

Caracterización de los componentes genéticos y ambientales implicados en el envejecimiento de las levaduras vínicas



Trabajo realizado por **María Elena Orozco Valverde** en el Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de València y en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC, para optar al grado de Doctora en Bioquímica

Valencia, enero de 2012

AGUSTÍN ARANDA FERNÁNDEZ, doctor en Ciencias Biológicas y Científico Titular del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC) y EMILIA MATAALLANA REDONDO, doctora en Ciencias Biológicas y Profesora Titular del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de València

CERTIFICAN que la presente Tesis Doctoral titulada “Caracterización de los componentes genéticos y ambientales implicados en el envejecimiento de las levaduras vínicas” ha sido realizada por la licenciada en Bioquímica Sra. María Elena Orozco Valverde, bajo su dirección en su laboratorio del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos

Valencia, enero de 2012

Fdo: Agustín Aranda Fernández

Fdo: Emilia Matallana Redondo

A mis hijos,
Agustín y Olivia

“En un primer momento la llave no entró en la cerradura y estuvo dispuesto a aceptar que se había equivocado de llave pero, como una memoria confusa que en un momento de lucidez descubriera su propia estupidez y el complicado orden el universo, la llave encajó en la cerradura con una extraña simetría y una sensación de felicidad que resultaban sorprendentes”.

Orhan Pamuk

El libro negro, 1994

Me gustaría reflejar en pocas palabras la profunda gratitud que siento por las personas que directa o indirectamente han contribuido a que la realización de este trabajo haya sido posible.

A mis directores de tesis, Agustín y Emilia. Por una dirección con la que sueñan todos los becarios, exigente, inteligente, enfocada y dedicada, pero sin dejar nunca de lado la opinión del becario. Me han permitido realizar este trabajo al acogerme en su grupo cuando lo daba todo por perdido, sin ellos mi camino científico habría terminado. A Agustín, por su admirable inquietud investigadora, aportando siempre ideas y transmitiendo su enorme vocación científica. Por no poder evitar estar en la bancada, codo a codo con sus becarios, y dotándome del privilegio de aprender directamente de su experiencia. A Emilia, por su enorme calidad científica y docente. Por su infinita capacidad de trabajo y dedicación, encontrando siempre tiempo para dedicarte a nosotros. Gracias por confiar en mí, por apoyarme y ofrecerme tu amistad.

A mis compañeras de laboratorio, Rocío y Esther que me han acompañado durante estos casi tres años de trabajo, siempre dispuestas a echar una mano. Porque crean un excelente ambiente de trabajo, y porque además de compañeras me han ofrecido su amistad. Gracias a Rocío, por sus discusiones científicas, por sus consejos y por desbordar ilusión con la investigación. A Esther, donde en ella rememoro mis comienzos, con unas ganas inmensas de aprender y trabajar. Gracias a Chirag, con el que tanto hemos aprendido durante su estancia en el laboratorio, espero que puedas volver pronto.

A los compañer@s del 304, a los que seguís arriba, a los que os habéis bajado al sótano y a los que os habéis ido a seguir con lo vuestro a otro lado. A Celia, Mariola, Iván, Paco, Carmen, Laura, Elena, Ana, Rosa, Javi, Violeta y Carlos. Porque formáis un grupo de amigos maravilloso, y me siento muy afortunada de que me hayáis incluido en él. Con vosotros la hora de comer supone un divertido paréntesis, y no digo nada de las cenas. A Celia, por todos los consejos que tanto me han ayudado en mi vida laboral y emocional. A Mariola, por su forma de ver la vida y por esos comentarios con

y sin sentido, llenos de humor andaluz. A Iván, por todo lo que me he reído con su humor ácido italiano. A Paco, por ver siempre el lado positivo de las cosas.

A mis compañeros de carrera. Un día escuché que con suerte, algunos compañeros de promoción podrían convertirse en los mejores amigos. Y yo he tenido esa suerte. A Andy, Bárbara, Miriam, Sonia, Isa y Gus, espero que siempre sigamos encontrándonos para compartir nuestros éxitos y desilusiones.

A José Enrique Pérez Ortín, porque esta andadura en la ciencia la comencé en su laboratorio, donde aprendí técnicas e importantes conocimientos de Biología Molecular que me han sido de mucha utilidad.

A Juan&Pauli, mis mejores compañeros fuera de la ciencia, y maestros de la montaña, el mar y los viajes a otros mundos.

A mi familia, porque siempre me han apoyado aunque no supieran lo que estaba haciendo. A mi madre, porque me puso alas cuando me dijo que estudiara para intentar ser una mujer independiente. No sabe la implicación que eso tuvo. A mis hermanos, porque no saben lo feliz que me hace que pongan esa cara de orgullo cuando les hablo de mi trabajo. A la abuela Pica, que tanto nos ayuda con el cuidado de los pequeños.

A mi marido, todo es posible gracias a él. A mis hijos. Esto, y todo lo que sigue, lo hago por ellos. Porque sé que van a saber perdonar mis ausencias.

Me gustaría dedicar un especial agradecimiento a todas las madres trabajadoras que se esfuerzan incesablemente en descubrir la forma de alargar los días para poder dedicar el mayor tiempo posible a sus hijos.

Índice

<u>Introducción</u>	1
1- Las levaduras en la producción de vino	3
1.1- Levaduras responsables de la producción de vino	4
1.1.1- La microbiota en la uva, en la bodega y en el mosto	4
1.1.2- Características genéticas de las levaduras vínicas	6
1.2- Etapas del proceso de producción de vino y condiciones de estrés asociadas a las mismas	7
1.2.1- Etapas de la vinificación	7
1.2.2- Condiciones de estrés asociadas a las fases del proceso de producción de vino	11
2- La longevidad de las levaduras	17
2.1- Longevidad replicativa y longevidad cronológica	18
2.2- Papel de las rutas de señalización por nutrientes en la longevidad	21
2.3- Papel de la autofagia en la longevidad	23
2.4- Papel de la respuesta a estrés en la longevidad	25
2.5- Papel de la maquinaria de acetilación/desacetilación en la longevidad celular	27
2.5.1- La maquinaria de acetilación/desacetilación celular	27
2.5.2- Las sirtuinas y la longevidad	30
2.5.3- Adhesión en <i>S. cerevisiae</i> : el papel de la maquinaria de acetilación/desacetilación	31
<u>Objetivos</u>	35
<u>Materiales y Métodos</u>	39
1- Materiales	41
1.1- Cepas de microorganismos	41
1.2- Plásmidos	44
1.3- Oligonucleótidos	44
2- Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	49
2.1- Bacterias	49

