegeneration. *Biochim.Biophys.Acta* **1658**:172-179.
- Carmel-Harel,O., Stearman,R., Gasch,A.P., Botstein,D., Brown,P.O., and Storz,G.** (2001) Role of thioredoxin reductase in the Yap1p-dependent response to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Microbiol.* **39**:595-605.
- Carratu,L., Franceschelli,S., Pardini,C.L., Kobayashi,G.S., Horvath,I., Vigh,L., and Maresca,B.** (1996) Membrane lipid perturbation modifies the set point of the temperature of heat shock response in yeast. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**:3870-3875.
- Causton,H.C., Ren,B., Koh,S.S., Harbison,C.T., Kanin,E., Jennings,E.G., Lee,T.I., True,H.L., Lander,E.S., and Young,R.A.** (2001) Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol.Biol.Cell* **12**:323-337.
- Celenza,J.L. and Carlson,M.** (1989) Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 protein kinase and evidence for functional interaction with the SNF4 protein. *Mol.Cell Biol.* **9**:5034-5044.

- Cereghino,G.P. and Scheffler,I.E.** (1996) Genetic analysis of glucose regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: control of transcription versus mRNA turnover. *EMBO J.* **15**:363-374.
- Chen,R.E. and Thorner,J.** (2007) Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim.Biophys.Acta* **1773**:1311-1340.
- Chen,X.J. and Butow,R.A.** (2005) The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat.Rev.Genet.* **6**:815-825.
- Chodosh,L.A., Olesen,J., Hahn,S., Baldwin,A.S., Guarente,L., and Sharp,P.A.** (1988) A yeast and a human CCAAT-binding protein have heterologous subunits that are functionally interchangeable. *Cell* **53**:25-35.
- Clotet,J., Escote,X., Adrover,M.A., Yaakov,G., Gari,E., Aldea,M., de,N.E., and Posas,F.** (2006) Phosphorylation of Hsl1 by Hog1 leads to a G2 arrest essential for cell survival at high osmolarity. *EMBO J.* **25**:2338-2346.
- Cohen,G., Rapatz,W., and Ruis,H.** (1988) Sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* CTA1 gene and amino acid sequence of catalase A derived from it. *Eur.J.Biochem.* **176**:159-163.
- 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.
- Culotta,V.C., Yang,M., and O'Halloran,T.V.** (2006) Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochim.Biophys.Acta* **1763**:747-758.
- Dang,V.D., Bohn,C., Bolotin-Fukuhara,M., and Daignan-Fornier,B.** (1996) The CCAAT box-binding factor stimulates ammonium assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*, defining a new cross-pathway regulation between nitrogen and carbon metabolisms. *J.Bacteriol.* **178**:1842-1849.
- 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,K.W. and van,D.K.** (1992) A method for the determination of changes of glycolytic metabolites in yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH. *Anal.Biochem.* **204**:118-123.

de,N.E. and Posas,F. (2010) Multilayered control of gene expression by stress-activated protein kinases. *EMBO J.* **29**:4-13.

de,N.E., Real,F.X., and Posas,F. (2007) Mucins, osmosensors in eukaryotic cells? *Trends Cell Biol.* **17**:571-574.

de,N.E., Zapater,M., Alepuz,P.M., Sumoy,L., Mas,G., and Posas,F. (2004) The MAPK Hog1 recruits Rpd3 histone deacetylase to activate osmoresponsive genes. *Nature* **427**:370-374.

Dean,R.T., Fu,S., Stocker,R., and Davies,M.J. (1997) Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem.J.* **324 (Pt 1)**:1-18.

Defontaine,A., Lecocq,F.M., and Hallet,J.N. (1991) A rapid miniprep method for the preparation of yeast mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res.* **19**:185.

Delaunay,A., Isnard,A.D., and Toledano,M.B. (2000) H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J.* **19**:5157-5166.

Delaunay,A., Pflieger,D., Barrault,M.B., Vinh,J., and Toledano,M.B. (2002) A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* **111**:471-481.

DeRisi,J.L., Iyer,V.R., and Brown,P.O. (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* **278**:680-686.

Dilova,I., Chen,C.Y., and Powers,T. (2002) Mks1 in concert with TOR signaling negatively regulates RTG target gene expression in *S. cerevisiae*. *Curr.Biol.* **12**:389-395.

Dilova,I. and Powers,T. (2006) Accounting for strain-specific differences during RTG target gene regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **6**:112-119.

Do,T.Q., Schultz,J.R., and Clarke,C.F. (1996) Enhanced sensitivity of ubiquinone-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae* to products of autoxidized polyunsaturated fatty acids. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**:7534-7539.

Durr,A., Cossee,M., Agid,Y., Campuzano,V., Mignard,C., Penet,C., Mandel,J.L., Brice,A., and Koenig,M. (1996) Clinical and genetic abnormalities in patients with Friedreich's ataxia. *N.Engl.J.Med.* **335**:1169-1175.

Dwight,S.S., Harris,M.A., Dolinski,K., Ball,C.A., Binkley,G., Christie,K.R., Fisk,D.G., Issel-Tarver,L., Schroeder,M., Sherlock,G., Sethuraman,A., Weng,S.,

- Botstein,D., and Cherry,J.M.** (2002) Saccharomyces Genome Database (SGD) provides secondary gene annotation using the Gene Ontology (GO). *Nucleic Acids Res.* **30**:69-72.
- Eisenberg,T., Buttner,S., Kroemer,G., and Madeo,F.** (2007) The mitochondrial pathway in yeast apoptosis. *Apoptosis.* **12**:1011-1023.
- Epstein,C.B., Waddle,J.A., Hale,W., 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.
- Escote,X., Zapater,M., Clotet,J., and Posas,F.** (2004) Hog1 mediates cell-cycle arrest in G1 phase by the dual targeting of Sic1. *Nat.Cell Biol.* **6**:997-1002.
- Fabrizio,P., Battistella,L., Vardavas,R., Gattazzo,C., Liou,L.L., Diaspro,A., Dossen,J.W., Gralla,E.B., and Longo,V.D.** (2004) Superoxide is a mediator of an altruistic aging program in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Cell Biol.* **166**:1055-1067.
- Fabrizio,P. and Longo,V.D.** (2003) The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell* **2**:73-81.
- Fahrenkrog,B., Koser,J., and Aebi,U.** (2004) The nuclear pore complex: a jack of all trades? *Trends Biochem.Sci.* **29**:175-182.
- Fannjiang,Y., Cheng,W.C., Lee,S.J., Qi,B., Pevsner,J., McCaffery,J.M., Hill,R.B., Basanez,G., and Hardwick,J.M.** (2004) Mitochondrial fission proteins regulate programmed cell death in yeast. *Genes Dev.* **18**:2785-2797.
- Fernandes,L., Rodrigues-Pousada,C., and Struhl,K.** (1997) Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Mol.Cell Biol.* **17**:6982-6993.
- Flattery-O'Brien,J., Collinson,L.P., and Dawes,I.W.** (1993) *Saccharomyces cerevisiae* has an inducible response to menadione which differs from that to hydrogen peroxide. *J.Gen.Microbiol.* **139**:501-507.
- Folch-Mallo,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.
- Forsburg,S.L. and Guarente,L.** (1989) Identification and characterization of HAP4: a third component of the CCAAT-bound HAP2/HAP3 heteromer. *Genes Dev.* **3**:1166-1178.

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.

Fridovich,I. (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu.Rev.Biochem.* **64**:97-112.

Fuge,E.K., Braun,E.L., and Werner-Washburne,M. (1994) Protein synthesis in long-term stationary-phase cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol.* **176**:5802-5813.

Gaber,R.F., Copple,D.M., Kennedy,B.K., Vidal,M., and Bard,M. (1989) The yeast gene ERG6 is required for normal membrane function but is not essential for biosynthesis of the cell-cycle-sparking sterol. *Mol.Cell Biol.* **9**:3447-3456.

Gaigg,B., Simbeni,R., Hrastnik,C., Paltauf,F., and Daum,G. (1995) Characterization of a microsomal subfraction associated with mitochondria of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. Involvement in synthesis and import of phospholipids into mitochondria. *Biochim.Biophys.Acta* **1234**:214-220.

Gancedo,J.M. (1992) Carbon catabolite repression in yeast. *Eur.J.Biochem.* **206**:297-313.

Ganster,R.W., McCartney,R.R., and Schmidt,M.C. (1998) Identification of a calcineurin-independent pathway required for sodium ion stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **150**:31-42.

Garciadeblas,B., Rubio,F., Quintero,F.J., Banuelos,M.A., Haro,R., and Rodriguez-Navarro,A. (1993) Differential expression of two genes encoding isoforms of the ATPase involved in sodium efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Gen.Genet.* **236**:363-368.

Gasch,A.P., Spellman,P.T., Kao,C.M., Carmel-Harel,O., Eisen,M.B., Storz,G., Botstein,D., and Brown,P.O. (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol.Biol.Cell* **11**:4241-4257.

Ghaemmaghami,S., Huh,W.K., Bower,K., Howson,R.W., Belle,A., Dephoure,N., O'Shea,E.K., and Weissman,J.S. (2003) Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **425**:737-741.

Gharahdaghi,F., Weinberg,C.R., Meagher,D.A., Imai,B.S., and Mische,S.M. (1999) Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis* **20**:601-605.

Giannattasio,M., Lazzaro,F., Plevani,P., and Muzi-Falconi,M. (2005) The DNA damage checkpoint response requires histone H2B ubiquitination by Rad6-Bre1 and H3 methylation by Dot1. *J.Biol.Chem.* **280**:9879-9886.

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.

Giorgi,C., De,S.D., Bononi,A., Rizzuto,R., and Pinton,P. (2009) Structural and functional link between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **41**:1817-1827.

Godon,C., Lagniel,G., Lee,J., Buhler,J.M., Kieffer,S., Perrot,M., Boucherie,H., Toledano,M.B., and Labarre,J. (1998) The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **273**:22480-22489.

Gourlay,C.W. and Ayscough,K.R. (2005) The actin cytoskeleton in ageing and apoptosis. *FEMS Yeast Res.* **5**:1193-1198.

Grant,C.M., MacIver,F.H., and Dawes,I.W. (1997) Mitochondrial function is required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **410**:219-222.

Graves,P.R. and Haystead,T.A. (2002) Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **66**:39-63.

Greetham,D. and Grant,C.M. (2009) Antioxidant activity of the yeast mitochondrial one-Cys peroxiredoxin is dependent on thioredoxin reductase and glutathione in vivo. *Mol.Cell Biol.* **29**:3229-3240.

Gregg,C., Kyryakov,P., and Titorenko,V.I. (2009) Purification of mitochondria from yeast cells. *J.Vis.Exp.*

Grossmann,G., Malinsky,J., Stahlschmidt,W., Loibl,M., Weig-Meckl,J., Frommer,W.B., Opekarova,M., and Tanner,W. (2008) Plasma membrane microdomains regulate turnover of transport proteins in yeast. *J.Cell Biol.* **183**:1075-1088.

- Gustin,M.C., Albertyn,J., Alexander,M., and Davenport,K.** (1998) MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **62**:1264-1300.
- Halliwell,B.** (2007) Biochemistry of oxidative stress. *Biochem.Soc.Trans.* **35**:1147-1150.
- Hamer,D.H.** (1986) Metallothionein. *Annu.Rev.Biochem.* **55**:913-951.
- Hanahan,D.J.** (1986) Platelet activating factor: a biologically active phosphoglyceride. *Annu.Rev.Biochem.* **55**:483-509.
- Hansford,R.G.** (1985) Relation between mitochondrial calcium transport and control of energy metabolism. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.* **102**:1-72.
- Hardie,D.G.** (2007) AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **8**:774-785.
- Hardie,D.G., Carling,D., and Carlson,M.** (1998) The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu.Rev.Biochem.* **67**:821-855.
- Haro,R., Garcíadeblas,B., and Rodríguez-Navarro,A.** (1991) A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett.* **291**:189-191.
- Hedbacker,K. and Carlson,M.** (2008) SNF1/AMPK pathways in yeast. *Front Biosci.* **13**:2408-2420.
- Herrero,E., Ros,J., Belli,G., and Cabisco,E.** (2008) Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim.Biophys.Acta* **1780**:1217-1235.
- Hochstrasser,M.** (1991) Functions of intracellular protein degradation in yeast. *Genet.Eng (N.Y.)* **13**:307-329.
- Hodges,P.E., McKee,A.H., Davis,B.P., Payne,W.E., and Garrels,J.I.** (1999) The Yeast Proteome Database (YPD): a model for the organization and presentation of genome-wide functional data. *Nucleic Acids Res.* **27**:69-73.
- 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.** (2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **66**:300-372.

- Hohmann,S., Krantz,M., and Nordlander,B.** (2007) Yeast osmoregulation. *Methods Enzymol.* **428**:29-45.
- Hong,H.Y., Yoo,G.S., and Choi,J.K.** (2000) Direct Blue 71 staining of proteins bound to blotting membranes. *Electrophoresis* **21**:841-845.
- 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.
- Huh,W.K., Falvo,J.V., Gerke,L.C., Carroll,A.S., Howson,R.W., Weissman,J.S., and O'Shea,E.K.** (2003) Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**:686-691.
- Ikner,A. and Shiozaki,K.** (2005) Yeast signaling pathways in the oxidative stress response. *Mutat.Res.* **569**:13-27.
- Inoue,Y., Matsuda,T., Sugiyama,K., Izawa,S., and Kimura,A.** (1999) Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **274**:27002-27009.
- Jacoby,T., Flanagan,H., Faykin,A., Seto,A.G., Mattison,C., and Ota,I.** (1997) Two protein-tyrosine phosphatases inactivate the osmotic stress response pathway in yeast by targeting the mitogen-activated protein kinase, Hog1. *J.Biol.Chem.* **272**:17749-17755.
- Jamieson,D.J.** (1992) *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. *J.Bacteriol.* **174**:6678-6681.
- 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.
- Jouaville,L.S., Pinton,P., Bastianutto,C., Rutter,G.A., and Rizzuto,R.** (1999) Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**:13807-13812.
- Kaasik,A., Safiulina,D., Zharkovsky,A., and Veksler,V.** (2007) Regulation of mitochondrial matrix volume. *Am.J.Physiol Cell Physiol* **292**:C157-C163.

- 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.
- Ko,C.H., Buckley,A.M., and Gaber,R.F.** (1990) TRK2 is required for low affinity K⁺ transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **125**:305-312.
- Kobayashi,N. and McEntee,K.** (1990) Evidence for a heat shock transcription factor-independent mechanism for heat shock induction of transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **87**:6550-6554.
- Kobayashi,N. and McEntee,K.** (1993) Identification of cis and trans components of a novel heat shock stress regulatory pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* **13**:248-256.
- Komeili,A., Wedaman,K.P., O'Shea,E.K., and Powers,T.** (2000) Mechanism of metabolic control. Target of rapamycin signaling links nitrogen quality to the activity of the Rtg1 and Rtg3 transcription factors. *J.Cell Biol.* **151**:863-878.
- Koonin,E.V.** (1994) Yeast protein controlling inter-organelle communication is related to bacterial phosphatases containing the Hsp 70-type ATP-binding domain. *Trends Biochem.Sci.* **19**:156-157.
- Kopec,K.O., Alva,V., and Lupas,A.N.** (2010) Homology of SMP domains to the TULIP superfamily of lipid-binding proteins provides a structural basis for lipid exchange between ER and mitochondria. *Bioinformatics.* **26**:1927-1931.
- 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.
- Koziol,S., Zagulski,M., Bilinski,T., and Bartosz,G.** (2005) Antioxidants protect the yeast *Saccharomyces cerevisiae* against hypertonic stress. *Free Radic.Res.* **39**:365-371.
- Krantz,M., Nordlander,B., Valadi,H., Johansson,M., Gustafsson,L., and Hohmann,S.** (2004) Anaerobicity prepares *Saccharomyces cerevisiae* cells for faster adaptation to osmotic shock. *Eukaryot.Cell* **3**:1381-1390.
- Krems,B., Charizanis,C., and Entian,K.D.** (1996) The response regulator-like protein Pos9/Skn7 of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in oxidative stress resistance. *Curr.Genet.* **29**:327-334.

Kucej,M., Kucejova,B., Subramanian,R., Chen,X.J., and Butow,R.A. (2008) Mitochondrial nucleoids undergo remodeling in response to metabolic cues. *J.Cell Sci.* **121**:1861-1868.

Kuge,S., Arita,M., Murayama,A., Maeta,K., Izawa,S., Inoue,Y., and Nomoto,A. (2001) Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. *Mol.Cell Biol.* **21**:6139-6150.

Kuge,S. and Jones,N. (1994) YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J.* **13**:655-664.

Kumar,A., Agarwal,S., Heyman,J.A., Matson,S., Heidtman,M., Piccirillo,S., Umansky,L., Drawid,A., Jansen,R., Liu,Y., Cheung,K.H., Miller,P., Gerstein,M., Roeder,G.S., and Snyder,M. (2002) Subcellular localization of the yeast proteome. *Genes Dev.* **16**:707-719.

Kurtz,S., Rossi,J., Petko,L., and Lindquist,S. (1986) An ancient developmental induction: heat-shock proteins induced in sporulation and oogenesis. *Science* **231**:1154-1157.

Lamb,D.C., Kelly,D.E., Manning,N.J., Kaderbhai,M.A., and Kelly,S.L. (1999) Biodiversity of the P450 catalytic cycle: yeast cytochrome b5/NADH cytochrome b5 reductase complex efficiently drives the entire sterol 14-demethylation (CYP51) reaction. *FEBS Lett.* **462**:283-288.

Laroche,C., Beney,L., Marechal,P.A., and Gervais,P. (2001) The effect of osmotic pressure on the membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae* at different physiological temperatures. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **56**:249-254.

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.

Leonhardt,S.A., Fearson,K., Danese,P.N., and Mason,T.L. (1993) HSP78 encodes a yeast mitochondrial heat shock protein in the Clp family of ATP-dependent proteases. *Mol.Cell Biol.* **13**:6304-6313.

Lewis,J.G., Learmonth,R.P., and Watson,K. (1995) Induction of heat, freezing and salt tolerance by heat and salt shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **141 (Pt 3)**:687-694.

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.

Ligr,M., Madeo,F., Frohlich,E., Hilt,W., Frohlich,K.U., and Wolf,D.H. (1998) Mammalian Bax triggers apoptotic changes in yeast. *FEBS Lett.* **438**:61-65.

Ligr,M., Velten,I., Frohlich,E., Madeo,F., Ledig,M., Frohlich,K.U., Wolf,D.H., and Hilt,W. (2001) The proteasomal substrate Stm1 participates in apoptosis-like cell death in yeast. *Mol.Biol.Cell* **12**:2422-2432.

Ligterink,W. and Hirt,H. (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways in plants: versatile signaling tools. *Int.Rev.Cytol.* **201**:209-275.

Lin,S.S., Manchester,J.K., and Gordon,J.I. (2003) Sip2, an N-myristoylated beta subunit of Snf1 kinase, regulates aging in *Saccharomyces cerevisiae* by affecting cellular histone kinase activity, recombination at rDNA loci, and silencing. *J.Biol.Chem.* **278**:13390-13397.

Liu,Z. and Butow,R.A. (1999) A transcriptional switch in the expression of yeast tricarboxylic acid cycle genes in response to a reduction or loss of respiratory function. *Mol.Cell Biol.* **19**:6720-6728.

Liu,Z. and Butow,R.A. (2006) Mitochondrial retrograde signaling. *Annu.Rev.Genet.* **40**:159-185.

Longo,V.D., Ellerby,L.M., Bredesen,D.E., Valentine,J.S., and Gralla,E.B. (1997) Human Bcl-2 reverses survival defects in yeast lacking superoxide dismutase and delays death of wild-type yeast. *J.Cell Biol.* **137**:1581-1588.

Ludovico,P., Rodrigues,F., Almeida,A., Silva,M.T., Barrientos,A., and Corte-Real,M. (2002) Cytochrome c release and mitochondria involvement in programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Biol.Cell* **13**:2598-2606.

Madeo,F., Frohlich,E., and Frohlich,K.U. (1997) A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *J.Cell Biol.* **139**:729-734.

Madeo,F., Herker,E., Maldener,C., Wissing,S., Lachelt,S., Herlan,M., Fehr,M., Lauber,K., Sigrist,S.J., Wesselborg,S., and Frohlich,K.U. (2002) A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol.Cell* **9**:911-917.

Maeda,T., Takekawa,M., and Saito,H. (1995) Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science* **269**:554-558.

- Maeda,T., Wurgler-Murphy,S.M., and Saito,H.** (1994) A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* **369**:242-245.
- Magasanik,B. and Kaiser,C.A.** (2002) Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **290**:1-18.
- 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-Pastor,M.T., Marchler,G., Schuller,C., Marchler-Bauer,A., Ruis,H., and Estruch,F.** (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J.* **15**:2227-2235.
- Massari,M.E. and Murre,C.** (2000) Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol.Cell Biol.* **20**:429-440.
- Matsuyama,S. and Reed,J.C.** (2000) Mitochondria-dependent apoptosis and cellular pH regulation. *Cell Death.Differ.* **7**:1155-1165.
- Mattison,C.P., Spencer,S.S., Kresge,K.A., Lee,J., and Ota,I.M.** (1999) Differential regulation of the cell wall integrity mitogen-activated protein kinase pathway in budding yeast by the protein tyrosine phosphatases Ptp2 and Ptp3. *Mol.Cell Biol.* **19**:7651-7660.
- McAlister,L. and Holland,M.J.** (1985) Differential expression of the three yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. *J.Biol.Chem.* **260**:15019-15027.
- McCartney,R.R. and Schmidt,M.C.** (2001) Regulation of Snf1 kinase. Activation requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the Snf4 subunit. *J.Biol.Chem.* **276**:36460-36466.

McNabb,D.S., Xing,Y., and Guarente,L. (1995) Cloning of yeast HAP5: a novel subunit of a heterotrimeric complex required for CCAAT binding. *Genes Dev.* **9**:47-58.

Meisinger,C., Sommer,T., and Pfanner,N. (2000) Purification of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria devoid of microsomal and cytosolic contaminations. *Anal.Biochem.* **287**:339-342.

Miller,A.L. and Atkinson,D.E. (1972) Response of yeast pyruvate carboxylase to the adenylate energy charge and other regulatory parameters. *Arch.Biochem.Biophys.* **152**:531-538.

Mitchel,R.E., Morrison,D.P., and Unrau,P. (1982) Assessment of the oxygen effect, and oxygen modification of OH. damage, on radiation-induced lethality and gene conversion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Radiat.Res.* **89**:528-536.

Miyagi,H., Kawai,S., and Murata,K. (2009) Two sources of mitochondrial NADPH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **284**:7553-7560.

Molin,C., Jauhainen,A., Warringer,J., Nerman,O., and Sunnerhagen,P. (2009) mRNA stability changes precede changes in steady-state mRNA amounts during hyperosmotic stress. *RNA.* **15**:600-614.

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.

Muller,E.G. (1995) A redox-dependent function of thioredoxin is necessary to sustain a rapid rate of DNA synthesis in yeast. *Arch.Biochem.Biophys.* **318**:356-361.

Nagarajan,L. and Storms,R.K. (1997) Molecular characterization of GCV3, the *Saccharomyces cerevisiae* gene coding for the glycine cleavage system hydrogen carrier protein. *J.Biol.Chem.* **272**:4444-4450.

Nakai,T., Yasuhara,T., Fujiki,Y., and Ohashi,A. (1995) Multiple genes, including a member of the AAA family, are essential for degradation of unassembled subunit 2 of cytochrome c oxidase in yeast mitochondria. *Mol.Cell Biol.* **15**:4441-4452.

Neely,K.E., Hassan,A.H., Brown,C.E., Howe,L., and Workman,J.L. (2002) Transcription activator interactions with multiple SWI/SNF subunits. *Mol.Cell Biol.* **22**:1615-1625.

Ni,L., Bruce,C., Hart,C., Leigh-Bell,J., Gelperin,D., Umansky,L., Gerstein,M.B., and Snyder,M. (2009a) Dynamic and complex transcription factor binding during an inducible response in yeast. *Genes Dev.* **23**:1351-1363.

Ni,L., Bruce,C., Hart,C., Leigh-Bell,J., Gelperin,D., Umansky,L., Gerstein,M.B., and Snyder,M. (2009b) Dynamic and complex transcription factor binding during an inducible response in yeast. *Genes Dev.* **23**:1351-1363.

Norbeck,J. and Blomberg,A. (1997) Metabolic and regulatory changes associated with growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 1.4 M NaCl. Evidence for osmotic induction of glycerol dissimilation via the dihydroxyacetone pathway. *J.Biol.Chem.* **272**:5544-5554.

Norbeck,J. and Blomberg,A. (1998) Amino acid uptake is strongly affected during exponential growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 0.7 M NaCl medium. *FEMS Microbiol.Lett.* **158**:121-126.

Norbeck,J. and Blomberg,A. (2000) The level of cAMP-dependent protein kinase A activity strongly affects osmotolerance and osmo-instigated gene expression changes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16**:121-137.

Nowikovsky,K., Schweyen,R.J., and Bernardi,P. (2009) Pathophysiology of mitochondrial volume homeostasis: potassium transport and permeability transition. *Biochim.Biophys.Acta* **1787**:345-350.

O'Rourke,S.M. and Herskowitz,I. (2004) Unique and redundant roles for HOG MAPK pathway components as revealed by whole-genome expression analysis. *Mol.Biol.Cell* **15**:532-542.

Ohlmeier,S., Kastaniotis,A.J., Hiltunen,J.K., and Bergmann,U. (2004) The yeast mitochondrial proteome, a study of fermentative and respiratory growth. *J.Biol.Chem.* **279**:3956-3979.

