

INTRODUCCIÓN.....	1
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
1.3) El estrés oxidativo.....	14
1.3.1 Efectos de los radicales libres de oxígeno en las moléculas biológicas.....	14
1.3.2 Efectos biológicos de ROS a nivel celular.....	15
1.3.3 Sistemas de defensa frente a ROS.....	15
1.3.4 Regulación de la respuesta a estrés oxidativo en la levadura <i>S. cerevisiae</i>	20
2.- La mitocondria como orgánulo responsable de la adaptación al estrés	22
2.1) Estructura, morfología y dinamismo de la mitocondria.....	22
2.2) Mitocondria y metabolismo.....	24
2.2.1 Glucólisis.....	24
2.2.2 Metabolismo anaeróbico.....	24
2.2.3 Metabolismo aeróbico.....	25
2.3) Rutas de señalización que regulan la actividad mitocondrial en levadura.....	27
2.3.1 La ruta retrógrada.....	27
2.3.2 La ruta de señalización por glucosa.....	30
2.4) Implicaciones de la mitocondria.....	31
2.4.1 La mitocondria como orgánulo generador de ATP.....	31
2.4.2 La mitocondria y la apoptosis.....	32
2.4.3 La mitocondria y el envejecimiento celular.....	34
2.4.4 La mitocondria y las enfermedades neurodegenerativas.....	35

ÍNDICE

2.4.5 La mitocondria y la homeostasis del calcio.....	36
2.4.6 La mitocondria y la adaptación al estrés.....	36
2.5) El proteoma mitocondrial.....	38
OBJETIVOS.....	43
MATERIAELS Y MÉTODOS.....	47
1.- Materiales.....	47
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 bioquímicas.....	71
RESULTADOS.....	83
1.- Búsqueda de nuevos determinantes de la tolerancia a estrés hiperosmótico y salino: identificación de la función mitocondrial.....	85
2.- Regulación selectiva de las proteínas mitocondriales bajo condiciones de estrés salino.....	89
3.- Control transcripcional de <i>SDH2</i> , <i>COX6</i> y <i>CIT1</i> en respuesta a estrés salino.....	92
4.- Medida de la actividad enzimática de la succinato deshidrogenasa durante la respuesta celular al estrés osmótico.....	96
5.- Papel de la mitocondria en la activación de la expresión génica en respuesta a estrés osmótico.....	97
6.- Medida de la acumulación de glicerol intracelular en respuesta al estrés osmótico.....	100

7.- Análisis del ratio energético en mutantes con defectos mitocondriales en condiciones de estrés osmótico.....	101
8.- Análisis de la función mitocondrial implicada en la producción/detoxificación de ros durante el estrés osmótico.....	103
9.- Estudio del efecto de la adición de antioxidantes sobre el crecimiento de cepas mutantes mitocondriales sometidas a estrés osmótico.....	106
10.- Análisis del crecimiento de las células de levadura sometidas a estrés osmótico: efecto del precultivo en galactosa o fuentes no fermentables.....	108
11.- Identificación a gran escala de las proteínas mitocondriales reguladas por estrés salino.....	109
11.1) Identificación de proteínas mitocondriales inducidas en respuesta a estrés salino.....	112
11.2) Proteínas reguladas negativamente en mitocondrias adaptadas a estrés salino.....	123
12. Relación mitocondria-retículo endoplasmático en respuesta a estrés salino.....	128
DISCUSIÓN.....	133
CONCLUSIONES.....	153
BIBLIOGRAFÍA.....	157
ANEJOS.....	185

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS

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)

