

Valencia, junio 2017



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Trabajo final de grado en Biotecnología

Estudio de la degradación de complejos respiratorios en el proceso de mitofagia en respuesta a estrés.

Autor:

David Sanfeliu Redondo

Tutor: Dra. Amparo Pascual-Ahuir

Tutor externo: Dr. Markus Proft



**Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Agronómica y del Medio Natural**

Curso:

2016-2017



RESUMEN

Datos del TFG:

Autor:	David Sanfeliu Redondo
Tutor de la UPV:	Dra. Amparo Pascual-Ahuir
Tutor externo:	Dr. Markus Proft
Titulación:	Grado en Biotecnología
Título del trabajo:	“Estudio de la degradación de complejos respiratorios en el proceso de mitofagia en respuesta a estrés”
Lugar de realización:	Instituto de Biomedicina de Valencia
Localidad y fecha:	Valencia, Junio de 2017

Palabras claves:

Mitocondria, Cadena respiratoria mitocondrial, Mitofagia, *Saccharomyces cerevisiae*

Resumen:

El control de calidad de las mitocondrias es una función esencial de las células eucariotas. En los seres humanos, la falta de eliminación de las mitocondrias dañadas o disfuncionales es una causa de neurodegeneración. Un importante mecanismo de control de calidad mitocondrial es la degradación regulada de las partes dañadas del orgánulo por vías autofágicas denominada mitofagia. En este trabajo se investiga en el modelo de levadura, si complejos específicos del transporte de electrones (ETC) se degradan diferencialmente en condiciones de estrés celular.

Este trabajo pretende ampliar los estudios anteriores de nuestro grupo de investigación que mostraron evidencia de una degradación selectiva de los complejos mitocondriales y que la proteína Atg11 era necesaria para este reciclaje mitocondrial. En este trabajo se quiere ampliar estos estudios y (i) medir las tasas de degradación de subunidades específicas de CII, CIII y CV con diferentes grados de respiración y daños mitocondriales, (ii) visualizar mediante microscopía de fluorescencia el proceso de mitofagia en respuesta al daño mitocondrial, (iii) evaluar la importancia de diferentes proteínas Atg para el crecimiento eficiente a altas tasas de respiración y daño mitocondrial y (iv) comprobar cuáles de estas proteínas están involucradas en la generación de mayor estrés oxidativo al inducir un daño mitocondrial.

Key words:

Mitochondria, Mitochondrial electron transport, Mitophagy, *Saccharomyces cerevisiae*.

Summary:

The quality control of mitochondria is an essential function of eukaryotic cells. In humans, failure to remove damaged or dysfunctional mitochondria are the cause of neurodegeneration. One important mechanism of mitochondrial quality control is the regulated degradation of the damaged parts of the organelle by autophagic pathways termed mitophagy. In this work we investigate in the yeast model, whether specific respiratory or electron transport complexes (ETC) are differentially degraded upon cellular stress. Previous results from our group of investigation show evidence of selective ways of mitochondrial complex degradation and that Atg11 protein was required for this mitochondrial recycling.

Here we want to extend these studies and (i) measure the degradation rates of specific subunits of CII, CIII and CV upon different respiratory activity and mitochondrial damage, (ii) visualize by fluorescence microscopy the process of mitophagy upon mitochondrial damage, (iii) evaluate the importance of different Atg proteins for efficient growth upon high respiration rates and mitochondrial damage and (iv) test which of these proteins are necessary for ROS balance upon mitochondrial damage.

*“La ciencia es una sola luz, e
iluminar con ella cualquier
parte es iluminar con ella el
mundo entero”*

Isaac Asimov

AGRADECIMIENTOS.

Este trabajo supone el fin de una etapa, donde he podido crecer como persona y sobretodo formarme como biotecnólogo. Este camino que ha durado cuatro años no lo he recorrido solo, sino que he tenido un gran apoyo detrás que me ha permitido alcanzar la meta que supone acabar una carrera universitaria.

Quiero agradecer a todos los profesores de la UPV que han estado acompañándonos durante la carrera, su paciencia y su esfuerzo por hacer de nosotros grandes profesionales, y proporcionarnos las herramientas que vamos a tener que poner en práctica en un futuro cercano cuando nos enfrentemos al mundo laboral. En especial me gustaría agradecer a mi tutora Payo su disponibilidad y atención, y que me abriera las puertas de este proyecto.

No puedo dejar de dar gracias a mi tutor Markus y a Benito, porque sin ellos este trabajo no habría salido adelante, y también por hacerme más ameno el tiempo en el laboratorio, y ayudarme siempre que necesitaba una mano, tanto en el trabajo como en todo lo demás.

Mis padres se merecen una mención especial pues ellos son los únicos que siempre están ahí para darme su cariño, su apoyo y su consejo, y me han enseñado que el trabajo duro es la única constante que debe marcar mi futuro profesional. Junto a ellos, mi familia también ha supuesto un pilar imprescindible, sus ánimos y su atención me han permitido dar el último empujón cuando todo parecía cuesta arriba.

Los amigos que he encontrado en la carrera también han sido muy importantes, con ellos he compartido experiencias, risas y llantos, y espero que la amistad que hemos cosechado durante estos cuatro años sea de esas que duran para siempre. El resto de ellos saben que nuestra amistad hace tiempo que está a otro nivel, y que estar con ellos es uno de los pocos placeres de la vida que no deseo perder nunca.

Entre tantas personas encontré a una que acabó siendo la más especial, ella ha estado a mi lado en los buenos momentos y en los malos, y me recordó que rendirse nunca es una opción.

Por último, me gustaría dar gracias a todas las personas que hacen o comunican ciencia (pero de verdad, nada de patrañas), pues ellos consiguen contagiar su pasión y animan a la gente como yo, a seguir su estela y tener el sueño de ser algún día un gran científico.



Abreviaturas.

AIM Motivo de interacción con la proteína Atg8

AmpR Gen de resistencia a ampicilina

APS Persulfato amónico

ATG Autofagia

ATP Adenosín trifosfato

CAT Catalasa

CoA Coenzima A

CSK2 Quinasa caseína 2

DB71 *DirectBlue 71*

DMSO Dimetilsulfóxido

DsRed Proteína roja fluorescente de *Discosoma sp.*

DTT Ditiotritol

ECT Cadena de transporte de electrones

EDTA Ácido etilendiaminotetracético

EtOH Etanol

FAD Flavín Adenín Dinucleótido

GABA Ácido γ -aminobutírico

GPx Glutación peroxidasa

LC3 Cadena ligera 3

MAPK Proteína MAP quinasa

mt Mitocondrial

mtDNA DNA mitocondrial

NAD Nicotamida Adenina Dinucleótido

OD Densidad óptica

OXPHOS Fosforilación oxidativa

PAGE Electroforesis en gel de poliacrilamida

PAS Sitio de ensamblaje del fagóforo

PEG Polietilenglicol

PINK1 Quinasa PTEN-inducida putativa 1

Pol g Polimerasa gamma

PVDF Polivinilideno de difluorido

Rheb Homólogo de RAS enriquecido en cerebro

ROS Especies reactivas de oxígeno

SD Medio sintético con glucosa

SDS Dodecil sulfato sódico

SGal Medio sintético con galactosa

SGlic Medio sintético con glicerol

SOD Superóxido dismutasa

TAE Tris-Acetato-EDTA

TAP Proteína activadora de células T

TBS Tampón salino de Tris

TCA Ácido tricarbóxico

TE Tris-EDTA

TEMED Tetrametiletenodiamida

TFAM Factor de transcripción A

TIM Translocasa mitocondrial interna

TOM Translocasa mitocondrial externa

Tris (Hidroximetil) Aminometano

tRNA RNA de transcripción

Val Valinomicina

VDAC Canal de aniones dependiente de voltaje

Wt Ceba silvestre

YNB Base nitrogenada de levadura

YPD Medio rico: extracto de levadura Peptona-Dextrosa

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. La mitocondria	1
1.1. Funciones mitocondriales	2
1.2. La cadena respiratoria mitocondrial	3
1.3. Adaptación a estrés de la mitocondria	4
1.4. La levadura como modelo de estudio de la mitocondria.....	5
2. La mitofagia	6
2.1 La mitofagia en levaduras.	7
2.2 La mitofagia en mamíferos.....	8
OBJETIVOS	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
1. Material biológico y condiciones de crecimiento	12
1.1 Cepas y condiciones de crecimiento de levadura.	12
1.2 Plásmidos utilizados	12
2. Ensayos de sensibilidad	13
2.1 Ensayos de crecimiento en medio líquido	13
2.2 Ensayos de crecimiento en medio sólido (Droptest)	13
3. Extracción de plásmidos de bacteria.....	13
4. Transformación de levadura	13
5. Manipulación y análisis de proteínas.....	14
5.1 Obtención de extractos proteicos totales.....	14
5.2 Electroforesis de proteínas	14
5.3 Transferencia de las proteínas a membranas de PVDF y tinción de proteína total 15	
5.4 Detección inmunológica de proteínas (<i>Western Blot</i>) y cuantificación	15
5.5 Análisis de la degradación proteica.....	16
6. Análisis de las especies reactivas de oxígeno (ROS).....	16
7. Microscopía confocal	17
8. Análisis estadístico	18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
1. Análisis de los complejos II, III y V de la cadena respiratoria mitocondrial en condiciones que inducen la respiración aeróbica.....	19



2. Análisis de la degradación de las proteínas Cor1 y Atp1 de los complejos mitocondriales III y V en condiciones de elevada tasa respiratoria.....	21
3. Estudio de la mitofagia mediante microscopía confocal	24
4. Estudio del crecimiento de cepas mutantes de <i>S. cerevisiae</i> para genes de autofagia en presencia de Valinomicina	26
5. Análisis de los niveles relativos de ROS producidos por mutantes de levadura para genes de autofagia en presencia de Valinomicina	28
CONCLUSIONES	30
BIBLIOGRAFÍA.....	31

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Representación de la fosforilación oxidativa.	3
Figura 2. Mecanismo molecular de la mitofagia en Levaduras.....	8
Figura 3. Rutas de mitofagia en levaduras y mamíferos.	10

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 4. Esquema de la estructura de la transferencia proteica.	15
Figura 5. Representación esquemática del sistema mtRosella para la detección de mitofagia mediante microscopía confocal en <i>S. cerevisiae</i>	17

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 6. Inmunodetección de las proteínas de los complejos respiratorios II, III, V en extractos totales de levadura en condiciones fermentativas y respiratorias.....	20
Figura 7. Inmunodetección de las proteínas Cor1 y Atp1 de los complejos respiratorios III y V en extractos de levadura crecidos en YPD, YPGal tras el tratamiento con cicloheximida. ...	22
Figura 8. Inmunodetección de las proteínas de los complejos respiratorios de extractos de levadura crecidos en YPGlic/EtOH tras el tratamiento con cicloheximida.	23
Figura 9. Detección de mitofagia en levadura mediante el sistema mtRosella por microscopía confocal.....	25
Figura 10. Ensayo de crecimiento en medio sólido (Droptest) de mutantes de levadura en presencia de valinomicina en medio YPGal.	27
Figura 11. Ensayo de crecimiento en medio sólido (Droptest) de mutantes de levadura en presencia de valinomicina en medio YPGlic/EtOH	27
Figura 12. Niveles de ROS relativos de mutantes <i>atg</i> tras la inducción de daño mitocondrial con valinomicina	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas.....	12
Tabla 2. Fluoróforos utilizados en los análisis mediante microscopía confocal	17

INTRODUCCIÓN

1. La mitocondria

Las mitocondrias son orgánulos celulares prácticamente ubicuos que participan activamente en el metabolismo celular, siendo su función más importante la obtención de ATP, a través de la fosforilación oxidativa.(Attardi & Schatz, 1988).

Estos orgánulos son lo bastante grandes como para poder observarse al microscopio óptico y fueron identificadas por primera vez durante el siglo XIX por Richard Altmann. Sin embargo no fue hasta 1948 cuando se desarrollaron las técnicas necesarias para comprender cuál era realmente la función mitocondrial.

La aparición de las mitocondrias se remonta 2 billones de años atrás, cuando se produjo la endosimbiosis entre el precursor de las células eucariotas modernas y las α -proteobacterium, lo que permitió abastecer los requerimientos energéticos que el aumento de la complejidad requería (Lane & Martin, 2010). A pesar de que la mitocondria ha mantenido su estructura de doble membrana y continúa siendo la principal productora de ATP al igual que su ancestro, tanto su forma como su composición se han visto alteradas, y han ido adquiriendo una gran cantidad de funciones imprescindibles para el correcto funcionamiento celular (Friedman & Nunnari, 2014).

Como se acaba de mencionar las mitocondrias son orgánulos membranosos que se componen de dos membranas altamente especializadas y con funciones muy diferentes. Ambas membranas definen dos compartimentos mitocondriales diferentes: la matriz mitocondrial y un espacio intermembrana, más pequeño que el anterior (Alberts *et al.*, 2008):

- **Matriz.** Este espacio interior contiene una mezcla muy concentrada de centenares de enzimas, incluyendo las necesarias para la oxidación del piruvato, la oxidación de los ácidos grasos y el ciclo del ácido cítrico. La matriz contiene algunas copias idénticas del genoma mitocondrial, ribosomas mitocondriales especiales, tRNA y varias enzimas necesarias para la expresión de genes mitocondriales.
- **Membrana interna.** La membrana interna está replegada en numerosas crestas, que incrementan considerablemente su superficie total. Contiene proteínas con tres tipos de funciones distintas: (1) las que llevan a cabo las reacciones de oxidación de la cadena de transporte electrónico; (2) la ATP sintasa que produce ATP en la matriz, y (3) proteínas transportadoras que permiten el paso de metabolitos hacia la matriz y hacia el exterior. A través de esta membrana se establece un gradiente electroquímico de H^+ que impulsa a la ATP sintasa, por lo que la membrana debe ser impermeable a los iones y a la mayor parte de las moléculas pequeñas cargadas.
- **Membrana externa.** La membrana externa contiene gran cantidad de una proteína formadora de canales denominada porina (VDAC), por lo que es permeable a todas las moléculas que presentan un peso molecular inferior a 5000 Da. Otras proteínas de esta membrana son las enzimas implicadas en la síntesis mitocondrial de lípidos y las que transforman sustratos lipídicos en compuestos que posteriormente serán metabolizados en la matriz, receptores de importación de proteínas mitocondriales y la maquinaria enzimática para la división y la fusión del orgánulo.

- **Espacio intermembrana.** Este espacio contiene varias enzimas que utilizan el ATP que sale de la matriz, para fosforilar otros nucleótidos.

La mayoría de las alrededor de 1000 proteínas mitocondriales están codificadas en el núcleo y son importadas a la mitocondria desde el citoplasma por proteínas translocasa especializadas, tanto de la membrana externa (TOM) como de la interna (TIM) (Sokol *et al.*, 2014).

Las mitocondrias son también orgánulos muy interesantes desde un punto de vista genómico pues presentan su propio DNA (mtDNA). Al contrario que el DNA nuclear, el mtDNA humano consiste en una molécula de doble cadena circular compuesto de 16569 pares de bases y que contiene la información de 37 genes. De estos, 2 codifican RNAs ribosomales (12S y 16S) y 22 codifican RNAs de transferencia (tRNAs). Los 13 genes restantes codifican subunidades estructurales peptídicas del sistema de la fosforilación oxidativa, específicamente las subunidades de los complejos I, III, IV y V (Holt & Reyes, 2012) (Friedman & Nunnari, 2014). En la mayor parte de los tipos celulares las mitocondrias individuales no existen, sino que forman un entramado en forma de red conectada que contiene múltiples copias del cromosoma mitocondrial, formando un sincitio (Friedman & Nunnari, 2014) La replicación, transcripción y traducción de este mtDNA están controladas por una única región no codificante conocida como bucle de desplazamiento (*D loop*) (Holt & Reyes, 2012). El mtDNA se encuentra altamente compacto dentro de la matriz mitocondrial gracias a una proteína asociada al mtDNA en las células de mamífero conocida como el factor de transcripción A (TFAM), el cual es capaz de unirse y doblar pequeños tramos del mtDNA, formando bucles y permitiendo el empaquetamiento (Ngo *et al.*, 2011).