Ohtake,Y. and Yabuuchi,S. (1991) Molecular cloning of the gamma-glutamylcysteine synthetase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **7**:953-961.

Okamoto,K. and Shaw,J.M. (2005) Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu.Rev.Genet.* **39**:503-536.

Olesen,J.T. and Guarente,L. (1990) The HAP2 subunit of yeast CCAAT transcriptional activator contains adjacent domains for subunit association and DNA recognition: model for the HAP2/3/4 complex. *Genes Dev.* **4**:1714-1729.

Olz,R., Larsson,K., Adler,L., and Gustafsson,L. (1993) Energy flux and osmoregulation of *Saccharomyces cerevisiae* grown in chemostats under NaCl stress. *J.Bacteriol.* **175**:2205-2213.

Pahlman,I.L., Gustafsson,L., Rigoulet,M., and Larsson,C. (2001) Cytosolic redox metabolism in aerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **18**:611-620.

Pandey,G., Yoshikawa,K., Hirasawa,T., Nagahisa,K., Katakura,Y., Furusawa,C., Shimizu,H., and Shioya,S. (2007) Extracting the hidden features in saline osmotic tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* from DNA microarray data using the self-organizing map: biosynthesis of amino acids. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **75**:415-426.

Parikh,V.S., Morgan,M.M., Scott,R., Clements,L.S., and Butow,R.A. (1987) The mitochondrial genotype can influence nuclear gene expression in yeast. *Science* **235**:576-580.

Parrou,J.L., Teste,M.A., and Francois,J. (1997) Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose. *Microbiology* **143 (Pt 6)**:1891-1900.

Pascual-Ahuir,A., Serrano,R., and Proft,M. (2001) The Sko1p repressor and Gcn4p activator antagonistically modulate stress-regulated transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* **21**:16-25.

Passos,J.F., Saretzki,G., Ahmed,S., Nelson,G., Richter,T., Peters,H., Wappler,I., Birket,M.J., Harold,G., Schaeuble,K., Birch-Machin,M.A., Kirkwood,T.B., and von,Z.T. (2007) Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. *PLoS.Biol.* **5**:e110.

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.

Pedrajas,J.R., Miranda-Vizuet,A., Javanmardy,N., Gustafsson,J.A., and Spyrou,G. (2000) Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity. *J.Biol.Chem.* **275**:16296-16301.

Perrone,G.G., Tan,S.X., and Dawes,I.W. (2008) Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochim.Biophys.Acta* **1783**:1354-1368.

Pizzo,P. and Pozzan,T. (2007) Mitochondria-endoplasmic reticulum choreography: structure and signaling dynamics. *Trends Cell Biol.* **17**:511-517.

Platará,M., Ruiz,A., Serrano,R., Palomino,A., Moreno,F., and Arino,J. (2006) The transcriptional response of the yeast Na(+)-ATPase ENA1 gene to alkaline stress involves three main signaling pathways. *J.Biol.Chem.* **281**:36632-36642.

Posas,F., Chambers,J.R., Heyman,J.A., Hoeffler,J.P., de,N.E., and Arino,J. (2000a) The transcriptional response of yeast to saline stress. *J.Biol.Chem.* **275**:17249-17255.

Posas,F., Chambers,J.R., Heyman,J.A., Hoeffler,J.P., de,N.E., and Arino,J. (2000b) The transcriptional response of yeast to saline stress. *J.Biol.Chem.* **275**:17249-17255.

Posas,F. and Saito,H. (1997) Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* **276**:1702-1705.

Posas,F., Takekawa,M., and Saito,H. (1998) Signal transduction by MAP kinase cascades in budding yeast. *Curr.Opin.Microbiol.* **1**:175-182.

Posas,F., Wurgler-Murphy,S.M., Maeda,T., Witten,E.A., Thai,T.C., and Saito,H. (1996) Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell* **86**:865-875.

Poyton,R.O. and McEwen,J.E. (1996) Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. *Annu.Rev.Biochem.* **65**:563-607.

Pozniakovsky,A.I., Knorre,D.A., Markova,O.V., Hyman,A.A., Skulachev,V.P., and Severin,F.F. (2005) Role of mitochondria in the pheromone- and amiodarone-induced programmed death of yeast. *J.Cell Biol.* **168**:257-269.

Premisler,T., Zahedi,R.P., Lewandrowski,U., and Sickmann,A. (2009) Recent advances in yeast organelle and membrane proteomics. *Proteomics.* **9**:4731-4743.

Proft,M., Mas,G., de,N.E., Vendrell,A., Noriega,N., Struhl,K., and Posas,F. (2006) The stress-activated Hog1 kinase is a selective transcriptional elongation factor for genes responding to osmotic stress. *Mol.Cell* **23**:241-250.

Proft,M. and Serrano,R. (1999) Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated ENA1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP protein Sko1p confers HOG-dependent osmotic regulation. *Mol.Cell Biol.* **19**:537-546.

Proft,M. and Struhl,K. (2002) Hog1 kinase converts the Sko1-Cyc8-Tup1 repressor complex into an activator that recruits SAGA and SWI/SNF in response to osmotic stress. *Mol.Cell* **9**:1307-1317.

Qiu,J., Yoon,J.H., and Shen,B. (2005) Search for apoptotic nucleases in yeast: role of Tat-D nuclease in apoptotic DNA degradation. *J.Biol.Chem.* **280**:15370-15379.

Raitt,D.C., Posas,F., and Saito,H. (2000) Yeast Cdc42 GTPase and Ste20 PAK-like kinase regulate Sho1-dependent activation of the Hog1 MAPK pathway. *EMBO J.* **19**:4623-4631.

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.

Reinders,J. and Sickmann,A. (2007) Proteomics of yeast mitochondria. *Methods Mol.Biol.* **372**:543-557.

Reinders,J., Zahedi,R.P., Pfanner,N., Meisinger,C., and Sickmann,A. (2006) Toward the complete yeast mitochondrial proteome: multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics. *J.Proteome.Res.* **5**:1543-1554.

Reiser,V., Ruis,H., and Ammerer,G. (1999) Kinase activity-dependent nuclear export opposes stress-induced nuclear accumulation and retention of Hog1 mitogen-activated protein kinase in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Biol.Cell* **10**:1147-1161.

Reiser,V., Salah,S.M., and Ammerer,G. (2000) Polarized localization of yeast Pbs2 depends on osmotic stress, the membrane protein Sho1 and Cdc42. *Nat.Cell Biol.* **2**:620-627.

Rep,M., Krantz,M., Thevelein,J.M., and Hohmann,S. (2000a) 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.

Rep,M., Krantz,M., Thevelein,J.M., and Hohmann,S. (2000b) 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.

Rep,M., Proft,M., Remize,F., Tamas,M., Serrano,R., Thevelein,J.M., and Hohmann,S. (2001) The *Saccharomyces cerevisiae* Sko1p transcription factor mediates HOG pathway-dependent osmotic regulation of a set of genes encoding enzymes implicated in protection from oxidative damage. *Mol.Microbiol.* **40**:1067-1083.

Rep,M., Reiser,V., Gartner,U., Thevelein,J.M., Hohmann,S., Ammerer,G., and Ruis,H. (1999) Osmotic stress-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* requires Msn1p and the novel nuclear factor Hot1p. *Mol.Cell Biol.* **19**:5474-5485.

Rios,G., Ferrando,A., and Serrano,R. (1997) Mechanisms of salt tolerance conferred by overexpression of the HAL1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**:515-528.

Rodriguez-Navarro,A. (2000) Potassium transport in fungi and plants. *Biochim.Biophys.Acta* **1469**:1-30.

Rodriguez-Navarro,A. and Ramos,J. (1984) Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol.* **159**:940-945.

Rose,A., Patel,S., and Meier,I. (2004) Plant nuclear envelope proteins. *Symp.Soc.Exp.Biol.*:69-88.

Scharfe,C., Zaccaria,P., Hoertnagel,K., Jaksch,M., Klopstock,T., Lill,R., Prokisch,H., Gerbitz,K.D., Mewes,H.W., and Meitinger,T. (1999) MITOP: database for mitochondria-related proteins, genes and diseases. *Nucleic Acids Res.* **27**:153-155.

Schauss,A.C., Bewersdorf,J., and Jakobs,S. (2006) Fis1p and Caf4p, but not Mdv1p, determine the polar localization of Dnm1p clusters on the mitochondrial surface. *J.Cell Sci.* **119**:3098-3106.

Schmitt,A.P. and McEntee,K. (1996) Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**:5777-5782.

Schmitt,M., Neupert,W., and Langer,T. (1995) Hsp78, a Clp homologue within mitochondria, can substitute for chaperone functions of mt-hsp70. *EMBO J.* **14**:3434-3444.

Schnell,N., Krems,B., and Entian,K.D. (1992) The PAR1 (YAP1/SNQ3) gene of *Saccharomyces cerevisiae*, a c-jun homologue, is involved in oxygen metabolism. *Curr.Genet.* **21**:269-273.

- Schuller,H.J.** (2003) Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr.Genet.* **43**:139-160.
- Schuller,H.J. and Entian,K.D.** (1988) Molecular characterization of yeast regulatory gene CAT3 necessary for glucose derepression and nuclear localization of its product. *Gene* **67**:247-257.
- Sedensky,M.M. and Morgan,P.G.** (2006) Mitochondrial respiration and reactive oxygen species in mitochondrial aging mutants. *Exp.Gerontol.* **41**:237-245.
- Sekito,T., Liu,Z., Thornton,J., and Butow,R.A.** (2002) RTG-dependent mitochondria-to-nucleus signaling is regulated by MKS1 and is linked to formation of yeast prion [URE3]. *Mol.Biol.Cell* **13**:795-804.
- Sekito,T., Thornton,J., and Butow,R.A.** (2000) Mitochondria-to-nuclear signaling is regulated by the subcellular localization of the transcription factors Rtg1p and Rtg3p. *Mol.Biol.Cell* **11**:2103-2115.
- Serrano,R.** (1996) Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int.Rev.Cytol.* **165**:1-52.
- Serrano,R., Bernal,D., Simon,E., and Arino,J.** (2004) Copper and iron are the limiting factors for growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in an alkaline environment. *J.Biol.Chem.* **279**:19698-19704.
- Serrano,R., Gancedo,J.M., and Gancedo,C.** (1973) Assay of yeast enzymes in situ. A potential tool in regulation studies. *Eur.J.Biochem.* **34**:479-482.
- Sickmann,A., Reinders,J., Wagner,Y., Joppich,C., Zahedi,R., Meyer,H.E., Schonfisch,B., Perschil,I., Chacinska,A., Guiard,B., Rehling,P., Pfanner,N., and Meisinger,C.** (2003) The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**:13207-13212.
- Sinha,S., Maity,S.N., Lu,J., and de,C.B.** (1995) Recombinant rat CBF-C, the third subunit of CBF/NFY, allows formation of a protein-DNA complex with CBF-A and CBF-B and with yeast HAP2 and HAP3. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**:1624-1628.
- Steinman,H.M.** (1980) The amino acid sequence of copper-zinc superoxide dismutase from bakers' yeast. *J.Biol.Chem.* **255**:6758-6765.
- Stevens,T.H. and Chan,S.I.** (1981) Histidine is the axial ligand to cytochrome alpha 3 in cytochrome c oxidase. *J.Biol.Chem.* **256**:1069-1071.

Takagi,H. (2008) Proline as a stress protectant in yeast: physiological functions, metabolic regulations, and biotechnological applications. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **81**:211-223.

Tamas,M.J., Rep,M., Thevelein,J.M., and Hohmann,S. (2000) Stimulation of the yeast high osmolarity glycerol (HOG) pathway: evidence for a signal generated by a change in turgor rather than by water stress. *FEBS Lett.* **472**:159-165.

Teige,M., Scheikl,E., Reiser,V., Ruis,H., and Ammerer,G. (2001) Rck2, a member of the calmodulin-protein kinase family, links protein synthesis to high osmolarity MAP kinase signaling in budding yeast. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**:5625-5630.

Territo,P.R., Mootha,V.K., French,S.A., and Balaban,R.S. (2000) Ca(2+) activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: role of the F(0)/F(1)-ATPase. *Am.J.Physiol Cell Physiol* **278**:C423-C435.

Thevelein,J.M. (1994) Signal transduction in yeast. *Yeast* **10**:1753-1790.

Thevelein,J.M. and de Winde,J.H. (1999) Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Microbiol.* **33**:904-918.

Thiele,D.J. (1988) ACE1 regulates expression of the *Saccharomyces cerevisiae* metallothionein gene. *Mol.Cell Biol.* **8**:2745-2752.

Thiele,D.J. (1992) Metal-regulated transcription in eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* **20**:1183-1191.

Thorpe,G.W., Fong,C.S., Alic,N., Higgins,V.J., and Dawes,I.W. (2004) Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: oxidative-stress-response genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**:6564-6569.

Tonge,R., Shaw,J., Middleton,B., Rowlinson,R., Rayner,S., Young,J., Pognan,F., Hawkins,E., Currie,I., and Davison,M. (2001) Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics.* **1**:377-396.

Tran,U.C. and Clarke,C.F. (2007) Endogenous synthesis of coenzyme Q in eukaryotes. *Mitochondrion.* **7 Suppl**:S62-S71.

- Trancikova,A., Weisova,P., Kissova,I., Zeman,I., and Kolarov,J.** (2004) Production of reactive oxygen species and loss of viability in yeast mitochondrial mutants: protective effect of Bcl-xL. *FEMS Yeast Res.* **5**:149-156.
- Traven,A., Wong,J.M., Xu,D., Sopta,M., and Ingles,C.J.** (2001) Interorganellar communication. Altered nuclear gene expression profiles in a yeast mitochondrial dna mutant. *J.Biol.Chem.* **276**:4020-4027.
- Trawick,J.D., Wright,R.M., and Poyton,R.O.** (1989) Transcription of yeast COX6, the gene for cytochrome c oxidase subunit VI, is dependent on heme and on the HAP2 gene. *J.Biol.Chem.* **264**:7005-7008.
- Tsuzi,D., Maeta,K., Takatsume,Y., Izawa,S., and Inoue,Y.** (2004) Regulation of the yeast phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase GPX2 by oxidative stress is mediated by Yap1 and Skn7. *FEBS Lett.* **565**:148-154.
- van Loon,A.P., Pesold-Hurt,B., and Schatz,G.** (1986) A yeast mutant lacking mitochondrial manganese-superoxide dismutase is hypersensitive to oxygen. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **83**:3820-3824.
- Vincent,O., Townley,R., Kuchin,S., and Carlson,M.** (2001) Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific beta subunits and a novel glucose signaling mechanism. *Genes Dev.* **15**:1104-1114.
- Voelker,D.R.** (2003) New perspectives on the regulation of intermembrane glycerophospholipid traffic. *J.Lipid Res.* **44**:441-449.
- Walther,T.C., Brickner,J.H., Aguilar,P.S., Bernales,S., Pantoja,C., and Walter,P.** (2006a) Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature* **439**:998-1003.
- Walther,T.C., Brickner,J.H., Aguilar,P.S., Bernales,S., Pantoja,C., and Walter,P.** (2006b) Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature* **439**:998-1003.
- 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.
- Wilkins,M.R., Pasquali,C., Appel,R.D., Ou,K., Golaz,O., Sanchez,J.C., Yan,J.X., Gooley,A.A., Hughes,G., Humphery-Smith,I., Williams,K.L., and Hochstrasser,D.F.** (1996) From proteins to proteomes: large scale protein

identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N.Y.)* **14**:61-65.

Wills,C. (1990) Regulation of sugar and ethanol metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Crit Rev.Biochem.Mol.Biol.* **25**:245-280.

Wilson,W.A., Hawley,S.A., and Hardie,D.G. (1996) Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio. *Curr.Biol.* **6**:1426-1434.

Winzeler,E.A., Lee,B., McCusker,J.H., and Davis,R.W. (1999) Whole genome genetic-typing in yeast using high-density oligonucleotide arrays. *Parasitology* **118 Suppl**:S73-S80.

Wissing,S., Ludovico,P., Herker,E., Buttner,S., Engelhardt,S.M., Decker,T., Link,A., Proksch,A., Rodrigues,F., Corte-Real,M., Frohlich,K.U., Manns,J., Cande,C., Sigrist,S.J., Kroemer,G., and Madeo,F. (2004) An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast. *J.Cell Biol.* **166**:969-974.

Wong,C.M., Siu,K.L., and Jin,D.Y. (2004) Peroxiredoxin-null yeast cells are hypersensitive to oxidative stress and are genomically unstable. *J.Biol.Chem.* **279**:23207-23213.

Wood,J.M. (1999) Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **63**:230-262.

Wright,R.M. and Poyton,R.O. (1990) Release of two *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome genes, COX6 and CYC1, from glucose repression requires the SNF1 and SSN6 gene products. *Mol.Cell Biol.* **10**:1297-1300.

Wu,A.L. and Moye-Rowley,W.S. (1994) GSH1, which encodes gamma-glutamylcysteine synthetase, is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Mol.Cell Biol.* **14**:5832-5839.

Yale,J. and Bohnert,H.J. (2001) Transcript expression in *Saccharomyces cerevisiae* at high salinity. *J.Biol.Chem.* **276**:15996-16007.

Yan,C., Lee,L.H., and Davis,L.I. (1998) Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. *EMBO J.* **17**:7416-7429.

Yancey,P.H., Clark,M.E., Hand,S.C., Bowlus,R.D., and Somero,G.N. (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**:1214-1222.

Ye,T., Garcia-Salcedo,R., Ramos,J., and Hohmann,S. (2006) Gis4, a new component of the ion homeostasis system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot.Cell* **5**:1611-1621.

Zahedi,R.P., Sickmann,A., Boehm,A.M., Winkler,C., Zufall,N., Schonfisch,B., Guiard,B., Pfanner,N., and Meisinger,C. (2006a) Proteomic analysis of the yeast mitochondrial outer membrane reveals accumulation of a subclass of preproteins. *Mol.Biol.Cell* **17**:1436-1450.

Zahedi,R.P., Sickmann,A., Boehm,A.M., Winkler,C., Zufall,N., Schonfisch,B., Guiard,B., Pfanner,N., and Meisinger,C. (2006b) Proteomic analysis of the yeast mitochondrial outer membrane reveals accumulation of a subclass of preproteins. *Mol.Biol.Cell* **17**:1436-1450.

Zahedi,R.P., Sickmann,A., Boehm,A.M., Winkler,C., Zufall,N., Schonfisch,B., Guiard,B., Pfanner,N., and Meisinger,C. (2006c) Proteomic analysis of the yeast mitochondrial outer membrane reveals accumulation of a subclass of preproteins. *Mol.Biol.Cell* **17**:1436-1450.

Zapater,M., Sohrmann,M., Peter,M., Posas,F., and de,N.E. (2007) Selective requirement for SAGA in Hog1-mediated gene expression depending on the severity of the external osmostress conditions. *Mol.Cell Biol.* **27**:3900-3910.

Zhang,X.N. and Qi,M. (2008) Mitochondrion and its related disorders: making a comeback. *J.Zhejiang.Univ.Sci.B* **9**:90-92.

Zhuge,J. and Wang,Z. (1999) [The HOG pathway and glycerol synthesis in yeast]. *Wei Sheng Wu Xue.Bao.* **39**:91-93.

Zuin,A., Gabrielli,N., Calvo,I.A., Garcia-Santamarina,S., Hoe,K.L., Kim,D.U., Park,H.O., Hayles,J., Ayte,J., and Hidalgo,E. (2008) Mitochondrial dysfunction increases oxidative stress and decreases chronological life span in fission yeast. *PLoS.One.* **3**:e2842.

Anejos

PROTEÍNAS CITADAS EN LA PRESENTE TESIS:

PROTEÍNA	nombre sistemático GEN	Nombre estándar GEN	localización	Función
Abf2	YMR072W	<i>ABF2</i>	mito	Proteína de unión al DNA mitocondrial implicada en la replicación y la recombinación.
Aco1	YLR304C	<i>ACO1 (GLU1)</i>	mito	Aconitasa requerida para el CAC y para el mantenimiento del DNAm.
Act1		<i>ACT1 (END7, ABY1)</i>	Toda la célula	Proteína estructural implicada en la polarización, la endocitosis y otras funciones citoesqueléticas.
Ald4	YOR374W	<i>ALD4</i>	mito	Aldehído deshidrogenasa.
Arg5	YER069W	<i>ARG5</i>	mito	Forma parte del complejo responsable de la biosíntesis de arginina.
Atp4	YPL078C	<i>ATP4 (LPF7)</i>	mito	Subunidad b del complejo F1F0-ATP-sintasa requerido para la síntesis de ATP.
Atp5	YDR298C	<i>ATP5 (OSC1)</i>	mito	Subunidad 5 del complejo F1F0-ATP-sintasa requerido para la síntesis de ATP.
Atp7	YPL078C	<i>ATP7</i>	mito	Subunidad d del complejo F1F0-ATP-sintasa requerido para la síntesis de ATP.

PROTEÍNA	nombre sistemático GEN	Nombre estándar GEN	localización	función
Atp12	YJL180C	<i>ATP12</i>	mito	Proteína necesaria para el ensamblaje de las diferentes subunidades del complejo F1F0-ATP sintasa.
Atp18	YML081C-A	<i>ATP18</i>	mito	Subunidad I o j del complejo F1F0-ATP-sintasa requerido para la síntesis de ATP.
Cit1		<i>CIT1 (LYS6)</i>	mito	Citrato sintasa que cataliza la reacción de síntesis de citrato durante el CAC.
Coq2	YNR041C	<i>COQ2</i>	mito	Proteína implicada en la biosíntesis de ubiquinona.
Coq6	YGR255C	<i>COQ6</i>	mito	Monooxigenasa implicada en la biosíntesis de la ubiquinona (Coenzima Q)
Coq7	YOR125C	<i>COQ7 (CAT5)</i>	mito	Proteína implicada en la biosíntesis de ubiquinona. Necesario para la activación de genes de gluconeogénesis.
Coq10	YOL008W	<i>COQ10</i>	mito	Proteína de unión entre cofactores de síntesis de ubiquinona.
Cox6	YHR051W	<i>COX6</i>	mito	Subunidad VI del citocromo c oxidasa.

PROTEÍNA	nombre sistemático GEN	Nombre estándar GEN	localización	función
Cpr5	YDR304C	<i>CPR5</i>	RE	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa del RE.
Ecm19	YLR390W	<i>ECM19</i>	mito	Proteína putativa de función no descrita.
Ecm40	YMR062C	<i>ECM40</i>	mito	Ornitina acetil transferasa que cataliza la biosíntesis de arginina.
Erg6	YML008C	<i>ERG6</i>	mito	$\Delta(24)$ -esterol-C-metiltransferasa implicada en la síntesis de ergosterol
Fba1	YKL060C	<i>FBA1</i>	mito/cito	Fructosa 1,6-bifosfato aldolasa requerida para glicólisis y gluconeogénesis.
Fkb2	YDR519W	<i>FKB2</i>	RE	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa del RE.
Fsh1	YHR049W	<i>FSH1</i>	mito/núcleo	
Fzo1	YBR179C	<i>FZO1</i>	mito	Mitofusina implicada en la fusión entre mitocondrias y el mantenimiento del genoma mt.
Gal83	YER027C	<i>GAL83 (SPM1)</i>	cito/núcleo	Subunidad del complejo Snf1.
Gcv3	YAL044C	<i>GCV3</i>	mito	Subunidad H del complejo glicina descarboxilasa requerido para el catabolismo de la glicina.

PROTEÍNA	nombre sistemático GEN	Nombre estándar GEN	localización	función
Gpp1	YIL053W	<i>GPP1 (RHR2)</i>	cito/núcleo	Implicada en la biosíntesis de glicerol.
Gpp2	YER062C	<i>GPP2 (HOR2)</i>	cito/núcleo	Implicada en la biosíntesis de glicerol.
Gtb1	YDR221W	<i>GTB1</i>	RE	Subunidad β de la glucosidasa implicada en la biogénesis de glicoproteínas del RE.
H2A	YDR225W		núcleo	Histona requerida para el ensamblaje de la cromatina.
H2B	YDR224C		núcleo	Proteína implicado en la biosíntesis de ubiquinona
Hap2	YGL237C	<i>HAP2</i>	núcleo	Subunidad del complejo hap2,3,4,5 regulador de la expresión de genes de respiración.
Hap3		<i>HAP3</i>	núcleo	Subunidad del complejo hap2,3,4,5 regulador de la expresión de genes de respiración.
Hfd1	YMR110C	<i>HFD1</i>	mito	Deshidrogenasa putativa de la síntesis de ácidos grasos.
Hog1	YLR113W	<i>HOG1 (SSK3)</i>	cito/núcleo	Proteína quinasa implicada en la osmorregulación.
Hsc82	YMR186W	<i>HSC82 (HSP90)</i>	cito/mito	Chaperona.

PROTEÍNA	nombre sistemático GEN	Nombre estándar GEN	localización	función
Hsp60	YLR259	<i>HSP60</i> (<i>CPN60, MIF4, MNA2</i>)	mito	Chaperonina tetradecamérica mitocondrial necesaria para el plegamiento peptídico
Hsp78	YDR258C	<i>HSP78</i>	mito	Chaperona oligomérica implicada en la termotolerancia.
Hsp82	YPL240C	<i>HSP82</i> (<i>HSP90</i>)	cito	Chaperona requerida durante la señalización de ferhormonas.
Idp1	YDL066W	<i>IDP1</i>	mito	Isocitrato deshidrogenasa que cataliza la oxidación del citrato.
Ilv2	YMR108W	<i>ILV2</i> (<i>SMR1, THI1</i>)	mito	Acetolactato sintasa que cataliza el 1er paso de la biosíntesis de valina e isoleucina.
Ilv5	YLR355C	<i>ILV5</i>	mito	Proteína implicada en la biosíntesis de aminoácidos.
Ilv6	YCL009C	<i>ILV6</i>	mito	Subunidad reguladora de la acetolactato sintasa.

