

Índice

Introducción

1. Mitocondria	3
1.1. Historia, evolución y estructura de la mitocondria	4
1.2. El genoma mitocondrial	5
1.3. El código genético y las modificaciones del tRNA	7
1.4. Sistema OXPHOS	9
1.5. Metabolismo mitocondrial	11
1.6. Enfermedades mitocondriales, enfermedades OXPHOS	14
1.6.1. Mutaciones en genes mitocondriales	14
1.6.2. Mutaciones en genes nucleares	15
2. Modificaciones post-transcripcionales de los tRNAs	16
2.1. Los tRNAs y sus modificaciones post-transcripcionales	16
2.2. Enzimas modificadoras de la U ₃₄ de tRNAs que leen codones de cajas mixtas acabados en purinas (NNA/NNG)	18
2.3. Fenotipos producidos por la ausencia de modificación en la U ₃₄	21
2.3.1. En <i>Escherichia coli</i>	21
2.3.2. En <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
2.3.3. En humanos	22
3. <i>Caenorhabditis elegans</i>	25
3.1. Sistema reproductor de <i>C. elegans</i> (tejido somático y germinal)	27
3.2. Mitocondria y genoma mitocondrial de <i>C. elegans</i>	31
3.3. Características especiales de los mt-tRNAs de <i>C. elegans</i>	36
3.4. Rutas de señalización de longevidad en <i>C. elegans</i>	37
3.4.1. Señalización por insulina/IGF-1 (IIS)	38
3.4.2. Señalización a través de TOR (target-of-rapamycin) o restricción calórica ..	40
3.4.3. Señalización por línea germinal	41
3.4.4. Señalización por hormonas o esteroides	42

3.4.5. Señalización por mitocondria	44
---	----

Justificación y objetivos

Justificación y objetivos	49
---------------------------------	----

Materiales y métodos

1. Materiales	53
1.1. Material biológico	53
1.1.1. Cepas bacterianas	53
1.1.2. Cepa de levadura	54
1.1.3. Cepas de <i>C. elegans</i>	54
1.1.4. Plásmidos	56
1.1.5. Oligonucleótios	59
1.2. Material químico y bioquímico	60
1.2.1. Medios de cultivo y tampones	60
1.2.2. Reactivos	62
1.3. Equipos	63
1.4. Programas informáticos	63
2. Métodos	64
2.1. Mantenimiento y crecimiento de los cultivos bacterianos y de nematodos	64
2.1.1. Cultivos bacterianos	64
2.1.2. Cultivos de <i>S. cerevisiae</i>	64
2.1.3. Cultivo de <i>C. elegans</i>	64
2.1.3.1. Cultivo sólido	64
2.1.3.2. Cultivo líquido	65
2.2. Genotipado (PCR a partir de un único gusano)	65
2.3. Obtención de machos	66
2.4. Cruces (“retrocruces” y obtención de dobles mutantes)	67
2.5. Sincronización de <i>C. elegans</i>	71

2.6. Construcción y expresión de proteínas de fusión fluorescentes en <i>S. cerevisiae</i>	71
2.7. Purificación de mitocondrias crudas	73
2.8. Purificación de RNA	73
2.8.1. Purificación de RNA total pequeño a partir de un extracto de mitocondrias crudas de <i>C. elegans</i>	73
2.8.2. Purificación de RNA total de <i>C. elegans</i>	74
2.8.3. Purificación de RNA total pequeño a partir de <i>C. elegans</i>	74
2.9. Análisis de las uridinas modificadas en los RNAs pequeños mitocondriales de <i>C. elegans</i> por espectrometría de masas	75
2.10. Electroforesis en gel desnaturizante con APM y análisis por transferencia Northern	77
2.11. Ensayo de sensibilidad a la actividad endonucleasa de la angiogenina	78
2.12. Cuantificación de la sobreexpresión de los mt-tRNAs	79
2.13. Tinción con TMRE y MitoTracker Red	79
2.14. Medidas de la ratio AMP/ATP en <i>C. elegans</i> utilizando HPLC	80
2.15. Cuantificación de la ratio mtDNA/nDNA	81
2.16. Transferencia Western y cuantificación de las subunidades de los complejos OXPHOS	81
2.17. Cuantificación de los niveles de mRNA por PCR cuantitativa a tiempo real	82
2.18. Ensayos de fertilidad y cuantificación de la longitud del ciclo reproductivo	83
2.19. Ensayo de silenciamiento por alimentación con RNA de interferencia (RNAi)	83
2.20. Disección de las gónadas y tinción con DAPI	85
2.21. Ensayos de longevidad	85