2.2- Levaduras	49
2.2.1- Crecimiento en condiciones de laboratorio	49
2.2.2- Crecimiento en condiciones de microvinificación	50
2.2.3- Condiciones de envejecimiento cronológico	51
2.2.4- Condiciones de autofagia	52
2.2.5- Medida de la resistencia a estrés	52
2.2.6- Medida de adherencia, formación de biofilm interfásico aire-líquido y morfología de colonia	53
3- Métodos de manipulación y análisis de ácidos nucleicos	54
3.1- Obtención de DNA	54
3.1.1- DNA plasmídico	54
3.1.2- DNA genómico de levadura	54
3.2- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	55
3.3- Electroforesis de DNA en geles de agarosa	55
3.4- Aislamiento de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa	56
3.5- Construcción de plásmidos	56
3.6- Obtención de RNA total de levadura	57
3.7- Electroforesis de RNA en geles desnaturalizantes de agarosa..	57
3.8- Transferencia de ácidos nucleicos a filtros	58
3.9- Marcaje de fragmentos de DNA con digoxigenina-11-dUTP	58
3.10- Hibridación de ácidos nucleicos	59
3.11- Inmunodetección de ácidos nucleicos	59
3.12- Revelado y cuantificación	59
3.13- Micromatrices de DNA	60
3.13.1- Obtención y marcaje de dDNA	60
3.13.2- Hibridación y análisis de micromatrices de DNA	60
4- Métodos de obtención y análisis de proteínas	61
4.1- Extracción de proteínas	61
4.1.1- Preparación de extractos proteicos para estudiar los niveles de proteína mediante <i>Western blot</i>	62

4.1.2-	Preparación de extractos proteicos para determinar la actividad enzimática	62
4.1.3-	Preparación de extractos proteicos para purificar mediante inmunoprecipitación.....	63
4.2-	Inmunoprecipitación de proteínas	63
4.3-	Técnicas electroforéticas	64
4.3.1-	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).....	64
4.3.2-	Transferencia del gel (Wesrtern blot) e inmunodetección de proteínas	64
4.3.3-	Revelado y cuantificación	65
4.4-	Determinación de actividades enzimáticas.....	65
4.4.1-	Métodos espectrofotométricos.....	65
4.4.2-	Zimogramas	67
5-	Medida de parámetros bioquímicos, enológicos y redox	67
5.1-	Determinación de azúcares reductores.....	67
5.2-	Determinación de etanol	67
5.3-	Determinación de ácido acético, acetaldehído y glicerol	68
5.4-	Determinación de la peroxidación de lípidos	68
6-	Métodos de manipulación de microorganismos	68
6.1-	Transformación de <i>Escherichia coli</i>	68
6.2-	Construcción de cepas de <i>S. cerevisiae</i>	69
6.3-	Transformación de levadura	70
7-	Técnicas microscópicas	71
8-	Tratamiento estadístico de los resultados	71
	<u>Resultados y discusión</u>	73
1-	Determinantes ambientales de la longevidad en levaduras vínicas ..	75
1.1-	Determinantes físicos de la LC	76
1.1.1-	Efecto del pH	76
1.1.2-	Efecto de la temperatura	78
1.2-	Determinantes químicos de la LC	76

1.2.1-	Efecto de los polifenoles resveratrol y quercetina en la longevidad de levaduras vínicas	76
1.2.2-	Efecto de los precursores del NAD ⁺ en la longevidad ...	85
1.2.3-	Efecto en la longevidad de los compuestos de dos carbonos producidos por el metabolismo fermentativo .	87
1.2.4-	Efecto de la restricción dietaria en la longevidad de levaduras vínicas	91
2-	Determinantes genéticos de la longevidad celular en levaduras vínicas	95
2.1-	Caracterización de la variabilidad natural de la longevidad de las levaduras vínicas	96
2.2-	Análisis del comportamiento en vinificación de las cepas vínicas industriales EC1118 y CSM	100
2.2.1-	Medida del crecimiento y de la viabilidad celular durante la vinificación	100
2.2.2-	Medida del estrés oxidativo y del daño celular	105
2.2.3-	Estudio de la autofagia durante la vinificación	106
2.3-	Análisis transcriptómico de las vínicas industriales EC1118 y CSM	110
2.3.1-	Estudio de la longitud de los telómeros durante la vinificación	113
2.4-	Estudio de la función de los genes <i>RDL1</i> y <i>RDL2</i>	114
2.5-	Estudio de la estructura y de la función del gen <i>CYR1</i> en levaduras vínicas	119
2.6-	Estudio del impacto de la apoptosis en la longevidad durante la vinificación.....	124
3-	Estudio de la función de la maquinaria de acetilación/ desacetilación en la formación de biofilm	127
3.1-	Papel de las sirtuinas y de las acetiltransferasas en la formación de <i>mats</i> en la cepa vínica C9	128
3.2-	Papel de las sirtuinas y de las acetiltransferasas en la formación de <i>mats</i> en la cepa comercial L2056	134

3.3- Papel de Sir2p en la interacción con el medio de las cepas de flor	137
4- Estudio de la función de la maquinaria de acetilación/ desacetilación en el metabolismo y en la longevidad	143
4.1- Papel de las sirtuinas y de las acetiltransferasas en el envejecimiento cronológico en condiciones de laboratorio	144
4.2- Papel de las sirtuinas y de las acetiltransferasas en el envejecimiento cronológico durante el proceso de vinificación ..	149
4.2.1- Análisis del comportamiento en vinificación de mutantes de sirtuinas y acetiltransferasas en la cepa C9	150
4.2.2- Análisis del comportamiento en vinificación de mutantes de sirtuinas y acetiltransferasas en cepas vónicas comerciales	153
4.2.2.1- Determinación de la viabilidad y longevidad celular	154
4.2.2.2- Estudio transcripcional a nivel genómico del mutante <i>sir2Δ</i>	159
4.2.2.3- Consumo de azúcares	160
4.2.2.4- Determinación de metabolitos	162
4.2.2.5- Determinación de actividades enzimáticas	168
4.3- Estudio de la acetilación de proteínas distintas a las histonas por las sirtuinas y las acetiltransferasas	177
4.4- Estudio de la función de Sas2p y Gcn5p en la regulación de la expresión de las proteínas Ald4p y Ald6p	180
4.4.1- Determinación de los niveles de Ald4p y Ald6p en los mutantes <i>sas2Δ</i> y <i>gcn5Δ</i> en condiciones de vinificación	181
4.4.2- Determinación de los niveles de Ald4p y Ald6p en el mutante <i>gcn5Δ</i> en condiciones de autofagia	184
4.4.3- Determinación de los niveles de mRNA del <i>ALD6</i> en el mutante <i>gcn5Δ</i> en condiciones de autofagia	186