1.1. Funciones mitocondriales.

Tradicionalmente se ha pensado en la mitocondria como un orgánulo productor de energía llegando a ser conocido como la "fábrica de energía de la célula" (McBride *et al.*, 2006). Sin embargo el estudio de este orgánulo nos ha permitido ampliar esta concepción y entender a la mitocondria como una parte fundamental del metabolismo y del correcto funcionamiento celular.

En la mitocondria se produce la oxidación tanto del piruvato (obtenido a partir de la glicólisis de azúcares en el citosol) como de los ácidos grasos (en un proceso conocido como β -oxidación). Ambos tipos de moléculas son transportadas a través de la membrana mitocondrial interna y son transformadas por enzimas localizadas en la matriz mitocondrial en moléculas de acetil-CoA. Los grupos acetilo de este intermediario metabólico son oxidados en la matriz a través del ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) produciendo CO_2 , como producto de deshecho, y generando electrones de alta energía, que son transportados por el NADH y el FADH_2 . Estos electrones de alta energía son transferidos a la membrana mitocondrial interna, donde entran en la cadena de transporte de electrones, la cual aprovecha la gran cantidad de energía liberada para la síntesis del ATP, lo que se conoce como fosforilación oxidativa (OXPHOS) (Alberts *et al.*, 2008). A pesar de que esta situación se da en la mayoría de eucariotas superiores, en *S. cerevisiae* la β -oxidación ocurre exclusivamente en los peroxisomas, produciéndose el intercambio de acetil-CoA entre estos y la mitocondria (Van Roermund *et al.*, 2003).

Pero como ya se ha comentado la mitocondria es mucho más que un reactor que oxida el piruvato y los ácidos grasos para alimentar la fosforilación oxidativa, pues desempeña otras funciones muy importantes que son específicas de este orgánulo y que lo hacen irremplazable, como son su participación en la apoptosis y la proliferación celular, la regulación del estado redox y de los niveles de segundos mensajeros, la síntesis de grupos hemo y esteroides, la producción y transmisión del potencial de membrana, actividades detoxificadoras y la producción de calor (Zorov *et al.*, 1997).

1.2. La cadena respiratoria mitocondrial.

La función principal de la mitocondria es la producción de ATP mediante la fosforilación oxidativa, a través de una vía enzimática que consiste en cinco complejos enzimáticos que están localizados en el interior la membrana mitocondrial interna (ver figura 1). Esta vía está subdividida en la cadena de transporte electrónica (ECT), formada por los complejos del I al IV, y la F_1F_0 -ATP sintasa (o Complejo V). La ECT está formada por: La NADH-ubiquinona oxidoreductasa como Complejo I (el único complejo de la ECT que difiere considerablemente entre mamíferos y levaduras respecto a su estructura), la succinato-ubiquinona oxidoreductasa como Complejo II, la ubiquinona-citocromo-c oxidoreductasa como Complejo III y la citocromo-c oxidasa como Complejo IV. (Vedel *et al.*, 1999).

El Complejo I es el punto de entrada para la transferencia de electrones, aceptando los electrones procedentes del NADH (los del $FADH_2$ son aceptados por el complejo II), los cuales son cedidos al Complejo III a través de la ubiquinona, después pasan al Complejo IV a través del citocromo c y finalmente son aceptados por el oxígeno produciendo agua (Vartak *et al.*, 2013).

La transferencia de electrones está acoplada con el bombeo de protones desde la matriz hacia el espacio intermembrana, debido al flujo energéticamente favorable de los electrones. Este desplazamiento genera como resultado tanto un gradiente de pH como de voltaje, que conducen a los protones de nuevo hacia el interior de la matriz, lo que origina un gradiente electroquímico de protones que ejerce una fuerza protón-motriz. El Complejo V genera una vía hidrofílica a través de la membrana mitocondrial interna, que permite fluir a los protones a favor de su gradiente electroquímico, los cuales son utilizados para impulsar la síntesis de ATP (Alberts *et al.*, 2008). Este gradiente no solo permite la síntesis de ATP, sino que además favorece el transporte de metabolitos y proteínas a través de la membrana interna (Stuart, 2008).

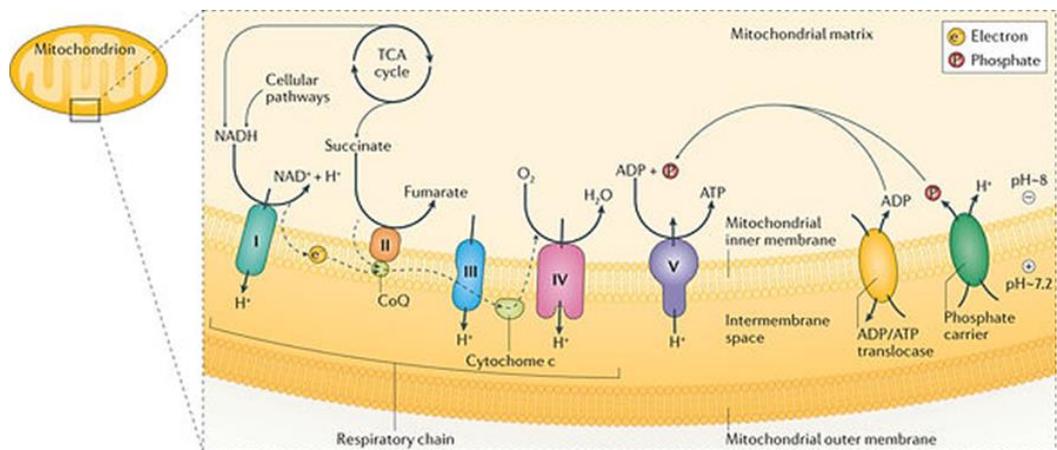


Figura 1. Representación de la fosforilación oxidativa. La fosforilación oxidativa es la ruta metabólica que utiliza la célula para oxidar los nutrientes, liberando energía en forma de ATP. La ruta respiratoria incluye los complejos I-IV de la cadena de transporte electrónica y el complejo V, una ATP sintasa (Youle & Narendra, 2011).

Recientemente ha habido un cambio de paradigma en cuanto a la forma en la que estos complejos se organizan, pues ya no son considerados como enzimas aisladas que se encuentran distribuidas de forma independiente en la membrana mitocondrial interna (modelo de mosaico fluido), sino que cada vez hay una evidencia más fuerte que defiende que los complejos se asocian en diferentes ensamblajes supramoleculares, conocidos como supercomplejos o respirasomas (Barrientos & Ugalde, 2013).

En levaduras se han descrito tres supercomplejos: el supercomplejo mitocondrial deshidrogenasa (formado por Ndi1, Nde1 y Nde2 asociadas con otras NADH deshidrogenasas), el supercomplejo citocromo bc_1 -COX, que presenta dos formas predominantes (III_2 - IV_2 y III_2 - IV) y el complejo dimérico/oligomérico F_1F_0 -ATP sintasa (Stuart, 2008). En mamíferos, la mayor diferencia es debida a que el complejo I forma supercomplejos con los complejos III y IV (Vartak *et al.*, 2013). La dinámica de ensamblaje de estos supercomplejos, ha sido propuesta como un mecanismo a través del cual las células pueden adaptarse a variaciones en las fuentes de carbono, y pueden adaptar la ECT a los requerimientos específicos de cada tipo celular (Lapiente-Brun *et al.*, 2013). La formación de estos supercomplejos se ha propuesto como un mecanismo dinámico que confiere ciertas ventajas a la célula, como la mejora de la transferencia de los electrones a través de la canalización del sustrato, aumenta la prevención de ROS y ayuda en el ensamblaje y estabilización del complejo I (Barrientos & Ugalde, 2013). A pesar de los grandes esfuerzos que se están realizando en este campo, la función concreta, el grado de interacción y las proteínas que colaboran en la formación de estos supercomplejos todavía no se conocen, así como, tampoco su papel en la patología de varias enfermedades humanas donde estos supercomplejos resultaban alterados (Vartak *et al.*, 2013).

1.3. Adaptación a estrés de la mitocondria.

El estrés celular consiste en cualquier cambio en el entorno celular, que impide que las condiciones de crecimiento sean óptimas y en consecuencia se deben desencadenar una serie de mecanismos de percepción y respuesta que permitan la adaptación, crecimiento y la supervivencia de las células. Los cambios en el medio externo a través de factores como la temperatura, la osmolaridad, el pH, la presencia de nutrientes o de agentes tóxicos, entre otros, pueden alterar la homeostasis celular impidiendo que las funciones celulares puedan desarrollarse correctamente. En estas condiciones, la célula es capaz de percibir estos cambios ambientales y responder a estos activando distintas vías de señalización. En última instancia, esta señalización celular va a provocar cambios en la expresión génica, activando los mecanismos de adaptación de la célula y desencadenando cambios en la fisiología celular que permitan la supervivencia.

La mitocondria es la principal fuente de estrés oxidativo en la célula debido a la producción de ROS durante la fosforilación oxidativa. En condiciones fisiológicas, el metabolismo aeróbico de las células produce ROS, tales como, el anión superóxido, el radical hidroxilo y el peróxido de hidrogeno. Aproximadamente entre 1-2% del Oxígeno consumido durante la respiración aeróbica es reducido incompletamente a estas ROS (estimación obtenida *in vitro*) (Murphy, 2009). La producción de estas ROS ocurre principalmente en dos puntos concretos de la ECT, el Complejo I y el III. El Complejo III es el principal productor de ROS en condiciones normales. Las ROS provocan daños en las proteínas, el DNA y los lípidos en el interior de la mitocondria, y los daños en el mtDNA que no sean reparados se traducen en la generación de complejos respiratorios defectuosos, los cuales a su vez incrementan la

producción de ROS, creando un ciclo vicioso de daño mitocondrial y celular que puede producir la apoptosis (Bhat *et al.*, 2015).

Para poder lidiar con este estrés oxidativo, las células han desarrollado diferentes sistemas de defensa antioxidante formados por enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa que actúan junto a diversas moléculas antioxidantes como el ascorbato, el α -tocoferol y el glutatión. Sin embargo, a pesar de este sistema en determinadas condiciones patológicas o debido a factores ambientales, una fracción de las ROS puede escapar y provocar daños en el DNA y el resto de biomoléculas, afectando a las funciones celulares y conduciendo al envejecimiento y enfermedad (Wei *et al.*, 2001).

Los daños en mtDNA provocados por este estrés oxidativo producen alteraciones en la ECT, provocando una deficiencia energética y pudiendo causar enfermedades neurodegenerativas. Se ha visto que las disfunciones mitocondriales presentan un papel muy importante en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas que están relacionadas con la edad, como el Alzheimer, el Parkinson o la esclerosis lateral amiotrófica (Federico *et al.*, 2012).

A pesar de todo lo mencionado anteriormente, las ROS también presentan un papel en la fisiología celular, pues pueden actuar como moléculas anti-microbianas y de señalización en el sistema inmune, y también están relacionadas con la regulación de la autofagia (Dan Dunn *et al.*, 2015). Recientemente también se ha observado como las ROS tienen un papel crucial no sólo en la inmunidad celular, sino también en la regulación de diferentes mecanismos metabólicos, de modificaciones postraduccionales y de defensa antioxidante (Bhat *et al.*, 2015).

1.4. La levadura como modelo de estudio de la mitocondria.

La secuenciación del genoma completo de *S. cerevisiae* se completó en 1995 y la primera colección de mutantes de delección de genes estuvo disponible en el año 2002. Sin embargo, este organismo ya fue propuesto para el estudio de la mitocondria mucho antes, gracias a su habilidad para sobrevivir a mutaciones en el sistema OXPHOS en presencia de azúcares fermentables (Ephrussi & Slonimski, 1955). Esto es debido a la capacidad de *S. cerevisiae* de activar y desactivar la respiración, en respuesta a cambios en la fuente de carbono que se encuentra disponible en el medio, gracias a su capacidad fermentativa. Esta levadura es capaz incluso de sobrevivir a mutaciones que inactivan la fosforilación oxidativa y presenta la habilidad de tolerar la completa pérdida de mtDNA (Lasserre *et al.*, 2015). De esta forma, podemos estudiar mutaciones patogénicas que causen una disfunción mitocondrial simplemente haciendo un ensayo de crecimiento en presencia de fuentes de carbono no fermentables, y viendo si la levadura es capaz de crecer o no (Baile & Claypool, 2013). Además estos cambios metabólicos también afectan a la morfología mitocondrial, pudiendo ver un aumento del entramado mitocondrial en función de la fuente de carbono disponible.

Debido a que las funciones mitocondriales están en general altamente conservadas entre humanos y *S. cerevisiae*, las levaduras son un modelo excelente para el estudio de las enfermedades mitocondriales, proporcionando información tanto de los procesos fisiológicos como de los patológicos (Baile & Claypool, 2013).

S. cerevisiae se ha utilizado para el estudio de enfermedades mitocondriales producidas por mutaciones en el mtDNA, debido a la facilidad de obtener poblaciones homoplásmicas, en

las cuales todas las moléculas de mtDNA presentan la mutación de interés (Lasserre *et al.*, 2015). Este organismo también permite estudiar enfermedades mitocondriales cuyo origen se encuentra en el genoma nuclear, como por ejemplo defectos en el mantenimiento del mtDNA debido a mutaciones en el gen POLG1, el cual se encuentra en el núcleo y codifica para la polimerasa gamma (pol g), la única replicasa que se encuentra en la mitocondria y que es imprescindible para la correcta replicación y reparación del mtDNA (Szczepanowska & Foury, 2010). Incluso se ha generado un modelo en levadura para el estudio de la función de Parkina y sus potenciales mecanismos de patogenicidad (Pereira *et al.*, 2015).

El modelo de levadura también nos permite estudiar el proceso de envejecimiento, en el cual se ha podido determinar el papel fundamental que desempeña la mitocondria. *S. cerevisiae* nos ha permitido descubrir una compleja red que relaciona muchas funciones mitocondriales con el envejecimiento, y nos ha mostrado mecanismos fisiológicos y genéticos capaces de aumentar la vida media en este modelo y que pueden ser compartidos con otros organismos más complejos (Barros *et al.*, 2010).

A pesar de todo, no podemos perder de vista que se trata de un organismo unicelular y por lo tanto es un modelo muy sencillo, cuyos resultados son limitados a la hora de trasladarlos a organismos más complejos como los humanos. Es por ello que a la hora de poder dilucidar los mecanismos moleculares de las patologías que estudiemos con este modelo, siempre va a ser necesario hacer un escalado con modelos animales y células humanas, para que este conocimiento pueda llegar a la clínica. Pero esto, no ha impedido que *S. cerevisiae* haya demostrado su potencial como modelo de estudio mitocondrial y la patogenicidad que va asociada.

2. La mitofagia.

Como ya se ha descrito, las mitocondrias presentan un papel fundamental en la supervivencia celular y están involucradas en muchos procesos celulares esenciales. La acumulación de mitocondrias disfuncionales se ha podido observar en varias enfermedades como el cáncer o varios desordenes neurodegenerativos, y también se produce durante el envejecimiento. Esto hace evidente que debe existir algún mecanismo que controle la calidad mitocondrial en la mayoría de células eucariotas. Uno de los más importantes es la mitofagia, una forma selectiva de autofagia que elimina las mitocondrias superfluas o dañadas (Müller *et al.*, 2015).