PROTEÍNA	nombre sistemático GEN	Nombre estándar GEN	localización	función
Kar2	YJL034W	KAR2	RE	ATPasa implicada en la importación de proteínas al RE también actúa como chaperona mediando el plegamiento de proteínas del RE.
Leu4	YNL104C	LEU4	mito/cito	2-isopropilmalato sintasa. Isoenzima de la biosíntesis de leucina.
Leu5		LEU5	mito	Proteína implicada en la acumulación de CoA.
Leu9	YOR108W	LEU9	mito	2-Isopropilmalato sintasa. Participa en la biosíntesis de leucina.
Lsp1	YPL004C	LSP1	mito/eisosoma	Componente de eisomas.
Mcr1	YKL150W	MCR1	mito	Proteína implicada en la biosíntesis de ergosterol.
Nps1	YJL041W	NPS1 (STH1)	núcleo	ATPasa componente del complejo remodelador de la cromatina.
Om14	YBR230C	OM14	mito	Proteína integral de la membrana externa mitocondrial.

PROTEÍNA	nombre sistemático GEN	Nombre estándar GEN	localización	función
Pdc1	YLR044C	<i>PDC1</i>	cito/núcleo	Isoenzima piruvato descarboxilasa con actividad durante la fermentación alcohólica.
Pdi1	YCL043C	<i>PDI1</i>	RE	Proteína disulfuro isomerasa esencial para la formación de puentes disulfuro en el RE.
Pgk1	YCR012C	<i>PGK1</i>	mito/cito	3-fosfoglicerato quinasa de glicólisis y gluconeogénesis.
Pil1	YGR086C	<i>PIL1</i>	eisosoma/cito/mito	Componente estructural de los eisosomas implicada en la endocitosis.
Prx1	YBL064C	<i>PRX1</i>	mito	Peroxirredoxina con actividad tiorredoxina peroxidasa.
Rdl1	YOR285W	<i>RDL1</i>	Mito/RE	Proteína con función desconocida.
Rip1	YEL024W	<i>RIP1</i>	mito	Ubiquinol-citocromo c reductasa que transfiere e ⁻ desde el ubiquinol al citocromo c1 durante la respiración.
Rpo41	YFL036W	<i>RPO41</i>	mito	RNApolimerasa.

PROTEÍNA	nombre sistemático GEN	Nombre estándar GEN	localización	función
Rtg1	YOL067C	<i>RTG1</i>	cito/núcleo	Factor de transcripción implicada en la comunicación entre orgánulos.
Rtg3	YBL103C	<i>RTG3</i>	cito/núcleo	Factor de transcripción implicada en la ruta TOR.
Sdh1	YKL148C	<i>SDH1</i>	mito	Subunidad de la succinato deshidrogenasa implicada en CAC y cadena respiratoria.
Sdh2	YLL041C	<i>SDH2 (ACN17)</i>	mito	Subunidad de la succinato deshidrogenasa implicada en CAC y cadena respiratoria.
Sdh3	YKL141W	<i>SDH3 (CYB3, YKL4)</i>	mito	Subunidad de la succinato deshidrogenasa implicada en CAC y cadena respiratoria.
Sdh4	YDR178W	<i>SDH4 (ACN18)</i>	mito	Subunidad de la succinato deshidrogenasa implicada en CAC y cadena respiratoria.
Sec6	YIL068C	<i>SEC6</i>		Proteína implicada en exocitosis.
Sip2	YGL208W	<i>SIP2</i>	cito	Subunidad de serina/tronina proteína quinasa Snf1.

PROTEÍNA	nombre sistemático GEN	Nombre estándar GEN	localización	función
Snf1	YDR477W	<i>SNF1 (CAT1, CCR1, GLC2, HAF3, PAS14)</i>	cito/mito/núcleo	Proteína serina/tronina AMP-activada requerida para la transcripción de genes reprimidos por glucosa.
Snf4	YGL115W	<i>SNF4 (CAT3, SCI1)</i>	Cito/núcleo	Subunidad del complejo Snf1.
Sod2	YHR008C	<i>SOD2</i>	mito	Superóxido dismutasa que protege a las células de los daños producidos por O ₂ .
Tdh1	YJL052W	<i>TDH1</i>	cito/núcleo/mito	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa isoenzima I, implicada en glicólisis y gluconeogénesis.
Tdh2	YJR009C	<i>TDH2</i>	cito/núcleo/mito	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa isoenzima II, implicada en glicólisis y gluconeogénesis.
Tdh3	YGR192C	<i>TDH3</i>	cito/núcleo/mito	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa isoenzima III, implicada en glicólisis y gluconeogénesis.

PROTEÍNA	nombre sistemático GEN	Nombre estándar GEN	localización	función
Tim8	YJR135W	<i>TIM8</i>	mito	Subunidad del complejo TOM implicado en el transporte de proteínas a través de la mitocondria.
Tim9	YEL020W	<i>TIM9</i>	mito	Subunidad del complejo TOM implicado en el transporte de proteínas a través de la mitocondria.
Tom22	YNL131W	<i>TOM22 (MAS17, MAS22, MOM22)</i>	mito	Subunidad del complejo TOM implicado en el transporte de proteínas a través de la mitocondria.
Tom70	YNL121C	<i>TOM70 (MAS70, MOM72, OMP1)</i>	mito	Subunidad del complejo TOM implicado en el transporte de proteínas a través de la mitocondria.
Yfh1	YDL120W	<i>YFH1</i>	mito	Chaperona implicada en la formación de puentes Fe-S.

FENOTIPOS DE LAS CEPAS MUTANTES ESTUDIADAS:

GEN	NOMBRE SISTEMÁTICO	LOC.	FUNCIÓN	FENOTIPO							
				YPD	NaCl		KCl		LiCl		
ALR2	YFL050C	Membrana plasmática	Se cree que es un transportador de Mg^{2+} cuya expresión confiere tolerancia a Al^{3+} y Ga^{3+} .	+	+	+	+	+	+	+	+
ATX1	YNL259C	Citosol	Metalochaperona citosólica que transporta cobre.	+	+	+	+	+	+	+	+
ATX2 YOR29-30	YOR079C	Membrana Golgi	Transportador de manganeso y responsable de su homeostasis.	+	+	+	+	+	+	+	+
BSD2	YBR290W	RE	Transportador de metales pesados a la vacuola para su detoxificación.	+	+	+	+	+	+	+	+
CCC2	YDR270W	Cara trans Aparato Golgi	ATPasa requerida para la exportación de cobre desde el citosol a los compartimentos extracitosólicos.	+	+	+	+	+	+	+	+
CCH1	YGR217W	Membrana plasmática	Canal de calcio implicado en la respuesta de estrés ambiental.	+	+	+	+	+	+	+	+
CCS1	YMR038C	Mitocondria; citosol; núcleo	Protección frente a estrés oxidativo.	+	+	-	-	-	-	-	--
COT1	YOR316C	Vacuola y mitocondria	Transportador de Zn al interior de la vacuola.	+	+	+	+	+	+	+	+
COX17	YLL009C	Citosol; espacio mitocondrial intermemb.	Metalochaperona que confiere Cu^{2+} a Sco1p y Cox1p para que lo liberen a nivel del citocromo c oxidasa.	+	+	+	+	+	+	+	+
COX19	YLL018C-A	Citosol; espacio mitocondrial intermemb.	Metalochaperona que libera cobre al citocromo c.	-	+	-	-	-	+	+	+
CUP5 (CLS7, GEF2 VMA3)	YEL027W	Membrana vacuolar	Requerida para homeostasis de Cu y Fe. Implicada en el transporte de H^+ . Implicada en la biogénesis de la vacuola y su acidificación.	-	+	-	+	-	+	+	+
FET3	YMR058W	Membrana plasmática	Hierro- O_2 -oxidorreductasa requerida para la toma de hierro e implicada en la Resistencia a la toxicidad por cobre.	+	+	+	+	-	+	+	+

Anejos

FET4	YMR319C	Membrana plasmática	Transportador de Fe (II) de baja afinidad.	+	+	+	+	+	+	+
FET5	YFL041W	Membrana vacuolar	Actividad ferroxidasa; implicada en el transporte de Fe.	+	+	+	+	+	+	+
FRE1	YLR214W	Membrana plasmática	Férrico-reductasa y cúprico-reductasa, reduce puentes sideróforos de hierro y oxida cobre para que puedan ser tomados por los transportadores.	+	+	+	+	+	+	+
FRE2	YKL220C	Membrana plasmática	Transporte de hierro y cobre.	+	+	+	+	+	+	+
FTH1	YBR207W	Membrana vacuolar	Transporte de hierro de alta afinidad al interior de la vacuola. Posiblemente implicado indirectamente con la endocitosis.	+	+	+	+	+	+	+
FTR1	YER145C	Membrana plasmática	Transporte de hierro.	+	+	-	-	-	+	-
ISA1	YLL027W	Matriz mitocondrial	Transporte de hierro.	-	--	--	--	--	+/-	+
ISA2	YPR067W	Espacio intermemb. mitocondrial	Proteína requerida para la maduración de proteínas Fe/S tanto mitocondriales como citosólicas.	+	+	-	+	--	+	+
LPE10	YPL060W	Membrana mitocondrial interna	Transportador de magnesio al interior de la mitocondria y responsable de su homeostasis.	+	+	+	+	+	+	+
MID1	YNL291C	RE; membrana plasmática	Canal permeable de Ca ²⁺ requerido para el flujo de calcio estimulado por feromonas.	+	+	+	+	+	+	+
MNR2	YKL064W	Membrana vacuolar	Transportador de ión magnesio y responsable de su homeostasis.	+	+	+	+	+	+	+
MRS2	YOR334W	Memb int mitocondrial	Canal de transporte de Mg ²⁺ mitocondrial.	+	+	+	+	+	+	+
MRS3	YJL133W	Mitocondria	Transportador de Fe ²⁺ a través de la memb. interna mitocondrial; en condiciones de baja disponibilidad de hierro puede transportar otros iones.	+	+	+	+	+	+	+
MRS4	YKR052C	Mitocondria	Transporte de Fe ²⁺ a través de la memb int mt; permanece activo durante baja disponibilidad de Fe ²⁺ pudiendo transportar otros iones.	+	+/-	+/-	-	-	+	+

MTM1	YGR257C	Memb int mitocondrial; mitocondria	Implicada en la activación de Sod2p facilitando la inserción al cofactor manganeso.	+	+	-	+	-	+	-
PHO84	YML123C	Membrana plasmática	Transportador de alta afinidad de fosfato inorgánico (Pi) y de baja afinidad de manganeso.	+	+	+	+	+	+	+
PMA2	YPL036W	Membrana plasmática	Bombeo de protones al exterior de la célula; regulación de pH citoplasmático y del potencial de membrana.	+	+	+	+	+	+	+
PMC1	YGL006W	Membrana vacuolar	ATPasa implicada en el transporte de ión Ca^{2+} .	+	+	+	+	+	+	+
PMR1 (BSD1, LDB1, SSC1)	YGL167C	Aparato de Golgi	ATPasa requerida para el transporte de Ca^{2+} y Mn^{2+} al aparato de Golgi.	+	+	+	-	--	+	++
POR1 (OMP2)	YNL055C	Membrana mitocondrial externa	Porina implicada en el mantenimiento de la estabilidad osmótica de la mitocondria.	+	+	+	+	+ /-	+	+
POR2	YIL114C	Membrana externa mitocondrial	Porina (canal aniónico dependiente de voltaje) implicada en la respiración y en la organización y biosíntesis de la mitocondria.	+	+	+	+	+	+	+
RCS1 (AFT1)	YGL071W	Núcleo y citoplasma	FT implicado en la utilización del Fe^{2+} y su homeostasis. Se une a secuencias consenso activando genes diana en respuesta a los cambios en su disponibilidad.	+	--	--	-	-	--	--
SCO1 (PET161)	YBR037C	Membrana interna mitocondrial	Libera cobre al citocromo c oxidasa. Actúa como una tioredoxina.	+	+	+	-	-	-	-
SCO2	YBR024W	Membrana interna mitocondrial	Libera cobre al citocromo c oxidasa.	+	+	+	+	+	+	+
SIA1	YOR137C	Membrana plasmática	Implicada en la activación de una ATPasa transportadora de H^+ .	+	+	+	+	+	+	+
SMF1 (SBS1)	YOL122C	Vacuola y membrana plasmática	Transportador de iones metálicos di y trivalentes.	+	+	-	+	-	-	-
SMF2	YHR050W	Vesículas citoplasmáticas unidas a membrana; mitocondria	Transportador de iones divalentes implicado en la homeostasis del manganeso.	+	+	+	+	+	+	+

Anejos

SMF3	YLR034C	Membrana vacuolar	Transportador de iones metálicos divalentes implicado en la homeostasis del Fe.	+	+	+	+	+	+	+
TOK1 (DUK1, YKC1, YPK1)	YJL093C	Membrana plasmática	Canal de potasio.	+	+	+	+	+	+	+
TRK1	YJL129C	Membrana plasmática	Transportador de potasio.	+	+	--	+	+	--	--
TRK2 (RPD2)	YKR050W	Membrana plasmática	Transportador de potasio.	+	+	+	+	+	+	+
VCX1 (HUM1, MNR1)	YDL128W	Membrana vacuolar	Intercambiador de Ca ²⁺ entre vacuola y citosol	+	+	+	+	+	+	+
VPS41 (CVT8, FET2SVL2, VAM2, VPL20)	YDR080W	Membrana vacuolar y endosoma	Transportador de hierro de alta afinidad. Subunidad del complejo HOPSesencial para la fusión Golgi-endosoma-vacuola.	+	+	+	+	+	+	-
	YBR235W		Transportador de iones.	+	+	+	+	+	+	+
YCT1 1	YLL055W	RE	Transportador de iones.	+	+	+	+	+	+	+
ZRC1 (OSR1)	YMR243C	Vacuola	Transportador vacuolar de zinc.	+	+	+	+	+	+	+
ZRG17	YNR039C	Retículo endoplásmico	Transportador de zinc.	+	+	+	+	+	+	+
ZRT1	YGL255W	Membrana plasmática	Transportador de zinc de alta afinidad responsable de la mayor parte de la toma de este ión.	+	+	+	+	+	+	+
ZRT2	YLR130C	Membrana plasmática	Transportador de Zn de baja afinidad.	+	+	+	+	+	+	+
ZRT3	YKL175W	Membrana vacuolar	Transportador de zinc y responsable de su homeostasis.	+	+	+	+	+	+	+

SONDAS UTILIZADAS PARA EL ANÁLISIS Northern:

Nombre	Secuencia 5'-3'	Descripción
ACT-1	ATTGAACACGGTATTGTCACCAAC	+518 pb en el ORF de <i>ACT1</i>
ACT-2	CCTTACGGACATCGACATCACAC	+1182 pb en el ORF de <i>ACT1</i>
SDH2-1	CACAACAGCTGCAGCTACGCATACC	+66 pb en el ORF de <i>SDH2</i>
SDH2-2	GGACAAGTTCTAGTACAGTTCATGA	+740 pb en el ORF de <i>SDH2</i>
COX6-1	CCAGACCTGGTGCTTATCATGCAAC	+56 pb en el ORF de <i>COX6</i>
COX6-2	GAAGAGCTTGGAAATAGCTCTTCC	+443 pb en el ORF de <i>COX6</i>
CIT1-1	GAATGCTCGCCACTATAGTAGCGCC	+96 pb en el ORF de <i>CIT1</i>
CIT1-2	TGGCCTTTCGATTGGAGACCAACA	+1380 pb en el ORF de <i>CIT1</i>

Adaptive Changes of the Yeast Mitochondrial Proteome in Response to Salt Stress

Mar Martínez-Pastor, Markus Proft, and Amparo Pascual-Ahuir

Abstract

Mitochondria are dynamic organelles with the capacity to adapt to environmental stimuli and stress. Here we use yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in combination with proteomic approaches to quantify the changes in the protein composition of mitochondria in the presence of salt stress provoked by NaCl. We identified 15 proteins that were more than twofold overrepresented in salt adapted mitochondria. These proteins are mainly involved in the oxidative stress defense, the biosynthesis of amino acids and ubiquinone or in the metabolism of pyruvate and acetate. Loss of function of most of the upregulated proteins did not result in a significant growth phenotype under high salt conditions. However, all identified proteins were necessary to sustain efficient growth under oxidative stress caused by hydrogen peroxide. Additionally, a subset of outer mitochondrial membrane proteins was shown to be upregulated upon salt stress. We furthermore identified nine proteins that were more than threefold underrepresented in salt adapted mitochondria. These proteins were mainly glycolytic enzymes or proteins with a predominant localization at the endoplasmatic reticulum. Our results underline the complex nature of the stress adaptation of mitochondria and identify functional groups of proteins whose specific role in salt resistance should be revealed in the future.

Introduction

ALL EUKARYOTIC CELLS contain mitochondria as the main ATP-generating organelles. Apart from their basic function in the supply of ATP to the cell via oxidative phosphorylation, mitochondria are involved in numerous metabolic and signaling processes, ranging from extensive functions in secondary metabolism, Ca²⁺ signaling, the homeostasis of redox equivalents to apoptosis. Additionally, mitochondrial dysfunction is the cause of neurodegenerative diseases in humans (Gibson et al., 2010). Mitochondria are remarkably dynamic organelles, which constantly change their shape, biomass, and activity in response to external stimuli (Chan, 2006; Detmer and Chan, 2007; McBride et al., 2006).

The budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* has served as a very powerful model to unravel both the biochemical functions of the mitochondria as well as their regulation. In *S. cerevisiae*, mitochondrial biogenesis and the oxidative phosphorylation activity are strictly regulated by the available carbon source. In the presence of fermentable sugars, nuclear and mitochondrial transcription of genes encoding enzymes of the respiratory metabolism are repressed by the so-called glucose repression signaling network (Carlson,

1999; Schuller, 2003). In turn, mitochondrial biomass and activity is heavily induced when the cells ATP supply can no longer be sustained by fermentation. A second signal transduction pathway exists in yeast, which monitors mitochondrial functions. This is the retrograde pathway, which signals from the organelle to the nucleus to compensate for mitochondrial dysfunctions (Liu and Butow, 2006).

Apart from the metabolic output, which is controlled by the above-mentioned pathways, it is the homeostasis of reactive oxygen species (ROS), which is a crucial parameter monitored in mitochondria. ROS production in eukaryotic cells is believed to mainly occur by electron leakage from the mitochondrial electron transport chain (Balaban et al., 2005; Murphy, 2009). Mitochondrial dysfunction has been shown to alter the formation of ROS in several eukaryotic organisms including yeast (Sedensky and Morgan, 2006). Moreover, ROS production is functionally linked to aging and apoptosis (Perrone et al., 2008). Because many yeast mutants in mitochondrial functions are impaired in the adaptation to oxidative stress (Grant et al., 1997; Thorpe et al., 2004), it can be concluded that mitochondria are not only the main source of ROS but they are critical for the adaptation to oxidative stress. Recently we have shown that the mitochondrial function is important for the efficient adaptation to hyperosmotic and

salt stress in yeast. Mitochondrial components are upregulated under such conditions in a selective manner to reduce ROS production after stress (Pastor et al., 2009).

The proteome of *S. cerevisiae* mitochondria has been intensively studied by the combination of density gradient purification of the organelle and high throughput protein identification methods (Reinders et al., 2006). Yeast mitochondria contain approximately 850 different proteins. Based on the knowledge of the general proteome of mitochondria, recent research aims at elucidating the dynamic changes of the organelle. Proteomic surveys identify abundant phosphorylation in mitochondria in several organisms (Aponte et al., 2009; Ito et al., 2009; Reinders et al., 2007), which indicates that the mitochondrial composition is highly regulated at the posttranslational level in response to stimuli.

Here we use the yeast model to investigate a complex adaptation of the mitochondria and determine the proteomic changes that occur in response to NaCl stress.

Materials and Methods

Yeast strains and growth conditions

For the purification of mitochondria, the yeast wild-type strain BY4741 (*MATa*; *his3Δ0*; *met15Δ0*; *leu2Δ0*; *ura3Δ0*) was used. Yeast strains expressing chromosomally tagged TAP fusion proteins were: BY4741 (*MATa*; *his3D0*; *met15D0*; *leu2D0*; *ura3D0*) with *COQ6-TAP-His3MX*, *PRX1-TAP-His3MX*, *SOD2-TAP-His3MX*, *ILV2-TAP-His3MX*, *ILV6-TAP-His3MX*, *LEU4-TAP-His3MX*, *LEU9-TAP-His3MX*, *LSP1-TAP-His3MX*, *PIL1-TAP-His3MX*, *OM14-TAP-His3MX*, *RDL1-TAP-His3MX*, *MCR1-TAP-His3MX*, *HFD1-TAP-His3MX*, *TOM22-TAP-His3MX*, *TOM70-TAP-His3MX*, *TDH1-TAP-His3MX*, *TDH2-TAP-His3MX*, *TDH3-TAP-His3MX*, *FBA1-TAP-His3MX*, *PGK1-TAP-His3MX* (Ghaemmaghami et al., 2003). Yeast deletion mutants were: BY4741 (*MATa*; *his3Δ0*; *met15Δ0*; *leu2Δ0*; *ura3Δ0*) with *atp4::KanMX4*, *sod2::KanMX4*, *prx1::KanMX4*, *coq7::KanMX4*, *rip1::KanMX4*, *leu4::KanMX4*, *leu9::KanMX4*, *ald4::KanMX4*, *hsp78::KanMX4*, *ilv6::KanMX4*, *ecm40::KanMX4*, *lsp1::KanMX* (Winzeler et al., 1999). Yeast cultures were grown in yeast extract-peptone containing 2% dextrose (YPD) or 3% glycerol (YPGly) as indicated. YPD medium was supplemented with the indicated amounts of NaCl, KCl or hydrogen peroxide.

Large-scale purification of mitochondria

The density gradient centrifugation using sucrose step gradients described by (Meisinger et al., 2000) was used. Briefly, yeast cells (2 L) were grown to an $OD_{600} = 0.8$ in YPD medium supplemented or not with 1 M NaCl. Cells were washed with H₂O and resuspended in zymolyase buffer (1.2 M sorbitol; 20 mM potassium phosphate, pH 7.4) containing 5 mg/g Zymolyase-20T. Spheroplasts were produced at 30°C for 45 min. Cells were lysed in homogenization buffer (0.6 M sorbitol; 10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 1 mM EDTA, 1 mM PMSF; 0.2% bovine serum albumin) using a glass homogenizer. Cell debris and nuclei were removed by centrifugation at 1,500×g. The supernatant was again centrifuged (3,000×g) and the mitochondria in the supernatant pelleted by additional centrifugation (12,000×g). The pellet was washed with SEM buffer (250 mM sucrose; 1 mM EDTA; 10 mM MOPS, pH 7.2), centrifuged at

12,000×g, and resuspended in SEM buffer. The mitochondrial fraction was loaded onto a three-step sucrose gradient (60–32–23–15%) in EM buffer (10 mM MOPS, pH 7.2; 1 mM EDTA). After ultracentrifugation (134,000×g, 1 h) mitochondria were recovered from the 60%/32% interface. The density gradient centrifugation was repeated once. Mitochondria were washed with SEM buffer and proteins were extracted by the addition of four volumes ice-cold acetone. Mitochondrial proteins were allowed to precipitate for 15 min, pelleted by centrifugation (10,000×g), and washed once with 80% acetone. Three independent extracts from highly purified mitochondria in nonstress and NaCl stress conditions were prepared.

2D DIGE analysis and mass spectrometry

2D DIGE and MALDI-ToF/ToF mass spectrometer analysis were performed by Applied Biomics (Hayward, CA). Mitochondrial protein samples were dissolved in 30 mM Tris-HCl (pH 8.8), 7 M urea, 2 M thiourea, and 4% CHAPS. Equal amounts of protein extract from paired samples (stress versus no stress) were labeled by CyDye DIGE fluoros, respectively. Additionally, an internal standard was created and simultaneously run on each 2D gel by pooling equal amounts of all extracts to allow for cross gel analysis. Samples (with and without NaCl, internal standard) were separated on the same 2D gel, using isoelectric focusing (IEF) in the first dimension (pH 3–10 gradient) and SDS polyacrylamide gel electrophoresis (10.5% acrylamide) in the second dimension. Three independent biological replica were resolved by 2D DIGE. After electrophoresis, the gels were scanned using a Typhoon scanner. ImageQuant software was used to generate the single and overlay images, which were then subjected to DeCyder software analysis to locate and analyze the multiplexed samples in the same gel and to measure differential protein expression (\pm NaCl) across the three replicates. The selected protein spots were subjected to in-gel trypsin digestion, peptide extraction, and desalting, followed by MALDI-ToF/ToF analysis (Applied Biosystems, Bedford, MA). Peptides were analyzed by using MASCOT and the NCBI nr database to identify the selected proteins.

Western blot analysis

Total protein extracts were produced by glass bead lysis of whole yeast cells in buffer A (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 15 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 2 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride using a Mini Beadbeater (Biospec Products, Bartlesville, OK). In the cases where cell fractionation was applied, yeast spheroplasts were produced for 30 min at 30°C in SP buffer (1.2 M sorbitol; 20 mM potassium phosphate pH 7.4) containing lyticase at 750 units/g cells. The spheroplasts were collected by centrifugation (2,500×g), washed, and resuspended in SH buffer (0.6 M sorbitol, 20 mM HEPES pH 7.4, 1 mM PMSF). Cells were lysed in a glass homogenizer and cell debris was pelleted by centrifugation (2,500×g). The supernatant was again centrifuged at 12,000×g. The supernatant contained the mainly cytosolic fraction. The mitochondria enriched pellet was washed and finally resuspended in SH buffer. Protein concentration in all extracts was determined by the Coomassie dye-binding assay (BioRad, Hercules, CA). An equal

total amount of protein was separated on 8% SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting using antiperoxidase-antiperoxidase (anti-PAP) antibody (Sigma, St. Louis, MO). The bands were visualized with ECL Plus (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Total protein was visualized by Direct Blue 71 (DB71) staining of the membranes (Hong et al., 2000).