4.5- Estudio del papel de la autofagia en la longevidad de cepas vínicas	189
4.5.1- Estudio del papel de Atg7p en la longevidad de la cepa vínica L2056 en condiciones de laboratorio	189
4.5.2- Estudio del papel de Atg7p en la longevidad de la cepa vínica L2056 en condiciones de vinificación	190
4.6- Estudio de la función de TOR en el control de la longevidad en cepas vínicas	193
4.7- Efecto de la sobreexpresión e las sirtuinas Sir2p y Hst3p y de la acetilasa Gcn5p durante la fermentación vínica	201
4.8- Extendiendo la exploración de genes implicados en la longevidad de las levaduras a otras familias de proteínas	209
<u>Conclusiones</u>	217
<u>Bibliografía</u>	221
<u>Anexo 1</u>	243

Introducción

1.- Las levaduras en la producción de vino

La producción de vino es un proceso que se ha realizado desde la antigüedad. Evidencias arqueológicas sitúan el origen de la producción del vino al sur del Cáucaso, alrededor del 7000 a.C. Posteriormente, existen referencias de la producción de vino en numerosas culturas, como la egipcia y la fenicia, siendo la época más importante para su expansión la correspondiente a las civilizaciones griegas y romanas, donde alcanza numerosos lugares del mundo antiguo, incluida España. A partir de ese momento, aumentó considerablemente el desarrollo de estrategias vitivinícolas, y actualmente la cultura del vino tiene una gran importancia socioeconómica.

Tradicionalmente el hombre utilizaba de manera inconsciente la levadura en las fermentaciones, pero no fue hasta 1856 cuando Louis Pasteur demostró que el microorganismo responsable de la conversión del

azúcar en etanol y dióxido de carbono en los procesos de fermentación es la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Debré, 1998; Jackson, 2000).

1.1- Levaduras responsables de la producción de vino

En la fermentación vínica, los azúcares y otros componentes del mosto de uva son transformados en etanol, dióxido de carbono y otros compuestos que contribuyen a la composición final del vino, como acetato, glicerol y multitud de moléculas orgánicas que contribuyen al aroma. Se trata de un proceso microbiológico complejo que implica interacciones entre levaduras, bacterias y hongos filamentosos. Entre estos organismos, las levaduras desempeñan un papel central. Se conocen miles de especies de levadura, pero las levaduras vínicas están representadas solamente por una quincena de ellas (Benda, 1982; Pretorius, 2000; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

1.1.1- La microbiota en la uva, en la bodega y en el mosto

Las especies de levadura que se encuentran en el mosto de forma natural pertenecen mayoritariamente a los géneros *Kluyveromyces*, *Hanseniospora*, *Pichia*, *Candida* y *Brettanomyces* (Pretorius, 2000; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). En los ambientes de las bodegas y en la maquinaria empleada para la producción del vino, se pueden encontrar de manera minoritaria levaduras del género *Saccharomyces* y diversas bacterias y hongos filamentosos (Orlic *et al.*, 2010; De Vuyst *et al.*, 2005). Como consecuencia de esta gran diversidad de microorganismos presentes al inicio de las vinificaciones espontáneas o tradicionales, en las que no se realiza inoculación externa, se produce una contribución muy variable de los mismos durante los primeros días de fermentación, la cual contribuye de manera importante a la heterogeneidad de las propiedades organolépticas del producto final. La composición y proporción de la microbiota inicial depende

de multitud de factores ambientales y ecológicos que varían dependiendo de la localización y de la añada. A medida que avanza la fermentación, se produce una competición por los nutrientes (Zott *et al.*, 2008) y las especies de género *Saccharomyces*, minoritarias al comienzo de la vinificación, se imponen por su mayor tolerancia a etanol, a las condiciones de anaerobiosis y a las elevadas concentraciones de sulfito (usado como antiséptico y antioxidante) y azúcares. La especie *S. cerevisiae* termina siendo la levadura predominante y es considerada como la principal responsable de la fermentación (Pretorius, 2000; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

La práctica tradicional consistente en la realización de vinificaciones espontáneas que se ha llevado a cabo durante siglos, ocasiona numerosos problemas en la industria vínica debido a la escasa reproducibilidad del proceso y del producto final, (Boulton *et al.*, 1996; Valero *et al.*, 2007). Por ello, el aislamiento y la selección de cepas vínicas naturales ha facilitado que la industria vinícola moderna haya optado por la inoculación de levaduras vínicas exógenas (con características enológicas óptimas), lo cual fomenta la imposición de la cepa seleccionada y el completo consumo de los azúcares del mosto, evita las paradas de fermentación y aporta un importante grado de reproducibilidad a lo largo de las diferentes campañas (Fleet, 1993). En la actualidad, la identificación por técnicas moleculares de cepas autóctonas adaptadas a cada región está facilitando su aislamiento y selección, de manera que las bodegas pueden utilizar la cepa de levadura más adecuada para cada vinificación con el fin de obtener un vino con las características organolépticas deseadas (Fernández-Espinar *et al.*, 2001; Kurtzman *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha sugerido que la utilización de inóculos también podría presentar inconvenientes, ya que la microflora natural interviene al inicio de la fermentación en las transformaciones bioquímicas del mosto generando vino de mayor complejidad organoléptica. Aunque diversos trabajos demuestran que aunque la cepa inoculada se impone rápidamente, no elimina completamente otras cepas en los primeros días de fermentación, con lo que esas transformaciones deseables para la riqueza organoléptica de los vinos podrían también tener lugar (Querol *et al.*, 1992; Fugelsang, 1996).