Resultados

1. Identificación de los genes y proteínas homólogos a los bacterianos <i>mnmA</i>, <i>mnmE</i> y <i>mnmG</i> en <i>C. elegans</i>	89
1.1. Gen <i>mttu-1</i> (B0035.16) y proteína MTTU-1	89
1.2. Gen <i>mtcu-1</i> (F39B2.7) y proteína MTCU-1	90
1.3. Gen <i>mtcu-2</i> (F52H3.2) y proteína MTCU-2	92
2. Localización mitocondrial de MTTU-1, MTCU-1 y MTCU-2	94

3. Descripción de las cepas mutantes simples <i>mttu-1</i>, <i>mtcu-1</i> y <i>mtcu-2</i> y mutantes dobles <i>mtcu-1;mtcu-2</i> y <i>mtcu-2;mttu-1</i>	96
3.1. Mutante <i>mttu-1</i>	97
3.2. Mutante <i>mtcu-1</i>	97
3.3. Mutante <i>mtcu-2</i>	98
3.4. Mutante <i>mtcu-1;mtcu-2</i>	99
3.5. Mutantes <i>mtcu-2;mttu-1</i> y <i>mtcu-1;mttu-1</i>	100
4. Las proteínas MTTU-1, MTCU-1 y MTCU-2 modifican los tRNAs mitocondriales de <i>C. elegans</i>	101
4.1. Análisis del estado de modificación de los tRNAs mitocondriales de <i>C. elegans</i> por espectrometría de masas	103
4.2. Análisis del estado de tiolación de los tRNAs mitocondriales de <i>C. elegans</i> mediante hibridación Northern en geles APM	104
4.3. Análisis de la modificación en posición 5 de la U ₃₄ de los mt-tRNAs de <i>C. elegans</i> por digestión con angiogenina	106
4.4. Alteración de los niveles constitutivos de los mt-tRNA ^{Leu} y mt-tRNA ^{Gln} en los mutantes simples <i>mttu-1</i> , <i>mtcu-1</i> y <i>mtcu-2</i>	109
5. La inactivación de <i>mttu-1</i>, <i>mtcu-1</i> y <i>mtcu-2</i> provoca disfunción mitocondrial en <i>C. elegans</i>	111
6. Estudio de la expresión de genes implicados en diferentes rutas metabólicas en los mutantes <i>mttu-1</i>, <i>mtcu-1</i> y <i>mtcu-2</i>	118
7. Estudio fenotípico de los mutantes simples <i>mttu-1</i>, <i>mtcu-1</i> y <i>mtcu-2</i> y de los dobles mutantes <i>mtcu-1;mtcu-2</i> y <i>mtcu-2;mttu-1</i>	121
7.1. Estudio de la fertilidad en los mutantes <i>mttu-1</i> , <i>mtcu-1</i> , <i>mtcu-2</i> y <i>mtcu-1;mtcu-2</i>	122
7.2. Estudio de la longitud del ciclo reproductivo en los mutantes <i>mttu-1</i> , <i>mtcu-1</i> , <i>mtcu-2</i> y <i>mtcu-1;mtcu-2</i>	123
8. La ausencia simultánea de MTTU-1 y MTCU-1 o MTCU-2 produce esterilidad y problemas en el desarrollo de <i>C. elegans</i>	124
9. La inactivación simultánea de <i>mttu-1</i> y <i>mtcu-2</i> alarga la vida media en <i>C. elegans</i>	129
10. La inactivación simultánea de <i>mttu-1</i> y <i>mtcu-2</i> en la línea somática o germinal causa defectos en el desarrollo o esterilidad, respectivamente	131