Salt and oxidative stress sensitivity assays

To quantitatively analyze the stress sensitivity of different yeast strains, fresh over night precultures were diluted to the same OD in multiwell plates in YPD medium with or without the indicated supplements. Three independent cultures were assayed for each strain and condition. The optical density of the cultures was continuously monitored in a Bioscreen C system (Thermo, Rochester, NY). Growth curves depicted in the graphs are derived from the mean values obtained for the three independent cultures for each strain.

Results

We have recently shown that the mitochondrial function in budding yeast significantly contributes to osmotic and salt stress resistance. Accordingly, mitochondrial proteins are upregulated in a selective and stress-dependent manner (Pastor et al., 2009). Here, we aimed at elucidating this mitochondrial stress response at the whole-organelle level by the use of proteomic approaches.

Identification of upregulated proteins in salt-adapted mitochondria

We quantitatively compared the mitochondrial proteome of unstressed cells with cells that had adapted to high salt (1M NaCl) conditions. The whole protein extracts from highly purified mitochondria in both conditions were differentially Cy3 and Cy5 labeled and resolved on 2D gels (Figs. 1 and 2). From the three independent overlay images the average fold change (stressed vs. unstressed) was calculated for those spots that were clearly identified on all three 2D DIGE gels. A ranked list of apparently overrepresented mitochondrial proteins upon salt stress was created. Twenty-eight individual spots were identified in this way, which showed more than twofold abundance in the stress adapted organelle. Nineteen of these proteins were identified by mass spectrometry yielding a list of 15 different protein functions, which were upregulated in response to NaCl stress (see Table 1). These proteins can be classified in functional groups: (1) mitochondrial antioxidant functions represent Prx1 (peroxiredoxin), Sod2 (superoxide dismutase), and Coq6, 7 (ubiquinone biosynthesis enzymes). (2) Leu4, Leu9, Ilv2, Ilv6, and Ecm40 are amino acid biosynthesis enzymes participating in leucine, isoleucine, valine, and arginine synthesis. (3) Ald4 and Pdc1 catalyze the conversion of pyruvate to acetate. (4) Hsp78 is a chaperone for mitochondrial matrix proteins. (5) Rip1 (subunit of cytochrome bc1 complex) and Atp4 (ATP synthase subunit) were the only components with a direct implication in mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation. (6) The Lsp1 protein is one of the principal structural components of eisosomes, which form patch structures originally identified at the plasma membrane.

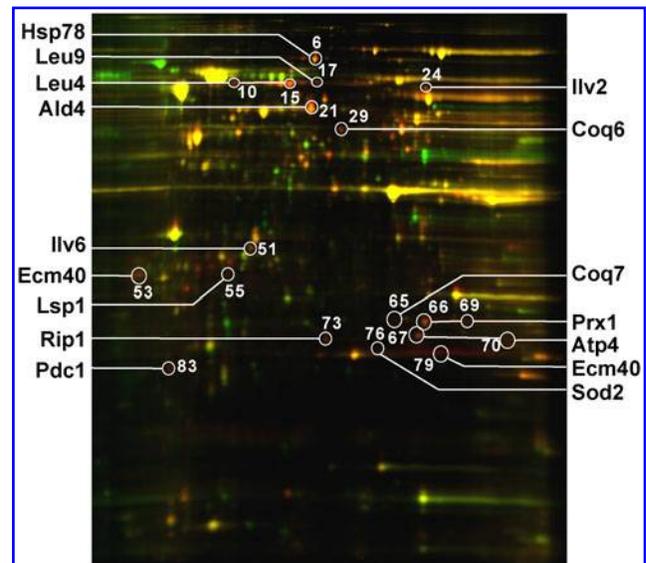


FIG. 1. 2D-DIGE analysis of NaCl induced mitochondrial proteins. A representative 2D gel is shown where the mitochondrial proteome under normal conditions (Cy3 labeled) and after adaptation to 1M NaCl (Cy5 labeled) has been resolved. The protein spots that have been identified by MALDI-TOF/MS-MS are indicated.

Response of mitochondrial antioxidant functions to NaCl stress

We next wanted to verify the obtained data by the immunological detection of some selected groups of mitochondrial proteins. For the antioxidant functions, we quantified the protein abundance of Coq6, Prx1, and Sod2 in whole-cell extracts under normal and high salt (1M NaCl) growth

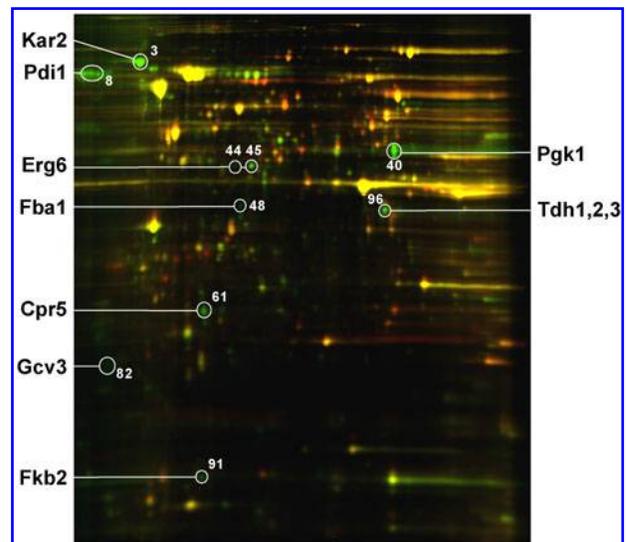


FIG. 2. 2D-DIGE analysis of mitochondrial proteins downregulated upon salt stress. A representative 2D gel is shown where the mitochondrial proteome under normal conditions (Cy3 labeled) and after adaptation to 1M NaCl (Cy5 labeled) has been resolved. The protein spots that have been identified by MALDI-TOF/MS-MS are indicated.

TABLE 1. LIST OF GREATER THAN TWOFOLD UPREGULATED PROTEINS IN SALT STRESS-ADAPTED MITOCHONDRIA

Spot No.	Protein name ^a	Gene	Protein MW	Protein PI	Peptides matched	Function	Ratio ^b	p-value ^c
79	Ecm40 ^{de}	YMR062C	47.8	6.77	15	Ornithine acetyltransferase, arginine biosynthesis	+5.7	0.0026
15	Leu4 ^e	YNL104C	68.4	5.7	30	2-isopropylmalate synthase I, leucine biosynthesis	+3.88	0.0002
83	Pdc1 ^d	YLR044C	61.5	5.8	4	Pyruvate decarboxylase isozyme 1	+2.97	0.036
66	Prx1 ^e	YBL064C	29.5	8.97	10	Peroxioredoxin with thioredoxin peroxidase activity	+2.68	0.0045
29	Coq6	YGR255C	53.5	6.52	13	Putative flavin-dependent monooxygenase, involved in ubiquinone biosynthesis	+2.65	0.0004
76	Sod2	YHR008C	26	8.5	4	Superoxide dismutase	+2.65	0.0092
21	Ald4	YOR374W	56.7	6.31	24	Aldehyde dehydrogenase	+2.62	0.0016
70	Atp4 ^e	YPL078C	27	9.16	15	Subunit b of mitochondrial ATP synthase	+2.51	0.009
17	Leu9	YOR108W	67.2	6.31	24	2-isopropylmalate synthase II, leucine biosynthesis	+2.49	0.0002
55	Lsp1	YPL004C	38	4.62	14	Primary component of eisosomes	+2.49	0.03
53	Ecm40 ^{de}	YMR062C	47.8	6.77	10	Ornithine acetyltransferase, arginine biosynthesis	+2.43	0.04
69	Prx1 ^e	YBL064C	29.5	8.97	7	Peroxioredoxin with thioredoxin peroxidase activity	+2.37	0.0032
6	Hsp78	YDR258C	91.3	8.17	38	Mitochondrial matrix chaperone	+2.33	0.0048
73	Rip1	YEL024W	20.1	5.94	12	Ubiquinol-cytochrome- <i>c</i> reductase, mitochondrial bc1 complex	+2.25	0.0052
67	Atp4 ^e	YPL078C	27	9.16	13	Subunit b of mitochondrial ATP synthase	+2.19	0.009
24	Ilv2	YMR108W	68.3	6.36	15	Acetolactate synthase, isoleucine, and valine biosynthesis	+2.11	0.0069
65	Coq7	YOR125C	30.9	8.79	11	Protein required for ubiquinone biosynthesis	+2.08	0.013
51	Ilv6	YCL009C	34	6.51	10	Regulatory subunit of acetolactate synthase, isoleucine and valine biosynthesis	+2.04	0.0009
10	Leu4 ^e	YNL104C	68.4	5.7	20	2-isopropylmalate synthase I, leucine biosynthesis	+2.02	0.0027

^aProteins were identified with 100% confidence score by MALDI-TOF/MS-MS.

^bAverage fold change after crossgel analysis of three independent 2-DIGE analyses.

^cThe significance of the observed changes was calculated by the Student's *t*-test.

^dThese proteins were not full length on the 2D gels.

^eProteins identified by more than one individual spot.

conditions using chromosomally TAP-tagged yeast strains. As shown in Figure 3, the abundance of all three proteins was strongly induced in NaCl-treated yeast cells. To test whether the observed upregulation was dependent on the cation species, we used 1M KCl instead of NaCl to provoke hyperosmotic stress. We observed that Coq6 and Prx1 induction

was still detectable, while the Sod2 protein levels were the same in both conditions. These data confirm the salt inducibility of the Coq6, Prx1, and Sod2 antioxidant functions, which was specific for Na⁺ in the case of Sod2.

Salt stress regulation of proteins involved in amino acid biosynthesis

Our proteomic approach identified several amino acid biosynthesis enzymes as upregulated during the adaptation to high salinity (Table 1). We next tested whether the amount of Ilv2, Ilv6, Leu4, and Leu9 increased in response to salt stress in whole-cell extracts. As shown in Figure 4A, the immunological detection of the respective TAP-tagged proteins revealed a significant upregulation upon NaCl stress only in the cases of Ilv2 and Leu4. Moreover, this upregulation was dependent on Na⁺ as it was not observed when the cells were treated with the same amount of KCl. Because only very subtle changes in the amounts of Ilv6 and Leu9 were observed in whole-cell extracts, we tested whether a regulation by salt stress could be identified by subcellular fractionation, which allows for more efficient release of mitochondrial proteins. We assayed whether the amount of TAP-tagged Ilv2, Ilv6, Leu4, and Leu9 in the cytosolic and mitochondria enriched fraction changed upon NaCl stress. We confirmed for all four proteins their predominant localization in the mitochondrial fraction (Fig. 4B). When the cells were grown in the presence of 1M NaCl the abundance of Ilv2, Ilv6, Leu4, and Leu9 increased, with Ilv6 and Leu9 showing a more subtle effect, thereby

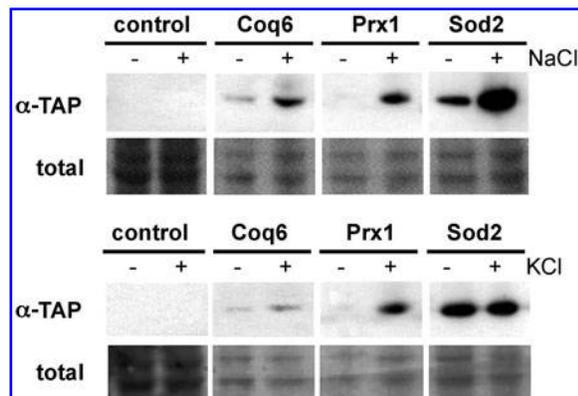


FIG. 3. Coq6, Prx1, and Sod2 proteins are induced upon salt stress. Whole-cell extracts of yeast cells expressing the indicated TAP-tagged proteins from their natural promoters were analyzed by Western blot using anti-PAP antibody. The cells were grown in the absence or presence of 1M NaCl or KCl as indicated. The total protein amount was visualized by DB71 staining of the membranes.

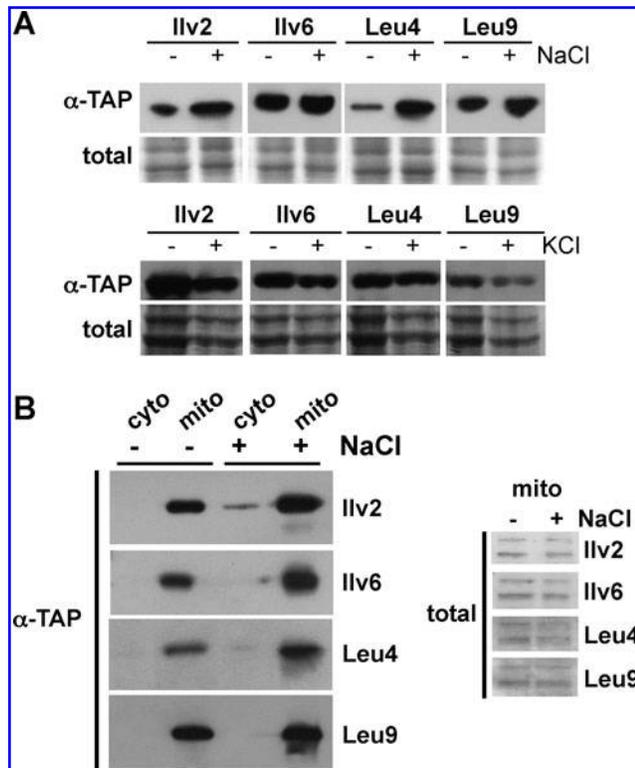


FIG. 4. The amino acid biosynthesis enzymes Ilv2, Ilv6, Leu4, and Leu9 enrich in mitochondria upon salt stress. **(A)** Whole-cell extracts of yeast cells expressing the indicated TAP-tagged proteins from their natural promoters were analyzed by Western blot using anti-PAP antibody. The total protein amount was visualized by DB71 staining of the membranes. The cells were grown in the absence or presence of 1 M NaCl as indicated. **(B)** Cytosolic and mitochondrial enriched cell extracts were prepared as described in Materials and Methods from yeast cells expressing the indicated TAP-tagged proteins. The total amount of the mitochondrial fraction was visualized for each strain by DB71 membrane staining. TAP-fusion proteins were detected by Western blot using anti-PAP antibody.

confirming our results obtained from the unbiased proteomic assay.

The importance of the identified upregulated proteins for salt and oxidative stress resistance

We next addressed the question whether the salt-inducible mitochondrial proteins identified by 2D-DIGE were important and therefore limiting determinants of growth in the presence of high salinity stress. We individually measured the growth kinetics under normal and high salinity conditions of gene deletion strains for 12 of the 15 NaCl inducible mitochondrial functions shown in Table 1. As shown in Figure 5A, we found that loss of the majority of those proteins (Sod2, Prx1, Leu4, Leu9, Ilv6, Ecm40, Ald4, Hsp78, and Lsp1) did not cause a significant growth delay or a decrease in growth yield even after exposure to 1 M NaCl, which dramatically slows growth of yeast wild-type cells. Only in the cases where the mitochondrial electron transport chain (*rip1* and *coq7* mutants) or oxidative phosphorylation (*atp4* mutant) was interrupted, we detected a decreased growth yield upon salt stress

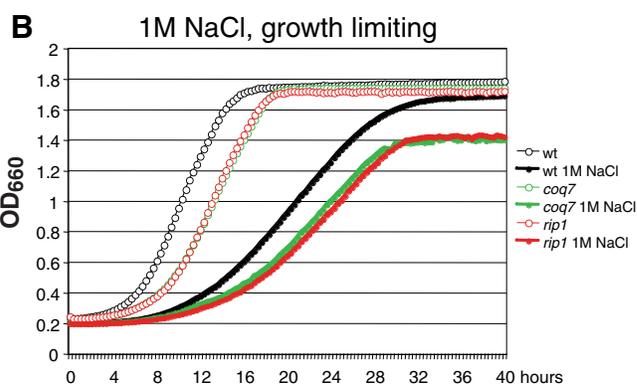
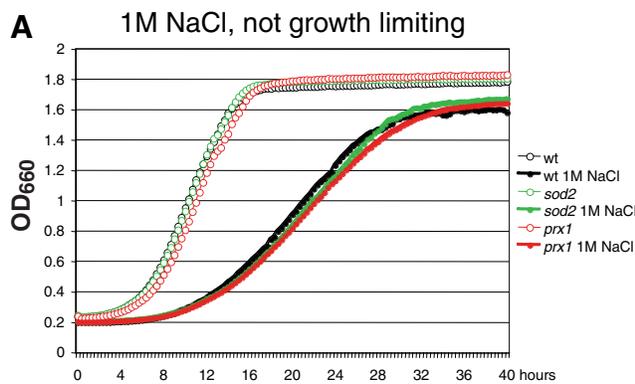
(Fig. 5B). Because hypertonic conditions cause oxidative stress in yeast (Kozioł et al., 2005), and the reduction of reactive oxygen species is an important protective function of the mitochondria upon salt stress (Pastor et al., 2009), we additionally tested the same set of mutant strains for their growth kinetics upon oxidative stress caused by hydrogen peroxide. As depicted in Figure 5C, all 12 knockout strains showed considerable sensitivities to treatment with 5 mM H₂O₂. As expected, the loss of antioxidant functions in the *prx1*, *sod2*, and *coq7* mutant strains caused a dramatic sensitivity to H₂O₂, which was equally observed in *rip1*, *hsp78*, or *atp4* mutants. We also detected a significant growth delay upon hydrogen peroxide stress in the amino acid biosynthesis mutants (*leu4*, *leu9*, *ilv6*, *ecm40*) and in the *lsp1* mutant.

Salt stress-regulated expression of proteins of the outer mitochondrial membrane

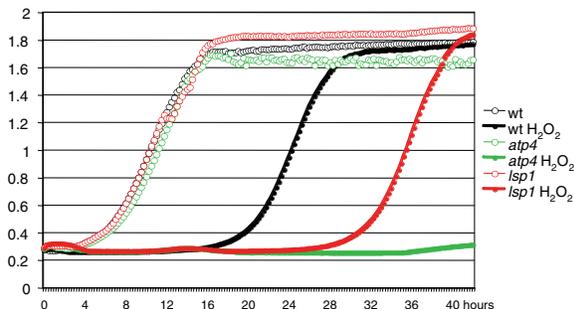
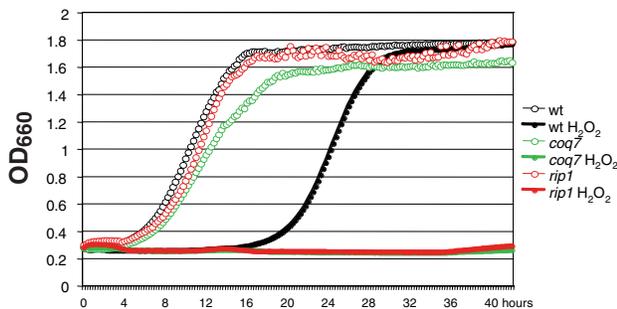
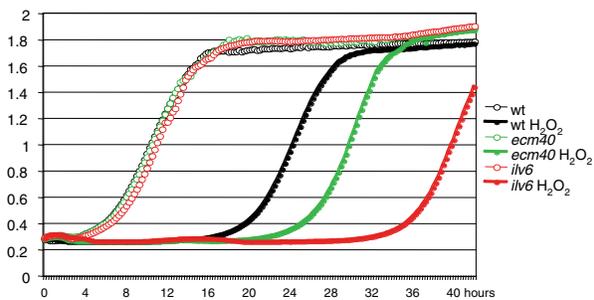
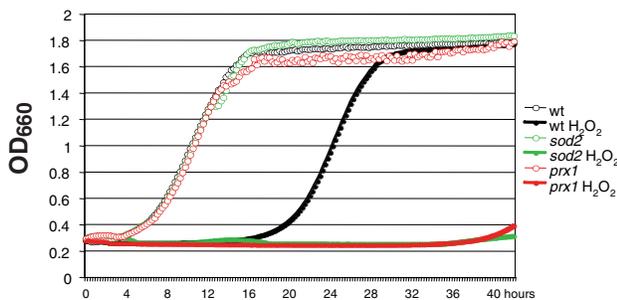
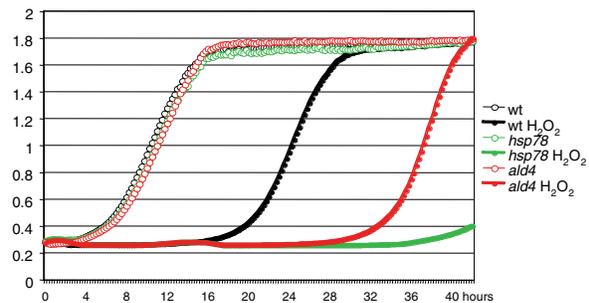
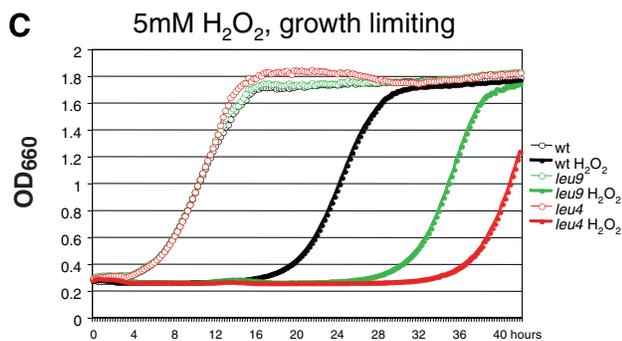
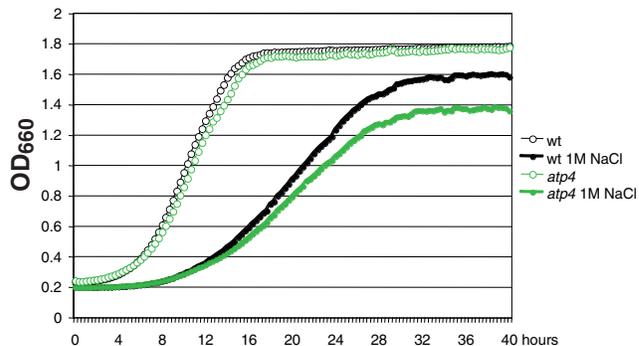
The Lsp1 protein was identified by our proteomic screen as a salt-inducible component of the mitochondria (Table 1). Lsp1 is the only protein that has a principle subcellular localization different from the mitochondria. Lsp1 and the homologous Pil1 protein were originally described as abundant structural proteins within patches at the inner surface of the plasma membrane, the so-called eisosomes (Walther et al., 2006). However, both proteins were also identified as components of the outer mitochondrial membrane (Zahedi et al., 2006). Therefore, we aimed at establishing a functional link between Lsp1 and mitochondrial function. We tested whether Lsp1 protein levels were upregulated in nonfermentable growth conditions that induce mitochondrial biogenesis in yeast. As shown in Figure 6A, Lsp1 protein abundance clearly increased upon growth with glycerol as the sole carbon source. A similar induction was observed under NaCl stress. In the same assay, the Pil1 protein showed a minor regulation by either nonfermentable growth or salt stress (Fig. 6A). These data indicated that Lsp1 might be involved in salt-induced changes of the outer mitochondrial membrane. We next searched for genes that share similar expression patterns in genomic transcription profiling experiments upon environmental stresses (Gasch et al., 2000). Remarkably, four other outer mitochondrial membrane proteins (Om14, Rdl1, Mcr1, Hfd1) belong to the 10 most similarly regulated cellular functions when compared to *LSP1*. We directly tested whether these proteins were induced by salt stress. As shown in Figure 6B, all four outer membrane proteins were clearly more abundant upon NaCl treatment. As a control, two subunits of the outer mitochondrial membrane protein import complex (Tom22 and Tom70) did not reveal any significant change in abundance in response to salt stress (Fig. 6B). These data suggested that the adaptation of mitochondria to NaCl stress involved a change in the composition of the organelles outer membrane with a specific enrichment of Lsp1, Om14, Rdl1, Mcr1, and Hfd1.

