

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	VII
RESUMEN	XIII
RESUM	XV
SUMMARY	XVII
ABREVIATURAS	XIX
ÍNDICE DE CONTENIDO	XXIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XXXI
ÍNDICE DE TABLAS	XXXVII
INTRODUCCIÓN	1
1. La mitocondria	3
1.1. Funciones mitocondriales	4
1.2. Dinámica mitocondrial	9
1.2.1. <i>Fisión mitocondrial</i>	9
1.2.2. <i>Fusión mitocondrial</i>	11
1.2.3. <i>Procesos celulares relacionados con la dinámica mitocondrial</i>	12
1.2.4. <i>Patologías humanas asociadas a fallos en la dinámica de la mitocondria</i>	14
1.3. La levadura como modelo de estudio de la mitocondria	16
2. Adaptación a estrés de la mitocondria	20
2.1. Consideraciones generales sobre el estrés	20

2.2. La mitocondria como orgánulo productor y detoxificador de estrés oxidativo	22
2.3. Cambios en el metabolismo mitocondrial ante estrés	24
2.3.1. Señalización por glucosa	25
2.3.2. La ruta retrógrada	28
2.4. Cambios adaptativos de la mitocondria durante estrés	30
2.4.1. Caso particular: proteína Mpc3	31
3. Control de calidad mitocondrial	34
3.1. Sistemas de control de calidad moleculares	35
3.2. Función de la dinámica mitocondrial en el control de calidad	37
3.3. Mitofagia	38
3.3.1. La mitofagia en levadura	39
3.3.2. La mitofagia en mamíferos	41
3.3.3. Alternativas a la mitofagia	42
OBJETIVOS	45
MATERIALES Y MÉTODOS	49
1. Material biológico y condiciones de crecimiento	51
1.1. Cepas y condiciones de cultivo de bacterias	51
1.2. Cepas y condiciones de cultivo de levadura	52
1.3. Plásmidos utilizados	53
2. Ensayos de sensibilidad	54
2.1. Ensayos de crecimiento en medio líquido	54
2.2. Ensayos de crecimiento en medio sólido (Goteos)	55
3. Técnicas de transferencia génica	55
3.1. Transformación de bacterias	55
3.1.1. Preparación de bacterias quimiocompetentes	55

3.1.2. Transformación de bacterias quimiocompetentes	56
3.1.3. Preparación de bacterias electrocompetentes	56
3.1.4. Transformación de bacterias electrocompetentes	57
3.2. Transformación de levadura	57
4. Manipulación y análisis de proteínas	58
4.1. Obtención de extractos proteicos totales	58
4.2. Electroforesis de proteínas	58
4.3. Transferencia a membrana de proteínas (<i>Western Blot</i>) y tinción de membranas	59
4.4. Detección inmunológica de proteínas y cuantificación	60
4.5. Co-inmunoprecipitación de proteínas	61
4.5.1. Co-inmunoprecipitación de proteínas mitocondriales	61
4.5.2. Co-inmunoprecipitación de proteínas citosólicas.....	62
5. Técnicas de manipulación génica	63
5.1. Purificación de DNA genómico total de levadura	63
5.2. Manipulación de fragmentos de DNA	63
5.3. Extracción de plásmidos de bacteria y levadura	64
5.4. Diseño de construcciones de delección y amplificación génica	64
6. Análisis de expresión mediante RT-PCR	65
6.1. Obtención de RNA total mediante el método de fenol ácido	65
6.2. Purificación y concentración del RNA total	66
6.3. Síntesis de cDNA mediante transcripción reversa	66
6.4. PCR cuantitativa en tiempo real	67
7. Análisis de las especies reactivas de oxígeno (ROS)	68
8. Consumo de oxígeno	69