11. Estudio de las rutas de señalización implicadas en la longevidad del doble mutante <i>mtcu-2;mttu-1</i>	133
11.1. Señalización por insulina	133
11.2. Ruta mediada por TOR (o restricción calórica)	134
11.3. Señalización por línea germinal mediada por una respuesta hormonal	135
11.4. Señalización mitocondrial	140
<u>Discusión</u>	
Discusión	147
<u>Conclusiones</u>	
Conclusiones	167
<u>Bibliografía</u>	
Bibliografía	173
<u>Anexos</u>	
Anexo I. Listado de reactivos utilizados en este trabajo	187
Anexo II. Listado de equipos utilizados en este trabajo	189
Anexo III. BLAST (NCBI) de las proteínas homólogas en <i>C. elegans</i> utilizando MnmA, MnmE y MnmG de <i>E. coli</i> , MTU1, MSS1 y MTO1 de <i>S. cerevisiae</i> y MTU1, GTPBP3 y MTO1 de <i>H. sapiens</i> como “query”	191
Anexo IV. Predicción de la localización mitocondrial de MTTU-1, MTCU-1 y MTCU-2 por MitoProt II	200
Anexo V. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las proteínas homólogas en los diferentes organismos (<i>E. coli</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>C. elegans</i> y <i>H. sapiens</i>) con el software CLUSTAL OMEGA	202

Índice de figuras

Figura I1. Sección de una mitocondria en el microscopio electrónico	5
Figura I2. Genoma mitocondrial humano	6
Figura I3. Código genético universal	7
Figura I4. Representación de la ETC y el sistema OXPHOS	10
Figura I5. Esquema de la relación entre las rutas metabólicas de la glucosa, los ácidos grasos y el ciclo del TCA en la mitocondria	13
Figura I6. Representación de la estructura secundaria del tRNA y las posibles modificaciones presentes en cada una de las posiciones	17
Figura I7. Rutas de modificación de la U ₃₄ controladas por las proteínas MnmE-MnmG y MnmA en <i>E. coli</i>	19
Figura I8. Ruta de modificación de la U ₃₄ de mt-tRNAs en eucariotas	20
Figura I9. Ciclo de vida de <i>C. elegans</i> a 22°C	26
Figura I10. Sistema reproductor de un hermafrodita adulto	28
Figura I11. Ilustración del desarrollo de la gónada (tejido somático y germinal)	29
Figura I12. Imagen de la gónada anterior de un adulto hermafrodita y de sus células germinales... ..	30
Figura I13. Representación de las vías metabólicas conservadas en la mitocondria de <i>C. elegans</i> ..	32
Figura I14. Representación del genoma mitocondrial de <i>C. elegans</i>	34
Figura I15. Estructura secundaria de los mt-tRNAs de <i>C. elegans</i>	37
Figura I16. Diagrama de la cascada de señalización por insulina en <i>C. elegans</i> que resulta en la modulación de la actividad del factor de transcripción DAF-16 por fosforilación	39
Figura I17. Esquema de la ruta de señalización de longevidad mediada por TOR en <i>C. elegans</i>	41
Figura I18. Modelo de la regulación de la longevidad por el sistema reproductor en <i>C. elegans</i>	43
Figura I19. Ilustración de un modelo de la UPR ^{mt}	45