Identification of downregulated proteins in salt-adapted mitochondria

We next wanted to identify proteins that were downregulated by salt stress and therefore underrepresented in the mitochondrial preparations from NaCl adapted cells. As described above, the obtained mean fold changes of all spots in the 2D-DIGE gels were ranked for the most downregulated



Identical results for:
leu4, *leu9*, *ald4*, *hsp78*,
ilv6, *ecm40*, *lsp1*



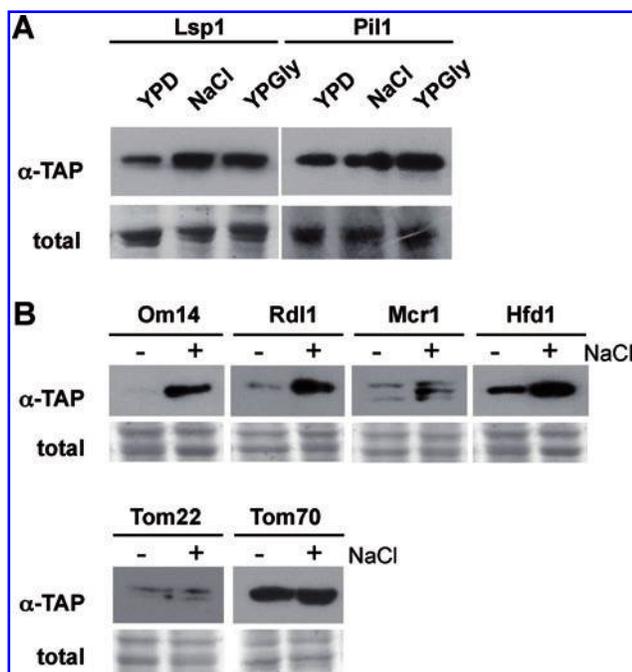


FIG. 6. A group of outer mitochondrial membrane proteins is induced upon salt stress. Whole-cell extracts of yeast cells expressing the indicated TAP-tagged proteins from their natural promoters were analyzed by Western blot using anti-TAP antibody. The cells were grown in glucose (YPD) or glycerol (YPGly) containing media or in the presence of 1 M NaCl as indicated. The total protein amount was visualized by DB71 staining of the membranes. **(A)** Lsp1 and Pil1 increase abundance in response to salt stress or during the shift from fermentation to respiration. **(B)** The outer mitochondrial membrane proteins Om14, Rdl1, Mcr1, and Hfd1 are induced by NaCl stress, while Tom22 and Tom70 are constitutive under the same conditions.

spots upon stress. Sixteen individual spots were identified in this way, which showed more than threefold reduced abundance in the stress adapted organelle. Ten of these proteins were identified by mass spectrometry, yielding a list of nine different protein functions, which were downregulated in response to NaCl stress (Fig. 2 and Table 2). These proteins can be classified by their function: (1) Kar2, Cpr5, Pdi1, and Fkb2 are resident in the endoplasmic reticulum involved in protein import and protein folding; (2) Fba1, Tdh1-3, and Pgc1 are glycolytic enzymes; (3) Erg6 is involved in the synthesis of ergosterol; (4) Gcv3 is involved in the catabolism of glycine. The only proteins with a known predominant mitochondrial localization are Erg6 and Gcv3.

Salt stress regulation of glycolytic enzymes

The identified downregulated proteins Fba1, Tdh1-3, and Pgc1 in our proteomic analysis of NaCl-adapted mitochon-

dria are abundant glycolytic enzymes mainly located in the cytoplasm. In the case of the highly homologous Tdh1-3 isozymes we cannot unambiguously decide which of the Tdh proteins is identified here. Yeast cells produce glycerol as the main osmolyte in response to hypertonic stress. Glycerol biosynthesis starts from the glycolysis intermediate dihydroxy-acetone-phosphate. As all three enzymatic activities catalyze conversions immediately upstream (Fba1) or downstream (Tdh1-3, Pgc1) of the formation of dihydroxy-acetone-phosphate, we analyzed all five proteins by immunological detection in the cytoplasmic and the mitochondria enriched fraction in the presence or absence of 1 M NaCl. As depicted in Figure 7, the Tdh2 and Tdh3 isozymes clearly diminished in the mitochondrial fraction upon salt stress, whereas the Tdh1 protein showed an induction both in the cytosolic and the mitochondrial fraction. These data strongly suggest that we actually identified the Tdh2 and/or Tdh3 isozyyme to respond to salt stress in the 2D gels, which is further supported by the greater number of matching peptides for Tdh2/3 after mass spectrometry (Table 2). The Fba1 enzyme revealed a partial loss from the mitochondria upon stress, whereas for Pgc1 no significant change in its cytosolic/mitochondrial distribution was observed. Altogether, these results indicate that some glycolytic enzyme activities, especially the Tdh1-3 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, are regulated by NaCl stress.

Discussion

Here we report the proteomic changes in the yeast mitochondrial composition in response to salt stress. The work presented here originated from our recent finding that the mitochondrial function in yeast is critical to efficiently adapt to hypertonic conditions (Pastor et al., 2009). More importantly, it is the transcriptional activation of specific mitochondrial functions, which leads to a proper adaptation to salt stress. In order to understand the impact of salt stress on the mitochondria at the whole organelle level we performed the proteomic approach by the 2D-DIGE technology described here.

One major group of proteins identified here within the most upregulated mitochondrial components upon adaptation to NaCl has antioxidant function (Fig. 8). It is well known that salt and hyperosmotic stress cause oxidative stress in yeast cells (Koziol et al., 2005). This explains that oxidative stress defense functions are among the principle determinants activated by hyperosmotic stress at the transcriptional level (Posas et al., 2000; Rep et al., 2000). However, it is largely unknown how reactive oxygen species are generated under those stress conditions. Electron leakage from one or several electron transport chain complexes at the inner mitochondrial membrane is probable (Murphy, 2009). On the other hand, respiratory metabolism is efficiently repressed by fermentable carbon sources in budding yeast (Carlson, 1999; Dieckmann and Staples, 1994), which points to other sources of ROS

FIG. 5. Sensitivity assays of mutant strains in the NaCl activated mitochondrial functions upon salt and oxidative stress. The growth of the indicated strains was continuously monitored in the absence or presence of 1 M NaCl or 5 mM H₂O₂. **(A)** Loss of most of the salt stress-activated mitochondrial functions was not growth limiting under high salt conditions. **(B)** The mutant strains lacking *COQ7*, *RIP1*, or *ATP4* show growth defects upon high salt stress. **(C)** Loss of the salt stress-activated mitochondrial functions is generally rate limiting for growth in the presence of oxidative stress (5 mM H₂O₂).

TABLE 2. LIST OF GREATER THAN THREEFOLD DOWNREGULATED PROTEINS IN SALT STRESS-ADAPTED MITOCHONDRIA

Spot No.	Protein name ^a	Gene	Protein MW	Protein PI	Peptides matched	Function	Ratio ^b	p-value ^c
40	Pgk1	YCR012W	44.7	7.11	21	3-phosphoglycerate kinase, glycolysis, and gluconeogenesis	-7.44	0.0009
48	Fba1	YKL060C	39.6	5.51	8	Fructose 1,6-bisphosphate aldolase, glycolysis, and gluconeogenesis	-7.29	0.0056
3	Kar2	YJL034W	74.4	4.79	36	ATPase involved in protein import into the ER	-4.56	0.0008
61	Cpr5	YDR304C	25.3	5.35	11	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase of the ER	-4.43	0.0013
82	Gcv3	YAL044C	19.6	4.85	5	H subunit of the mitochondrial glycine decarboxylase complex	-4.16	0.0009
8	Pdi1	YCL043C	58.2	4.38	26	Protein disulfide isomerase of the ER	-4.11	0.032
44	Erg6 ^d	YML008C	43.5	5.46	18	Delta(24)-sterol C-methyltransferase, ergosterol biosynthesis	-3.97	0.0026
96 ^e	Tdh3	YGR192C	35.7	6.46	15	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isozyme 3, glycolysis, and gluconeogenesis	-3.9	0.0015
	Tdh2	YJR009C	35.8	6.46	13	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isozyme 2, glycolysis, and gluconeogenesis	-3.9	0.0015
	Tdh1	YJL052W	35.7	8.29	7	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isozyme 1, glycolysis, and gluconeogenesis	-3.9	0.0015
45	Erg6 ^d	YML008C	43.5	5.46	19	Delta(24)-sterol C-methyltransferase, ergosterol biosynthesis	-3.45	0.0032
91	Fkb2	YDR519W	14.5	5.34	8	Membrane bound peptidyl-prolyl <i>cis-trans</i> isomerase of the ER	-3.1	0.0099

^aProteins were identified with 100% confidence score by MALDI-TOF/MS-MS.

^bAverage fold change after crossgel analysis of three independent 2-DIGE analyses.

^cThe significance of the observed changes was calculated by the Student's *t*-test.

^dProtein identified by more than one individual spot.

^eAll three Tdh isozymes were identified with 100% confidence by mass spectrometry and are listed with decreasing numbers of matching peptides.

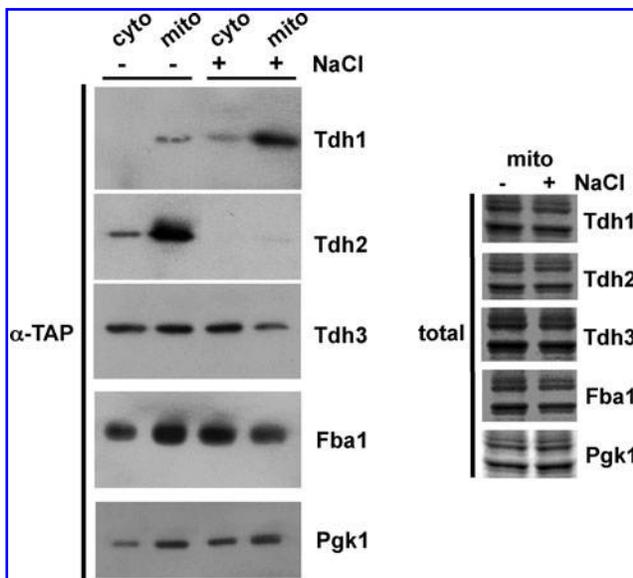


FIG. 7. Regulation of the glycolytic enzymes Tdh1-3, Fba1, and Pgk1 upon salt stress. Cytosolic and mitochondria-enriched cell extracts were prepared as described in Materials and Methods from yeast cells expressing the indicated TAP-tagged proteins from their natural promoters. The cells were grown in the absence or presence of 1M NaCl as indicated. Equal amounts of cytosolic or mitochondrial fraction was loaded for each strain. The total amount of the mitochondrial fraction was visualized for each strain by DB71 membrane staining. TAP-fusion proteins were detected by Western blot using anti-PAP antibody.

contributing to oxidative stress upon hypertonic stress. Moreover, the importance of the mitochondrial function for oxidative and salinity stress resistance has been shown (Pastor et al., 2009; Thorpe et al., 2004). This, together with the finding that antioxidant treatment improves growth of mutants with mitochondrial defects under salt stress (Pastor et al., 2009), points to the mitochondria as an important site for antioxidant defense during stress. Accordingly, we identify the following antioxidants to be enriched in NaCl adapted mitochondria: Sod2 is a mitochondrial superoxide dismutase, which catalyzes the conversion of superoxide radicals to hydrogen peroxide (Steinman, 1980). The second enzyme is Prx1, a mitochondrial peroxiredoxin, which catalyzes the reduction and detoxification of hydroperoxides (Pedrajas et al., 2000). Both enzymes could therefore ensure the full reduction of superoxide radicals to H₂O during NaCl stress. The Prx1 antioxidant function needs thioredoxin reductase Trr2 and glutathione to be reactivated for continuous redox cycles (Greetham and Grant, 2009). However, *TRR2* expression is largely unresponsive to salt stress (Ni et al., 2009) and Trr2 is not identified by our 2D analysis. Our results indicate that Prx1 and Sod2 are the major salt-inducible antioxidants of the mitochondria. This is confirmed by the strong transcriptional activation usually found for *PRX1* and *SOD2* in genomic profiling experiments upon salt stress (Ni et al., 2009; Posas et al., 2000; Rep et al., 2000).

Coq6 and Coq7 are identified here as overrepresented in salt adapted mitochondria. Both proteins participate in the numerous enzymatic steps of coenzyme Q (ubiquinone) synthesis at the inner mitochondrial membrane (Tran and

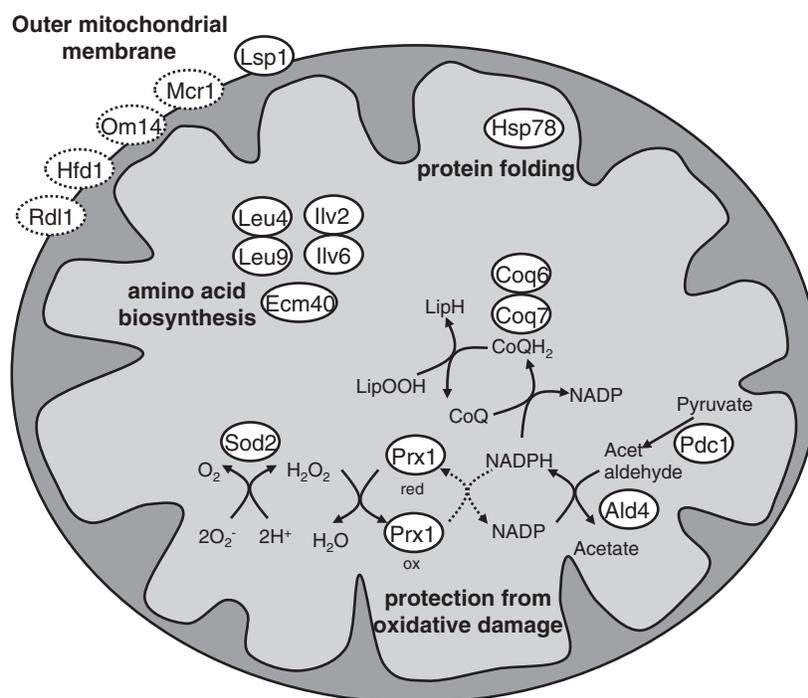


FIG. 8. Schematic representation of the NaCl-induced mitochondrial functions identified in this study. Proteins are grouped according to their possible function during salt stress or to their location in the case of the outer membrane proteins. Note that Mcr1, Om14, Hfd1, and Rdl1 were not identified by our proteomic analysis, but by their regulation similar to Lsp1. CoQ and CoQH₂ refer to the oxidized and reduced form of coenzyme Q and LipOOH to lipid hydroperoxides.

Clarke, 2007). Apart from being an essential electron carrier in the mitochondrial electron transport chain, coenzyme Q is a lipid soluble antioxidant found in all intracellular membranes (Bentinger et al., 2007). Reduced coenzyme Q is an efficient antioxidant preventing lipid and protein peroxidation. Activation of coenzyme Q biosynthesis upon salt stress could be a way of preventing oxidative damage of lipids occurring as a consequence of the NaCl stress in the mitochondria and other membranes. Our results are confirmed by the fact that expression of most of the coenzyme Q biosynthetic genes (*COQ1–COQ10*) are found to be robustly activated upon salt stress. Interestingly, we also identify Rip1 to be enriched in NaCl-treated mitochondria. Rip1 is a subunit of the cytochrome bc1 complex, which directly transfers electrons from ubiquinone to cytochrome *c*1 during respiration.

The antioxidant systems Prx1 and coenzyme Q require redox equivalents in the form of NADPH to be recycled into their reduced states. Yeast mitochondria have two sources of NADPH: the NAD and NADH kinase activity of Pos5 and the acetaldehyde dehydrogenase Ald4 (Miyagi et al., 2009). We only identified Ald4 as a salt-induced component of the mitochondria, which coincides with a massive transcriptional activation of *ALD4* by salt stress and the absence of such regulation in the case of *POS5* (Ni et al., 2009; Posas et al., 2000; Rep et al., 2000). Intriguingly, we additionally found Pdc1 to be enriched after stress. Pdc1 is a pyruvate decarboxylase, which could provide acetaldehyde as the substrate for the Ald4 reaction. Taken together our results, we propose that the major salt regulated antioxidant functions of the mitochondria are superoxide dismutase Sod2, peroxiredoxin Prx1, and coenzyme Q, and that enhanced oxidation of acetaldehyde by the Ald4 enzyme compensates for a higher

NADPH demand during ROS detoxification upon salt stress (Fig. 8). As expected, loss of the identified proteins with a possible antioxidant function resulted in severe sensitivity to hydrogen peroxide. However, the same mitochondrial functions were dispensable for growth under severe NaCl stress. It might be therefore that the oxidative stress generated by high salinity can still be counteracted in the absence of the discussed mitochondrial ROS protective functions, but not under acute oxidative damage caused by hydrogen peroxide. Only the mutants with an interrupted electron transport chain showed a salt sensitive phenotype, which reinforces the critical role of complete electron transfer in the mitochondria to efficiently deal with oxidative and osmotic stress (Pastor et al., 2009; Thorpe et al., 2004).

We identify numerous mitochondrial proteins (Leu4, 9; Ilv2, 6; Ecm40) involved in amino acid biosynthesis to enrich in the salt stressed organelle. These findings might be explained by the need to reinforce amino acid biosynthetic pathways because of the inhibition of the uptake and/or the biosynthesis of specific amino acids in the presence of high salinity. It has been reported previously that hyperosmotic stress causes amino acid depletion at least partially by the inhibition of the uptake of amino acids (Norbeck and Blomberg, 1998; Pascual-Ahuir et al., 2001). Moreover, a *gcn4* mutant in the central transcriptional activator of the general control pathway adjusting amino acid biosynthesis to the cells demand is sensitive to salt stress (Pascual-Ahuir et al., 2001). This, together with the finding that amino acid supplementation rescues the growth of yeast cells under high salt conditions, points to the amino acid supply as a critical determinant of hypertonic growth (Pandey et al., 2007). This is demonstrated here by the identification of several enzymes

and regulators involved in leucine, isoleucine, valine, and arginine biosynthesis to be upregulated in response to salt stress. Additionally, metabolic enzymes, including amino acid biosynthesis enzymes, have been discovered to play structural and protective functions as they form a complex with the mitochondrial genome, the so-called mitochondrial nucleoid (Chen and Butow, 2005). This structure is important for the stability and inheritance of the organelles genome. Importantly, the mitochondrial nucleoid is a dynamic complex, which changes its protein composition in response to metabolic alterations (Kucej et al., 2008). Metabolic enzymes in the nucleoid are usually bifunctional as their enzymatic activity is not required for nucleoid organization and function. *Ilv6* is one of the components of yeast nucleoids and is identified here to be overrepresented in salt-adapted mitochondria. It is possible that the amino acid biosynthesis enzymes identified here have protective functions that are independent on their metabolic function. This could also explain that the loss of these enzymes causes hypersensitivity to oxidative stress (Fig. 5).

We additionally identify the *Lsp1* protein as a salt-induced mitochondrial component. *Lsp1*, together with the highly homologous *Pil1* protein, forms the cytoplasmic portion of stable cortical patch structures or eisosomes at the plasma membrane (Walther et al., 2006). These structures have functions in endocytosis and the turnover of membrane transporters (Grossmann et al., 2008; Walther et al., 2006). Several integral membrane proteins and soluble proteins have been shown to colocalize with *Lsp1*/*Pil1*, suggesting that these patch structures represent specialized domains within the plasma membrane (Grossmann et al., 2008). Although both *Lsp1* and *Pil1* have been identified in highly purified outer mitochondrial membranes (Zahedi et al., 2006), their function in mitochondria are not known. Here we show that *Lsp1* and to a lesser degree *Pil1*, are induced by nonfermentable growth when mitochondrial biogenesis is heavily activated in yeast. Further analysis is required to test the very interesting possibility that *Lsp1* participates in the spatial organization of the outer mitochondrial membrane. Here we show that apart from *Lsp1* at least four other mitochondrial outer membrane proteins (*Om14*, *Rdl1*, *Mcr1*, *Hfd1*) are specifically induced by NaCl stress. This demonstrates that the mitochondrial envelope undergoes a change in its protein composition when challenged with salt stress. With the exception of *Mcr1*, which has NADH-cytochrome b5 reductase activity (Lamb et al., 1999), the functions of the here-identified mitochondrial outer membrane proteins remain to be determined. We do not know the impact of NaCl stress on the mitochondrial ion homeostasis and on the organelles volume control. However, we can anticipate that any hypertonic insult must interfere with the osmotic balance of the mitochondria, which is critical for its function and mostly regulated by K^+ fluxes (Kaasik et al., 2007; Nowikovsky et al., 2009), and therefore might trigger an adaptive response of the organelle at the level of its membrane permeability.

The Hsp78 chaperone was identified here as a salt-inducible mitochondrial compound, and we show that the loss of Hsp78 function causes severe sensitivity to oxidative stress. Hsp78 and *Ssc1* cooperate in the mitochondrial matrix to stabilize proteins after heat shock (Leonhardt et al., 1993; Schmitt et al., 1995). According to genomic profiling data, the expression of *HSP78* is much more activated by salt stress

than *SSC1*. This indicates that the induced Hsp78 activity prevents mitochondrial protein denaturation caused by the high salinity stress.

We additionally identify proteins in the mitochondrial extracts with a decrease in abundance upon salt stress. Only two of them (*Erg6* and *Gcv3*) are exclusively located at the mitochondria. *Erg6* is an enzyme specifically involved in the biosynthesis of ergosterol at the outer mitochondrial membrane (Gaber et al., 1989; Zahedi et al., 2006). We have recently found that total ergosterol levels are significantly down regulated in response to salt stress in yeast cells at least partially by the transcriptional repression of several ergosterol biosynthesis genes (Martinez-Montañés, Pascual-Ahuir, and Proft, unpublished results). These observations are in line with the finding that salt-adapted mitochondria contain reduced levels of *Erg6* compared to the untreated organelle.

Gcv3 is a subunit of the mitochondrial glycine cleavage complex involved in the catabolism of glycine (Nagarajan and Storms, 1997). It remains speculative how the regulation of the *Gcv* complex is physiologically connected to salt adaptation. However, our finding seems to be supported by genomic expression profiling, which identifies the *Gcv1*, *2*, and *3* subunits as repressed upon NaCl stress (Ni et al., 2009).

The glycolytic enzymes (*Fba1*, *Tdh1-3*, *Pgk1*) catalyzing the conversions from fructose-1,6-bisphosphate to phosphoglycerate kinase were identified here to be underrepresented in the salt-stressed mitochondrial fraction. These enzymes are abundant cytosolic proteins; however, *Tdh3* and *Pgk1* have been also identified in highly purified mitochondria (Reinders et al., 2006). A direct way how hyperosmotic stress could interfere with the flux through glycolysis is the massive production of glycerol, which serves as the major osmolyte in yeast cells (Hohmann, 2002). Glycerol biosynthesis starts from the glycolytic intermediate dihydroxy acetone phosphate and could therefore compete with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Tdh1-3*) for its substrate. Thus, it is plausible that glycerol biosynthesis during salt stress is favored by the reduction of glycolytic enzymes involved in the steps downstream of dihydroxy acetone phosphate. This is confirmed by the fact that the two major *Tdh* isoforms *Tdh2* and *Tdh3*, which govern 75–90% of the total enzymatic activity in yeast (McAlister and Holland, 1985), are significantly underrepresented in the mitochondria-enriched fractions upon hypertonic stress. Thus, most likely we originally identified *Tdh2* and/or *Tdh3* to be downregulated upon salt stress in the 2D gels and not the minor *Tdh1* isoform, which is oppositely regulated and increases its abundance upon stress. Altogether, the *Tdh* enzymes show a striking regulation of their isoform pattern in response to salt stress. Further investigation will be required to determine whether the adjustment of glycolytic enzyme activity and the association of glycolytic enzymes with the mitochondria is a physiologically relevant feature of osmotic adaptation.

We observe here that some abundant ER proteins (*Kar2*, *Cpr5*, *Fkb2*) are several-fold underrepresented in the extracts of NaCl adapted mitochondria. It is known that ER components can easily copurify with mitochondria, which is to a large extent avoided by the use of sucrose gradient centrifugation as applied here (Meisinger et al., 2000). However, it has been shown mainly in mammalian cells, that mitochondria and ER contact each other, and that these interorganelle contacts are important for signaling as well as Ca^{2+} and lipid

transfer (Giorgi et al., 2009; Pizzo and Pozzan, 2007). These close contacts, which communicate ER and the mitochondria, are known as mitochondrial associated membranes (Hayashi et al., 2009), and it has been shown that the degree of coupling of the two organelles can dynamically change (Csordas et al., 2006). Moreover, the joint ER-mitochondria structures contain several enzymes involved in phospholipid biosynthesis and specific chaperones. Physical contacts between ER and mitochondria have been reported for yeast (Achleitner et al., 1999; Gaigg et al., 1995), and the molecular architecture of the joint structure has been determined very recently (Kornmann et al., 2009). Thus, in the light of the discovery of the dynamic manner of the connection of ER with mitochondria in mammals, it will be very important to determine whether and how the mitochondria-ER associations are regulated by osmotic stress in yeast.

In summary, the proteomic analysis of the mitochondria in response to NaCl presented here underlines the dynamic and complex nature of the organelles adaptation to salinity stress. We mostly identify protein functions that are not primarily related to the general ATP generating machinery of the mitochondria, such as antioxidants, amino acid biosynthesis enzymes, outer membrane proteins, and others. These data indicate that changes in the mitochondrial composition upon stress affect functions different from its respiratory capacity and further support the idea that mitochondria integrate many environmental signals. Furthermore, to define the molecular implication in the salt stress response of the proteins discovered here should be an interesting task for future investigations.

Acknowledgments

We thank María Dolores Bernal and Jorge Lozano Juste for their help in the initial phase of this project. This work was supported by grants from Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2005-0174), Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU2008-00271), and Generalitat de Valencia (ACOMP07-198).