La autofagia es un proceso catabólico donde proteínas y orgánulos que se encuentran dañados o que no son necesarios para el metabolismo celular, son transportados hasta los lisosomas en mamíferos o a la vacuola en levaduras, a través de su encapsulación en una estructura de doble membrana conocida como autofagosoma (Youle & Narendra, 2011). Este proceso se activa en respuesta a estrés, ayuno o infección y consta de varios pasos: 1) nucleación y extensión de una membrana en una estructura en forma de U que delimita una porción de citosol, 2) cierre del autofagosoma en un compartimento cerrado y delimitado por una doble membrana, 3) fusión del nuevo compartimento con lisosomas/vacuolas y 4) digestión de la membrana interna del autofagosoma y de su contenido (Alberts *et al.*, 2008). Existen tres tipos de autofagia: la macroautofagia, que ocurre mediante autofagosomas, la microautofagia, donde los componentes a degradar son secuestrados directamente por la invaginación de la membrana lisosomal o vacuolar; y la autofagia mediada por chaperonas, en

la que estas reconocen y translocan ciertas proteínas, y únicamente se ha descrito en eucariotas superiores. Dentro de la macroautofagia se han descrito dos tipos: la no selectiva, que se produce en ausencia de nutrientes para proporcionar la energía y las moléculas necesarias para la supervivencia; y la selectiva, en la cual se eliminan específicamente orgánulos dañados o agregados proteicos que puedan llegar a ser tóxicos (Youle & Narendra, 2011). La mitofagia es por lo tanto un proceso selectivo, pues únicamente se elimina este orgánulo y es temporalmente distinto a la autofagia no selectiva, sin embargo, es funcionalmente dependiente de la maquinaria del proceso no selectivo, siendo necesarios la mayoría de genes ATG (AuTophagy related) que participan en la autofagia general (Eiyama *et al.*, 2013).

2.1 La mitofagia en levaduras.

En *S. cerevisiae* se conocen pocos mecanismos para inducir la mitofagia, y en todos los casos esta es inducida simultáneamente junto con la autofagia no selectiva. Para inducir la mitofagia, se suele recurrir a crecer las células en medios con fuentes de carbono no fermentables y llevarlas hasta la fase estacionaria, someter a las células a condiciones de ayuno (principalmente de nitrógeno) o también se ha utilizado la rapamicina para inhibir el complejo TOR (Kanki *et al.*, 2015). Dos grupos independientes realizaron un rastreo genómico de mutantes, con la intención de identificar los genes que eran esenciales para la mitofagia, y ambos determinaron *ATG11* y *ATG32* como genes importantes para la degradación mitocondrial (Okamoto *et al.*, 2009)(Kanki *et al.*, 2009).

Atg32 fue identificada como la primera proteína específica de mitofagia que no era necesaria para la autofagia no selectiva, u otras formas de autofagia selectiva. Esta proteína presenta un dominio transmembrana, localizado en la membrana externa, con el dominio N-terminal orientado hacia el citosol. Presenta dos residuos de serina, Ser-114 y Ser-119, en el dominio citosólico, que son fosforilados cuando la mitofagia es inducida (Müller *et al.*, 2015). *Atg32* participa en el reclutamiento de la maquinaria autofágica, sin embargo su pérdida no afecta a los niveles de ROS celular, ni al crecimiento a partir de fuentes de carbono no fermentables, lo que implica que deben existir otras rutas de control de la calidad independientes de las mediadas por *Atg32* (Ashrafi & Schwarz, 2013).

Atg32 es el receptor de *Atg11*, una proteína adaptadora, que interacciona con proteínas receptoras específicas que actúan como cargamento del autofagosoma, y son reclutadas en el sitio de ensamblaje del fagóforo (PAS) (Müller *et al.*, 2015). Las modificaciones postraduccionales que sufre *Atg32* son dependientes de dos rutas de señalización MAPK, *Wsc1-Pkc1-Bck1-Mkk1/2-Slt2* y *Ssk1-Pbs2-Hog1*, que son importantes para el proceso de mitofagia en levaduras, sin embargo, la fosforilación de los residuos de serina es producida por acción de la casein kinasa-2 (CSK2). Esta fosforilación estabiliza la interacción de *Atg32-Atg11*, lo que permite el ensamblaje del core de proteínas *Atg*, seguido de la formación del autofagosoma y produciendo la degradación mitocondrial en última instancia (ver figura 2) (Liu *et al.*, 2014).

Atg32 posee un motivo WXXL (AIM) en el dominio citosólico, capaz de interactuar con *Atg8*, que es el componente central de la maquinaria autofagosomal. Esta interacción también es dependiente de fosforilación. De esta forma *Atg32* puede interactuar con *Atg8*

indirectamente a través de Atg11 o directamente a través del motivo AIM (Müller *et al.*, 2015). Esta interacción, aunque no es absolutamente necesaria para la mitofagia (Liu *et al.*, 2014), puede facilitar la formación de los autofagosomas conectando la Atg32 mitocondrial con la cara cóncava del autofagosoma, donde Atg8-PE-Atg12-Atg5-Atg16 forman una arquitectura en forma de malla (Kanki *et al.*, 2015).

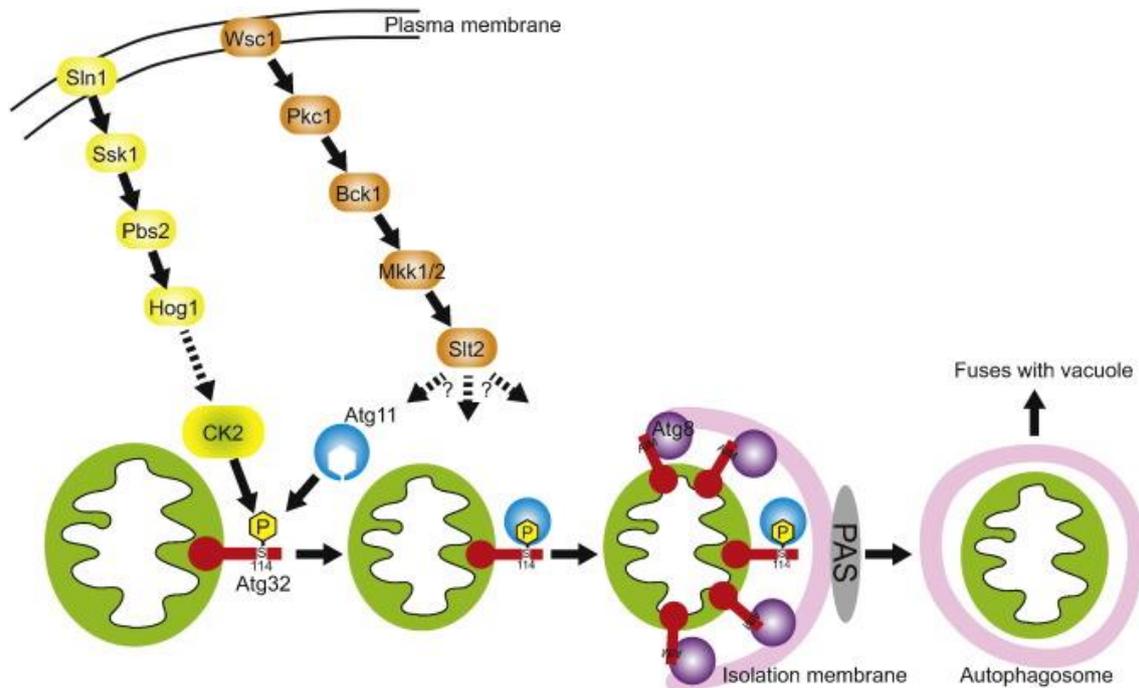


Figura 2. Mecanismo molecular de la mitofagia en levaduras. Los sensores celulares de superficie, Sln1 y Wsc1, detectan el estímulo de mitofagia y activan las rutas de señalización de Hog1 y Stl2. Después se produce la activación de CK2, que fosforila las Ser-114 y la Ser-119 en Atg32. Atg11 interacciona con Atg32 dependiendo de la fosforilación de estas serinas. Atg11 recluta la mitocondria al sitio de ensamblaje del fagóforo (PAS) donde el autofagosoma se genera y engulle a la mitocondria. En la región PAS Atg32 interacciona con Atg8, a través del motivo AIM, lo que facilita la formación del autofagosoma. Los factores que actúan por debajo en la señalización de Stl2 no han sido identificados todavía. (Liu *et al.*, 2014).

Otros autores han demostrado que Atg17, Atg29 y Atg31 son esenciales en el proceso de mitofagia ante ayuno, formando un complejo adaptador entre Atg11 y el complejo proteína quinasa Atg1-Atg13, que colabora en la formación del autofagosoma (Eiyama *et al.*, 2013).

La principal cuestión que queda por resolver es si la mitofagia en levaduras se activa para eliminar mitocondrias disfuncionales y contribuye en el control de la calidad mitocondrial. En las células de mamífero se ha comprobado como la acumulación de mitocondrias disfuncionales induce mitofagia, sin embargo, en las levaduras, aunque está claro que la mitofagia elimina selectivamente la mitocondria, no existe evidencia experimental que apoye esta hipótesis (Kanki *et al.*, 2015).

2.2 La mitofagia en mamíferos.

La mitofagia en células eucariotas ocurre bajo determinadas condiciones fisiológicas, que podemos agrupar en dos categorías: la mitofagia relacionada con los controles de calidad mitocondrial y la mitofagia inducida durante el desarrollo (ver figura 3) (Dengjel & Abeliovich, 2017). Esta mitofagia parece presentar un mecanismo y una regulación específica, donde no

encontramos homólogos para algunas proteínas imprescindibles en la mitofagia en levadura como Atg32.

Los receptores de la mitofagia en mamíferos, están localizados en la membrana externa mitocondrial y presentan la secuencia W/F/YxxL/I que media la interacción con LC3 (ortólogo de Atg8) para la autofagia selectiva. Existen dos familias de receptores NIX (o BNIP3L) y BNIP3, y FUNDC1 (Liu *et al.*, 2014).

En la mayoría de los mamíferos, los eritrocitos maduros pierden sus mitocondrias debido a la mitofagia que se produce en las células inmaduras conocidas como reticulocitos. Este proceso está mediado por NIX, que es un regulador de la apoptosis y de la necrosis. Como ya hemos mencionado esta proteína presenta un dominio LIR capaz de interactuar con LC3 y con la proteína asociada al receptor GABA (GABARAP). Esta interacción produce el reclutamiento de membranas aisladas que engloben a la mitocondria y media la unión de la mitocondria al autofagosoma (Youle & Narendra, 2011).

Estas proteínas también están relacionadas con la inducción de la mitofagia por hipoxia, posiblemente mediante su interacción con Rheb, una pequeña GTPasa de la superfamilia de RAS, que promueve la mitofagia en células con una alta activación de la fosforilación oxidativa (Melser *et al.*, 2013). El receptor FUNDC1 también parece estar relacionado con la inducción de la mitofagia por hipoxia, mediante su desfosforilación en respuesta a un estrés hipóxico o a la pérdida del potencial de membrana. La desfosforilación de FUNDC1 aumenta la afinidad por LC3, permitiendo el reclutamiento específico del autofagosoma y eliminando la mitocondria afectada (Liu *et al.*, 2014).

La ruta mitofágica de control de calidad está mediada por dos proteínas: PINK1, una quinasa de la membrana mitocondrial externa, y parkina, una E3 ubiquitina ligasa citosólica. Mutaciones en los genes que codifican estas proteínas han sido relacionadas con la enfermedad del Parkinson. PINK1 actúa como un sensor de daño mitocondrial, que en condiciones fisiológicas es importado al interior mitocondrial y es rápidamente degradado por proteólisis, manteniéndose en niveles muy bajos. Sin embargo cuando se produce el daño mitocondrial la proteólisis es inhibida y se produce la acumulación de PINK1 solamente en las mitocondrias dañadas (Youle & Narendra, 2011). La estabilización de PINK1 induce la translocación de parkina, que una vez reclutada es fosforilada por PINK1, activándola y produciendo la ubiquitinización de numerosas proteínas mitocondriales. Las cadenas de ubiquitinas actúan como señales moleculares que reclutan la maquinaria autofágica y promueven la formación del autofagosoma (Nguyen *et al.*, 2016). Entre las proteínas que se ubiquitan, encontramos la mitofusina 1 y la 2, lo que puede explicar la incapacidad de las mitocondrias despolarizadas a fusionarse con otras sanas (Dengjel & Abeliovich, 2017).

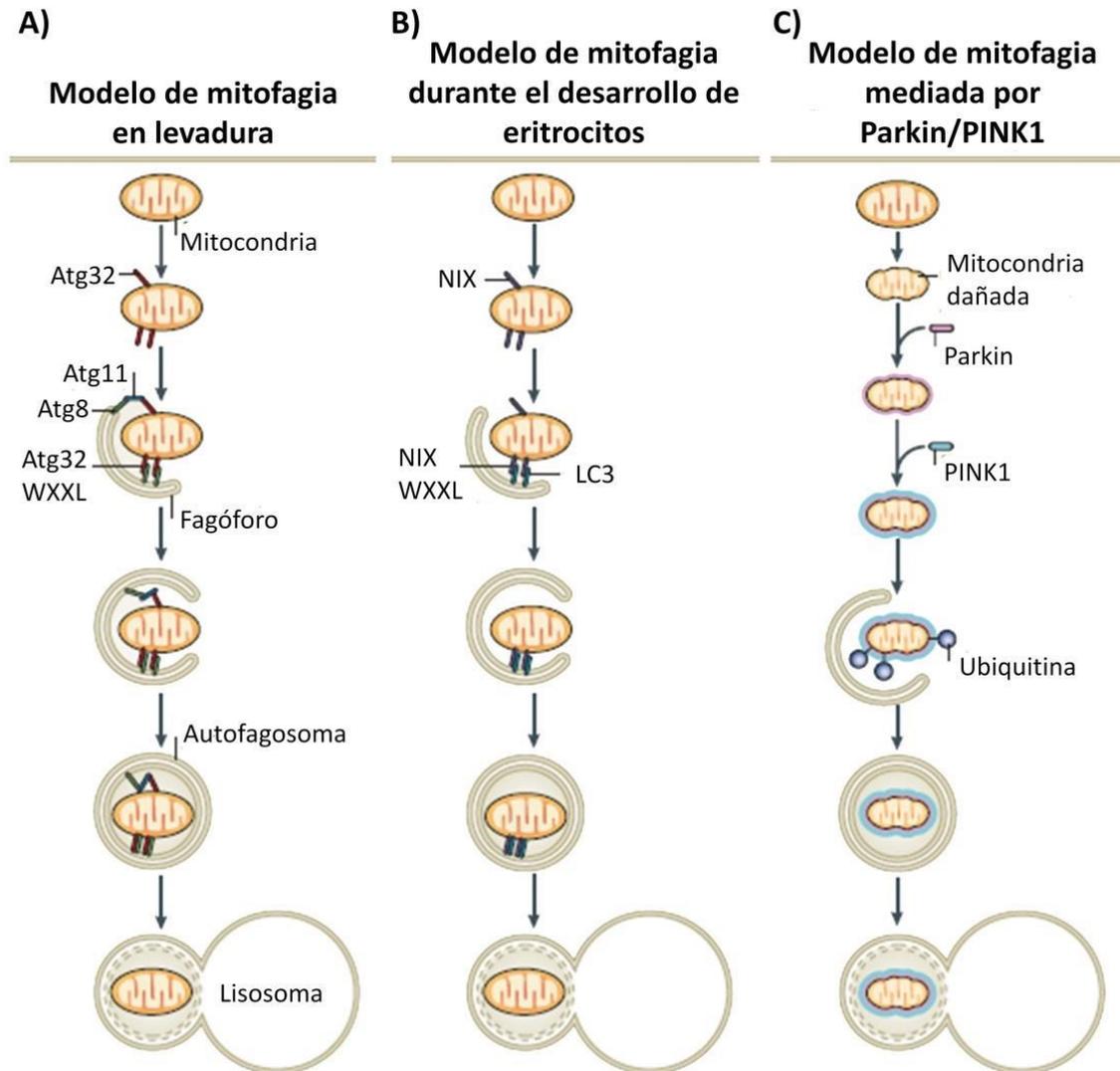


Figura 3. Rutas de mitofagia en levaduras y mamíferos. La mitofagia requiere el etiquetado específico de la mitocondria y su reclutamiento en membranas de aislamiento (fagóforos). A) Modelo en levadura. Atg32 es el receptor de membrana que se une a Atg8 mediante su motivo WXXL. Atg11 interacciona con Atg32 y Atg8 conectando el fagóforo y la mitocondria. Finalmente, se cierra la membrana entorno a la mitocondria, formando el autofagosoma, que se une a la vacuola para su degradación. B) Modelo en el desarrollo de eritrocitos. Durante su diferenciación, los glóbulos rojos pierden sus mitocondrias expresando NIX en la membrana mitocondrial. Éste se une a LC3 de la membrana del fagóforo para eliminar la mitocondria. C) Modelo mediado por Parkina/PINK1. Ante un fallo en el potencial de membrana de la mitocondria, PINK1 se acumula en la membrana externa y recluta a Parkina, la cual ubiquitina las proteínas mitocondriales y provoca la encapsulación. Imagen modificada de Youle and Narendra, 2011.