Figura M1. Plásmido L4440	57
Figura M2. Plásmido pME18S-FL3	58
Figura M3. Plásmido pGREG600	58
Figura M4. Representación de un “retrocruce”	68
Figura M5. Representación de los cruces a realizar para obtener un doble mutante	70
Figura M6. Ilustración de la construcción y expresión de las proteínas de fusión fluorescentes en <i>S. cerevisiae</i>	72
Figura M7. Digrama de flujo del procedimiento para analizar las uridinas modificadas en los RNAs pequeños mitocondriales de <i>C. elegans</i> por espectrometría de masas	77
Figura M8. Representación del ensayo de digestión del RNA total pequeño de <i>C. elegans</i> con la nucleasa angiogenina	78
Figura R1. Esquema del operón CEOP4428 y del gen <i>mttu-1</i>	90
Figura R2. Esquema del operón CEOP1760 y del gen <i>mtcu-1</i>	91
Figura R3. Esquema del operón CEOP2696 y del gen <i>mtcu-2</i>	92
Figura R4. Alineamiento múltiple de secuencia de los primeros aminoácidos de los homólogos en <i>E. coli</i> , <i>T. marítima</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>C. elegans</i>	95
Figura R5. Localización mitocondrial de las proteínas de <i>C. elegans</i> MTTU-1, MTCU-1 y MTCU-2 por expresión heteróloga en <i>S. cerevisiae</i>	96
Figura R6. Comprobación del genotipo de los mutantes de <i>C. elegans</i> por PCR	99
Figura R7. Matriz de un doble mutante <i>mtcu-2;mttu-1/nT1g</i> balanceado	101
Figura R8. Hipótesis de la ruta de modificación de la uridina de tambaleo de los tRNAs mitocondriales de <i>C. elegans</i>	102
Figura R9. Análisis del estado de tiolación del mt-tRNA ^{Leu} y mt-tRNA ^{Gln} de <i>C. elegans</i>	106
Figura R10. Digestión con angiogenina del mt-tRNA ^{Leu} procedente de los mutantes simples <i>mtcu-1</i> y <i>mtcu-2</i> y de la cepa salvaje de <i>C. elegans</i>	108
Figura R11. Cuantificación de los niveles estacionarios de los mt-tRNA ^{Leu} y mt-tRNA ^{Gln} en las cepas salvaje y simples mutantes <i>mttu-1</i> , <i>mtcu-1</i> y <i>mtcu-2</i>	110
Figura R12. Niveles estacionarios de las subunidades NUO-2, CTC-1 y ATP-2 de los complejos I, IV y V, respectivamente, de la fosforilación oxidativa	112

Figura R13. Cuantificación del potencial de membrana mitocondrial en la cepa salvaje y los mutantes simples <i>mttu-1</i> y <i>mtcu-2</i> y el mutante doble <i>mtcu-2;mttu-1</i> mediante la tinción in vivo con (A) TMRE y (B) MitoTracker Red	113
Figura R14. Determinación de la relación AMP/ATP en extractos de la cepa salvaje (N2), los simples mutantes <i>mttu-1</i> , <i>mtcu-1</i> y <i>mtcu-2</i> y los dobles mutantes <i>mtcu-1;mtcu-2</i> y <i>mtcu-2;mttu-1</i> por HPLC	114
Figura R15. Cuantificación de la ratio mtDNA/nDNA por PCR cuantitativa en la cepa N2 y los mutantes simples <i>mttu-1</i> , <i>mtcu-1</i> y <i>mtcu-2</i> y los mutantes dobles <i>mtcu-1;mtcu-2</i> y <i>mtcu-2;mttu-1</i>	115
Figura R16. Cuantificación de los niveles de mRNA de <i>ucp-4</i> en la cepa salvaje y los mutantes simples <i>mttu-1</i> , <i>mtcu-1</i> y <i>mtcu-2</i> , por PCR cuantitativa a partir de un extracto de RNA total	116
Figura R17. Cuantificación de los niveles de mensajero de <i>hsp-6</i> y <i>hsp-60</i> en la cepa salvaje y los mutantes simples <i>mttu-1</i> , <i>mtcu-1</i> y <i>mtcu-2</i>	118
Figura R18. Cuantificación de los niveles de mensajero de <i>pfk-1.1</i> , <i>fgt-1</i> y <i>ldh-1</i> en la cepa salvaje y los mutantes simples <i>mttu-1</i> , <i>mtcu-1</i> y <i>mtcu-2</i>	119
Figura R19. Cuantificación de los niveles de mRNA de <i>acs-17</i> y <i>acd-12</i> , que transcriben proteínas directamente implicadas en la vía de la oxidación de ácidos grasos, en la cepa salvaje y los mutantes simples <i>mttu-1</i> , <i>mtcu-1</i> y <i>mtcu-2</i>	120
Figura R20. Expresión de <i>glna-1</i> en la cepa salvaje y los mutantes simples <i>mttu-1</i> , <i>mtcu-1</i> y <i>mtcu-2</i>	121
Figura R21. Fertilidad de los mutantes <i>mttu-1</i> , <i>mtcu-1</i> , <i>mtcu-2</i> y <i>mtcu-1;mtcu-2</i>	123
Figura R22. Duración del ciclo reproductivo en los mutantes <i>mttu-1</i> , <i>mtcu-1</i> , <i>mtcu-2</i> y <i>mtcu-1;mtcu-2</i>	124
Figura R23. La inactivación simultánea de MTTU-1 y MTCU-2 produce esterilidad, letalidad embrionaria y defectos en el desarrollo de <i>C. elegans</i>	126
Figura R24. La inactivación simultánea de MTTU-1 y MTCU-2 produce defectos en las gónadas de <i>C. elegans</i>	128
Figura R25. La inactivación simultánea de MTTU-1 y MTCU-2 promueve longevidad en <i>C. elegans</i>	129
Figura R26. El silenciamiento específico de <i>mtcu-2</i> en la línea germinal del mutante <i>mttu-1</i> promueve longevidad a 25°C	131