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Achleitner, G., Gaigg, B., Krasser, A., Kainersdorfer, E., Kohlwein, S.D., Perktold, A., et al. (1999). Association between the endoplasmic reticulum and mitochondria of yeast facilitates interorganelle transport of phospholipids through membrane contact. *Eur J Biochem* 264, 545–553.
- Aponte, A.M., Phillips, D., Hopper, R.K., Johnson, D.T., Harris, R.A., Blinova, K., et al. (2009). Use of (32)P to study dynamics of the mitochondrial phosphoproteome. *J Proteome Res* 8, 2679–2695.
- Balaban, R.S., Nemoto, S., and Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120, 483–495.
- Bentinger, M., Brismar, K., and Dallner, G. (2007). The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion* 7(Suppl), S41–S50.
- Carlson, M. (1999). Glucose repression in yeast. *Curr Opin Microbiol* 2, 202–207.
- Chan, D.C. (2006). Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* 125, 1241–1252.
- Chen, X.J., and Butow, R.A. (2005). The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat Rev Genet* 6, 815–825.
- Csordas, G., Renken, C., Varnai, P., Walter, L., Weaver, D., Buttle, K.F., et al. (2006). Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J Cell Biol* 174, 915–921.
- Detmer, S.A., and Chan, D.C. (2007). Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 870–879.
- Dieckmann, C.L., and Staples, R.R. (1994). Regulation of mitochondrial gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int Rev Cytol* 152, 145–181.
- Gaber, R.F., Copple, D.M., Kennedy, B.K., Vidal, M., and Bard, M. (1989). The yeast gene ERG6 is required for normal membrane function but is not essential for biosynthesis of the cell-cycle-sparking sterol. *Mol Cell Biol* 9, 3447–3456.
- Gaigg, B., Simbeni, R., Hrastnik, C., Paltauf, F., and Daum, G. (1995). Characterization of a microsomal subfraction associated with mitochondria of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. Involvement in synthesis and import of phospholipids into mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1234, 214–220.
- Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., et al. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* 11, 4241–4257.
- Ghaemmaghami, S., Huh, W.K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., et al. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425, 737–741.
- Gibson, G.E., Starkov, A., Blass, J.P., Ratan, R.R., and Beal, M.F. (2010). Cause and consequence: mitochondrial dysfunction initiates and propagates neuronal dysfunction, neuronal death and behavioral abnormalities in age-associated neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 1802, 122–134.
- Giorgi, C., De Stefani, D., Bononi, A., Rizzuto, R., and Pinton, P. (2009). Structural and functional link between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 1817–1827.
- Grant, C.M., Maciver, F.H., and Dawes, I.W. (1997). Mitochondrial function is required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 410, 219–222.
- Greetham, D., and Grant, C.M. (2009). Antioxidant activity of the yeast mitochondrial one-Cys peroxiredoxin is dependent on thioredoxin reductase and glutathione in vivo. *Mol Cell Biol* 29, 3229–3240.
- Grossmann, G., Malinsky, J., Stahlschmidt, W., Loibl, M., Weig-Meckl, I., Frommer, W.B., et al. (2008). Plasma membrane microdomains regulate turnover of transport proteins in yeast. *J Cell Biol* 183, 1075–1088.
- Hayashi, T., Rizzuto, R., Hajnoczky, G., and Su, T.P. (2009). MAM: more than just a housekeeper. *Trends Cell Biol* 19, 81–88.
- Hohmann, S. (2002). Osmotic adaptation in yeast—control of the yeast osmolyte system. *Int Rev Cytol* 215, 149–187.
- Hong, H.Y., Yoo, G.S., and Choi, J.K. (2000). Direct Blue 71 staining of proteins bound to blotting membranes. *Electrophoresis* 21, 841–845.
- Ito, J., Taylor, N.L., Castleden, I., Weckwerth, W., Millar, A.H., and Heazlewood, J.L. (2009). A survey of the *Arabidopsis thaliana* mitochondrial phosphoproteome. *Proteomics* 9, 4229–4240.
- Kaasik, A., Safiulina, D., Zharkovsky, A., and Veksler, V. (2007). Regulation of mitochondrial matrix volume. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C157–C163.
- Kornmann, B., Currie, E., Collins, S.R., Schuldiner, M., Nunnari, J., Weissman, J.S., et al. (2009). An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science* 325, 477–481.

- Kozioł, S., Zagulski, M., Bilinski, T., and Bartosz, G. (2005). Antioxidants protect the yeast *Saccharomyces cerevisiae* against hypertonic stress. *Free Radic Res* 39, 365–371.
- Kucej, M., Kucejova, B., Subramanian, R., Chen, X.J., and Butow, R.A. (2008). Mitochondrial nucleoids undergo remodeling in response to metabolic cues. *J Cell Sci* 121, 1861–1868.
- Lamb, D.C., Kelly, D.E., Manning, N.J., Kaderbhai, M.A., and Kelly, S.L. (1999). Biodiversity of the P450 catalytic cycle: yeast cytochrome b5/NADH cytochrome b5 reductase complex efficiently drives the entire sterol 14-demethylation (CYP51) reaction. *FEBS Lett* 462, 283–288.
- Leonhardt, S.A., Fearson, K., Danese, P.N., and Mason, T.L. (1993). HSP78 encodes a yeast mitochondrial heat shock protein in the Clp family of ATP-dependent proteases. *Mol Cell Biol* 13, 6304–6313.
- Liu, Z., and Butow, R.A. (2006). Mitochondrial retrograde signaling. *Annu Rev Genet* 40, 159–185.
- McAlister, L., and Holland, M.J. (1985). Differential expression of the three yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. *J Biol Chem* 260, 15019–15027.
- McBride, H.M., Neuspiel, M., and Wasiak, S. (2006). Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr Biol* 16, R551–R560.
- Meisinger, C., Sommer, T., and Pfanner, N. (2000). Purification of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria devoid of microsomal and cytosolic contaminations. *Anal Biochem* 287, 339–342.
- Miyagi, H., Kawai, S., and Murata, K. (2009). Two sources of mitochondrial NADPH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 284, 7553–7560.
- Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417, 1–13.
- Nagarajan, L., and Storms, R.K. (1997). Molecular characterization of GCV3, the *Saccharomyces cerevisiae* gene coding for the glycine cleavage system hydrogen carrier protein. *J Biol Chem* 272, 4444–4450.
- Ni, L., Bruce, C., Hart, C., Leigh-Bell, J., Gelperin, D., Umansky, L., et al. (2009). Dynamic and complex transcription factor binding during an inducible response in yeast. *Genes Dev* 23, 1351–1363.
- Norbeck, J., and Blomberg, A. (1998). Amino acid uptake is strongly affected during exponential growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 0.7 M NaCl medium. *FEMS Microbiol Lett* 158, 121–126.
- Nowikovskiy, K., Schweyen, R.J., and Bernardi, P. (2009). Pathophysiology of mitochondrial volume homeostasis: potassium transport and permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1787, 345–350.
- Pandey, G., Yoshikawa, K., Hirasawa, T., Nagahisa, K., Katakura, Y., Furusawa, C., et al. (2007). Extracting the hidden features in saline osmotic tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* from DNA microarray data using the self-organizing map: biosynthesis of amino acids. *Appl Microbiol Biotechnol* 75, 415–426.
- Pascual-Ahuir, A., Serrano, R., and Proft, M. (2001). The Sko1p repressor and Gcn4p activator antagonistically modulate stress-regulated transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 21, 16–25.
- 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.
- Pedrajas, J.R., Miranda-Vizuete, A., Javanmardy, N., Gustafsson, J.A., and Spyrou, G. (2000). Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity. *J Biol Chem* 275, 16296–16301.
- Perrone, G.G., Tan, S.X., and Dawes, I.W. (2008). Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1783, 1354–1368.
- Pizzo, P., and Pozzan, T. (2007). Mitochondria-endoplasmic reticulum choreography: structure and signaling dynamics. *Trends Cell Biol* 17, 511–517.
- Posas, F., Chambers, J.R., Heyman, J.A., Hoefler, J.P., De Nadal, E., and Arino, J. (2000). The transcriptional response of yeast to saline stress. *J Biol Chem* 275, 17249–17255.
- Reinders, J., Zahedi, R.P., Pfanner, N., Meisinger, C., and Sickmann, A. (2006). Toward the complete yeast mitochondrial proteome: multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics. *J Proteome Res* 5, 1543–1554.
- Reinders, J., Wagner, K., Zahedi, R.P., Stojanovski, D., Eyrich, B., van der Laan, M., et al. (2007). Profiling phosphoproteins of yeast mitochondria reveals a role of phosphorylation in assembly of the ATP synthase. *Mol Cell Proteomics* 6, 1896–1906.
- 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.
- Schmitt, M., Neupert, W., and Langer, T. (1995). Hsp78, a Clp homologue within mitochondria, can substitute for chaperone functions of mt-hsp70. *EMBO J* 14, 3434–3444.
- Schuller, H.J. (2003). Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 43, 139–160.
- Sedensky, M.M., and Morgan, P.G. (2006). Mitochondrial respiration and reactive oxygen species in mitochondrial aging mutants. *Exp Gerontol* 41, 237–245.
- Steinman, H.M. (1980). The amino acid sequence of copper-zinc superoxide dismutase from bakers' yeast. *J Biol Chem* 255, 6758–6765.
- Thorpe, G.W., Fong, C.S., Alic, N., Higgins, V.J., and Dawes, I.W. (2004). Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: oxidative-stress-response genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 6564–6569.
- Tran, U.C., and Clarke, C.F. (2007). Endogenous synthesis of coenzyme Q in eukaryotes. *Mitochondrion* 7(Suppl), S62–S71.
- Walther, T.C., Brickner, J.H., Aguilar, P.S., Bernales, S., Pantoja, C., and Walter, P. (2006). Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature* 439, 998–1003.
- Winzeler, E.A., Shoemaker, D.D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., et al. (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* 285, 901–906.
- Zahedi, R.P., Sickmann, A., Boehm, A.M., Winkler, C., Zufall, N., Schonfisch, B., et al. (2006). Proteomic analysis of the yeast mitochondrial outer membrane reveals accumulation of a subclass of preproteins. *Mol Biol Cell* 17, 1436–1450.

Address correspondence to:

Dr. Markus Proft

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas
 Universidad Politécnica de Valencia (UPV)
 Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)
 Ciudad Politécnica de la Innovación
 Ingeniero Fausto Elio s/n, 46022 Valencia, Spain

E-mail: mproft@ibmcp.upv.es

Mitochondrial Function Is an Inducible Determinant of Osmotic Stress Adaptation in Yeast*

Received for publication, July 30, 2009 Published, JBC Papers in Press, August 31, 2009, DOI 10.1074/jbc.M109.050682

Mar Martínez Pastor, Markus Proft¹, and Amparo Pascual-Ahuir

From the Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universidad Politécnica de Valencia-CSIC, 46022 Valencia, Spain

Hyperosmotic stress triggers a great variety of adaptive responses in eukaryotic cells that affect many different physiological functions. Here we investigate the role of the mitochondria during osmotic stress adaptation in budding yeast. Mitochondrial function is generally required for proper salt and osmotic stress adaptation because mutants with defects in many different mitochondrial components show hypersensitivity to increased NaCl and KCl concentrations. Mitochondrial protein abundance rapidly increases upon osmotic shock in a selective manner, because it affects Calvin cycle enzymes (Sdh2 and Cit1) and components of the electron transport chain (Cox6) but not the ATP synthase complex (Atp5). Transcription of the *SDH2*, *CIT1*, and *COX6* genes is severalfold induced within the first minutes of osmotic shock, dependent to various degree on the Hog1 and Snf1 protein kinases. Mitochondrial succinate dehydrogenase enzyme activity is stimulated upon osmotic stress in a Snf1-dependent manner. The osmosensitivity of mitochondrial mutants is not caused by impaired stress-activated transcription or by a general depletion of the cellular ATP pool during osmotic stress. We finally show that the growth defect of mitochondrial mutants in high salt medium can be partially rescued by supplementation of glutathione. Additionally, mitochondrial defects cause the hyperaccumulation of reactive oxygen species during salt stress. Our results indicate that the antioxidant function of the mitochondria might play an important role in adaptation to hyperosmotic stress.

All living cells dynamically respond to environmental stress to adapt and survive. A fundamental challenge for the cell is a change in the osmolarity of the surrounding medium. Hyperosmotic and salt stress cause the rapid loss of water from the cell, and the resulting intracellular ion imbalances interfere with many vital functions. The hyperosmotic stress response has been intensively studied in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* (1). A complex picture is emerging from these studies where many diverse physiological functions of the cell have to be coordinately modulated to efficiently adapt to the stress. The major signal transduction pathway in yeast that is specifically activated upon hyperosmotic stress is the high

osmolarity glycerol MAPK² pathway with its terminal MAPK Hog1 (2, 3). The adaptive responses orchestrated by the high osmolarity glycerol pathway in response to osmotic stress are complex and involve the direct regulation of plasma membrane cation transporters (4), the modulation of translation efficiency (5, 6), the controlled cell cycle arrest during stress (7–9), the transcriptional activation of more than 150 genes in the nucleus (10, 11), and the production of osmolytes as a long term adaptation (12). Our work identifies the mitochondrial function as an important physiological determinant of the efficient adaptive response to osmotic stress.

Mitochondria are the main ATP-generating organelles in eukaryotic cells. In addition to their function as the cell power supply via oxidative phosphorylation, mitochondria play fundamental roles in secondary metabolism, Ca²⁺ signaling, homeostasis of redox equivalents, and apoptosis. Recent research has characterized the mitochondria as a much more dynamic organelle than anticipated, because they continuously and dynamically change their metabolic activity, biomass, and morphology (13, 14). In *S. cerevisiae*, the mitochondrial function is regulated over a large range, being repressed as long as sufficient ATP can be produced by the fermentation of sugars, and activated in the presence of nonfermentable carbon sources. This phenomenon is known as glucose repression and affects the nuclear and mitochondrial transcription of many components of the mitochondrial oxidative phosphorylation machinery (15–18). The central activator of respiratory metabolism is the evolutionarily conserved Snf1 protein kinase, which is essential for the metabolic adaptation upon glucose starvation (19, 20). Snf1 is necessary to activate the transcription of a large set of genes in response to nutrient limitation, which include many mitochondrial functions (21). Activation of glucose-repressed genes encoding respiratory functions is globally controlled by the Hap2,3,4,5 transcriptional activator complex (22–24). Additionally, Snf1 affects the tolerance to salt stress and is necessary for the salt-induced transcription of the *ENA1* gene (25); however, the reason why *snf1* mutants fail to adapt to salt stress remains elusive (26).

Apart from their up-regulation during the switch from fermentation to respiration, signal transduction pathways exist to monitor mitochondrial function and to trigger compensatory adaptation upon mitochondrial dysfunction. This is the so-called retrograde signaling pathway, which transmits signals

* This work was supported by Ministerio de Educación y Ciencia Grant BFU2005-0174, Ministerio de Ciencia e Innovación Grant BFU2008-00271, and Generalitat de Valencia Grant ACOMP07-198.

¹ To whom correspondence should be addressed: Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Ingeniero Fausto Elio s/n, 46022 Valencia, Spain. Tel.: 34-96-3879932; Fax: 34-96-3877859; E-mail: mproft@ibmcp.upv.es.

² The abbreviations used are: MAPK, mitogen-activated protein kinase; ROS, reactive oxygen species; GFP, green fluorescent protein; SDH, succinate dehydrogenase; HPLC, high pressure liquid chromatography; TAP, tandem affinity purification.

Mitochondrial Function in Osmostress Adaptation

from mitochondria to the nucleus to effect changes in nuclear gene expression to accommodate cells to defects in mitochondria (27). The key transcriptional activators of the retrograde pathway are the Rtg1 and Rtg3 proteins (28, 29). Specifically, the Hap and Rtg regulators can activate the same target genes, for example the first enzymes of the citric acid cycle, in response to diauxic shift or compromised mitochondrial function, respectively (30).

Mitochondria are considered to be the major source of reactive oxygen species (ROS) in eukaryotic cells because of leakage of electrons from their electron transport chains (31, 32). Mutants in mitochondrial functions have been shown to result in altered production of ROS in a number of eukaryotic organisms including yeast (33). Moreover, ROS production is intimately linked to aging and apoptosis (32, 34). Mitochondria are both the source and the site for the detoxification of reactive oxygen species in yeast. The importance of the antioxidant function of the mitochondria is reflected by the fact that the majority of mitochondrial mutants in yeast are hypersensitive to hydrogen peroxide (35, 36). The implication of the mitochondria in ROS production has been mainly derived by *in vitro* studies or by the use of artificial uncouplers or mutants in mitochondrial functions. However, it is crucial to understand how mitochondrial metabolism is regulated under physiological conditions upon environmental challenges that cause oxidative stress. In the present work we show that the up-regulation of the mitochondria is an essential and novel feature of the adaptation to hyperosmotic stress, which involves the reduction of the levels of reactive oxygen species.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Yeast Strains and Plasmids—*S. cerevisiae* strains used in this study were: wild type BY4741 (*MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0*) and the mutant alleles *aco1::KanMX4*, *atp5::KanMX4*, *atp7::KanMX4*, *cox6::KanMX4*, *rpo41::KanMX4*, *abf2::KanMX4*, *fzo1::KanMX4*, *snf1::KanMX4*, *hog1::KanMX4*, *rtg1::KanMX4*, *rtg3::KanMX4*, *hap2::KanMX4*, *hap3::KanMX4*, *sdh1::KanMX4* (37). All of the mutants were rho⁺ as determined by the isolation of mitochondrial DNA as described in Ref. 38. Yeast strains expressing chromosomally tagged GFP fusion proteins were: BY4741 (*MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0*) with *SDH2-GFP(S65T)-His3MX*, *COX6-GFP(S65T)-His3MX*, *CIT1-GFP(S65T)-His3MX*, *ATP5-GFP(S65T)-His3MX*, *IDP1-GFP(S65T)-His3MX* (39). Yeast strains expressing chromosomally tagged TAP fusion proteins were: BY4741 (*MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0*) with *SDH1-TAP-His3MX*, *SDH2-TAP-His3MX*, or *ATP5-TAP-His3MX* (40). Yeast cultures were grown in yeast extract-peptone containing 2% dextrose (YPD) with or without the indicated supplementation of NaCl, KCl, or glutathione. For continuous growth experiments, yeast strains were grown in microtiter plates in a Bioscreen C system (Thermo). For osmotic stress-inducible β-galactosidase expression, we used plasmid pMP224 (*CYC1prom-(2xCRE_{ENA1})-lacZ; 2μ; URA3*). It contains a tandem insertion of the binding site for the transcription factor Sko1 (CRE) into the *CYC1* core promoter fused to *lacZ*, conferring very low expression levels under normal growth conditions and high inducibility upon hyperosmotic stress (41).

Screening for Osmosensitive Yeast Strains—Our original screen aimed at identifying novel proteins involved in transport processes necessary for the adaptation to hyperosmotic stress. We focused at the subset of the haploid yeast deletion strain collection with an annotated function in transport. All of the strains were individually spotted in serial dilutions onto YPD plates containing 1 M NaCl or 1.5 M KCl. Growth was scored and compared with the BY4741 wild type parent. We identified nine mutant strains with significantly reduced growth at high osmolarity media. The genes involved encoded either mitochondrial Fe²⁺ or Cu²⁺ transporters/chaperones (*SCO1*, *MRS4*, *ISA1*, *ISA2*, and *COX19*) or Fe²⁺ transporters of the plasma membrane and their transcriptional activator (*FET3*, *FTR1*, and *RCSI*). Additionally, a mutant in the Ca²⁺/Mn²⁺ ATPase Pmr1 was identified as hypersensitive to osmotic stress.

Western Blot—Total protein extracts were produced by glass bead lysis of yeast cells in buffer A (50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 15 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 2 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) with a Mini Beadbeater (Biospec Products). An equal total amount of protein was separated on 8% SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting using anti-GFP antibody (Roche Applied Science) or anti-peroxidase-anti-peroxidase (anti-PAP) antibody (Sigma). The bands were visualized with ECL Plus (Amersham Biosciences).

Northern Blot—Total RNA was isolated by acid phenol extraction from YPD-grown yeast cells that were either untreated or subjected to the indicated osmotic stress conditions. Approximately 30 μg of RNA/lane were separated in formaldehyde gels and blotted onto nylon membranes (Hybond N; Amersham Biosciences). Radioactively labeled probes were hybridized in PSE buffer (300 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 7.2, 7% SDS, 1 mM EDTA) at 65 °C. The probes used were PCR fragments spanning nucleotides 66–740 of *SDH2*, 56–443 of *COX6*, 96–1380 of *CIT1*, and 519–1182 of *ACT1*. Signal intensities were quantified using a Fujifilm BAS-1500 phosphorimaging device.

Succinate Dehydrogenase (SDH) Assay—Mitochondria enriched extracts were prepared in TSB buffer (10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 0.6 M sorbitol) according to Ref. 42. SDH assays were performed with *p*-iodonitrotetrazolium violet as an artificial electron acceptor for the SDH complex. Extracts were incubated in 300 μl of succinate buffer (10 mM succinic acid hexahydrate in 50 mM phosphate buffer, pH 7.4) with 100 μl of *p*-iodonitrotetrazolium violet solution (2.5 mg of *p*-iodonitrotetrazolium violet in 50 mM phosphate buffer, pH 7.4). The reactions were stopped with 1 ml of Stop solution (10 g of trichloroacetic acid in 100 ml of ethyl acetate/ethanol (1:1 v/v)), and the absorbance was measured in the supernatant at 490 nm.

β-Galactosidase Assay—Transformed yeast strains were grown selectively until saturation in synthetic dextrose-uracil medium and were then diluted in YPD. Logarithmically growing cells were treated or not with the indicated salts and permeabilized by ethanol/toluene treatment, and β-galactosidase activity was determined as described in Ref. 43.

Quantification of AMP/ATP Pools—7.5 ml of YPD grown yeast culture (OD₆₆₀ of 0.6) was rapidly quenched in 30 ml of 60% methanol-water solution at –20 °C. After centrifugation the pellet was extracted twice by the addition of 1 ml of 100%

methanol. The collected supernatant was vacuum-dried, and the samples were kept at -20°C for HPLC analysis. Just before analysis the samples were resuspended in $100\ \mu\text{l}$ of water, filtered through Millipore HV filters ($0.45\ \mu\text{m}$), and injected onto a reversed phase C18 column (LiChrosphere 100, $4 \times 250\ \text{mm}$, $5\text{-}\mu\text{m}$ particle size; Merck), eluted, and detected as described (44). Detection of nucleotides was performed by HPLC (Waters 600E) coupled to a photo diode array (PDA996). ATP and AMP peaks were identified by co-injection with standards.

ROS Measurements—The yeast cells were grown in YPD to $0.5\text{--}0.8 \times 10^7$ cells/ml. Culture aliquots were incubated for 30 min with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (Sigma) at a final concentration of $10\ \mu\text{M}$. The cells were washed with water and resuspended in 1 ml of 50 mM Tris/HCl, pH 7.5. After the addition of $10\ \mu\text{l}$ of chloroform and $5\ \mu\text{l}$ of 0.1% SDS, the cells were extracted by rigorous agitation (Mini Beadbeater). Fluorescence was quantified in the supernatant in a Tecan Genios microplate reader at 492-nm excitation and 525-nm emission wavelengths. For microscopic visualization of ROS production, the cells were incubated with dihydroethidium (Sigma) at a final concentration of $20\ \mu\text{M}$. The cells were visualized at 518-nm excitation and 605-nm emission wavelengths with a Nikon Eclipse E600 fluorescence microscope.

RESULTS

Defects in Many Mitochondrial Functions Cause Sensitivity to Hyperosmotic Stress—In an attempt to characterize new determinants involved in the tolerance to osmotic stress, we screened a subset of the yeast deletion mutant collection for strains, which showed hypersensitivity to elevated concentrations of NaCl or KCl (see “Experimental Procedures” for details). Because we found a strong bias toward mutants affecting mitochondrial and cytoplasmic Fe^{2+} and Cu^{2+} transport (“Experimental Procedures”), we wanted to know whether defects in mitochondrial function generally cause osmosensitivity. Therefore we individually tested selected strains with nuclear mutations in mitochondrial functions for their growth under high Na^+ or K^+ conditions. As shown in Fig. 1A, deletion mutants in citric acid cycle enzymes (*ACO1* encoding aconitase), ATP synthase subunits (*ATP5*, γ), enzymes of the mitochondrial electron transport chain (*COX6* encoding cytochrome *c* oxidase subunit 6), the mitochondrial RNA polymerase (*RPO41*), or factors involved in mitochondrial DNA replication (*ABF2*) showed a clear hypersensitivity to osmotic stress. All of the mutants were severely affected by high Na^+ concentrations and to a minor extent by high K^+ concentrations. We next addressed the question whether mitochondrial biogenesis was needed for the efficient adaptation to osmotic stress. We tested a yeast *fzo1* mutant strain, which has impaired mitochondrial fusion activity because of the lack of the mitofusin function (45, 46). We found that the loss of *Fzo1* function causes a severe sensitivity to both Na^+ and K^+ stress (Fig. 1B). The observed sensitivities are comparable with the osmotic stress phenotype caused by the loss of the *Snf1* kinase (Fig. 1C), the key activator of respiratory metabolism in the absence of fermentable carbon sources.

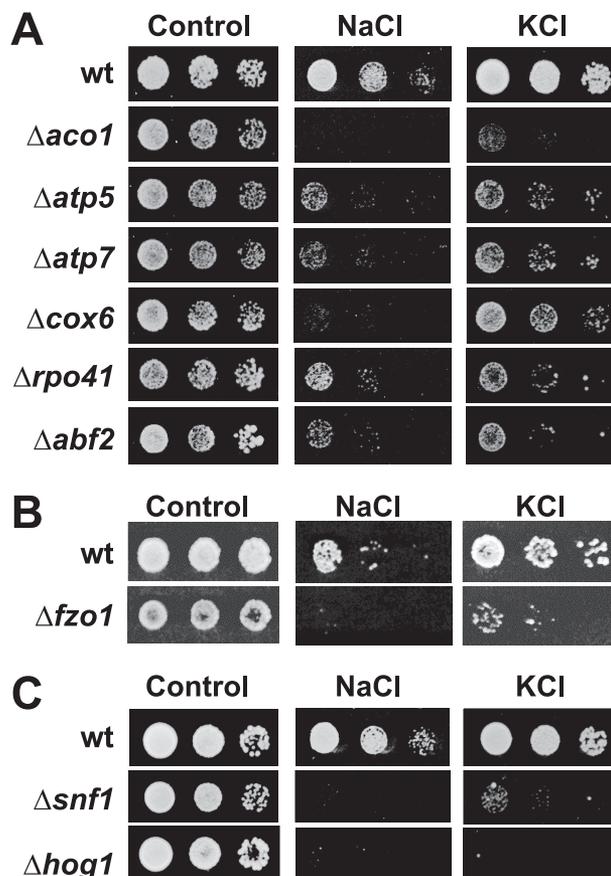


FIGURE 1. Mutations in many mitochondrial functions lead to osmotic and salt stress sensitivity. Isogenic yeast strains BY4741 (wild type, wt) and deletion mutants *aco1* Δ , *atp5* Δ , *atp7* Δ , *cox6* Δ , *rpo41* Δ , *abf2* Δ (A); *fzo1* Δ (B); and *snf1* Δ and *hog1* Δ (C) were spotted onto YPD plates (control) and YPD plates containing 1 M NaCl or 1 M KCl.