1.1.2- Características genéticas de las levaduras vínicas

Las cepas vínicas de *S. cerevisiae* aisladas de los ambientes de las bodegas difieren de manera importante de las cepas utilizadas cotidianamente en el laboratorio, sobre todo desde el punto de vista genético (Landry *et al.*, 2006). Las cepas de laboratorio han sido seleccionadas o manipuladas con el fin de que presenten auxotrofías para algunos aminoácidos o bases nitrogenadas, mientras que las cepas vínicas son protótrofas y por ello no tienen requerimientos nutricionales importantes. Esto plantea una importante diferencia en cuanto a las posibilidades de manipulación genética, ya que en las cepas vínicas se debe recurrir al uso de genes de resistencia a antibióticos, como la cicloheximida o la geneticina como marcadores de selección, o a crear auxotrofías para cada cepa de interés (del Pozo *et al.*, 1991; Hadfield *et al.*, 1990; Ramón y González, 2011). Otra gran diferencia se encuentra en la dotación genética, mientras las cepas de laboratorio son haploides o diploides y presentan longitudes cromosómicas definidas, las cepas vínicas comerciales, aunque son mayoritariamente diploides (Bradbury *et al.*, 2006), en muchos casos pueden ser poliploides o incluso aneuploides (Bakalinsky y Snow, 1990; Codon *et al.*, 1995), y muestran un elevado polimorfismo en la longitud cromosómica (Rachidi *et al.*, 1999), lo que determina una alta variabilidad en la capacidad de esporulación y en la viabilidad de las esporas. Esta diferencia también condiciona las posibilidades de manipulación genética de estas levaduras, ya que para conseguir una deleción génica es necesario realizar al menos dos procesos de disrupción, lo cual también se complica debido a su prototrofia. La ploidía podría proporcionar a estas levaduras ciertas ventajas de adaptación a entornos variables o podría constituir una forma de aumentar la dosis de algunos genes importantes para la fermentación (Bakalinsky y Snow, 1990; Salmon, 1990). Finalmente, las levaduras vínicas son mayoritariamente homotálicas (*HO*) por lo que, después de un proceso de esporulación, las células derivadas pueden cambiar de sexo, conjugarse con otra célula de tipo sexual opuesto, y formar una célula diploide y homocigota

para todos los genes excepto para el locus *MAT* (Bakalinsky y Snow, 1990; Thorton y Eschenbruch, 1976). Sin embargo, las levaduras de laboratorio son heterotáticas (*ho*), por lo que mantienen el tipo sexual y permanecen en estado haploide hasta que encuentran una célula de tipo sexual contrario.

1.2- Etapas del proceso de producción de vino y condiciones de estrés asociadas a las mismas

1.2.1- Etapas de la vinificación

El proceso de vinificación consta de múltiples etapas, tal y como se refleja en la Figura I.1.

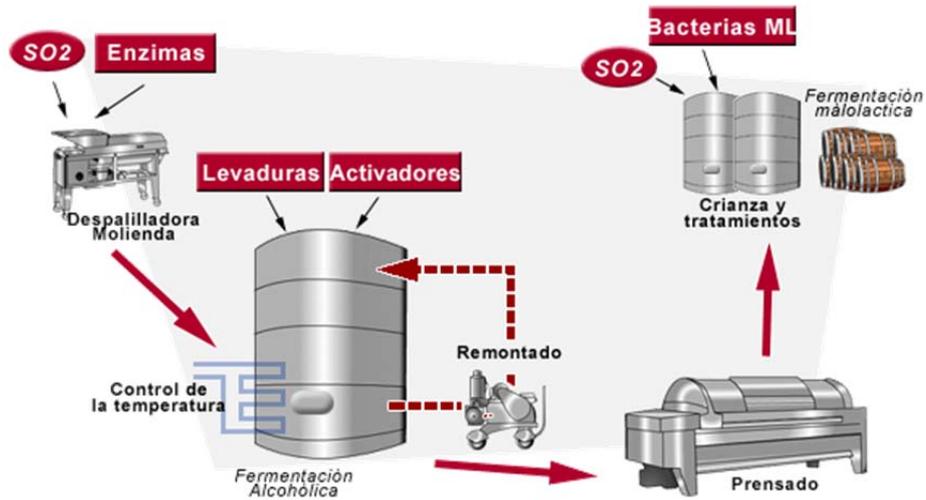


Figura I.1. Esquema representativo de las etapas que componen la producción de vino tinto.

Se inicia con la obtención del mosto mediante el prensado mecánico de la uva, previamente separada de los restos vegetales que componen el

racimo. Posteriormente, el mosto es introducido en grandes tanques de fermentación junto con un inóculo formado por levaduras iniciadoras, generalmente en forma de levadura seca activa (LSA). La producción industrial de biomasa de dichas levaduras se considera parte importante del proceso de producción de vino, ya que condiciona el estado fisiológico con que las células entran en contacto con el mosto. En esta etapa previa, las levaduras se obtienen mediante el crecimiento en condiciones óptimas para la obtención de una gran cantidad de biomasa, que consiste en la utilización de melazas enriquecidas con requerimientos nutricionales, como fuentes de nitrógeno, sales de fósforo y magnesio y diversas vitaminas, e induciendo un metabolismo respiratorio que se consigue mediante un cultivo de tipo fed-batch.

Posteriormente a la obtención de biomasa, las levaduras son sometidas a un proceso de deshidratación para su comercialización en forma de LSA. En la bodega, previamente al inóculo en el mosto, la LSA se somete a un proceso de rehidratación durante aproximadamente media hora a 37 °C en una solución de agua con glucosa al 5-10% (p/v) y posteriormente se adiciona directamente al tanque de fermentación a una concentración aproximada de 10^6 células/mL.

Una vez en el tanque, el proceso fermentativo comienza rápidamente y, tras un corto período de latencia, se inicia el crecimiento típico de *Saccharomyces* en las fermentaciones vínicas. Como se representa en la Figura I.2, dicho crecimiento consta de tres etapas (Lafon-Lafourcade, 1982; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). La primera es una fase de crecimiento exponencial limitado que dura entre 2 y 5 días, donde se produce un crecimiento de entre 4 y 7 generaciones, llegando a una densidad de 10^7 - 10^8 células/mL. En esta fase, la velocidad de fermentación es máxima y se produce el consumo de aproximadamente la mitad de los azúcares presentes en el mosto (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). A continuación, el cultivo entra en una fase quasi-estacionaria que puede constituir hasta el 80% de la duración total de la fermentación y durante la cual no se produce un aumento en el número de células en la población, pero la velocidad de fermentación sigue

alta debido a que las células están metabólicamente activas, y por ello sigue acumulándose etanol, que alcanza concentraciones muy altas (en torno a 110-140 g/L). Así, la parada en el crecimiento no se produce por el agotamiento de fuente de carbono sino por la ausencia de otro tipo de nutrientes, particularmente de fuente de nitrógeno, por lo que no podemos asimilar completamente esta fase a la fase estacionaria canónica obtenida en medios de cultivo de laboratorio, donde se ha consumido toda la glucosa y, tras el cambio diáuxico, también el etanol producido durante la fermentación.