Figura R27. El silenciamiento de <i>mtcu-2</i> en el tejido somático de un mutante <i>mttu-1</i> induce defectos en el desarrollo de <i>C. elegans</i> , mientras que su inactivación en tejido germinal provoca esterilidad a 25°C	132
Figura R28. Efecto del silenciamiento de <i>daf-2</i> sobre la longevidad de las cepas N2 y <i>mtcu-2;mttu-1</i> a 25°C	134
Figura R29. Efecto del silenciamiento de <i>daf-15</i> o <i>rict-1</i> sobre la supervivencia de las cepas N2 y <i>mtcu-2;mttu-1</i> a 25°C	135
Figura R30. Efecto del silenciamiento independiente de <i>kri-1</i> , <i>daf-9</i> y <i>daf-12</i> en la supervivencia de la cepa <i>mtcu-2;mttu-1</i> a 25°C	139
Figura R31. Efecto del silenciamiento independiente de <i>aak-1</i> y <i>aak-2</i> en la supervivencia de la cepa <i>mtcu-2;mttu-1</i> a 25°C	142
Figura R32. Efecto del silenciamiento de <i>hsp-6</i> en la supervivencia de N2 y <i>mtcu-2;mttu-1</i> a 25°C	143
Figura D1. Metabolismo mitocondrial en los mutantes simples <i>mttu-1</i> , <i>mtcu-1</i> y <i>mtcu-2</i> de <i>C. elegans</i>	158
Figura D2. Hipotéticas rutas de señalización de longevidad en el doble mutante <i>mtcu-2;mttu-1</i>	163

Índice de tablas

Tabla I1. Desviaciones del código genético universal en la mitocondria	8
Tabla I2. Hipótesis de tambaleo y sus posteriores variaciones por las modificaciones post-transcripcionales en el lazo anticodón	9
Tabla I3. Cadena de reacciones del ciclo del TCA	12
Tabla I4. Destino metabólico de los aminoácidos en el ciclo del TCA	13
Tabla I5. Tiempo de desarrollo de <i>C. elegans</i> a diferentes temperaturas de crecimiento	27
Tabla M1. Relación de cepas bacterianas utilizadas en este trabajo	53
Tabla M2. Listado de cepas de <i>C. elegans</i> utilizadas en este estudio	55
Tabla M3. Relación de cebadores utilizados en este trabajo	59
Tabla M4. Condiciones cromatográficas para resolver los nucleósidos previamente a ser analizados por un espectrómetro de masas	75
Tabla M5. Datos de fragmentación de los nucleósidos en el espectrómetro de masas.....	76
Tabla M6. Condiciones de separación cromatográfica para detectar ATP y AMP	81
Tabla M7. Ejemplo de una mezcla de reactivos y muestra para amplificar mRNA por PCR cuantitativa a tiempo real	82
Tabla R1. Información sobre los genes <i>mttu-1</i> , <i>mtcu-1</i> y <i>mtcu-2</i> y sobre las proteínas que codifican, MTTU-1, MTCU-1 y MTCU-1	93
Tabla R2. Porcentaje de identidad de secuencia y similitud de las proteínas de <i>C. elegans</i> con sus homólogas en <i>E. coli</i> , <i>S. cerevisiae</i> y <i>H. sapiens</i> calculado a partir del alineamiento de secuencia realizado utilizando el programa BLAST (NCBI)	93
Tabla R3. Datos estadísticos de los ensayos de silenciamiento y longevidad	14