Osmotic Stress Causes the Selective Up-regulation of Mitochondrial Proteins—We next addressed the question of whether adaptation to osmotic stress involved the activation of the mitochondria. We tested by Western blot whether the protein abundance of several GFP-tagged mitochondrial proteins was affected by treatment of the cells with 0.4 M NaCl. As depicted in Fig. 2A, the protein levels of mitochondrial succinate dehydrogenase subunit 2 (Sdh2), cytochrome *c* oxidase subunit 6 (Cox6), and mitochondrial citrate synthase (Cit1) were rapidly stimulated upon NaCl shock. Two other mitochondrial components, subunit 5 of the ATP synthase complex (Atp5) and isocitrate dehydrogenase (Idp1), did not show changes along the same stress treatment (Fig. 2A). In contrast, the amount of all five mitochondrial proteins was stimulated when the cells were shifted from fermentative (glucose) to respiratory (ethanol) growth (Fig. 2B). To visualize protein changes in the early phase of osmotic induction, we employed yeast strains expressing TAP-tagged Sdh1, Sdh2, or Atp5. The more sensitive immunological detection of the TAP fusion proteins revealed that an increase of succinate dehydrogenase can be observed already at 30 min of osmotic treatment (Fig. 2C). Taken together, our data suggested that NaCl stress caused a partial and selective up-regulation of mitochondrial proteins, which occurs rapidly after the osmotic insult.

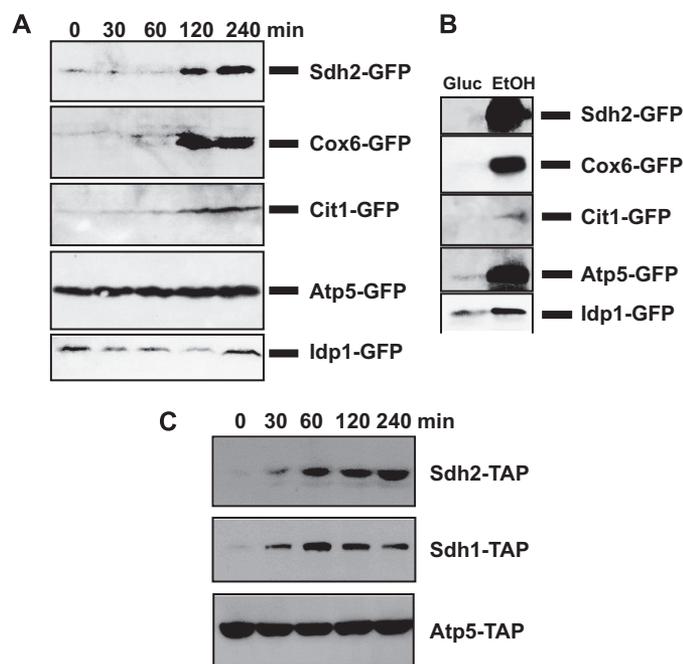


FIGURE 2. The abundance of the mitochondrial proteins Sdh1, Sdh2, Cox6, and Cit1 is stimulated upon salt stress. *A*, yeast strains expressing the indicated C-terminal GFP fusion proteins under control of their endogenous promoter were treated with 0.4 M NaCl for the indicated times in YPD medium. Immunoblot analysis was performed on equal amounts of total protein extract using anti-GFP antibody. *B*, the same yeast strains were grown in YPD (2% dextrose) or YPEtOH (3% ethanol) to mid-log phase, and immunodetection was performed as described above. *C*, yeast strains expressing the indicated C-terminal TAP fusion proteins under control of their natural promoter were treated as in *A*. TAP fusion proteins were detected using anti-peroxidase-anti-peroxidase (anti-PAP) antibody.

Transcriptional Control of SDH2, CIT1, and COX6 upon NaCl Stress—We next tested whether the induction of the mitochondrial Sdh2, Cox6, and Cit1 proteins was the consequence of the transcriptional activation of the corresponding nuclear genes. We quantified the expression levels of all three genes by Northern blot before and during the brief exposure to NaCl stress. We found that *SDH2*, *COX6*, and *CIT1* were rapidly and transiently activated by 0.4 M NaCl treatment in wild type cells (Fig. 3). The expression levels increased 5–12-fold in the first 10 min of the osmoshock. We next assayed for the participation of several signaling kinases and specific transcription factors in this transcriptional activation. Deletion of the Hog1 MAPK or the Snf1 kinase completely abolished the stress-activated transcription of *COX6* and partially diminished the induction of *SDH2* and *CIT1* (Fig. 3). The transcriptional activator complexes Rtg1/3 and Hap2/3/4/5 are known to stimulate transcription of genes encoding mitochondrial functions upon dysfunction of the organelle or glucose limitation, respectively. We tested whether *rtg1,3* or *hap2,3* mutants displayed an altered transcriptional response of *SDH2*, *CIT1*, and *COX6* upon NaCl stress. As shown in Fig. 3, mutations in the Hap2/3/4 complex resulted in a complete loss of *COX6* induction, whereas *CIT1* and *SDH2* expression upon salt shock was only very slightly reduced. The loss of Rtg1/3 function mainly affected the NaCl induced expression of *CIT1*, which was >2-fold reduced and much more transient as compared with wild type. *SDH2* or *COX6* transcription upon salt shock appeared to be largely independent on Rtg1/3. Taken together,

we show that a rapid transcriptional activation of mitochondrial functions occurs in response to hyperosmotic shock and that increased expression depends on multiple signaling kinases (Snf1 and Hog1) and specific transcriptional activators (Hap2/3/4 and Rtg1/3).

Regulation of Mitochondrial SDH Activity in Response to Salt Stress—Having seen that components of the citric acid cycle and the mitochondrial respiratory chain are immediately up-regulated at the transcriptional level, we aimed at quantifying mitochondrial enzyme activity in response to osmotic stress. We measured succinate dehydrogenase activity in yeast wild type cells before and after osmoshock. A brief treatment with 0.4 M NaCl caused a 2.5-fold increase in SDH activity in wild type cells (Fig. 4). We compared this induction with several regulatory mutants. The loss of Hog1 MAPK function did not alter the induction of SDH activity. However, in the absence of Snf1, the induction of SDH upon salt shock was completely absent. A significant reduction of SDH stimulation was observed in *rtg1* and *rtg3* mutants, whereas mutants in the Hap2/3/4 complex showed levels of SDH induction comparable with the wild type (Fig. 4).

The Transcriptional Response to Osmostress in Mutants with Mitochondrial Defects—We have characterized the induction of mitochondrial functions as a component of the adaptive response to hyperosmotic stress. We next wanted to identify possible protective functions of the mitochondria that would be necessary to properly adapt to the stress. Because transcriptional activation of many defense genes is one of the major physiological responses of the yeast cell to osmoshock, we addressed the question of whether transcriptional stimulation was impaired by the loss of mitochondrial function. To monitor activated transcription during exposure to osmotic stress in a sensitive manner, we employed a highly osmo-responsive *lacZ* reporter gene (for details see “Experimental Procedures”). Exposure of yeast wild type cells to 1 M KCl leads to a rapid induction of *lacZ* expression, which reaches its maximal level within 60 min (Fig. 5). When we tested various mutants in mitochondrial functions, which cause strong hypersensitivity to osmotic stress (Fig. 1), we observed a slight delay of the induction profile as compared with wild type (Fig. 5, 30-min time point). However, all strains tested were able to reach very similar fully induced expression levels after 60 min of KCl treatment. We performed a second set of expression analysis under more severe conditions using 1 M NaCl. The higher toxicity of Na⁺ as compared with K⁺ ions results in a slower induction profile of the *lacZ* reporter. Maximal induction occurs in wild type cells at 120 min (Fig. 5). Again, the strains with various mitochondrial defects revealed a slight delay in β -galactosidase induction (Fig. 5, 60- and 120-min time points) but were not defective for high expression levels at longer time points. We conclude that mitochondrial function might be necessary for the efficient transcriptional response to osmotic stress. However, a defect in transcriptional activation caused by the lack of mitochondrial function cannot explain the severe growth defect under hyperosmotic stress.

AMP/ATP Ratios in Mutants with Mitochondrial Defects upon Osmotic Shock—We next addressed the question of whether mitochondrial function was essential for the energy or

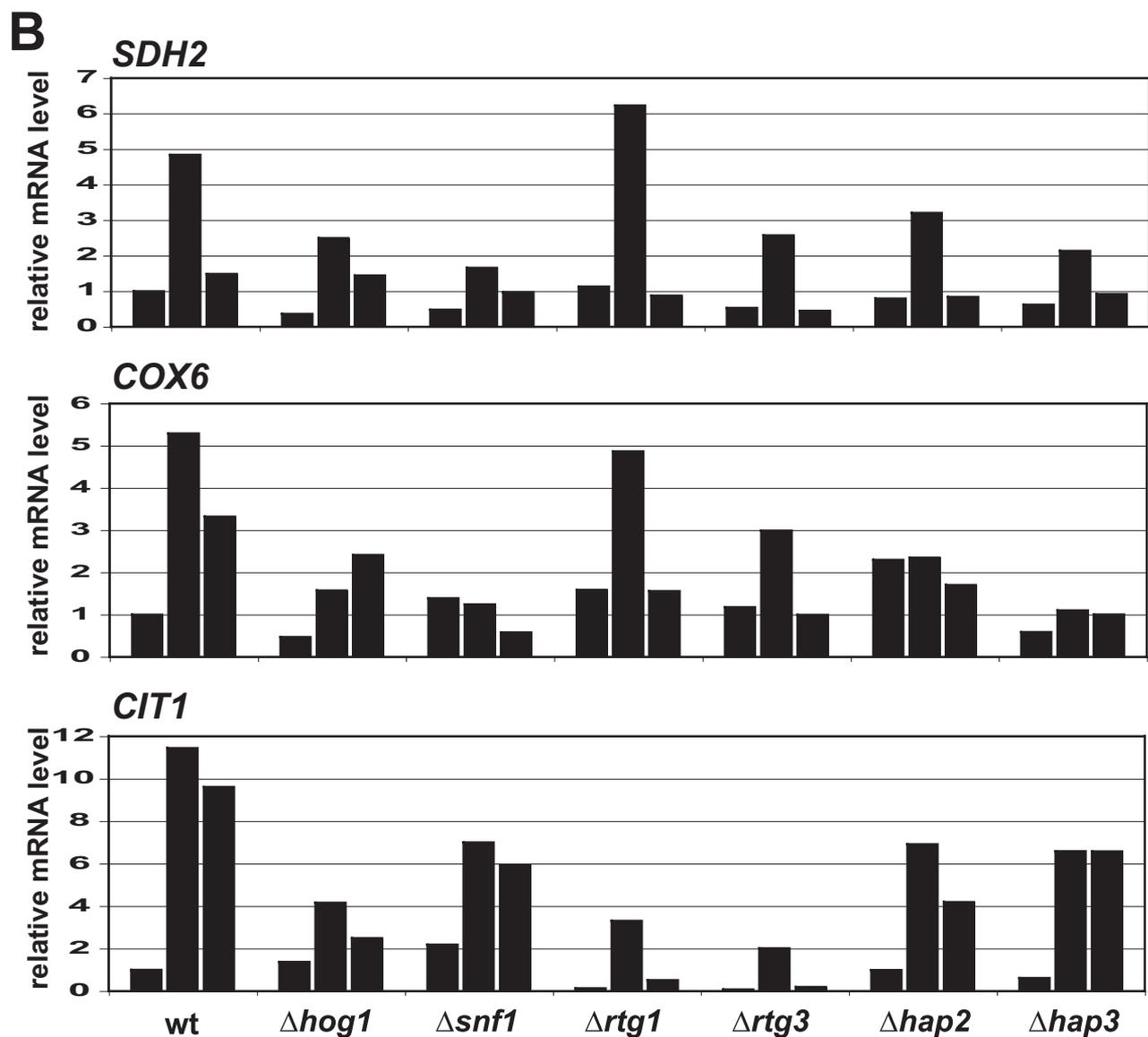
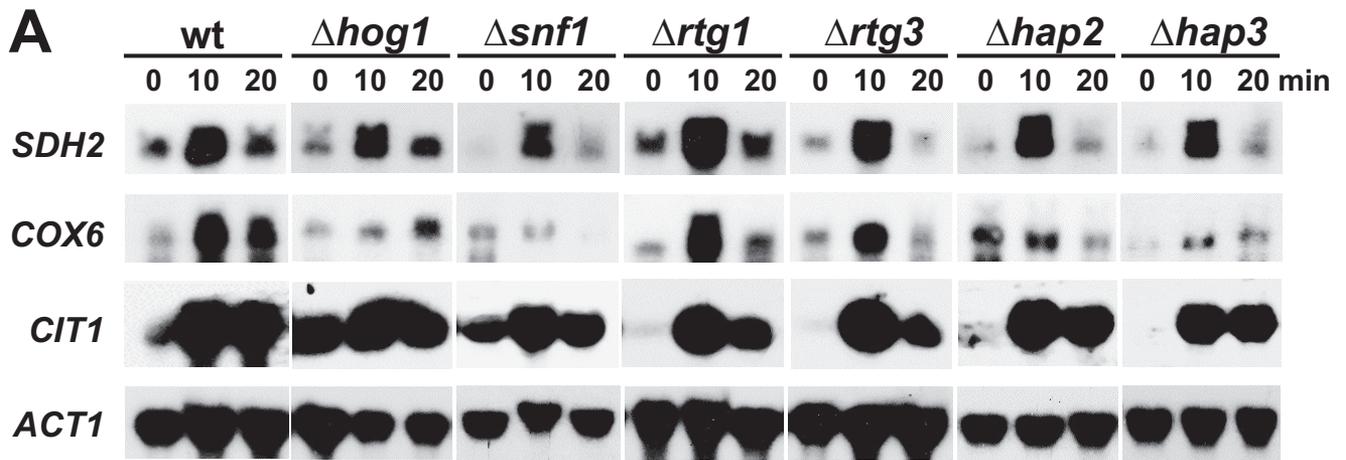


FIGURE 3. **Transcriptional regulation of *SDH2*, *COX6*, and *CIT1* in response to salt stress.** Yeast wild type (BY4741, wt) and the indicated isogenic deletion strains were treated for the indicated times with 0.4 M NaCl. *A*, transcript levels of the indicated genes were monitored by Northern blot. *B*, the mRNA levels were quantified, normalized for the *ACT1* loading control, and depicted in the graphs. The value obtained for the uninduced mRNA level in the wild type was arbitrarily set to 1 for each gene. The results shown come from the same original blot, which was probed with the indicated genes.

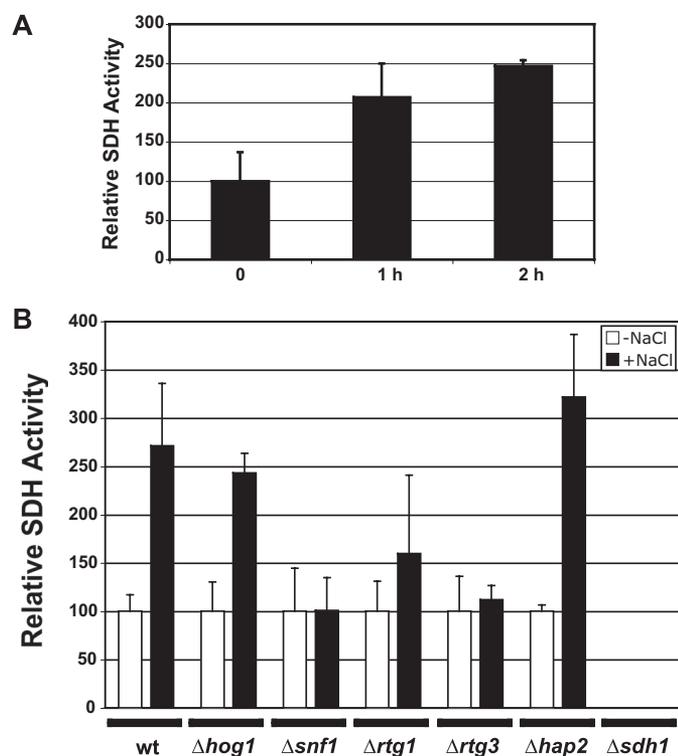


FIGURE 4. **SDH enzyme activity is activated by salt stress.** *A*, yeast wild type (BY4741) cells were grown in YPD (0) or subjected to a salt shock (0.4 M NaCl) for 1 and 2 h. The specific SDH enzyme activity was measured in mitochondria enriched extracts, and basal SDH activity was arbitrarily set to 100 for each strain. SDH activity was measured in duplicate in three independent cultures. *B*, yeast wild type (BY4741, wt) and the indicated deletion strains were grown in YPD (–NaCl) or subjected to a brief salt shock (0.4 M NaCl for 2 h). SDH activity was measured as in *A*.

ATP supply during osmotic stress. We therefore quantified the intracellular ATP and AMP levels by HPLC before and during osmotic stress (1 M NaCl) and compared wild type with mutants in mitochondrial enzymes (*aco1*, *cox6*, and *sdh1*), mitochondrial biogenesis (*fzo1*) and regulation (*snf1*). As shown in Fig. 6, yeast wild type cells are able to maintain low AMP to ATP ratios even under acute osmotic stress caused by 1 M NaCl. No difference was observed for the *aco1* and *cox6* mutant strains. Slightly elevated AMP/ATP ratios were detected in *snf1* and *fzo1* mutants, whereas the *sdh1* deletion strain showed the highest AMP/ATP ratio comparable with wild type cells in stationary growth phase. In none of the cases, however, was a depletion of ATP observed, and the severe osmosensitivity of the mutants in mitochondrial functions was not generally accompanied by increases in the AMP/ATP ratios.

The Growth Defect on Hyperosmotic Media of Mutants Involved in Mitochondrial Functions Is Rescued by Antioxidant Supplementation—One of the growth inhibitory effects of hyperosmotic stress is the formation of ROS. In an attempt to define the role of ROS formation in the protective function of the mitochondria under hyperosmotic growth conditions, we investigated the effect of antioxidant supplementation on the growth kinetics under osmotic stress of mutants with impaired mitochondrial function. As shown in Fig. 7, mutants in mitochondrial metabolism (*aco1*, *sdh1*), biogenesis (*fzo1*), or regulation (*snf1*) showed a marked delay and lower growth efficiency under high salt conditions. Mutants in the mitochon-

drial ATP synthase complex (*atp7*; Fig. 7) showed a more subtle growth defect in this continuous liquid culture assay. The addition of glutathione to the growth medium significantly improved growth of all of the mitochondrial mutants tested, almost exclusively by shortening the lag phase in response to the salt shock.

Defects in Mitochondrial Functions Increase ROS Production upon Osmotic Stress—Our supplementation experiments with antioxidants indicated that ROS detoxification was an important determinant of the adaptation to hyperosmotic stress and that it was deficient in mutants with impaired mitochondrial function. We next measured directly the levels of ROS in different mitochondrial mutant strains compared with wild type cells along the osmotic shock. We first quantified ROS by the fluorescence generated by the oxidation of dichlorodihydrofluorescein to dichlorofluorescein. Salt stress caused by 1 M NaCl resulted in an ~2-fold increase in intracellular ROS levels in wild type cells (Fig. 8A). In *aco1*, *sdh1*, and *fzo1* mutants, which are defective for mitochondrial energy metabolism and biogenesis, respectively, ROS levels were about 2-fold increased under normal growth conditions and 3–5-fold increased under salt stress conditions as compared with wild type (Fig. 8A). Additionally, the regulatory mutant *snf1* showed moderately elevated ROS levels under both normal and salt stress conditions (Fig. 8A). We finally visualized ROS production in living cells by the oxidation of hydroethidine to ethidium by fluorescence microscopy. We confirm that *snf1*, *aco1*, and *fzo1* mutants display an overproduction of ROS upon exposure to salt stress (Fig. 8B).

Growth in Nonfermentable Carbon Sources Prepares Yeast Cells for Salt Stress Adaptation—We have shown that activation of mitochondrial function is an important feature of salt stress adaptation. We reasoned that a preactivation of mitochondria prior to the salt shock could be advantageous to withstand the stress. We therefore compared growth on high salinity plates (1 M NaCl or 1.5 M KCl) of yeast wild type cells that were grown to exponential phase with glucose (repression of mitochondrial metabolism) or galactose, glycerol, or ethanol (partially or fully activating mitochondrial metabolism) as the sole carbon source. As shown in Fig. 9, the preculture in either galactose, glycerol, or ethanol conferred salt stress resistance over the glucose grown yeast cells.

DISCUSSION

Here we investigate the regulation and function of mitochondria in the adaptive response of budding yeast to hyperosmotic stress. We define a positive role for the mitochondria in the osmotic stress adaptation based on the sensitivity phenotype of mutants in diverse mitochondrial functions, the selective up-regulation of mitochondrial proteins, and the stimulated transcription of genes encoding mitochondrial enzymes upon exposure to hyperosmotic conditions. To understand osmotic stress tolerance, mitochondrial metabolism has therefore to be considered as an important physiological parameter that is modulated in a stress-dependent fashion.

Activation of Mitochondrial Functions as a Strategy for Osmotic Stress Adaptation—A broad range of mitochondrial defects leads to sensitivity to hyperosmotic stress. This phe-

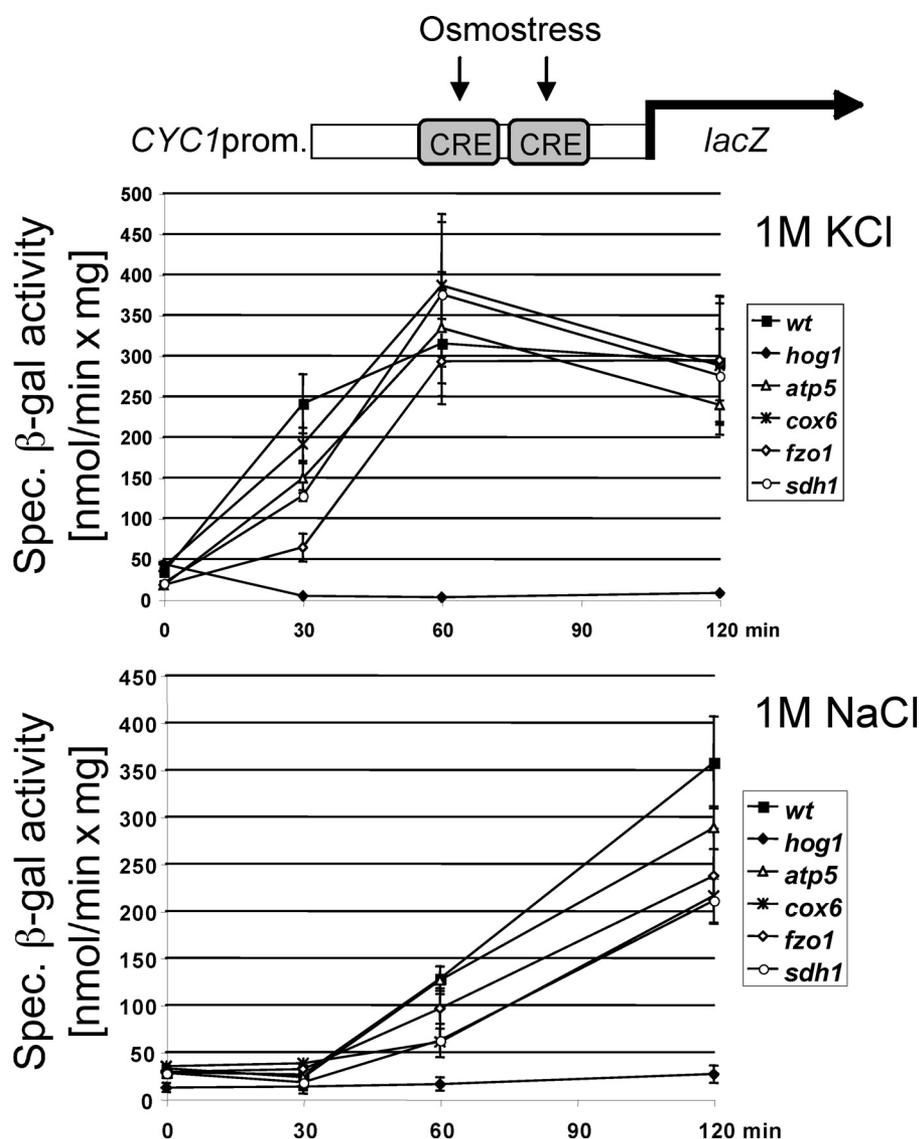


FIGURE 5. The transcriptional response to osmohock is only minimally affected in mitochondrial mutants. A reporter gene (*CYC1*-(2x*CRE*)-*lacZ*; pMP224) was used to monitor transcriptional induction by KCl or NaCl treatment. Yeast wild type (BY4741) and the indicated null mutant strains, transformed with pMP224, were subjected to osmotic stress caused by 1 M KCl or 1 M NaCl, and the specific β -galactosidase activity was determined. The values were obtained by duplicate measurements of three independent transformants.