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura I.1: Rutas de MAP Quinasas de la levadura *S. cerevisiae* (8)**
- Figura I.2: Ruta HOG de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (10)**
- Figura I.3: Funciones de la MAP Quinasa Hog1 (11)**
- Figura I.4: Sistema enzimático implicado en la detoxificación de ROS y en el control del estado redox de proteínas tiólicas en *S. cerevisiae* (16)**
- Figura I.5: Esquema del ciclo de Krebs (25)**
- Figura I.6: Modelo de regulación de la ruta retrógrada (29)**
- Figura I.7: La maquinaria molecular de la apoptosis en levadura (33)**
- Figura I.8: Clasificación de proteínas mitocondriales identificadas según su función (39)**
- 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+} (86)**
- 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 (87)**
- Figura R.1.3: Análisis de DNA mitocondrial de la cepas silvestre BY4741 y con defectos mitocondriales utilizadas en el presente trabajo (88)**
- Figura R.2.1: Análisis de Inmunodetección de las proteínas Sdh1, Sdh2, Cox6, Cit1, Atp5 e Idp1 en respuesta a estrés (90)**
- Figura R.2.2: Microscopía confocal de Sdh2-GFP y Cox6-GFP (91)**
- Figura R.3.1: Regulación transcripcional de los genes *SDH2*, *COX6* y *CIT1* en respuesta a estrés salino (92)**
- Figura R.3.2: Estudio de crecimiento y sensibilidad de diluciones seriadas de las cepas silvestre (BY4741) y mutantes $\Delta hog1$ y $\Delta snf1$ (93)**

ÍNDICE

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 *Δhog1* y *Δsnf1* (94)

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 (95)

Figura R.4: Regulación de la actividad enzimática Succinato Deshidrogenasa (SDH) en respuesta al estrés salino (96)

Figura R.5: Medida de la inducción de la expresión génica por estrés osmótico a las cepas de levadura silvestre y mutantes mitocondriales (*Δhog1*, *Δatp5*, *Δcox6*, *Δfzo1* y *Δsdh1*) (99).

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 (100)

Figura R.7: Medida de la ratio AMP/ATP en células de levadura silvestre y mutantes con defectos mitocondriales con y sin tratamiento salino (102)

Figura R.8.1: Cuantificación de ROS en células de levaduras silvestre (BY4741) y mutantes *Δsnf1*, *Δaco1*, *Δsdh1* y *Δfzo1* mediante fluorescencia (104).

Figura R.8.2: Medida cualitativa de ROS en células de levaduras *in vivo* silvestres (BY4741) y mutantes *Δsnf1*, *Δaco1*, y *Δfzo1* mediante fluorescencia HE (105).

Figura R.9: Análisis de crecimiento de la cepa silvestre y mutantes mitocondriales cuando se añaden antioxidantes al medio (107).

Figura R.10: Efecto de la pre-activación de la mitocondria sobre la tolerancia al estrés osmótico (108)

Figura R.11.1: Geles bidimensionales del análisis proteómico comparativo entre mitocondrias purificadas en condiciones normales (YPD) y estrés salino (1M NaCl) (110)

- Figura R.11.2: Proteínas identificadas por su expresión diferencial (YPD/YPD+1M NaCl) mediante técnica 2D-DIGE (111)**
- Figura R.11.3: Perfil de expresión de una de las proteínas mitocondriales cuya acumulación aumenta en condiciones de estrés hiperosmótico (112)**
- Figura R.11.4: Gel bidimensional de proteínas mitocondriales inducidas en condiciones de estrés salino (113)**
- Figura R.11.5. Inmunodetección de proteínas mitocondriales con función antioxidante en presencia y ausencia de estrés salino (116).**
- Figura R.11.6: Inmunodetección de proteínas mitocondriales implicadas en la biosíntesis de aminoácidos en presencia y ausencia de estrés osmótico (118)**
- Figura R.11.7: Inmunodetección de proteínas de la membrana externa mitocondrial en respuesta a estrés hiperosmótico (120)**
- Figura R.11.8: Ensayo de viabilidad de mutantes en funciones mitocondriales identificadas por 2D-DIGE en condiciones de estrés salino y estrés oxidativo (122)**
- Figura R.11.9: Gel bidimensional de proteínas reprimidas en condiciones de estrés salino (123)**
- Figura R.11.10: Perfil de expresión de una de las proteínas cuya acumulación disminuye en condiciones de estrés hiperosmótico (124)**
- Figura R.11.11: Inmunodetección de enzimas glicolíticos en ausencia y presencia de estrés salino (127)**
- Figura R.12: Inmunodetección de proteínas del Retículo Endoplasmático (RE) reguladas negativamente como consecuencia del estrés hiperosmótico (129)**
- Figura D.1: Representación esquemática de las funciones mitocondriales inducidas por estrés osmótico (148)**

ÍNDICE