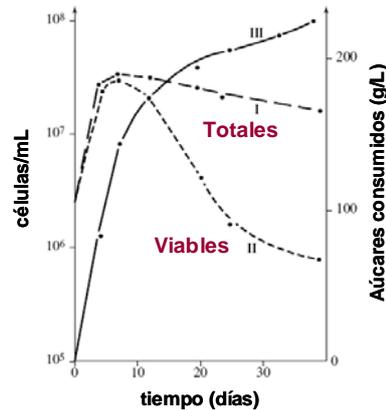


Figura 1.2. Curva de crecimiento y consumo de azúcares de *S. cerevisiae* durante la fermentación vinica. (I) Células totales. (II) Células viables. (III) Azúcares consumidos. Adaptado de Lafon-Lafourcade (1982).

Finalmente, el cultivo entra en una fase de muerte cuya duración puede ser muy variable, desde días a semanas. Esta fase puede comenzar cuando todavía quedan en el medio azúcares que siguen siendo consumidos por las células que permanecen viables en estado estacionario (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006), y se produce como consecuencia de las condiciones adversas a las que se enfrentan, como las altas concentraciones de etanol. Otros autores afirman que solo hay fase de muerte celular cuando se agotan los azúcares (Boulton *et al.*, 1996). Datos obtenidos en nuestro laboratorio

indican que se pueden observar ambos comportamientos, dependiendo de las condiciones y cepas utilizadas (Cardona *et al.*, 2007; Puig y Pérez-Ortín, 2000). A pesar de que el proceso de fermentación alcohólica es la fase mejor estudiada del proceso de elaboración del vino, todavía hay fenómenos cuya regulación está poco caracterizada, como las fase estacionaria y de muerte celular. La lisis posterior a la muerte de las células tiene también un papel esencial en ciertos procesos post-fermentativos, que se mencionan a continuación.

Una vez terminada la fermentación, se eliminan las levaduras y demás residuos sólidos por prensado. En la producción de la mayoría de vinos tintos de calidad se produce una fermentación maloláctica, llevada a cabo por bacterias lácticas, principalmente *Oenococcus oeni* (Alexandre *et al.*, 2004). En esta segunda fermentación se produce la descarboxilación del ácido málico a ácido láctico, lo que disminuye la acidez del vino, mejorando su sabor y su aroma. La interacción entre las levaduras y las bacterias lácticas es compleja. La lisis celular que acompaña a la muerte de las levaduras tras las fermentación alcohólica puede tener un efecto positivo o negativo según las condiciones, ya que se ha descrito que la liberación de ciertos compuestos, principalmente ácidos grasos de cadena corta, inhibe el crecimiento bacteriano, mientras que el efecto positivo es debido principalmente a la liberación de compuestos nitrogenados que promueven el crecimiento bacteriano. La lisis de las levaduras y posterior liberación de nutrientes también puede favorecer el crecimiento de levaduras alterantes del vino, como por ejemplo *Bretanomyces* (Fleet, 2003).

En ciertos vinos tradicionales, como los de Borgoña, se recurre al envejecimiento del vino en barril en presencia de las levaduras muertas (llamadas lías) durante 3 a 6 meses (Jackson, 2000). En esta maduración sobre lías (*sur lies*), la lisis de las levaduras mejora las características organolépticas del producto y las manoproteínas liberadas de la pared celular contribuyen a estabilizar el producto final.

En los vinos espumosos se produce una segunda fermentación llevada a cabo también por levaduras. En la elaboración de cava, una vez

finalizada la primera fermentación, se procede a la adición de levaduras con capacidad de floculación y de una fuente de carbono, generalmente sacarosa a una concentración de 20-25 g/L (Carrascosa *et al.*, 2011). Posteriormente se produce la segunda fermentación y el envejecimiento, donde tiene lugar la lisis celular que contribuye de manera importante a las características propias de este tipo de vinos. Tras el envejecimiento se procede a la eliminación de las lías y a la adición de licor de expedición para rellenar las pérdidas de vino.

En la elaboración de los vinos finos de Jerez, que son sometidos a una crianza biológica, no se añade una fuente de carbono fermentable, sino que se adiciona alcohol vínico hasta llegar a 15.5-16% (v/v), de manera que se produce un metabolismo respiratorio por parte de las levaduras denominadas de flor presentes en las bodegas. Estas levaduras forman de manera espontánea una película o velo sobre la superficie del vino, debido a que poseen la capacidad de agregar y flotar en medios con fuentes de carbono no fermentables. El metabolismo respiratorio produce un perfil aromático muy particular en estos vinos, donde es de especial relevancia la producción de acetaldehído en grandes concentraciones. Estas levaduras, aunque también pertenecen a la especie *S. cerevisiae*, son muy distintas a las de fermentación con respecto a sus características metabólicas, fisiológicas y genéticas (Benítez *et al.*, 2011).

1.2.2- Condiciones de estrés asociadas a las fases del proceso de producción de vino.

Durante la propagación de biomasa, las células están sometidas a diversas condiciones de estrés. Al inocular las células en la melaza se produce un estrés hiperosmótico debido a la alta concentración de azúcares, y posteriormente, durante el crecimiento, la presencia de oxígeno y los cambios metabólicos determinan la aparición de un importante estrés oxidativo (Gómez-Pastor *et al.*, 2010a; Pérez-Torrado *et al.*, 2005). También suelen producirse de forma solapada condiciones de estrés hipo osmótico, iónico, por presencia de ácidos orgánicos y alcoholes y, entre las etapas de

realimentación, pueden darse situaciones de ayuno y limitación de nutrientes. La fase final de preparación de la levadura seca activa (LSA) conjuga un periodo prolongado de privación de nutrientes con los múltiples efectos de la pérdida de agua que enfrentan a las levaduras a un punto crítico para su estabilidad tecnológica (Singh *et al.*, 2005). Además, el déficit de agua aumenta la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) que contribuyen al daño celular actuando sobre lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Franca *et al.*, 2007). Aunque el proceso de rehidratación se realiza a pie de cuba y se intenta que se produzca en el menor tiempo posible, en este punto las levaduras están sometidas a un estrés hipoosmótico y por choque térmico (Novo *et al.*, 2007).