OBJETIVOS

En el modelo experimental de levadura se han identificado los mecanismos de mitofagia exclusivamente en condiciones de ayuno, que induce la degradación masiva y no selectiva de la mitocondria. Queda por determinar si existen vías mitofágicas en levadura que respondan a una disfunción mitocondrial y en general, no se sabe si se pueden eliminar complejos mitocondriales dañados por mitofagia de forma más selectiva. El objetivo de este trabajo es profundizar en los mecanismos de la homeostasis mitocondrial tratando de comprender como funciona y que componentes están implicados. Para cumplir este objetivo general se han desarrollado dos objetivos específicos en el modelo experimental de levadura:

1. Estudiar la estabilidad de los complejos mitocondriales de la cadena respiratoria II, III y V en respuesta a condiciones de elevada tasa de respiración.
2. Estudiar la importancia del proceso de autofagia en respuesta a daño mitocondrial y su impacto a la generación de ROS intracelular.

MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Material biológico y condiciones de crecimiento.

1.1 Cepas y condiciones de crecimiento de levadura.

Las cepas de *S. cerevisiae* empleadas para los experimentos se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas. En la tabla se muestran las cepas de levadura empleadas en este trabajo junto a su genotipo y procedencia.

<i>Cepa</i>	<i>Genotipo</i>	<i>Procedencia</i>
BY4741	<i>MATα; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i>	Euroscarf
Mutantes de delección		
<i>Δatg1</i>	BY4741 <i>atg1::KANMX4</i>	Euroscarf
<i>Δatg7</i>	BY4741 <i>atg7::KANMX4</i>	Euroscarf
<i>Δatg8</i>	BY4741 <i>atg8::KANMX4</i>	Euroscarf
<i>Δatg9</i>	BY4741 <i>atg9::KANMX4</i>	Euroscarf
<i>Δatg11</i>	BY4741 <i>atg11::KANMX4</i>	Euroscarf
<i>Δatg32</i>	BY4741 <i>atg32::KANMX4</i>	Euroscarf
Cepas con el epítipo-TAP		
SDH1-TAP	BY4741 <i>SDH1-TAP-His3MX</i>	Ghaemmaghami <i>et al.</i> , 2003
SDH2-TAP	BY4741 <i>SDH2-TAP-His3MX</i>	Ghaemmaghami <i>et al.</i> , 2003
SDH3-TAP	BY4741 <i>SDH3-TAP-His3MX</i>	Ghaemmaghami <i>et al.</i> , 2003
COR1-TAP	BY4741 <i>COR1-TAP-His3MX</i>	Ghaemmaghami <i>et al.</i> , 2003
QCR2-TAP	BY4741 <i>QCR2-TAP-His3MX</i>	Ghaemmaghami <i>et al.</i> , 2003
CYT1-TAP	BY4741 <i>CYT1-TAP-His3MX</i>	Ghaemmaghami <i>et al.</i> , 2003
ATP1-TAP	BY4741 <i>ATP1-TAP-His3MX</i>	Ghaemmaghami <i>et al.</i> , 2003
ATP3-TAP	BY4741 <i>ATP3-TAP-His3MX</i>	Ghaemmaghami <i>et al.</i> , 2003
ATP5-TAP	BY4741 <i>ATP5-TAP-His3MX</i>	Ghaemmaghami <i>et al.</i> , 2003

Las células de levadura fueron cultivadas según métodos estándar (Holz *et al.*, 2003) y crecidas en medio rico YPD o medio mínimo SD a 28°C en agitación a 180 rpm. El medio YPD está compuesto por glucosa (2%, m/v), peptona bacteriológica (2%, m/v) y extracto de levadura (1%, m/v). El medio SD contiene glucosa (2%, m/v), *yeast nitrogen base* (YNB, 0,7%, m/v) y ácido succínico (50 mM) a pH 5,5 ajustado con Tris. Este medio es utilizado para la selección de cepas mediante auxotrofías. Para ello se suplementan los aminoácidos necesarios, como histidina (100 μ g /mL), leucina (100 μ g /mL) y metionina (100 μ g /mL).

En ambos medios se añadió agar bacteriológico (2%, m/v) en los casos en los que se requería de medios sólidos. Cuando se necesitaba comparar condiciones con fuentes de carbono distintas a la glucosa, esta fue reemplazada por galactosa (2%, m/v) o glicerol (3%, v/v)/etanol (3%, v/v).

1.2 Plásmidos utilizados.

El plásmido empleado en este trabajo se utilizó para introducir construcciones génicas en las cepas de levadura. Este plásmido es el pVT100U-mtRosella que presenta resistencia a ampicilina y contiene el gen *URA3* (Rosado *et al.*, 2008).

2. Ensayos de sensibilidad.

2.1 Ensayos de crecimiento en medio líquido.

La densidad óptica (OD) de los cultivos de levadura se utilizó como medida para cuantificar la capacidad de crecimiento de las células en medio líquido a lo largo del tiempo (Burke *et al.*, 2000), donde una OD = 1 equivale a 1 mg de peso fresco de levadura en 1 mL. Se partió en todos los casos de cultivos celulares saturados, diluidos 1:5 en los diferentes medios estudiados. Este ensayo se ha utilizado para conseguir unas condiciones de cultivo específicas, donde las levaduras se encuentran en la fase exponencial de su crecimiento (OD entre 1,5-2), para poder realizar posteriores experimentos en estas condiciones. La OD se analizó en el *BioPhotometer Plus* de Eppendorf a una longitud de onda de 595 nm.

2.2 Ensayos de crecimiento en medio sólido (Droptest).

Este ensayo se utilizó para comparar el crecimiento de distintos mutantes (*Δatg1*, *Δatg7*, *Δatg8*, *Δatg9*, *Δatg11* y *Δatg32*) frente a crecientes concentraciones del antibiótico valinomicina (Sigma, stock a 1 mM en DMSO), que es utilizado para inducir daño mitocondrial y la mitofagia. Se partió de cultivos saturados en medio líquido y se realizaron diluciones seriadas (1:10, 1:100, 1:1000) de cada mutante, para cada concentración de valinomicina, en una placa de 96 pocillos; y con ayuda de un replicador manual (Sigma), se depositó una gota de cada dilución en las placas con medio sólido de YPD. Las placas se incubaron entre 1 y 3 días a 28°C, haciendo réplicas cada 22 horas aproximadamente. En el análisis se tuvo en cuenta tanto el diámetro de la colonia como la dilución a la que se observaba el crecimiento.

3. Extracción de plásmidos de bacteria.

El DNA plasmídico de bacteria se obtuvo a partir de cultivos de 3 mL mediante el sistema NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel). Se aplicó el protocolo recomendado por el fabricante. La cuantificación del DNA obtenido se llevó a cabo con el aparato *NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific).

Con el fin de determinar que la extracción funcionó correctamente se realizó la digestión del plásmido extraído para confirmar que presentaba el tamaño esperado. Para ello se incubó durante toda la noche una mezcla compuesta por: DNA plasmídico (10%, m/v), tampón EcoRI 10x (10%, v/v), agua miliQ (77,5%, v/v) y enzima EcoRI (2,5%, m/v). La digestión se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa (50mL tampón TAE (40 mM Tris-acetate, 10 mM EDTA), 0.5 g de agarosa).

4. Transformación de levadura.

La transformación de levadura se realizó mediante el método del acetato de litio modificado (Gietz *et al.*, 1995). Se partió de un cultivo de levadura con una OD₅₉₅ = 0,7-1,2 y se centrifugaron a 1500 rpm durante 3 min. Se lavaron una vez con agua estéril y otra con

tampón LiTE 1X (Acetato de litio (0.1 M) en tampón TE (10 mM Tris/HCl pH 7.6, 1 mM EDTA)). Se resuspendieron las células en 0,5 mL de LiTE 1X y se incubaron 15 min a 30°C para hacerlas competentes. Posteriormente se añadieron 3 µL de DNA plasmídico a 60 µL de células competentes y 300 µL de LiTE/PEG4000 (40% v/v). Se realizó un vórtex de la mezcla y se incubó durante 30 min a 30°C. Después la muestra se sometió a un choque térmico a 42°C durante 20 min, para permitir la entrada del DNA en las células. Por último se lavaron las células de nuevo y se sembraron en placas con medio selectivo, incubándolas a 30°C durante 1-2 días.

5. Manipulación y análisis de proteínas.

5.1 Obtención de extractos proteicos totales.

Los extractos proteicos se obtuvieron mediante el método de hervido de Laemmli. El tampón Laemmli 5x está compuesto por Tris/HCl pH 6,8 (0,3 M), SDS (7,5%, m/v), DTT (0,1 M), EDTA (10 mM), sacarosa (30%, m/v) y azul de bromofenol (0,25 mg/mL). Las células se crecieron durante la noche hasta alcanzar una OD = 1-2. Se transfirió el mismo número de células (10 mL aprox.) de cada cultivo a tubos falcon de 15 mL y se centrifugaron a 3000 rpm durante 3 min. Después se realizó un lavado con agua y se resuspendieron las células en 150 µL de tampón Laemmli 2x, hirviendo las muestras 5 min a 95°C con el fin de desnaturalizar las proteínas que mejorar la unión al colorante.

5.2 Electroforesis de proteínas.

La electroforesis de proteínas se realizó mediante el sistema *Mini Protean 3* (BioRad), utilizando geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), para que la movilidad electroforética dependiera únicamente del peso molecular de las proteínas. Los geles presentaban dos partes: el *resolving gel*, donde las proteínas corren en función de su peso molecular (parte de abajo) y el *stacking gel*, donde las proteínas se concentran en una fina línea antes de entrar en la zona de separación (parte de arriba). La composición de la capa de empaquetamiento es de: 1 mL de acrilamida/bisacrilamida 29:1 (40%, m/v), 5 mL tampón *Stacking 2x* (Tris/HCl (0,25 M) pH 6.8, SDS (0,2%, m/v)), 4 mL de agua miliQ, 5 µL de TEMED y 100 µL de APS (10%, m/v). Y la del gel de separación es: 2 mL de acrilamida/bisacrilamida 29:1 (40%, m/v), 5 mL tampón *Resolving 2x* (Tris/HCl (0,75 M) pH 8.8, SDS (0,2%, m/v)), 3 mL de agua miliQ, 5 µL de TEMED y 100 µL de APS (10%, m/v). La electroforesis tuvo lugar a una diferencia de potencial constante de 80 V durante 30 min y posteriormente de 100 V durante 2 horas, utilizando el tampón de resolución SDS-PAGE 1x (glicina (0,19 M), SDS (0,1%, m/v) a pH 8,3 ajustado con Tris). Las muestras (apartado 5.1) fueron inyectadas en el gel junto a un marcador de pesos moleculares (*PageRuler™ Prestained Protein Ladder*, Fermentas).

5.3 Transferencia de las proteínas a membranas de PVDF y tinción de proteína total.

Las proteínas deben ser transferidas a membranas para que sean más accesibles a la hora de realizar la inmunodetección con anticuerpos. Las membranas utilizadas fueron *Immunoblot® PVDF* 0,45µm (Amersham™ Hybond™, GE Healthcare) y las proteínas se transfirieron mediante corriente eléctrica con el sistema *Mini-Trans Blot* (BioRad). Para la transferencia se obtuvo el gel de electroforesis y se eliminó el gel de empaquetamiento, utilizando el gel de separación para formar el "sándwich" de transferencia, compuesto de: dos esponjas, dos rectángulos de papel de filtro, la membrana de PVDF y el gel (ver figura 4).

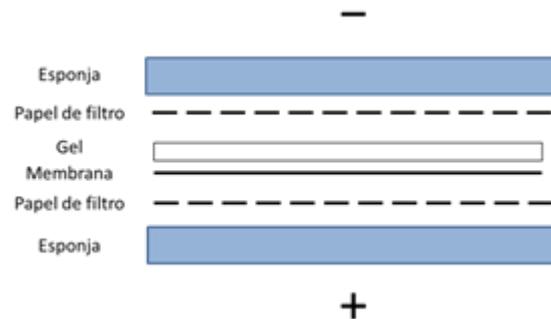


Figura 4. Esquema de la estructura de la transferencia proteica.

El tampón de transferencia estaba compuesto por SDS-PAGE 1x y metanol (20%, v/v), que rompe el complejo SDS-proteína y permite su unión a la membrana. La transferencia se realizó aplicando una diferencia de potencial constante de 10 V a 4°C, durante toda la noche.

La tinción de las membranas se realizó para analizar la cantidad de proteína total que presentaba la muestra y comprobar la eficiencia de la transferencia. Para ello se utilizó el colorante *DirectBlue 71* (DB71), que presenta una elevada afinidad, no específica por las proteínas. Las membranas de PVDF se sumergieron en la solución de tinción de DB71 (0,008%, w/v) durante 5 min en agitación, y posteriormente en la solución de lavado (etanol absoluto (40%, v/v), ácido acético glacial (10%, v/v), agua destilada (50% v/v)) otros 5 min. Tras escanear la membrana, en caso de ser necesitada, se incubó 15 min con la solución de desteñido (etanol absoluto (50%, v/v), bicarbonato sódico (1 M) (15%, m/v), agua destilada (35%, v/v)).

5.4 Detección inmunológica de proteínas (*Western Blot*) y cuantificación.

Para realizar la inmunodetección lo primero que se realizó fue el bloqueo de la membrana para evitar la unión inespecífica del anticuerpo primario utilizando una solución de bloqueo (TBS 1x (NaCl (1,5 M), Tris/HCl (0,2 M) a pH 7.6), leche desnatada en polvo (2%, m/v)), con el que se incubó la membrana durante 30 min. A continuación se incubó la membrana con el anticuerpo primario específico α -PAP (Sigma) en una solución diluida 1:10000 en la solución de bloqueo, durante 1 hora. Tras la incubación se realizaron tres lavados de la membrana de 5 min, dos con la solución de bloqueo y la última con tampón TBS 1x, para eliminar el exceso de anticuerpo primario. Por último se incubó la membrana con el anticuerpo secundario α -HRP-conejo (Sigma), también diluido 1:10000 en tampón TBS 1x, durante 1 hora; y se realizaron dos lavados más con TBS 1x.

Para la detección se utilizó el sistema *ECL Prime Western Blotting Detection* (GE Healthcare – Amersham Bioscience) y la señal de quimioluminiscencia se obtuvo de forma

electrónica mediante la cámara LAS-3000 (Fujifilm). El procesamiento de las imágenes y la cuantificación de la intensidad de la señal se realizaron con el programa Fiji (ImageJ).

5.5 Análisis de la degradación proteica.

Para este experimento se utilizó la cicloheximida (Sigma), un inhibidor de la síntesis proteica, en condiciones de inducción de la respiración en levaduras. Para ello se crecieron las levaduras hasta una OD = 1-2, y se añadió 50 μL de cicloheximida [50 mg/mL] por cada 10 mL de cultivo a tiempo 0. Se obtuvieron muestras a 0, 30 min y una hora y se procesaron de la siguiente forma: de cada muestra se obtuvo el volumen de cultivo necesario para que todas las muestras contuvieran el mismo número de células; después se añadió 67 μL de NaN_3 (1%, v/v) (para arrestar el metabolismo celular) por cada mL de cultivo. Se centrifugaron las muestras a 3000 rpm durante 3 min y se realizó un lavado con agua; posteriormente se les añadió 100 μL de NaOH (0,2 M) y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. Por último se realizó otra centrifugación a 13000 rpm durante 30 s y se resuspendieron las muestras en Laemmli 2x para poder observar la degradación por *Western Blot*.