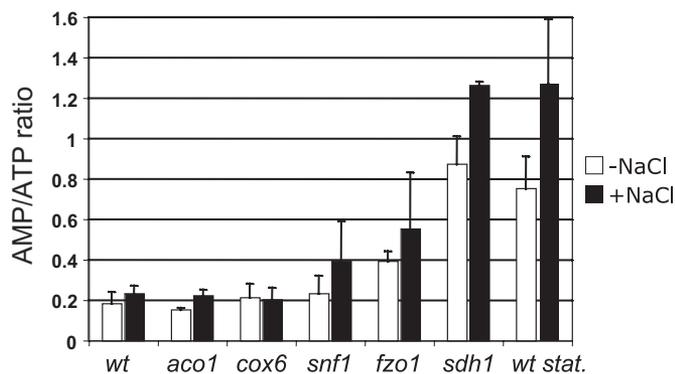


FIGURE 6. AMP/ATP ratios in yeast wild type and mutants with mitochondrial defects. Yeast wild type (BY4741, wt) and the indicated mutant strains were grown in YPD and subjected or not to a brief osmotic shock with 1 M NaCl for 2 h. The cells were immediately quenched, and the extracted nucleotides were analyzed by HPLC. The AMP/ATP ratio was calculated for each strain in triplicate. A stationary wild type yeast culture (wt stat.) was grown for 2 days in YPD medium.

nomenon is not restricted to specific enzymatic activities like citric acid cycle enzymes, proteins involved in the mitochondrial electron transport chain, or ATP synthase subunits (Fig. 1A) but also applies for a defect in mitochondrial biogenesis caused by the deletion of the yeast mitofusin Fzo1 (Fig. 1B). These phenotypes suggest that yeast cells employ an up-regulation of the organelle in general to efficiently cope with hyperosmolarity. This activation has an important transcriptional component because we find genes like *SDH2*, *COX6*, or *CIT1* to be induced by acute osmohock. Transcriptional activation (5–12-fold) occurs rapidly upon mild osmohock (0.4 M NaCl), and its transient kinetics resembles the one typically found for other stress defense genes (10, 11). Thus mitochondrial activation at the level of the expression of nuclear genes is targeted immediately during the adaptation to hyperosmotic insult. However, mitochondrial function has not been identified as a functional category by several transcription profiling experiments performed under the same osmotic stress conditions (10, 11, 47). This might be due to the moderate induction rate observed for osmohock for the mitochondrial markers shown here. Also, the fully induced mitochondrial protein levels observed for nonfermentative growth are significantly higher than for salt induction (Fig. 2, A and B).

This leads to the conclusion that although necessary for the proper adaptation to the stress, the up-regulation of mitochondria upon osmotic stress is weaker as compared with its massive activation during the diauxic shift. This interpretation is confirmed by our unpublished observation that mitochondrial morphology only moderately changes upon acute or chronic salt stress, whereas a much more extensive tubular network is found in cells growing with a nonfermentable carbon source.

Here we have tested the function of two signaling kinases, Hog1 and Snf1, for osmohock-activated transcription of genes encoding mitochondrial functions. Hog1 MAPK is the dominant regulator of the yeast transcriptional osmohock program (2), and Snf1 is the master activator of cellular functions needed for the switch from fermentative to respiratory metabolism (19, 48). Both kinases contribute to the activated transcription of the *SDH2*, *COX6*, and *CIT1* genes upon osmohock (Fig. 3). Specifically, the activated transcription

Mitochondrial Function in Osmostress Adaptation

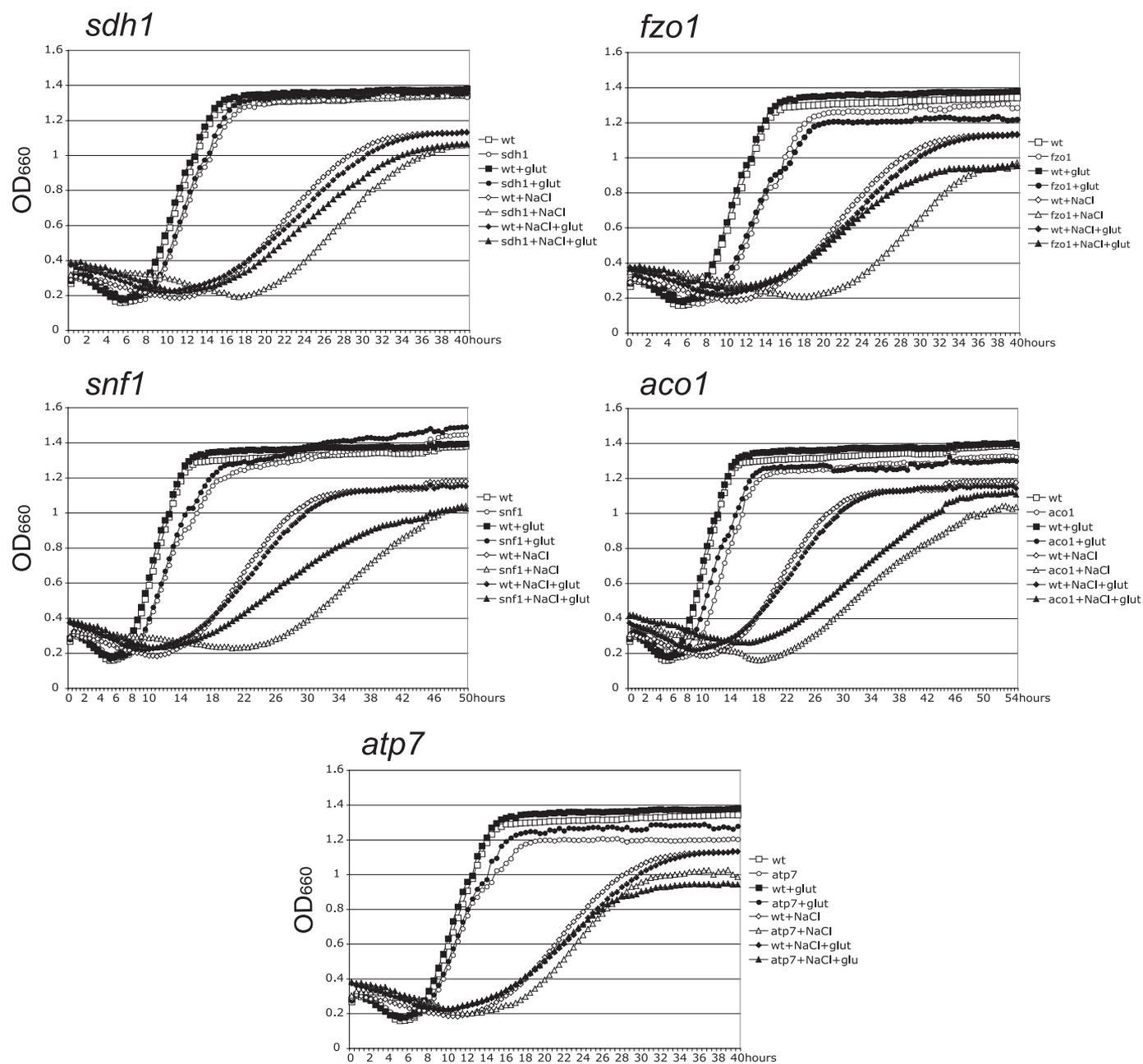


FIGURE 7. Growth in high salinity of mutants with mitochondrial defects is rescued by addition of glutathione. The growth of the indicated wild type (BY4741, wt) and mutant strains was monitored. The cells were grown in YPD, YPD + 5 mM glutathione, YPD + 1 M NaCl, or YPD + 5 mM glutathione + 1 M NaCl. The growth curves are derived from the mean values of three independent cultures for each time point.

of *COX6* was completely absent in *snf1*, *hap2*, and *hap3* mutants. *COX6* is known to be positively regulated by Snf1 and the Hap2,3,4,5 transcriptional activator upon glucose starvation (49, 50), which suggests that similarly upon osmotic stress the Snf1 kinase activates *COX6* expression via the Hap2,3,4,5 transcription factor complex.

The Snf1 Protein Kinase Is a Potential Functional Link between Mitochondrial Up-regulation and Salt Stress Resistance—Here we present evidence for a much broader implication of the Snf1 kinase in the adaptation to salt stress via the activation of mitochondrial metabolism. Deletion of Snf1 results in reduced resistance to elevated Na^+ and K^+ concentrations (Fig. 1), impaired transcriptional control of mitochondrial markers

(Fig. 3), and absent activation of mitochondrial SDH enzyme activity upon salt stress (Fig. 4). The sensitivity of *snf1* mutants to salt stress has been previously reported (25, 51). However, the only functional link between Snf1 activity and the adaptive response to salt stress has been identified with the carbon source-regulated *ENA1* gene (25, 52, 53), which encodes a Na^+ extrusion ATPase of yeast (54). We propose that a major contribution of Snf1 to salt stress adaptation is the activation of mitochondrial function. It has been shown that salt stress indeed rapidly activates the catalytic activity of Snf1 but does not promote its accumulation in the nucleus (55, 56). The role of Snf1 in transcriptional activation upon salt stress might therefore be less pronounced and not reflected by a massive

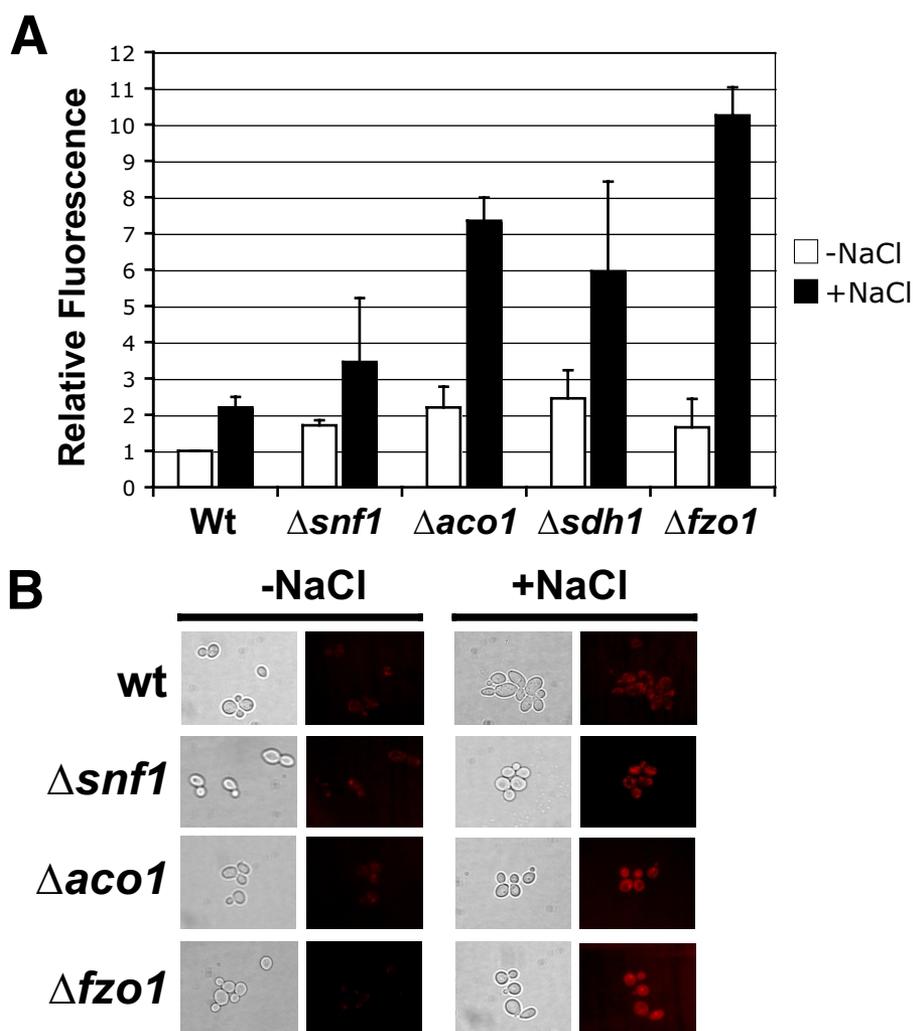


FIGURE 8. Mitochondrial defects and loss of Snf1 function cause hyperaccumulation of ROS upon salt stress. Yeast wild type (BY4741, *Wt*) and isogenic $\Delta snf1$, $\Delta aco1$, $\Delta sdh1$, and $\Delta fzo1$ strains were grown in YPD and subjected or not to a brief osmotic shock with 1 M NaCl for 2 h. *A*, ROS was quantified by the oxidation of dichlorodihydrofluorescein as described under "Experimental Procedures." Fluorescence of the wild type before stress was arbitrarily set to 1. Fluorescence was determined for three independent cultures in duplicate. *B*, ROS was visualized by the oxidation of hydroethidine using fluorescence microscopy as indicated under "Experimental Procedures." *wt*, wild type.

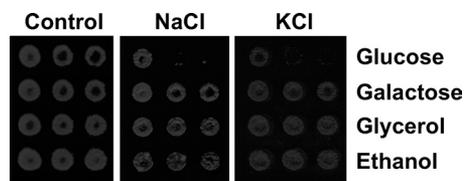


FIGURE 9. Growth with galactose or nonfermentable carbon sources makes yeast cells more resistant to osmotic stress. Wild type (BY4741) cells were pre-grown in YPD (2% glucose), YPGal (2% galactose), YPGlyc (3% glycerol), or YPE (3% ethanol) to mid log growth phase and then spotted onto YPD plates (control) and YPD plates containing 1 M NaCl or 1.5 M KCl.

nuclear accumulation as observed under nutrient starvation (57).

Mitochondria Do Not Serve as ATP Supply under Osmo-stress—We further tested whether a higher ATP demand during the adaptation to salt stress was the reason for the partial up-regulation of the mitochondria. Specifically, the involvement of the Snf1 kinase, which is activated generally by nutrient and energy depletion, prompted us to test this hypothesis. Salt

stress does not appear to increase the cellular AMP/ATP ratio in wild type yeast (Fig. 6). Also *cox6* and *aco1* mutants, which display severe growth defects on high salt media, maintain very low AMP/ATP ratios identical to wild type. Although other defects linked to mitochondrial function or activation, like *sdh1*, *fzo1*, or *snf1* mutants, seem to partially increase the AMP/ATP ratio, these results exclude ATP depletion as the driving force for the observed mitochondrial stimulation upon salt stress. Consistent with this interpretation, it was found that yeast cells actually adapt more quickly to salt stress under anaerobic conditions, *i.e.* in the absence of ATP generation via oxidative phosphorylation (58). Accordingly we find that the efficiency of transcriptional activation upon salt stress, one of the major energy consuming processes instigated by salt stress, is only minimally affected by mitochondrial defects. We additionally found that intracellular accumulation of glycerol, the main osmolyte produced by budding yeast in response to salt shock, is not affected by mitochondrial defects.³

Amino acid starvation is another potential link between salt stress and mitochondrial function. Mitochondrial metabolism is essential for the biosynthesis of the majority of amino acids, and amino acid starvation can be caused by salt stress (59–61). Specifically, the supplementation with an excess of amino acids improves the adaptation of yeast cells to saline stress (60). However, external feeding of amino acids to mitochondria-deficient strains did not rescue the salt-sensitive growth.³

Mitochondrial Function Is Necessary to Keep Low Intracellular ROS Levels upon Salt Stress—Here we present experimental evidence that supports a model in which mitochondrial activation is needed to counteract ROS production upon salt stress. External addition of the antioxidant glutathione generally rescues the growth defect of mitochondrial mutants in the presence of high NaCl concentrations (Fig. 7), and mitochondrial deficiency results in higher intracellular ROS concentrations, especially upon exposure to Na⁺ shock (Fig. 8). Although it is well documented that saline and osmotic stress cause increases in toxic ROS production (62) and transcriptional activation of

³ M. Martínez Pastor, M. Proft, and A. Pascual-Ahuir, unpublished results.

oxidative stress defense genes (10, 11, 63, 64), it is not known how ROS is formed under those conditions. Electron leakage from the mitochondrial electron transport chain upon salt challenge is one candidate but most probably not the only explanation (34). Mitochondrial dysfunction can result in both an increase and a decrease in ROS production (reviewed in Ref. 33). In *S. cerevisiae*, mitochondrial function is generally required for oxidative stress resistance (36), and a very recent report shows that in *Schizosaccharomyces pombe* mitochondrial dysfunction causes intrinsic oxidative stress (65). On the other hand, although mitochondrial respiration is the major source of ROS under physiological conditions (66, 67), a controlled stimulation of the mitochondrial respiratory capacity by calorie restriction or mild uncouplers has been found to promote decreases in ROS and increases in life span both in yeast and in human fibroblasts (68, 69). Thus it seems likely that in *S. cerevisiae* signaling pathways that operate upon salt stress (high osmolarity glycerol and glucose repression pathways) stimulate mitochondrial function. The enhanced respiratory capacity is needed to more efficiently eliminate ROS after the exposure to saline stress. This is of special relevance in *S. cerevisiae* where mitochondrial biogenesis and metabolism are generally repressed by fermentative carbon sources.

Acknowledgments—We thank José María Bellés and María Pilar López Gresa for help with the HPLC measurements of ATP/AMP pools.

REFERENCES

- Hohmann, S. (2002) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 300–372
- de Nadal, E., Alepuz, P. M., and Posas, F. (2002) *EMBO Rep.* **3**, 735–740
- O'Rourke, S. M., Herskowitz, I., and O'Shea, E. K. (2002) *Trends Genet.* **18**, 405–412
- Proft, M., and Struhl, K. (2004) *Cell* **118**, 351–361
- Bilsland-Marchesan, E., Ariño, J., Saito, H., Sunnerhagen, P., and Posas, F. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20**, 3887–3895
- Teige, M., Scheikl, E., Reiser, V., Ruis, H., and Ammerer, G. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 5625–5630
- Clotet, J., Escoté, X., Adrover, M. A., Yaakov, G., Garí, E., Aldea, M., de Nadal, E., and Posas, F. (2006) *EMBO J.* **25**, 2338–2346
- Clotet, J., and Posas, F. (2007) *Methods Enzymol.* **428**, 63–76
- Escoté, X., Zapater, M., Clotet, J., and Posas, F. (2004) *Nat. Cell Biol.* **6**, 997–1002
- Posas, F., Chambers, J. R., Heyman, J. A., Hoeffler, J. P., de Nadal, E., and Ariño, J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 17249–17255
- Rep, M., Krantz, M., Thevelein, J. M., and Hohmann, S. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 8290–8300
- Hohmann, S. (2002) *Int. Rev. Cytol.* **215**, 149–187
- Chan, D. C. (2006) *Cell* **125**, 1241–1252
- Detmer, S. A., and Chan, D. C. (2007) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 870–879
- Carlson, M. (1999) *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 202–207
- Dieckmann, C. L., and Staples, R. R. (1994) *Int. Rev. Cytol.* **152**, 145–181
- Mueller, D. M., and Getz, G. S. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 11756–11764
- Ulery, T. L., Jang, S. H., and Jaehning, J. A. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1160–1170
- Hardie, D. G. (2007) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 774–785
- Hardie, D. G., Carling, D., and Carlson, M. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 821–855
- Young, E. T., Dombek, K. M., Tachibana, C., and Ideker, T. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 26146–26158
- Forsburg, S. L., and Guarente, L. (1989) *Genes Dev.* **3**, 1166–1178
- Pinkham, J. L., and Guarente, L. (1985) *Mol. Cell. Biol.* **5**, 3410–3416
- Schüller, H. J. (2003) *Curr. Genet.* **43**, 139–160
- Alepuz, P. M., Cunningham, K. W., and Estruch, F. (1997) *Mol. Microbiol.* **26**, 91–98
- Sanz, P. (2003) *Biochem. Soc Trans* **31**, 178–181
- Liu, Z., and Butow, R. A. (2006) *Annu. Rev. Genet.* **40**, 159–185
- Jia, Y., Rothermel, B., Thornton, J., and Butow, R. A. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**, 1110–1117
- Sekito, T., Thornton, J., and Butow, R. A. (2000) *Mol. Biol. Cell* **11**, 2103–2115
- Liu, Z., and Butow, R. A. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6720–6728
- Ambrosio, G., Zweier, J. L., Duilio, C., Kuppasamy, P., Santoro, G., Elia, P. P., Tritto, I., Cirillo, P., Condorelli, M., and Chiariello, M. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 18532–18541
- Balaban, R. S., Nemoto, S., and Finkel, T. (2005) *Cell* **120**, 483–495
- Sedensky, M. M., and Morgan, P. G. (2006) *Exp. Gerontol.* **41**, 237–245
- Perrone, G. G., Tan, S. X., and Dawes, I. W. (2008) *Biochim. Biophys. Acta* **1783**, 1354–1368
- Grant, C. M., MacIver, F. H., and Dawes, I. W. (1997) *FEBS Lett.* **410**, 219–222
- Thorpe, G. W., Fong, C. S., Alic, N., Higgins, V. J., and Dawes, I. W. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 6564–6569
- Winzler, E. A., Shoemaker, D. D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J. D., Bussey, H., Chu, A. M., Connelly, C., Davis, K., Dietrich, F., Dow, S. W., El Bakkoury, M., Foury, F., Friend, S. H., Gentalen, E., Giaever, G., Hegemann, J. H., Jones, T., Laub, M., Liao, H., Liebundguth, N., Lockhart, D. J., Lucau-Danila, A., Lussier, M., M'Rabet, N., Menard, P., Mittmann, M., Pai, C., Rebischung, C., Revuelta, J. L., Riles, L., Roberts, C. J., Ross-MacDonald, P., Scherens, B., Snyder, M., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R. K., Véronneau, S., Voet, M., Volckaert, G., Ward, T. R., Wysocki, R., Yen, G. S., Yu, K., Zimmermann, K., Philippsen, P., Johnston, M., and Davis, R. W. (1999) *Science* **285**, 901–906
- Defontaine, A., Lecocq, F. M., and Hallet, J. N. (1991) *Nucleic Acids Res.* **19**, 185
- Huh, W. K., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S., and O'Shea, E. K. (2003) *Nature* **425**, 686–691
- Ghaemmaghami, S., Huh, W. K., Bower, K., Howson, R. W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E. K., and Weissman, J. S. (2003) *Nature* **425**, 737–741
- Proft, M., and Serrano, R. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 537–546
- Nakai, T., Yasuhara, T., Fujiki, Y., and Ohashi, A. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 4441–4452
- Gaxiola, R., de Larrinoa, I. F., Villalba, J. M., and Serrano, R. (1992) *EMBO J.* **11**, 3157–3164
- Li, F. M., Lim, C. K., and Peters, T. J. (1989) *J. Chromatogr.* **461**, 353–359
- Hermann, G. J., Thatcher, J. W., Mills, J. P., Hales, K. G., Fuller, M. T., Nunnari, J., and Shaw, J. M. (1998) *J. Cell Biol.* **143**, 359–373
- Rapaport, D., Brunner, M., Neupert, W., and Westermann, B. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 20150–20155
- Yale, J., and Bohnert, H. J. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 15996–16007
- Hedbacker, K., and Carlson, M. (2008) *Front. Biosci.* **13**, 2408–2420
- Trawick, J. D., Wright, R. M., and Poyton, R. O. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 7005–7008
- Wright, R. M., and Poyton, R. O. (1990) *Mol. Cell. Biol.* **10**, 1297–1300
- Ganster, R. W., McCartney, R. R., and Schmidt, M. C. (1998) *Genetics* **150**, 31–42
- Platara, M., Ruiz, A., Serrano, R., Palomino, A., Moreno, F., and Ariño, J. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 36632–36642
- Ye, T., García-Salcedo, R., Ramos, J., and Hohmann, S. (2006) *Eukaryot. Cell* **5**, 1611–1621
- Haro, R., Garcíadeblas, B., and Rodríguez-Navarro, A. (1991) *FEBS Lett.* **291**, 189–191
- Hong, S. P., and Carlson, M. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 16838–16845
- Ye, T., Elbing, K., and Hohmann, S. (2008) *Microbiology* **154**, 2814–2826
- Vincent, O., Townley, R., Kuchin, S., and Carlson, M. (2001) *Genes Dev.* **15**, 1104–1114
- Krantz, M., Nordlander, B., Valadi, H., Johansson, M., Gustafsson, L., and Hohmann, S. (2004) *Eukaryot. Cell* **3**, 1381–1390

59. Norbeck, J., and Blomberg, A. (1998) *FEMS Microbiol. Lett.* **158**, 121–126
60. Pandey, G., Yoshikawa, K., Hirasawa, T., Nagahisa, K., Katakura, Y., Furusawa, C., Shimizu, H., and Shioya, S. (2007) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**, 415–426
61. Pascual-Ahuir, A., Serrano, R., and Proft, M. (2001) *Mol. Cell. Biol.* **21**, 16–25
62. Koziol, S., Zagulski, M., Bilinski, T., and Bartosz, G. (2005) *Free Radic. Res.* **39**, 365–371
63. Rep, M., Proft, M., Remize, F., Tamás, M., Serrano, R., Thevelein, J. M., and Hohmann, S. (2001) *Mol. Microbiol.* **40**, 1067–1083
64. Tsujimoto, Y., Izawa, S., and Inoue, Y. (2000) *J. Bacteriol.* **182**, 5121–5126
65. Zuin, A., Gabrielli, N., Calvo, I. A., García-Santamarina, S., Hoe, K. L., Kim, D. U., Park, H. O., Hayles, J., Ayté, J., and Hidalgo, E. (2008) *PLoS ONE* **3**, e2842
66. Andreyev, A. Y., Kushnareva, Y. E., and Starkov, A. A. (2005) *Biochemistry* **70**, 200–214
67. Cadenas, E., and Davies, K. J. (2000) *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 222–230
68. Barros, M. H., Bandy, B., Tahara, E. B., and Kowaltowski, A. J. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 49883–49888
69. Passos, J. F., Saretzki, G., Ahmed, S., Nelson, G., Richter, T., Peters, H., Wappler, I., Birket, M. J., Harold, G., Schaeuble, K., Birch-Machin, M. A., Kirkwood, T. B., and von Zglinicki, T. (2007) *PLoS Biol* **5**, e110