9. Inducción y detección de mitofagia	69
10. Ensayo de doble híbrido en levadura	70
10.1. Análisis de la interacción proteína-proteína en placa	71
10.2. Ensayo cuantitativo de la actividad β -galactosidasa	71
10.3. Amplificación de una colección de plásmidos pACT	72
10.4. Transformación y <i>screening</i> de una colección de plásmidos en levadura	73
10.5. Comprobación de los clones positivos en el ensayo de doble híbrido	74
11. Microscopía confocal	75
12. Aplicaciones bioinformáticas	76
13. Análisis estadístico	77
 RESULTADOS	 79
 CAPÍTULO 1. Función del transportador de piruvato mitocondrial (MPC) en la adaptación de la actividad mitocondrial	 79
1. Análisis bioinformático de la secuencia proteica de la familia MPC en <i>S. cerevisiae</i>	81
2. Estudio de la expresión de las proteínas Mpc en respuesta a diferentes tipos de estrés	84
3. Regulación transcripcional de los genes <i>MPC</i> ante estrés salino y cambio diáuxico	87
4. Estudio fenotípico de los mutantes Δmpc	89
5. Análisis fenotípico de las cepas de sobreexpresión de los genes <i>MPC</i>	93
6. Análisis del efecto de la pérdida y ganancia de función de los genes <i>MPC</i> en la tasa respiratoria	97
7. Cuantificación de los niveles de oxidación intracelular	99

8. Caracterización de las interacciones de Mpc3 con otras proteínas de la familia MPC	102
9. Relación funcional entre las proteínas Mpc y el transportador de carnitina mitocondrial	104
10. Análisis del efecto de los genes MPC en la morfología mitocondrial	109

CAPÍTULO 2. Caracterización de una mitofagia específica para complejos individuales de la cadena electrónica mitocondrial 111

1. Análisis de los complejos mitocondriales de la cadena de transporte de electrones en condiciones de elevada tasa respiratoria	113
1.1. Análisis de las proteínas de los complejos respiratorios mediante <i>Western Blot</i>	113
1.2. Análisis de los genes responsables de la degradación de los complejos de la cadena de transporte electrónico ante una elevada tasa respiratoria	116
2. Análisis del crecimiento de cepas de levadura mutantes para genes de autofagia	119
3. Generación de un modelo de estudio de daño mitocondrial específico para levadura	121
4. Efecto de la valinomicina en las proteínas de los complejos respiratorios mitocondriales	125
4.1. Análisis de las proteínas de los complejos mitocondriales por el ensayo de <i>Western Blot</i>	125
4.2. Comprobación de la degradación de los complejos I y III mediante microscopía confocal	127
5. Comprobación de que la degradación controlada de la mitocondria en presencia de valinomicina ocurre en la vacuola en levadura: Sistema mtRosella	132
5.1. Análisis de la degradación mitocondrial en diferentes condiciones	133

5.2. Análisis de la mitofagia mediante microscopía confocal en los mutantes <i>Δatg11</i> y <i>Δatg32</i>	136
6. Análisis de crecimiento de mutantes de levadura en presencia de valinomicina	138
7. Análisis de los genes implicados en la degradación de los complejos de la cadena de transporte de electrones en presencia de valinomicina	139
8. Análisis de condiciones alternativas en las que se activa la mitofagia en levadura	144

CAPÍTULO 3. Caracterización funcional de la proteína Atg11 en el proceso de mitofagia inducida por daño mitocondrial..... 147

1. Estudio de la regulación génica y proteica de Atg11	149
2. Estudio del efecto de la sobreexpresión de Atg11	150
2.1. Análisis de la localización celular de Atg11 tras su sobreexpresión	151
2.2. Efecto de la sobreexpresión de Atg11 en los complejos I y III de la cadena de transporte electrónico analizado por <i>Western Blot</i>	153
2.3. Efecto de la sobreexpresión de Atg11 en los complejos I y III de la cadena de transporte electrónico analizado por microscopía confocal	155
3. Localización de Atg11 en niveles endógenos	157
4. Estudio de las interacciones proteicas de Atg11	159
4.1. Comprobación del sistema de doble híbrido: interacción Atg11-Atg32	160
4.2. Rastreo de proteínas que interaccionan con Atg11 en presencia y ausencia de valinomicina	163
4.3. Verificación de los principales genes obtenidos por doble híbrido	167
5. Estudio de la interacción Atg11-Atg11	170

6. Análisis de la conservación de Atg11 en organismos superiores: <i>Arabidopsis thaliana</i>	173
DISCUSIÓN	177
CONCLUSIONES	203
REFERENCIAS	207
FIGURAS SUPLEMENTARIAS	237
TABLAS SUPLEMENTARIAS	257
ANEXO. Timón-Gómez, A., Proft, M., Pascual-Ahuir, A. (2013). Differential regulation of mitochondrial pyruvate carrier genes modulates respiratory capacity and stress tolerance in yeast. <i>Plos one</i> , 8(11): e79405	267