En la fase de fermentación alcohólica, las células están sometidas a importantes condiciones de estrés: choque hiperosmótico, bajo pH, variaciones de temperatura, deficiencias nutricionales, niveles subóptimos de oxígeno, presencia de compuestos fenólicos, etc. (Bisson *et al.*, 2007). En los mostos se alcanzan concentraciones de azúcares entre el 20 y el 28% (p/v), lo que causa que inicialmente las células sufran un importante choque hiperosmótico en el momento de la inoculación. La respuesta molecular al estrés osmótico al inicio de la vinificación es compleja y depende de numerosos factores (Pérez-Torrado *et al.*, 2002a). Una de las principales respuestas de la levadura frente a este estrés es la activación de genes implicados en la síntesis de glicerol, por lo que se produce una acumulación intracelular de este osmolito compatible. También se ha descrito la importancia de otros genes de respuesta general a estrés, que participan en procesos celulares diferentes a la síntesis de glicerol, y que intervienen en la capacidad de las levaduras para superar el estrés osmótico e iniciar su crecimiento en el mosto (Zuzuarregui y del Olmo, 2004). El mosto supone unas condiciones de estrés ácido en comparación con los medios de laboratorio. Su pH sin embargo, está dentro del rango para el crecimiento óptimo de las levaduras vínicas (entre 2.75 y 4.2), que están especialmente adaptadas al mismo (Heard *et al.*, 1988). Además, la elevada concentración de ácidos como el cítrico o el málico, confieren a este medio una gran

capacidad tamponadora. En cuanto a la temperatura, *S. cerevisiae* muestra una temperatura óptima de crecimiento alrededor de los 28 °C, y aunque puede adaptarse a un amplio rango de temperatura, se produce la inducción de genes de respuesta a estrés térmico tanto a temperaturas altas como bajas (Aranda *et al.*, 2011). Aún así, la producción de vino tinto suele realizarse en torno a los 20 °C, y el aumento que se produce debido al carácter exotérmico de la reacción, suele estar controlado puesto que conforme la temperatura aumenta, también lo hace la toxicidad del etanol. Además, el aumento de temperatura favorece la evaporación de este metabolito y de otros compuestos volátiles esenciales para las características organolépticas del vino (Torija *et al.*, 2003). Por el contrario, las temperaturas bajas ralentizan el metabolismo y aumentan el riesgo de paradas de la fermentación (Beltrán *et al.*, 2006).

Al final de la fase de fermentación, se produce un estrés causado por la elevada concentración de etanol que se alcanza durante el avance de la fermentación, que es también muy importante en la elaboración de algunos vinos, como los cavas y los vinos de Jerez, donde se parte de concentraciones de 95-115 g/L y de 150-155g/L de etanol, respectivamente (Carrascosa *et al.*, 2011). El etanol es altamente tóxico y afecta al metabolismo y crecimiento de las levaduras. El efecto de mayor repercusión en la fisiología de las células de levadura es la alteración de la permeabilidad de las membranas (Nabais *et al.*, 1988). Estudios transcriptómicos en condiciones de laboratorio demuestran que el etanol provoca la inducción de numerosos genes de respuesta a estrés, tanto específicos de la detoxificación de este metabolito, como de otros relacionados con la homeostasis de iones, choque térmico, síntesis de trehalosa y defensa antioxidante (Alexandre *et al.*, 2001). También se ha encontrado una mayor sensibilidad a etanol en mutantes de genes relacionados con la respiración, indicando que la sensibilidad a etanol es mayor en condiciones de limitación de oxígeno (Fujita *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2008).

Durante la fermentación vínica también se produce una acumulación de acetaldehído. Esta molécula es particularmente tóxica debido a su

reactividad química, especialmente cuando la concentración de etanol es baja (Stanley *et al.*, 1993). La resistencia al acetaldehído se correlaciona con numerosos cambios de expresión de diversos genes relacionados con el metabolismo del azufre, la resistencia a estrés y otros genes relacionados con la expresión génica, como las sirtuinas (Aranda y del Olmo, 2004; Aranda y del Olmo, 2003; Aranda *et al.*, 2002). Parte del acetaldehído puede pasar a acetato por acción de las aldehído deshidrogenasas (Ald), disminuyendo la producción de etanol. El ácido acético es también un conocido inductor de la apoptosis (Kaeberlein, 2010). La acumulación de acetato y acetaldehído por encima de ciertos límites no es deseable durante la fermentación vinica, mientras que la cantidad final de etanol es uno de los parámetros fundamentales que definen el éxito de una fermentación (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006), por lo que el equilibrio entre estas tres especies químicas y las enzimas que las producen es de vital importancia en enología.

Al final de la fase de fermentación, se produce también un estrés por agotamiento de nutrientes, que provoca que las células entren en estado estacionario. La entrada en fase estacionaria es un proceso complicado y altamente regulado, que depende de importantes cambios en la expresión génica de numerosos genes con función en procesos celulares muy distintos. En condiciones de vinificación la entrada en fase estacionaria se atribuye al agotamiento de nitrógeno que, como se comentará más adelante, reprimiría la actividad de la ruta TOR (Rossignol *et al.*, 2003). Se produce una represión de genes relacionados con el crecimiento, como la síntesis de RNA y proteínas y una inducción de genes de resistencia general a estrés, de homeostasis de protones, de biogénesis de la pared celular y de genes relacionados con la biosíntesis de carbohidratos, como los del metabolismo del glucógeno y de la trehalosa (Pérez-Torrado *et al.*, 2002; Puig y Pérez-Ortín, 2000; Rossignol *et al.*, 2003).