6. Análisis de las especies reactivas de oxígeno (ROS).

Para la detección de las ROS, se empleó el compuesto 2',7'-dicloro-dihidro-fluoreceína diacetato ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$, Sigma). Este compuesto solo emite fluorescencia cuando es oxidado, pero para ello se deben eliminar los grupos acetato presentes, para lo que se requieren las enzimas deacetilasas del interior celular.

Para realizar el análisis se crecieron las células hasta una OD = 1-1,5. Una vez las células se encontraban en la fase exponencial se dividió el volumen de cultivo de forma equivalente, usando una parte como control y la otra como tratamiento con valinomicina (1 mM), y se incubaron durante 2 horas a 28°C. Tras el cultivo, para cada condición se tomaron 9 mL de cultivo para el tratamiento con la fluoresceína y 9 mL para el control sin tratamiento (DMSO). Se añadieron 18 μL de cada reactivo respectivamente, y se incubaron las muestras 30 min a 28°C, permitiendo la entrada de la fluoresceína en la célula. Tras esto se dividieron las muestras en 3 tubos eppendorf, añadiendo 1,5 mL y tras centrifugar a 12000 rpm durante 1 min, se añadieron los 1,5 mL restantes. Después se realizó un lavado con agua y se resuspendieron las células en 1 mL de Tris/HCl a pH 7,5 (50 mM), 10 μL de cloroformo y 5 μL de SDS (0,1%, m/v). Se agitó la mezcla con el vórtex durante 30s para romper las células, y se centrifugaron a 13000 rpm durante 3 min. Por último se adicionaron 300 μL de sobrenadante de cada muestra por duplicado en una placa multipocillo negra (Costar) y la fluorescencia se midió en un lector microplacas *Glomax®-Multi Detection System* (Promega), con un filtro de excitación a 490 nm y de emisión a 510-570 nm. El valor obtenido para cada muestra fue normalizado frente al valor obtenido para la muestra control y frente a la OD inicial de cada cultivo.

7. Microscopía confocal.

El microscopio confocal se utilizó para el estudio de la mitofagia y de la morfología mitocondrial. Se empleó el microscopio confocal Zeiss LMS 780 con un objetivo plano acromático 40x acetite/1,3 de apertura numérica. Para la observación se utilizó el plásmido pVT100-ROSELLA [URA3] que contiene los fluoróforos DsRed y pHluorin (ver tabla 2).

Tabla 2. Fluoróforos utilizados en los análisis mediante microscopía confocal. Se muestran las longitudes de onda (λ) de emisión y excitación de los fluoróforos, y el láser empleado para la detección de dichas λ .

Fluoróforo	$\lambda_{emisión}(nm)$	$\lambda_{excitación}(nm)$	Láser utilizado
DsRed.T3	587	543	Argón 514
pHluorin	508	488	Argón 488

Las células fueron crecidas hasta la fase exponencial, para que el número de células no influyese en su comportamiento bajo el microscopio. La mitofagia se observó creciendo las células en medio mínimo SD -N (ver figura 5). Se emplearon también medios con fuentes de carbono distintas de glucosa (galactosa y glicerol/etanol) para inducir una mayor respiración y aumentar la biomasa mitocondrial. En estas condiciones se utilizó el antibiótico valinomicina para inducir la mitofagia y comparar los resultados frente a las condiciones control.

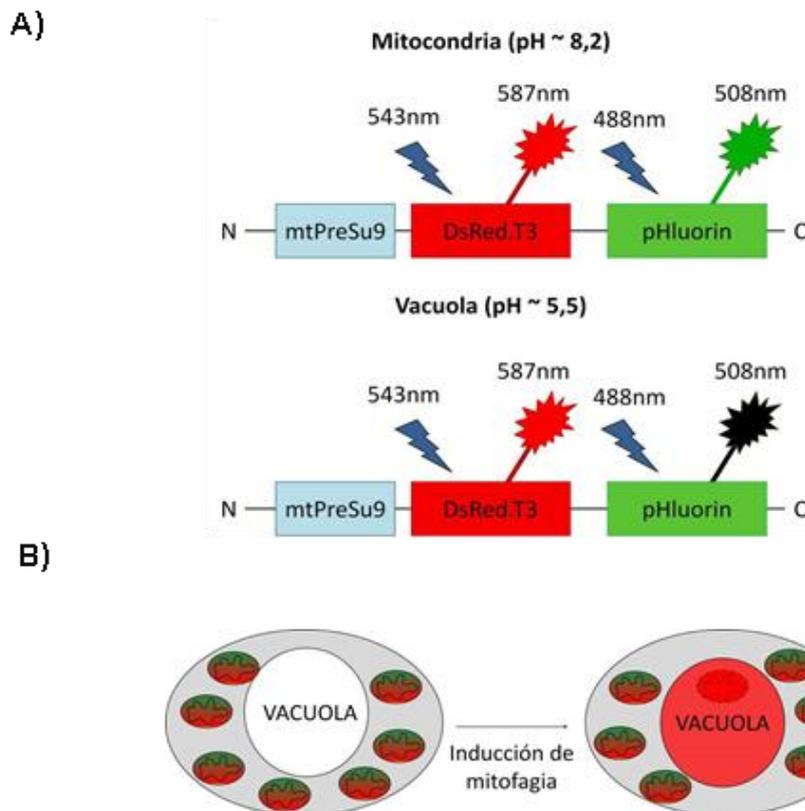


Figura 5. Representación esquemática del sistema mtRosella para la detección de mitofagia mediante microscopía confocal en *S. cerevisiae*. (A) Reportero fluorescente mtRosella, con el péptido de localización mitocondrial de levadura (mtPreSu9) y los fluoróforos rojo DsRed.T3 (resistente a pH) y verde pHluorin (sensible a pH). Se indica la longitud de onda máxima de excitación y emisión para cada fluoróforo en condiciones de pH mitocondrial y vacuolar. El pHluorin deja de emitir fluorescencia cuando la mitocondria es introducida en el interior de la vacuola. (B) Representación esquemática de los resultados esperados antes y después de inducir la mitofagia. Las mitocondrias se detectan mediante fluorescencia verde y roja, antes de la inducción, pero tras ella, las mitocondrias son transportadas a la vacuola, donde únicamente se detectan por fluorescencia roja. Figura modificada de Mijaljica et al., 2011.



8. Análisis estadístico.

Para el análisis de las réplicas se obtuvo la media de las muestras y se calculó la desviación típica de los datos. Para determinar si las diferencias entre dos poblaciones de datos eran estadísticamente significativas se utilizó la prueba *t de Student*, que calcula la diferencia de medias entre dos muestras independientes. Se estimó un valor *p-value* $< 0,05$ como significativo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La mitocondria no solo es la principal productora de energía para la célula, sino que además participa en una gran cantidad de funciones que la hacen indispensable para poder mantener la homeostasis celular. Debido a esto la célula debe asegurar que la mitocondria presente un estado óptimo, ya que en el momento en que la mitocondria empieza a acumular daños, surgen diversas patologías, muchas de las cuales se deben a problemas a nivel de la fosforilación oxidativa (Gorman *et al.*, 2016). Para evitar esta situación la célula presenta varias rutas encargadas de mantener la calidad mitocondrial, entre las que se encuentra la mitofagia, una forma de autofagia selectiva que se encarga de eliminar las mitocondrias dañadas (Ashrafi & Schwarz, 2013). El objetivo de este trabajo pretende por tanto determinar que componentes están involucrados en este proceso en el modelo celular de levadura y que ocurre con las proteínas que forman parte de los complejos mitocondriales de la cadena respiratoria en condiciones que pueden inducir el proceso de la mitofagia.

1. Análisis de los complejos II, III y V de la cadena respiratoria mitocondrial en condiciones que inducen la respiración aeróbica.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de realizar tanto la fermentación como la respiración aeróbica gracias al denominado efecto Crabtree (Verduyn *et al.*, 2015), de forma que la fosforilación oxidativa sólo se activa en ausencia de una fuente de carbono fermentable. Esta característica de la levadura nos permitió estudiar cómo se regulaban las proteínas de los complejos OXPHOS cuando la célula debía adaptarse a condiciones de elevada tasa respiratoria.

Con este objetivo, se analizaron una serie de cepas de *S. cerevisiae* que expresaban proteínas de los complejos de la cadena respiratoria, marcadas específicamente con el epítipo TAP (Ghaemmaghami *et al.*, 2003). En total se analizaron 9 proteínas: Sdh1 (*Succinate DeHydrogenase*), Sdh2 y Sdh3 del complejo II; Cor1 (*CORE protein of QH2 cytochrome c reductase*), Qcr2 (*QH2:cytochrome-C oxidoReductase*) y Cyt1 (*CYTochrome c1*) del complejo III; y Atp1 (*ATP synthase*), Atp3 y Atp5 del complejo F_1F_0 -ATP sintasa (complejo V). Para ello, se realizó una extracción de proteína total, de aquellas cepas de levadura que contenían las proteínas marcadas con el epítipo TAP, en medio rico (YPD) permitiendo la fermentación, y usando fuentes de carbono no fermentables (YPGlic/EtOH) para inducir la respiración aeróbica. Los extractos proteicos se analizaron mediante *Western Blot* para ver cómo se comportaban en cada condición. Se analizaron específicamente los complejos II, III y V debido a que estudios previos de nuestro grupo de investigación habían confirmado que el complejo I sufría una degradación muy evidente frente a altas tasas de respiración, mientras que el complejo IV se mantenía relativamente estable. A pesar de que el resto de complejos también habían sido analizados era necesario profundizar en el comportamiento de sus diferentes subunidades (Timón Gómez, 2016).

De las proteínas analizadas se seleccionaron tres, una en representación de cada complejo, debido a que su detección por *Western Blot* era más clara. Estas proteínas fueron Sdh1, Cor1 y Atp1, como se muestra en la figura 6. Como se observa en dicha figura, las tres proteínas se detectan de forma específica en condiciones de fermentación como una única banda a la altura de la proteína “*full-length*” (Sdh1-70kDa, Cor1-50kDa y Atp1-59kDa, más los

20kDa que supone el epítipo TAP). Solo en el caso de Atp1 se detecta una banda de menor peso molecular ya en condiciones de crecimiento con glucosa. Debido a esto, no podemos determinar que la degradación que se observa al inducir la respiración se deba realmente a dicha condición. Cor1 y Sdh1 demuestran comportamientos diferentes durante el aumento de la tasa de respiración. En el caso de Sdh1, aumenta de forma muy significativa la abundancia de la proteína “full length” y se empiezan a detectar bandas de peso molecular inferior que pueden significar una degradación aumentada de la proteína. Sin embargo, el cambio tan dramático de la abundancia de la proteína, entre ambas condiciones, hace muy difícil decidir si realmente puede haber un cambio en la tasa de degradación de esta proteína. Solo en el caso de Cor1 se puede apreciar un claro aumento de las posibles bandas de degradación con respecto a la forma “full-length” en condiciones de alta respiración. Esto parece indicar que hay un aumento de la expresión, sobre todo de Sdh1, cuando se obliga a la levadura a realizar la respiración aeróbica, y además la degradación, especialmente en la proteína Cor1, parece incrementarse a medida que la función de estas proteínas es requerida.

Sin embargo, a pesar de estos datos no podemos conocer si esta degradación se da únicamente en los complejos mitocondriales que intervienen en la cadena respiratoria, o si por el contrario afecta también a otras proteínas mitocondriales que tengan algún papel en la respiración mitocondrial.

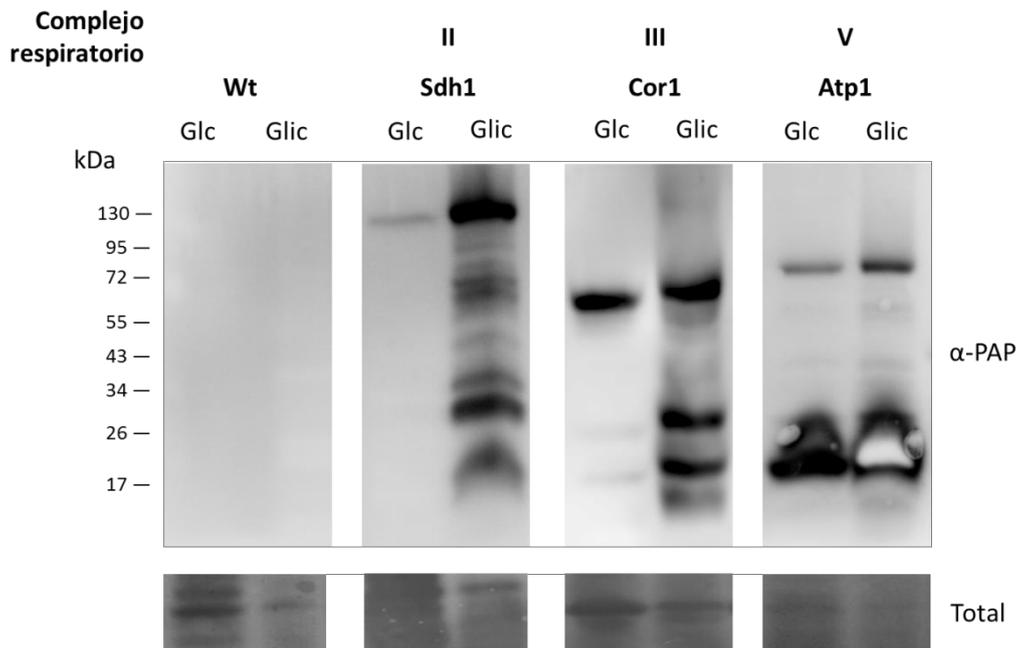


Figura 6. Inmunodetección de las proteínas de los complejos respiratorios II, III, V en extractos totales de levadura en condiciones fermentativas y respiratorias. Se utilizaron cepas de levadura que expresan las proteínas indicadas de diferentes complejos de la cadena electrónica mitocondrial, como fusión con el epítipo TAP. Extractos totales de proteína fueron analizadas por *Western Blot* tras haber sido crecidas en medio fermentativo (YPD) o en medio de inducción de la respiración (YPGlic/EtOH). Se observa la degradación de las proteínas tras activarse la respiración. Las proteínas se detectaron con el anticuerpo α-PAP y como control de la carga se utilizó la tinción de membrana mediante DB71. Wt hace referencia a la cepa silvestre.

Que las proteínas que intervienen en la respiración mitocondrial se degradan durante la activación del metabolismo respiratorio es bastante evidente, por lo menos en el complejo III y, con las observaciones anteriormente descritas, también en el complejo II, sin embargo, el

objetivo de esta degradación se desconoce. A pesar de ello, parece factible que esta degradación sea selectiva, permitiendo reciclar aquellos componentes mitocondriales que se encuentran más activos o acumulan daños más severos durante la respiración. De esta forma se podrían mantener niveles óptimos de aquellos complejos que tienen una mayor participación en este proceso, con el fin de evitar que se produzcan fallos durante la fosforilación oxidativa que puedan causar una disfunción mitocondrial.

2. Análisis de la degradación de las proteínas Cor1 y Atp1 de los complejos mitocondriales III y V en condiciones de elevada tasa respiratoria.

Una vez se comprobó que la inducción de la respiración aumentaba la degradación de algunas subunidades de los complejos mitocondriales, el siguiente paso fue determinar de forma más cuantitativa si esta degradación se producía de la misma forma en todos los complejos, o si por el contrario existen diferencias entre las distintas proteínas. Para ello se analizó la cinética de degradación de las proteínas representativas de cada complejo, mediante la adición de cicloheximida a los cultivos.