La deficiencia de nitrógeno es uno de los principales problemas en enología, ya que puede conducir a la ralentización o incluso la parada de la fermentación (Bisson *et al.*, 2007), lo que conlleva grandes pérdidas económicas. La intervención habitual en estos casos es añadir una fuente de

nitrógeno fácilmente asimilable, como el fosfato de diamonio, aunque si la parada se encuentra en un estadio avanzado, la adición de nitrógeno resulta ineficaz para reanudar el proceso. La deficiencia de nitrógeno desencadena una amplia respuesta transcripcional que implica la activación de genes del metabolismo oxidativo de la glucosa y de la síntesis de proteínas (Mendes-Ferreira *et al.*, 2007).

En los procesos de segunda fermentación y de crianza biológica que tiene lugar en la producción de cava y de vinos de Jerez, las levaduras están sometidas a unas condiciones de estrés muy severas, debidas fundamentalmente a la elevada concentración de etanol presente durante todo el proceso de envejecimiento. Durante la producción de vinos espumosos las levaduras parten de estar sometidas a una concentración de etanol de 9-10% (v/v), que va aumentando conforme transcurre la segunda fermentación (Carrascosa *et al.*, 2011). En el caso del envejecimiento en la crianza biológica, tras el encabezado, la concentración de este metabolito puede alcanzar el 16% (v/v) (Benítez *et al.*, 2011). En la segunda fermentación también se produce un estrés por baja temperatura, ya que suele producirse en torno a los 12 °C. En el velo, las levaduras están sometidas también a altas concentraciones de acetaldehído, intermediario producido en el metabolismo respiratorio, a estrés hídrico y por ausencia de nitrógeno.

2.- La longevidad de las levaduras

El envejecimiento es un proceso natural que conduce a la degradación de las funciones biológicas que acompaña al paso del tiempo (Carnes, 2011), y que termina provocando la muerte de la célula o del individuo. La levadura *S. cerevisiae* ha sido utilizada como modelo eucariota para estudiar los mecanismos moleculares que modulan la duración de la vida, o longevidad, desde hace más de 50 años (Mortimer y Johnston, 1959). Este organismo, en comparación con otros sistemas modelo, permite una fácil y rápida medida de la longevidad, por lo que su utilización ha permitido un importante progreso en la identificación de docenas de factores que regulan el envejecimiento. La mayoría de los factores que regulan este proceso en invertebrados y en mamíferos han sido caracterizados en levadura, y estos estudios han dado lugar al descubrimiento de posibles drogas anti-edad. Esto es debido a que, aunque diversos aspectos del envejecimiento son específicos de levadura, la mayoría de los mecanismos

que regulan la longevidad en este organismo están muy conservados (Kaeberlein, 2010). En la última década se ha producido una revolución en el entendimiento del proceso de envejecimiento, y por ello está creciendo un ambiente optimista en torno a la posibilidad de intervención en su regulación.

En la determinación de la longevidad intervienen diversos mecanismos reguladores de gran importancia en la fisiología de la célula, entre ellos, las rutas de señalización por nutrientes, la maquinaria de acetilación/desacetilación, la respuesta a estrés y la autofagia. Estos mecanismos poseen funciones muy diversas en la célula, formando una compleja red donde el efecto de cada uno interviene directa o indirectamente en la regulación de los otros, de forma que conjuntamente tienen una consecuencia común, la determinación de la longevidad.

2.1- Longevidad replicativa y longevidad cronológica

De manera similar a los organismos pluricelulares, las células de levadura poseen dos tipos de envejecimiento (Figura 1.3), la longevidad replicativa (LR) y la longevidad cronológica (LC) (Kaeberlein, 2010). La LR es un parámetro que deriva de la división celular asimétrica de esta levadura de gemación y se define como el número de células hijas producido por una célula madre. Este es el modelo de longevidad de las células activas mitóticamente, como los fibroblastos y los linfocitos de mamíferos, y en *S. cerevisiae* puede medirse mediante la utilización de un microscopio y microdisecionando las células hijas, fácilmente distinguibles. El número máximo de generaciones es variable, ya que depende de la cepa, por ejemplo, en la cepa de laboratorio BY4742 el número de generaciones es en promedio de 27 (Steinkraus *et al.*, 2008). El daño celular que causa el envejecimiento se retiene en la célula madre, liberando a la célula hija de dicha carga y dotándola de una máxima capacidad intrínseca de división (Kaeberlein, 2010). El principal marcador molecular del envejecimiento replicativo es la acumulación de los denominados Círculos

Extracromosómicos de DNA Ribosómico (*Extrachromosomal Ribosomal DNA Circles*, ERCs). Se trata de pequeñas moléculas circulares de DNA derivadas de la recombinación entre las copias en tándem de los genes que codifican para el rRNA (Sinclair y Guarente, 1997) y que son capaces de replicarse autónomamente, secuestrando factores celulares esenciales y promoviendo el envejecimiento. Las proteínas dañadas por el estrés oxidativo y las mitocondrias inactivas o dañadas también tienden a retenerse en las células madres (Erjavec *et al.*, 2007; Lai *et al.*, 2002), rejuveneciendo a las células hijas.

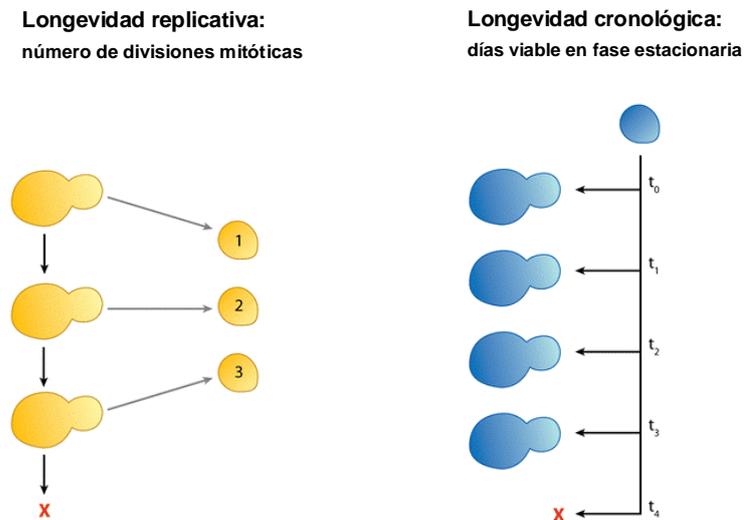


Figura I.3. Modelos de longevidad replicativa (izquierda) y longevidad cronológica (derecha) en *S. cerevisiae*. Adaptado de Steinkraus *et al.* (2008).