La cicloheximida es un antibiótico producido por la bacteria *Streptomyces griseus*. Es una molécula permeable a la célula que es capaz de inhibir específicamente la traducción citosólica en células eucariotas, interfiriendo con el paso de translocación que se produce durante la síntesis proteica y por tanto bloqueando la elongación. La cicloheximida es muy utilizada en biología molecular para determinar la vida media de las proteínas, tratando las células con cicloheximida y analizando sus lisados, tras un determinado tiempo de exposición, mediante *Western Blot*. La adición de esta molécula permite asegurar que el descenso de la abundancia de una proteína es debido a su degradación (Buchanan *et al.*, 2016).

Para realizar esta cinética se crecieron los cultivos de las cepas que habían sido seleccionadas en el apartado 1, por ser las que mayor degradación presentaban cuando realizaban la respiración, tanto en condiciones fermentativas (YPD) como en condiciones que inducen una respiración parcial (YPGAL) o completa (YPGlic/EtOH). Tras la adición de la cicloheximida, se obtuvieron extractos proteicos a distintos tiempos que fueron analizados y cuantificados por *Western Blot* para observar cómo se había producido la degradación en cada una de las condiciones. El nivel de proteína se normalizó respecto a la cantidad de proteína a tiempo 0 para cada condición, que se consideró como un nivel 100, a partir del cual se pudo estimar si se había producido mayor o menor degradación.

En los estudios previos se había visto como los complejos I y III sufrían una mayor degradación frente al resto de complejos cuando eran sometidos a elevadas tasas de respiración (Timón Gómez, 2016). Se seleccionaron para este estudio las proteínas Cor1 (CIII) y Atp1 (CV), porque los resultados anteriores sugerían que Cor1 sufría una degradación mayor en condiciones de alta tasa respiratoria en comparación con Atp1.

Como se observa en la figura 7 tanto Cor1 como Atp1 en condiciones fermentativas o de inducción parcial de la respiración, no mostraban una degradación significativa posiblemente debido a que la mitocondria en estas condiciones, no se encuentra lo suficientemente activa como para que estos complejos resulten tan dañados que se tenga que producir su reciclaje mediante algún proceso de degradación. Lo que sí se puede observar, es una inducción de la

expresión proteica en condiciones de respiración parcial, lo que apoya la hipótesis que ha sido desarrollada en el apartado 1.

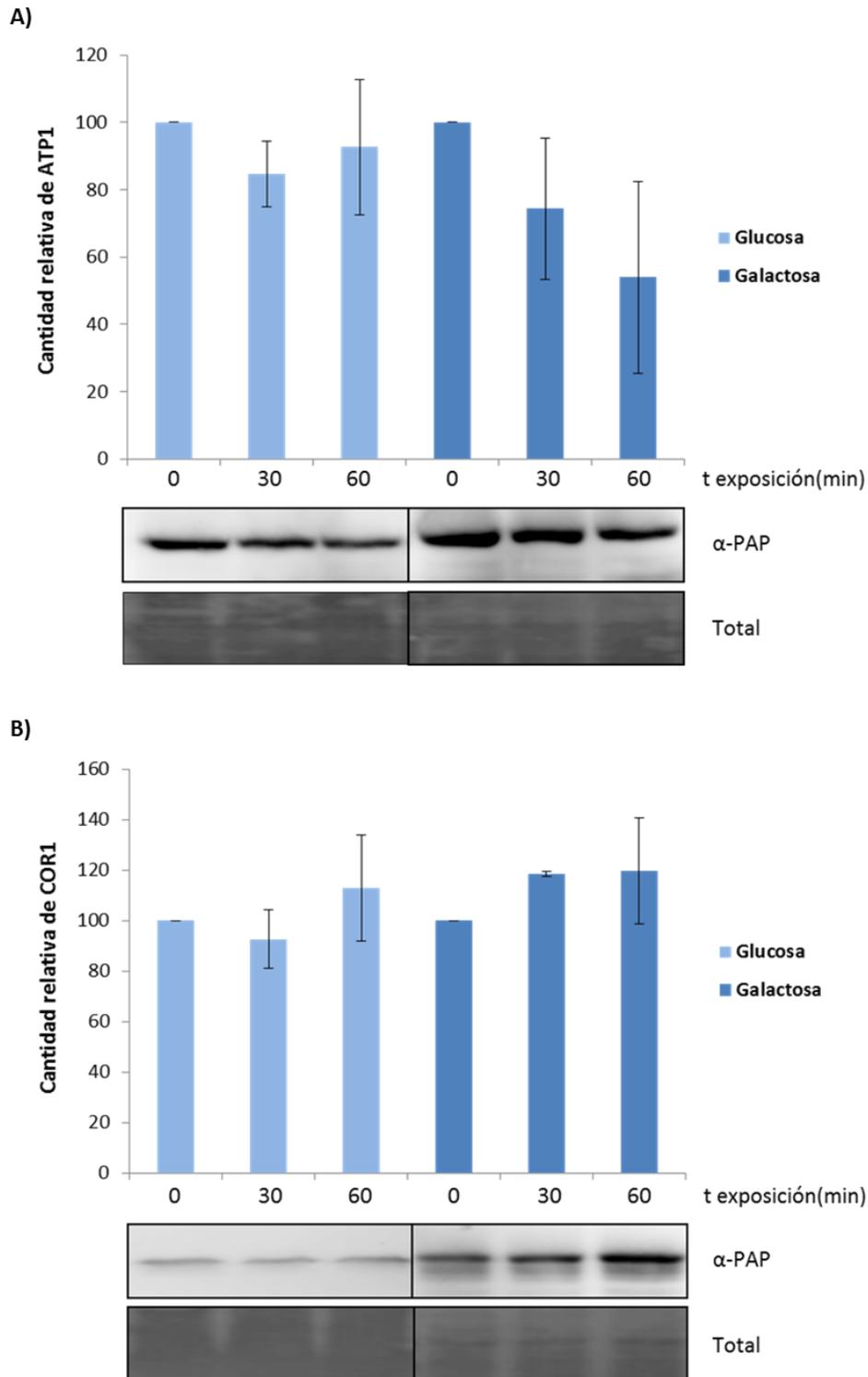


Figura 7. Inmunodetección de las proteínas Cor1 y Atp1 de los complejos respiratorios III y V en extractos de levadura crecidos en YPD, YPGal tras el tratamiento con cicloheximida. Las proteínas Cor1 y Atp1 no muestran una degradación significativa en ninguna de las condiciones tras el tratamiento con cicloheximida. Las cepas de levadura con las proteínas marcadas con el epítipo TAP fueron analizadas por *Western Blot* tras su tratamiento con cicloheximida (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante una hora, recogiendo muestra cada 30 min. La detección de las proteínas se realizó con el anticuerpo α -PAP, utilizando como control de carga la tinción de la membrana con DB71. **(A)** Detección y cuantificación de la proteína Atp1. **(B)** Detección y cuantificación de la proteína Cor1. Los datos son la media y el error típico de dos réplicas.

Cuando analizamos los datos obtenidos de los cultivos en condiciones que inducen una respiración total se observó que Cor1, al contrario que Atp1, sí que mostraba una degradación significativa cuando la mitocondria se encontraba totalmente activada (véase la figura 8). Esto concuerda con los resultados previamente obtenidos donde el complejo III presentaba una mayor degradación que el resto de complejos respiratorios al ser sometidos a altas tasas respiratorias.

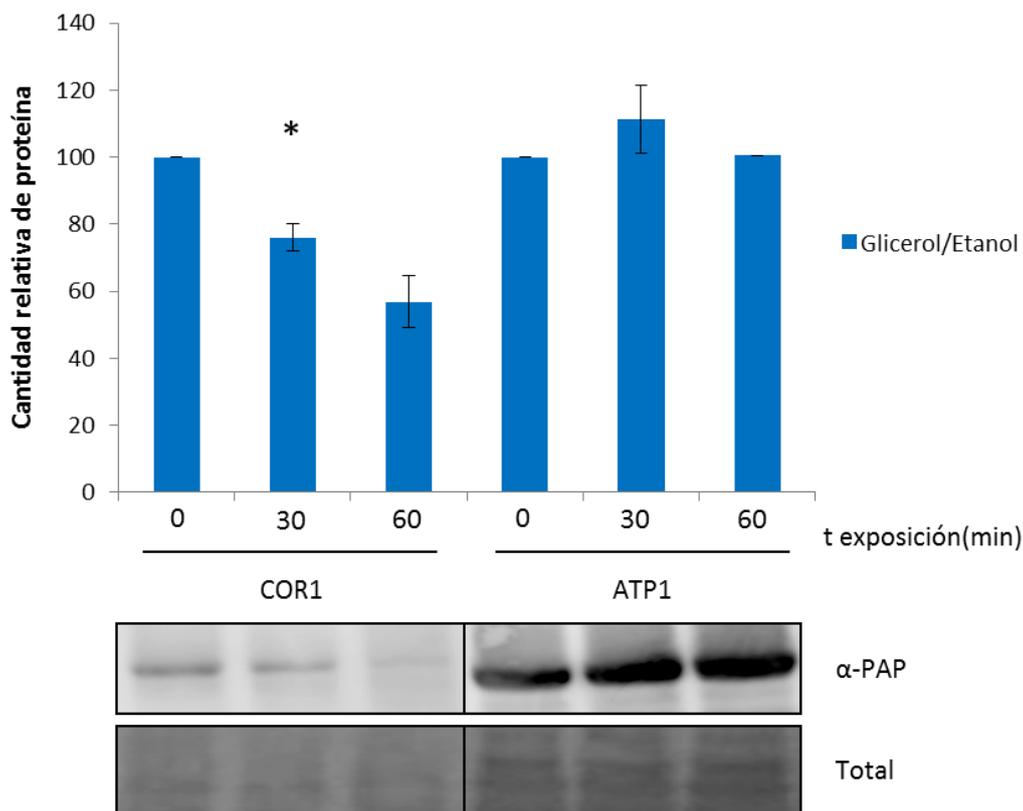


Figura 8. Inmunodetección de las proteínas de los complejos respiratorios de extractos de levadura crecidos en YPGlic/EtOH tras el tratamiento con cicloheximida. Se observa una degradación significativa en Cor1 frente a la activación total de la respiración tras el tratamiento con cicloheximida. Los niveles de Atp1 se mostraban estables. Las cepas de levadura con las proteínas marcadas con el epítipo TAP fueron analizadas por *Western Blot* tras su tratamiento con cicloheximida (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante una hora, recogiendo muestra cada 30 min. La detección de las proteínas se realizó con el anticuerpo $\alpha\text{-PAP}$, utilizando como control de carga la tinción de la membrana con DB71. Los datos son la media y el error típico de dos réplicas. El asterisco (*) indica que existen diferencias significativas entre los valores de 0 y 60 min de tratamiento ($p\text{-value} < 0,05$), según el test *t de Student*.

Estos resultados apoyan la hipótesis de que existen vías selectivas de degradación capaces de eliminar complejos mitocondriales concretos con el fin de mantener su actividad óptima. Esto se puede observar en el complejo III, pues en comparación con los otros dos complejos analizados es el único que presenta una degradación significativa cuando la levadura es inducida a realizar la respiración. Que sea este complejo el que presenta una mayor degradación no es trivial, pues es, junto al complejo I, uno de los principales productores de ROS mitocondrial (Wei *et al.*, 2001). Es por ello que cuando la síntesis proteica se paraliza mediante la acción de la cicloheximida, este complejo sufre un daño oxidativo mayor que los otros complejos y al no poder reciclarse es degradado rápidamente. Cuando este complejo presenta alguna alteración, se produce por tanto un aumento del estrés

oxidativo, y esto puede acarrear graves consecuencias a nivel celular. Debido a esto la célula debe ser capaz de eliminar aquellos componentes que puedan aumentar el daño celular produciendo la alteración de la homeostasis, actuando como un mecanismo de defensa.

3. Estudio de la mitofagia mediante microscopía confocal.

Los estudios realizados permitieron observar evidencias de que el proceso de mitofagia podría ser más selectivo de lo que había sido considerado hasta el momento, sin embargo, no permiten observar cómo se desarrolla el proceso en el interior celular.

Para poder tener una visualización más directa de la mitofagia, se utilizó el sistema Rosella mediante microscopía confocal. Este método fue desarrollado por Mijaljica y colaboradores para poder detectar la mitofagia en levaduras. El ensayo emplea un reportero fluorescente, denominado Rosella, que es un biosensor de emisión dual formado por una proteína roja fluorescente resistente al pH vacuolar (DsRed.T3) y una proteína verde fluorescente mucho más sensible al pH (pHluorin). Este reportero dual se expresa fusionado a un péptido de localización mitocondrial (mt) (Mijaljica *et al.*, 2011). Cuando la mitofagia no se encuentra activa, la cepa silvestre, transformada con el plásmido pVT100U-mtRosella, presenta ambas fluorescencias distribuidas a lo largo de toda la red mitocondrial. Sin embargo, cuando la mitofagia es activada y la mitocondria es introducida en la vacuola para su degradación, la proteína verde fluorescente del reportero es degradada y solo se observa fluorescencia roja, por lo que en estas condiciones además de la fluorescencia de ambos colores que presenta la red mitocondrial, se podrá ver fluorescencia roja en el interior de la vacuola (ver figura 5). De esta forma se puede cuantificar la actividad mitofágica determinando el número de células que presentan vacuolas con fluorescencia roja.

Este sistema fue utilizado para observar en qué condiciones se inducía una degradación mitocondrial por medio de este proceso de autofagia selectiva. Para ello, se crecieron las células durante toda la noche sometidas a distintas condiciones de cultivo. Como control positivo se utilizó el ayuno de nitrógeno (SD-N), pues se sabe que en ayuno la célula entra en una situación crítica metabólicamente y se produce la degradación de la mayor parte de complejos celulares, que son utilizados como fuente de metabolitos para permitir la supervivencia celular. Debido a esto es una condición perfecta para observar la degradación mitocondrial a través de la vacuola (Eiyama *et al.*, 2013). Las células también fueron crecidas en medios de activación parcial (SGal) y total (SGlic/EtOH) de la respiración, y sometidas a tratamiento con valinomicina durante dos horas con el fin de inducir un daño específico en la mitocondria.

La valinomicina es un antibiótico obtenido a partir de ciertas cepas de *Streptomyces* que produce una pérdida de potencial de membrana en la mitocondria. Se trata de un ionóforo neutro que presenta una elevada afinidad por el ion potasio (K^+), permitiendo su transporte a través de las membranas lipídicas. En condiciones normales, la membrana mitocondrial interna es impermeable al K^+ , pero la valinomicina al permitir su entrada en la matriz mitocondrial, provoca que se iguale el gradiente electroquímico de la membrana interna afectando al proceso de la fosforilación oxidativa, que depende de dicho gradiente. Este antibiótico nos permite por tanto provocar un daño específicamente en la mitocondria, al dañar el potencial de membrana y estudiar cómo responde la célula a dicho daño (Safiulina *et al.*, 2006).

Para este ensayo se utilizó la cepa silvestre BY4741 transformada con el plásmido pVT100U-mtRosella tal y como se describe en el apartado 4 de materiales y métodos.

En la figura 9 se muestra que la única condición en la que se pudo observar una mitofagia de forma evidente fue en ayuno de nitrógeno. La activación de la respiración no proporcionó resultados satisfactorios, aunque no eran esperados ya que en principio no se debería producir un daño generalizado ni detectable. Ni siquiera al provocar un daño mitocondrial mediante el tratamiento con valinomicina se pudo observar la entrada de la mitocondria en la vacuola como cabría esperar. Lo que sí se pudo observar es el aumento de la biomasa mitocondrial conforme se aumenta la tasa respiratoria.

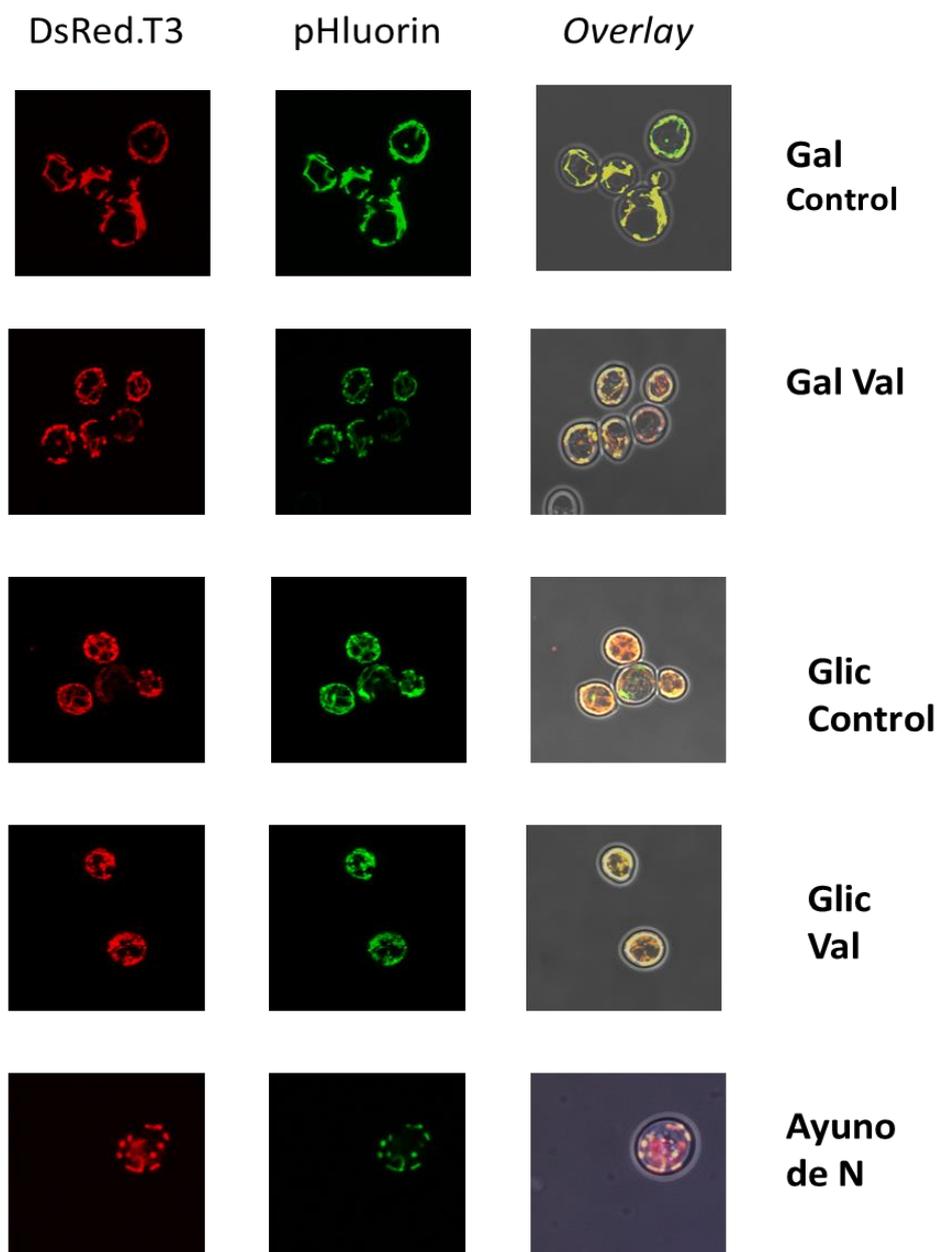


Figura 9. Detección de mitofagia en levadura mediante el sistema mtRosella por microscopía confocal. Las células de levadura BY4741 transformadas con el plásmido pVT100U-mtRosella fueron crecidas en distintas condiciones: ayuno de nitrógeno (SD-N), respiración parcial (SGal) y respiración total (SGlic/EtOH). En estas dos últimas las células también fueron sometidas a tratamiento con Valinomicina (1mM) durante 2h. La única condición en la que se pudo observar la mitofagia de forma evidente fue en ayuno de nitrógeno.

Los trabajos previos realizados por nuestro grupo de investigación mostraron que el sistema Rosella había permitido detectar mitofagia tanto en condiciones de ayuno de nitrógeno como tras el tratamiento con valinomicina durante 2h, sin embargo, el porcentaje de mitofagia observada no fue muy elevado y la degradación mitocondrial no resultaba tan evidente como se esperaba (Timón Gómez, 2016). Estos resultados unidos a los resultados negativos que hemos obtenido nos incitan a pensar que el sistema Rosella puede no ser lo suficientemente potente como para permitir la visualización del proceso de la mitofagia, debido tal vez a que como ya hemos comentado con anterioridad, este proceso parece ser más selectivo de lo que se consideraba en un principio. Por lo tanto, al no producirse una entrada masiva de la mitocondria en la vacuola, sino simplemente de aquellas partes que resulten dañadas después del tratamiento con valinomicina, la fluorescencia que se podría visualizar en la vacuola resulta tan leve que no podemos detectarla.

4. Estudio del crecimiento de cepas mutantes de *S. cerevisiae* para genes de autofagia en presencia de Valinomicina.

La mitofagia en levaduras es dependiente de los genes *ATG*, por lo que mutantes de dichos genes muestran cantidades alteradas e insuficientes de las proteínas de los complejos respiratorios, al no poder realizar este proceso correctamente (Suzuki *et al.*, 2011).

Tras el intento fallido de observar la mitofagia mediante microscopía confocal, decidimos analizar algunos de los mutantes *atg* para ver si producían una alteración de la mitofagia lo suficientemente importante como para comprometer la viabilidad celular al inducir un daño mitocondrial con valinomicina. Para ello, se analizó el crecimiento de los mutantes en condiciones de respiración parcialmente (YPGal) o totalmente (YPGlic/EtOH) inducida frente a concentraciones crecientes de valinomicina (1, 4 y 10 μ M), mediante ensayos de crecimiento en medio sólido (*Droptest*). Se analizaron los mutantes $\Delta atg1$, $\Delta atg7$, $\Delta atg8$, $\Delta atg9$, $\Delta atg11$ y $\Delta atg32$ comparándolos con la cepa silvestre BY4741 como se muestra en las figuras 10 y 11.

Los ensayos de crecimiento en medio sólido mostraron que en condiciones de inducción parcial de la respiración los mutantes $\Delta atg11$, $\Delta atg7$ y $\Delta atg8$ presentaban una inhibición del crecimiento en comparación con la cepa silvestre (Wt), que se incrementaba a mayores concentraciones de antibiótico. En condiciones en las que se produce una inducción total de la respiración los mutantes $\Delta atg11$ y $\Delta atg8$ mantuvieron esta inhibición, sin embargo aparecieron dos mutantes más donde también se observó el mismo fenotipo, $\Delta atg9$ y $\Delta atg32$. El mutante $\Delta atg1$ fue el único que no mostró inhibición para ninguna de las condiciones analizadas.

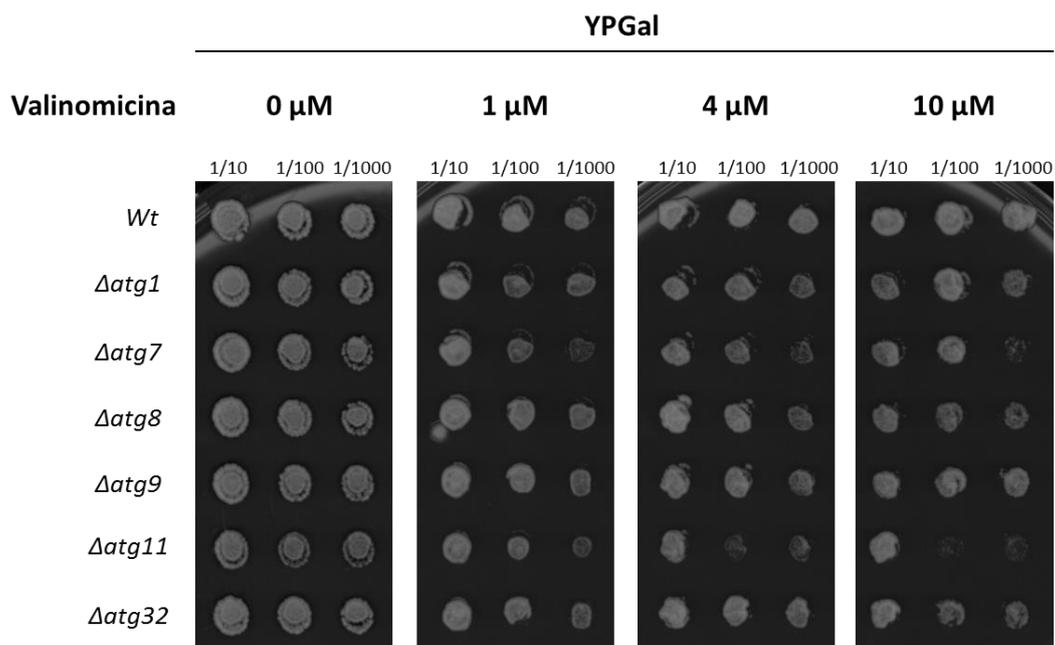


Figura 10. Ensayo de crecimiento en medio sólido (Droptest) de mutantes de levadura en presencia de valinomicina en medio YPGal. Las cepas se crecieron en medio YPGal con diferentes concentraciones de valinomicina (1, 4 y 10 μM), y se comparó su crecimiento con el de la cepa silvestre BY4741 (*Wt*). Los cultivos se crecieron hasta una OD = 1-1,5, y se prepararon tres diluciones seriadas para cada uno. Se incubaron las células a 28°C, realizando tres réplicas cada 22 horas aprox. Los mutantes $\Delta atg11$, $\Delta atg7$ y $\Delta atg8$ presentaban una inhibición del crecimiento en presencia de valinomicina.

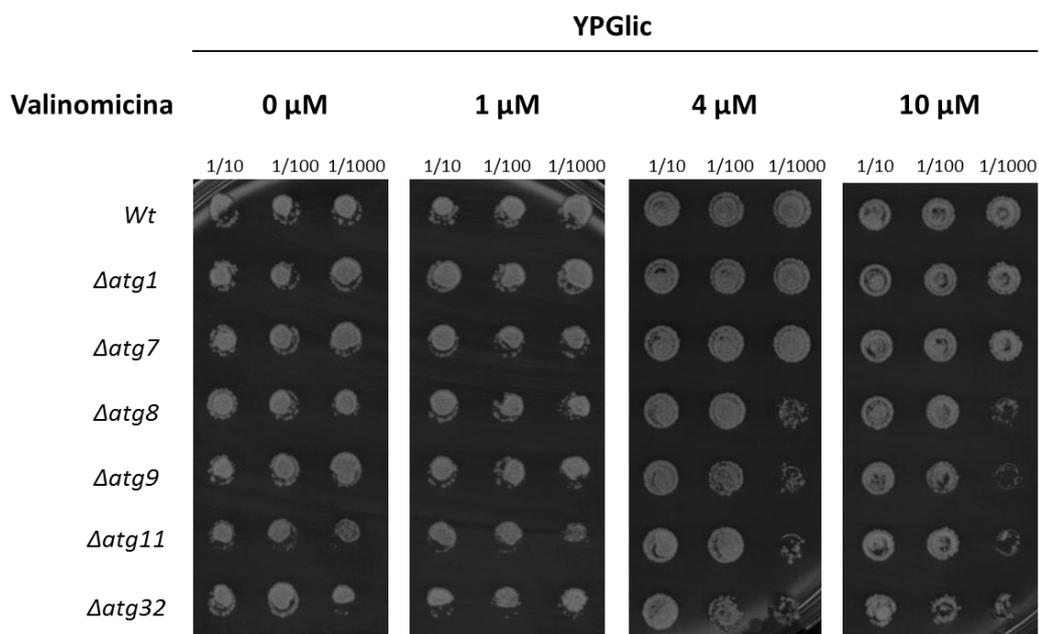


Figura 11. Ensayo de crecimiento en medio sólido (Droptest) de mutantes de levadura en presencia de valinomicina en medio YPGlic/EtOH. Las cepas se crecieron en medio YPGlic/EtOH con diferentes concentraciones de valinomicina (1, 4 y 10 μM), y se comparó su crecimiento con el de la cepa silvestre BY4741 (*Wt*). Los cultivos se crecieron hasta una OD = 1-1,5, y se prepararon tres diluciones seriadas para cada uno. Se incubaron las células a 28°C, realizando tres réplicas cada 22 horas aprox. Los mutantes $\Delta atg11$, $\Delta atg9$, $\Delta atg32$ y $\Delta atg8$ presentaban una inhibición del crecimiento en presencia de valinomicina.

Los resultados obtenidos parecen indicar que el proceso de mitofagia inducida por valinomicina tiene lugar a través de una ruta diferente a la que ocurre ante otras formas de activación de dicho proceso. Esto se puede observar en la poca participación que parece tener Atg32 en esta activación, pues en su ausencia, la viabilidad celular no resulta tan alterada como se esperaría observar. Esta proteína es un receptor esencial en la activación de otras formas de mitofagia, como la activada en condiciones de ayuno (Kanki et al., 2015), por lo que esta vía alternativa de autofagia selectiva podría ser independiente de receptores, más similar a la ruta PINK1/parkina que presentan los mamíferos, o actuar a través de otros receptores mitocondriales desconocidos. Las proteínas que sí presentan una elevada implicación en este proceso parecen ser Atg11 y Atg8, ambas implicadas en diferentes procesos de autofagia selectiva, pues su ausencia disminuye considerablemente la viabilidad celular en las dos condiciones que fueron testadas. Esto parece concordar con los resultados obtenidos previamente por nuestro grupo de investigación, que mostraron que la mitofagia inducida por daño mitocondrial podría estar marcada por la generación de agregados, cercanos a la mitocondria, de la proteína Atg11 (Timón Gómez, 2016). El papel de Atg8 en este proceso no ha sido identificado todavía. Además de la participación de Atg11 y Atg8, los resultados parecen mostrar una participación de otras proteínas accesorias, como Atg7 y Atg9, para que se produzca la activación de esta forma de mitofagia.

5. Análisis de los niveles relativos de ROS producidos por mutantes de levadura para genes de autofagia en presencia de Valinomicina.

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos en el ensayo de crecimiento en medio sólido, decidimos analizar la cantidad de estrés oxidativo que producían los mutantes más característicos del ensayo anterior, cuando eran sometidos al tratamiento con valinomicina.

La respiración aeróbica da lugar a la generación de ROS, especies parcialmente reducidas del oxígeno que resultan nocivas para la célula por su elevada reactividad y su gran poder oxidante. Ya se ha comentado que los complejos I y III son los principales puntos productores de este estrés oxidativo, por lo que alteraciones en la cadena de transporte electrónico van a producir complejos ineficientes que generarán una mayor cantidad de ROS. Es por ello que si tras la inducción de un daño mitocondrial con valinomicina, el proceso de mitofagia no está activo y no se pueden reciclar los complejos dañados, los niveles de ROS se verán aumentados.

Los mutantes analizados fueron $\Delta atg8$, $\Delta atg9$, $\Delta atg11$ y $\Delta atg32$, y se midieron los niveles de ROS relativos que cada uno de ellos generaba (ver figura 12), para determinar la ausencia de qué proteínas tenía una mayor repercusión en el proceso de mitofagia inducida por daño mitocondrial.

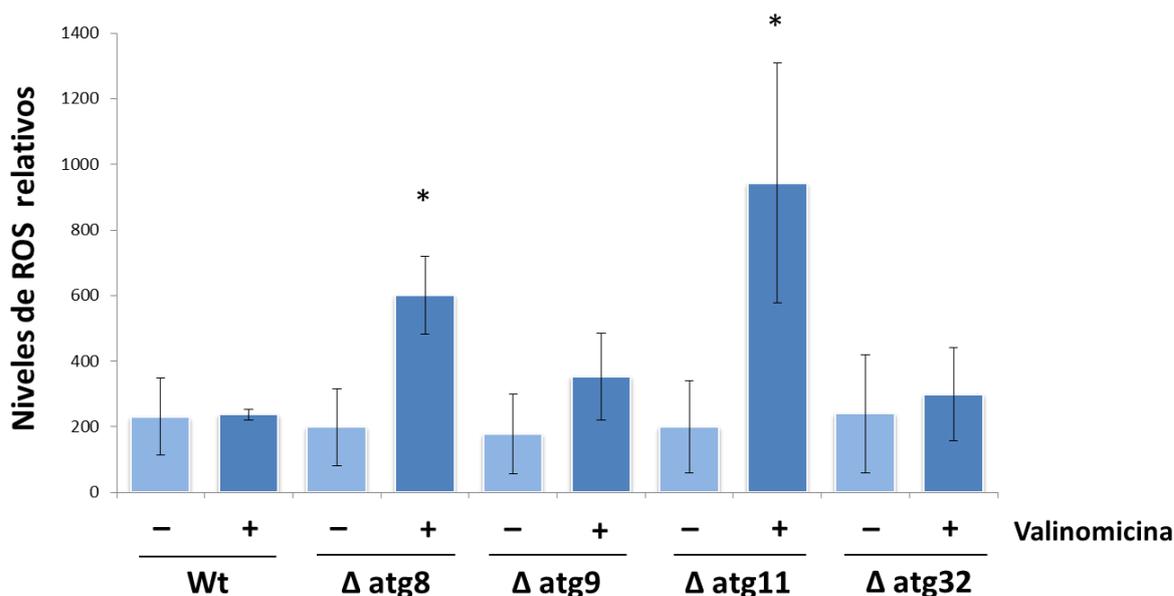


Figura 12. Niveles de ROS relativos de mutantes *atg* tras la inducción de daño mitocondrial con valinomicina. Las células fueron crecidas en medio YPGal hasta una OD = 1 y sometidas a un tratamiento con valinomicina (1mM) durante 2h. Tras el tratamiento se añadió el H₂DCF-DA para medir los niveles de ROS, comparándolos contra el nivel de la cepa silvestre (Wt). De cada mutante se obtuvieron tres réplicas. Los mutantes que produjeron un incremento de los niveles de ROS significativos fueron *Δatg8* y *Δatg11*. El asterisco (*) indica que existen diferencias significativas entre los valores de 0 y 60 min de tratamiento (*p-value* < 0,05), según el test *t de Student*.

La cuantificación de los niveles relativos de ROS mostró que los mutantes *Δatg8* y *Δatg11* eran los que mayor estrés oxidativo producían. Esto concuerda con los resultados obtenidos en el *droptest* mostrando que estas proteínas son las principales implicadas en el proceso de la mitofagia inducida por daño mitocondrial, pues su ausencia incrementa significativamente los valores de ROS y por tanto puede estar causando un daño oxidativo en la célula que afecte a su viabilidad. El mutante *Δatg32* no mostró un aumento de los niveles de ROS tal y como ya había sido descrito en la bibliografía (Ashrafi & Schwarz, 2013), apoyando la hipótesis de que deben existir vías alternativas de mitofagia que sean independientes de Atg32.

En resumen, este trabajo ha permitido ampliar los conocimientos previos que se tenían de la homeostasis mitocondrial. La estabilidad diferencial de los complejos respiratorios mitocondriales indica que existen vías más específicas de degradación y “reciclaje” de complejos concretos de este orgánulo. Una mitofagia más selectiva podría garantizar el reciclaje de aquellas proteínas que puedan alterar el correcto funcionamiento de la mitocondria. Además, la importancia de varias proteínas Atg, involucradas en la formación del autofagosoma en el proceso de la mitofagia durante el daño mitocondrial, sugiere que, también en levaduras, existen mecanismos mitofágicos inducidos por la disfunción mitocondrial. De esta forma, hemos podido observar como este proceso mitofágico se encuentra coordinado por diferentes vías, que son activadas en función de la señal que inicie la respuesta. El estudio de la mitofagia nos permite comprender mejor los mecanismos moleculares de las enfermedades relacionadas con la mitocondria y nos puede proporcionar las herramientas necesarias para diseñar tratamientos específicos contra dichas patologías.

CONCLUSIONES

1. Subunidades de diferentes complejos respiratorios de la mitocondria parecen tener diferentes velocidades de degradación durante una respiración inducida.
2. El complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial presenta una mayor degradación que el complejo V en condiciones de elevada tasa respiratoria. Esto sugiere que el proceso de la mitofagia podría ser más selectivo para eliminar complejos específicos del orgánulo.
3. El sistema Rosella se ha mostrado eficaz para la identificación de la mitofagia en condiciones de ayuno, pero no resulta lo suficientemente sensible para detectar este proceso en condiciones que no impliquen una degradación masiva de la mitocondria.
4. El proceso de mitofagia podría presentar vías alternativas de degradación, independientes de Atg32, cuando es inducido mediante daño mitocondrial con valinomicina. Atg8 y Atg11 parecen tener una función esencial en dicho proceso, resultando imprescindibles para la tolerancia de daño mitocondrial.
5. Los niveles de ROS se ven aumentados en ausencia de las proteínas Atg8 y Atg11 cuando se produce un daño mitocondrial, pero no varían en ausencia de Atg32, apoyando la hipótesis de que deben existir vías de reciclaje mitocondrial independientes de Atg32, que estén dirigidas por dichas proteínas.

BIBLIOGRAFÍA

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; & WALTER, P. (2008). *Molecular biology of the cell, 5th edition*. Editorial EDICIONES OMEGA.
- ASHRAFI, G.; & SCHWARZ, T. L. (2013). The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death and Differentiation*, 20(1), 31–42.
- ATTARDI, G.; & SCHATZ, G. (1988). Biogenesis of mitochondria. *Annual Review of Cell Biology*, 4, 289–333.
- BAILE, M. G.; & CLAYPOOL, S. M. (2013). The power of yeast to model diseases of the powerhouse of the cell. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 18(7), 241–78.
- BARRIENTOS, A.; & UGALDE, C. (2013). I Function, therefore i am: Overcoming skepticism about mitochondrial supercomplexes. *Cell Metabolism*, 18(2), 147–149.
- BARROS, M. H.; DA CUNHA, F. M.; OLIVEIRA, G. A.; TAHARA, E. B.; & KOWALTOWSKI, A. J. (2010). Yeast as a model to study mitochondrial mechanisms in ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*, 131(7–8), 494–502.
- BHAT, A. H.; DAR, K. B.; ANEES, S.; ZARGAR, M. A.; MASOOD, A.; SOFI, M. A.; & GANIE, S. A. (2015). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 74, 101–110.
- BUCHANAN, B. W.; LLOYD, M. E.; ENGLE, S. M.; & RUBENSTEIN, E. M. (2016). Cycloheximide Chase Analysis of Protein Degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Visualized Experiments*, (110), e53975–e53975.
- BURKE, D.; DAWSON, D.; & STEARNS, T. (2000). *Methods in yeast genetics: a Cold Spring Harbor Laboratory course manual*. CSHL Press.
- DAN DUNN, J.; ALVAREZ, L. A. J.; ZHANG, X.; & SOLDATI, T. (2015). Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox Biology*, 6, 472–485.
- DENGJEL, J.; & ABELIOVICH, H. (2017). Roles of mitophagy in cellular physiology and development. *Cell and Tissue Research*, 367(1), 95–109.
- EIYAMA, A.; KONDO-OKAMOTO, N.; & OKAMOTO, K. (2013). Mitochondrial degradation during starvation is selective and temporally distinct from bulk autophagy in yeast. *FEBS Letters*, 587(12), 1787–1792.
- EPHRUSSI, B.; & SLONIMSKI, P. P. (1955). Yeast Mitochondria: Subcellular Units involved in the Synthesis of Respiratory Enzymes in Yeast. *Nature*, 176(4495), 1207–1208.
- FEDERICO, A.; CARDAIOLI, E.; DA POZZO, P.; FORMICHI, P.; GALLUS, G. N.; & RADI, E. (2012). Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *Journal of the Neurological Sciences*, 322(1–2), 254–262.
- FRIEDMAN, J. R.; & NUNNARI, J. (2014). Mitochondrial form and function. *Nature*, 505(7483), 335–343.
- GHAEMMAGHAMI, S.; HUH, W.-K.; BOWER, K.; HOWSON, R. W.; BELLE, A.; DEPHOURE, N.; ... WEISSMAN, J. S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*, 425(6959), 737–741.
- GIETZ, R. D.; SCHIESTL, R. H.; WILLEMS, A. R.; & WOODS, R. A. (1995). Studies on the transformation

- of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast (Chichester, England)*, *11*(4), 355–360.
- GORMAN, G. S.; CHINNERY, P. F.; DIMAURO, S.; HIRANO, M.; KOGA, Y.; MCFARLAND, R.; ... TURNBULL, D. M. (2016). Mitochondrial diseases. *Nature Reviews Disease Primers*, *2*, 16080.
- HOLT, I. J.; & REYES, A. (2012). Human Mitochondrial DNA Replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(12), a012971–a012971.
- HOLZ, C.; PRINZ, B.; BOLOTINA, N.; SIEVERT, V.; BUSSOW, K.; SIMON, B.; ... LANG, C. (2003). Establishing the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a system for expression of human proteins on a proteome-scale. *Journal of Structural and Functional Genomics*, *4*(2–3), 97–108.
- KANKI, T.; FURUKAWA, K.; & YAMASHITA, S. ICHI. (2015). Mitophagy in yeast: Molecular mechanisms and physiological role. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1853*(10), 2756–2765.
- KANKI, T.; WANG, K.; BABA, M.; BARTHOLOMEW, C. R.; LYNCH-DAY, M. A.; DU, Z.; ... KLIONSKY, D. J. (2009, November). A Genomic Screen for Yeast Mutants Defective in Selective Mitochondria Autophagy. (C. Boone, Ed.), *Molecular Biology of the Cell*.
- LANE, N.; & MARTIN, W. (2010). The energetics of genome complexity. *Nature*, *467*(7318), 929–934.
- LAPUENTE-BRUN, E.; MORENO-LOSHUERTOS, R.; ACIN-PEREZ, R.; LATORRE-PELLICER, A.; COLAS, C.; Balsa, E.; ... ENRIQUEZ, J. A. (2013). Supercomplex Assembly Determines Electron Flux in the Mitochondrial Electron Transport Chain. *Science*, *340*(6140), 1567–1570.
- LASSERRE, J.-P.; DAUTANT, A.; AIYAR, R. S.; KUCHARCZYK, R.; GLATIGNY, A.; TRIBOUILLARD-TANVIER, D.; ... DI RAGO, J.-P. (2015). Yeast as a system for modeling mitochondrial disease mechanisms and discovering therapies. *Disease Models & Mechanisms*, *8*(6), 509–526.
- LIU, L.; SAKAKIBARA, K.; CHEN, Q.; & OKAMOTO, K. (2014). Receptor-mediated mitophagy in yeast and mammalian systems. *Cell Research*, *24*(7), 787–795.
- MCBRIDE, H. M.; NEUSPIEL, M.; & WASIAK, S. (2006). Mitochondria: More Than Just a Powerhouse. *Current Biology*, *16*(14), 551–560.
- MELSER, S.; CHATELAIN, E. H.; LAVIE, J.; MAHFOUF, W.; JOSE, C.; OBRE, E.; ... BÉNARD, G. (2013). Rheb regulates mitophagy induced by mitochondrial energetic status. *Cell Metabolism*, *17*(5), 719–730.
- MIJALJICA, D.; PRESCOTT, M.; & DEVENISH, R. J. (2011). A Fluorescence Microscopy Assay for Monitoring Mitophagy in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Visualized Experiments*, (53), 1–6.
- MÜLLER, M.; LU, K.; & REICHERT, A. S. (2015). Mitophagy and mitochondrial dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1853*(10), 2766–2774.
- MURPHY, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, *417*(1), 1–13.
- NGO, H. B.; KAISER, J. T.; & CHAN, D. C. (2011). The mitochondrial transcription and packaging factor Tfam imposes a U-turn on mitochondrial DNA. *Nat Struct Mol Biol*, *18*(11), 1290–

- 1296.
- NGUYEN, T. N.; PADMAN, B. S.; & LAZAROU, M. (2016). Deciphering the Molecular Signals of PINK1 / Parkin Mitophagy. *Trends in Cell Biology*, xx(10), 1–12.
- OKAMOTO, K.; KONDO-OKAMOTO, N.; & OHSUMI, Y. (2009). Mitochondria-Anchored Receptor Atg32 Mediates Degradation of Mitochondria via Selective Autophagy. *Developmental Cell*, 17(1), 87–97.
- PEREIRA, C.; COSTA, V.; MARTINS, L. M.; & SARAIVA, L. (2015). A yeast model of the Parkinson's disease-associated protein Parkin. *Experimental Cell Research*, 333(1), 73–79.
- ROSADO, C. J.; MIJALJICA, D.; HATZINISIRIOU, I.; PRESCOTT, M.; & DEVENISH, R. J. (2008). Rosella: a fluorescent pH-biosensor for reporting vacuolar turnover of cytosol and organelles in yeast. *Autophagy*, 4(2), 205–213.
- SAFIULINA, D.; VEKSLER, V.; ZHARKOVSKY, A.; & KAASIK, A. (2006). Loss of mitochondrial membrane potential is associated with increase in mitochondrial volume: Physiological role in neurones. *Journal of Cellular Physiology*, 206(2), 347–353.
- SOKOL, A. M.; SZTOLSTENER, M. E.; WASILEWSKI, M.; HEINZ, E.; & CHACINSKA, A. (2014). Mitochondrial protein translocases for survival and wellbeing. *FEBS Letters*, 588(15), 2484–2495.
- STUART, R. A. (2008). Supercomplex organization of the oxidative phosphorylation enzymes in yeast mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 40(5), 411–417.
- SUZUKI, S. W.; ONODERA, J.; & OHSUMI, Y. (2011). Starvation induced cell death in autophagy-defective yeast mutants is caused by mitochondria dysfunction. *PLoS ONE*, 6(2), 0–7.
- SZCZEPANOWSKA, K.; & FOURY, F. (2010). A cluster of pathogenic mutations in the 3'-5' exonuclease domain of DNA polymerase gamma defines a novel module coupling DNA synthesis and degradation. *Human Molecular Genetics*, 19(18), 3516–3529.
- TIMÓN GÓMEZ, A. (2016). Mecanismos de adaptación de la actividad mitocondrial en respuesta a estrés. Tesis Doctoral en Biotecnología. Univ. Politécnica de Valencia, 308pp.
- VAN ROERMUND, C. W. T.; WATERHAM, H. R.; IJLST, L.; & WANDERS, R. J. A. (2003). Fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60(9), 1838–1851.
- VARTAK, R.; PORRAS, C. A. M.; & BAI, Y. (2013). Respiratory supercomplexes: Structure, function and assembly. *Protein and Cell*, 4(8), 582–590.
- VEDEL, F.; LALANNE, É.; SABAR, M.; CHÉTRIT, P.; & DE PAEPE, R. (1999). The mitochondrial respiratory chain and ATP synthase complexes: Composition, structure and mutational studies. *Plant Physiology and Biochemistry*.
- VERDUYN, C.; POSTMA, E.; SCHEFFERS, W. A.; & VAN DIJKEN, J. P. (2015). Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anerobic glucose-limited chemostats. *Journal of General Microbiology*, 136(1990), 395–403.
- WEI, Y.; LU, C.; WEI, C.; MA, Y.; & LEE, H. (2001). Oxidative Stress in Human Aging and Mitochondrial Disease – Consequences of Defective Mitochondrial Respiration and Impaired Antioxidant Enzyme System. *Chinese Journal Of Physiology*, 44(1), 1–11.



YOULE, R. J.; & NARENDRA, D. P. (2011). Mechanisms of mitophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(1), 9–14.

ZOROV, D. B.; KRASNIKOV, B. F.; KUZMINOVA, A. E.; VYSOKIKH, M. Y.; & ZOROVA, L. D. (1997). Mitochondria Revisited. Alternative Functions of Mitochondria. *Bioscience Reports*, 17(6), 507 LP-520.