La LC se define como la capacidad de las células estacionarias de mantener la viabilidad en el tiempo, y es el modelo de longevidad de las células postmitóticas que constituyen la mayor parte de los tejidos en mamíferos. En la levadura *S. cerevisiae* este modelo de envejecimiento suele medirse mediante el cultivo en medio líquido donde, tras consumirse la fuente

de carbono y entrar en fase estacionaria, se van tomando muestras a lo largo del tiempo y se mide la capacidad de crecimiento en medio fresco evaluando la formación de colonias. La LC es muy variable, ya que puede durar desde días a meses, dependiendo de la cepa y del medio de cultivo. En este tipo de envejecimiento, las proteínas y las mitocondrias dañadas se van acumulando a lo largo del tiempo a pesar de los mecanismos de protección, pudiendo causar la muerte celular (Kaeberlein, 2010).

A pesar de las claras diferencias entre ellos, estos modelos de longevidad mantienen una relación estrecha, ya que la edad cronológica de una levadura tiene un efecto negativo en su longevidad replicativa, es decir, las células hijas de una madre envejecida cronológicamente se dividen menos veces que las que proceden de madres jóvenes (Ashrafi *et al.*, 1999; Kennedy *et al.*, 1994).

Desde el punto de vista de su relevancia en los procesos industriales relacionados con la elaboración de vino, el estudio de la longevidad replicativa es interesante en los procesos que requieren una elevada capacidad de división celular, como la producción de biomasa, mientras que la longevidad cronológica es relevante en un cultivo que ya no se divide, como ocurre al final de la fermentación alcohólica. En este trabajo se han pretendido estudiar los factores que regulan la longevidad cronológica de las levaduras vínicas, con la finalidad de ampliar el conocimiento de los procesos que regulan el envejecimiento y la muerte celular al final de la vinificación. Veremos los principales mecanismos celulares implicados en el envejecimiento cronológico, y cómo responden y se adaptan las células de levadura a los condicionantes externos.

2.2- Papel de las rutas de señalización por nutrientes en la longevidad

En todos los organismos eucariotas existen complejas rutas de señalización celular, que están muy conservadas y que aseguran una rápida

y óptima adaptación del metabolismo en respuesta a los cambios ambientales. Las rutas de señalización por nutrientes regulan el crecimiento y la proliferación celular, el metabolismo y la resistencia a estrés. En levadura, estas rutas permiten a la célula un óptimo consumo de nutrientes estimulando el crecimiento, y en períodos de escasez de nutrientes inducen la entrada en fase estacionaria, asegurando la supervivencia por largos períodos de tiempo (Zaman *et al.*, 2008).

La principal alteración ambiental que extiende la longevidad es la disminución del aporte de nutrientes sin inducir la malnutrición, la llamada restricción dietaria. Este parámetro es determinante de la longevidad en todos los organismos eucariotas, y en *S. cerevisiae* extiende tanto la longevidad replicativa como la cronológica (Kaeberlein *et al.*, 2007). En levadura, la restricción dietaria puede ejercerse disminuyendo el aporte de fuentes de nitrógeno o de carbono, llamándose en este último caso, restricción calórica. La restricción calórica en levaduras se provoca por disminución de la concentración de glucosa del 2% estándar al 0.5-0.05%. La disminución del aporte calórico conlleva diversos cambios fisiológicos relevantes para la longevidad (Kaeberlein, 2010), regulados fundamentalmente por las rutas de señalización por nutrientes Ras/cAMP/PKA y TOR/Sch9p (Figura I.4). Diversos estudios globales de expresión génica ponen de manifiesto que la mayoría de genes implicados en la longevidad cronológica están relacionados con la actividad de estas rutas de señalización por nutrientes (Delaney *et al.*, 2011; Powers *et al.*, 2006).

La ruta Ras/cAMP/PKA es la principal vía de control de la disponibilidad de fuente de carbono fermentable. En presencia de glucosa, Ras activa a la adenilato ciclasa Cyr1p, que hace aumentar el nivel de cAMP, el cual activa a la proteína quinasa A (Smets *et al.*, 2010). Como resultado de esta activación se estimula el crecimiento y la proliferación celular, se reprime la movilización de carbohidratos de reserva como el glucógeno y la trehalosa, y se inhibe la transcripción de genes de respuesta general a estrés mediada por los factores transcripcionales Msn2/4p (Figura I.4). La ruta TOR/Sch9p controla la respuesta a la disponibilidad de nitrógeno. En presencia de

nitrógeno asimilable, Tor1p (una de las dos proteína quinasas Tor presentes en levadura) fosforila, entre otros, a la quinasa Rim15p, inactivándola, de manera que no se inducen genes implicados en otras rutas, como por ejemplo los de respuesta estrés vía Msn2/4p, ni los de fase estacionaria dependientes de Gis1p, ni los implicados en el metabolismo del nitrógeno dependientes de Gln3p. Por otra parte, activa a otra serina/treonina proteína quinasa, Sch9p, la cual promueve la biogénesis de ribosomas y la traducción (Figura 1.4). En relación al proceso de síntesis de proteínas, estudios recientes demuestran una relación directa y negativa entre traducción y longevidad, de manera que mutantes con una menor tasa de traducción, son más longevos (Delaney *et al.*, 2011; Kaeberlein y Kennedy, 2011). Las dos rutas Ras/cAMP/PKA y TOR/Sch9p también convergen en la represión del proceso de autofagia, un proceso esencial en la respuesta a la restricción dietaria y de una gran relevancia en longevidad, tal y como se describirá en el siguiente apartado.

La reducción de la actividad de la rutas Ras/cAMP/PKA y TOR/Sch9p conduce al aumento de la longevidad en diversos organismos modelo (Fontana *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2009). En levadura, la utilización de inhibidores químicos (como la rapamicina o la metilsulfamida, inhibidores de TOR) o la mutación de genes codificantes de algunas de las proteínas que cause una disminución en la actividad de estas rutas, como Tor1p, Sch9p ó Cyr1p, causan la extensión de la longevidad, tanto cronológica como replicativa (Fabrizio *et al.*, 2001; Kaeberlein *et al.*, 2005). De especial interés en enología resulta el hecho de que la inhibición de TOR/Sch9p provoca un aumento en la acumulación de glicerol, un metabolito que estimula la LC (Wei *et al.*, 2009)

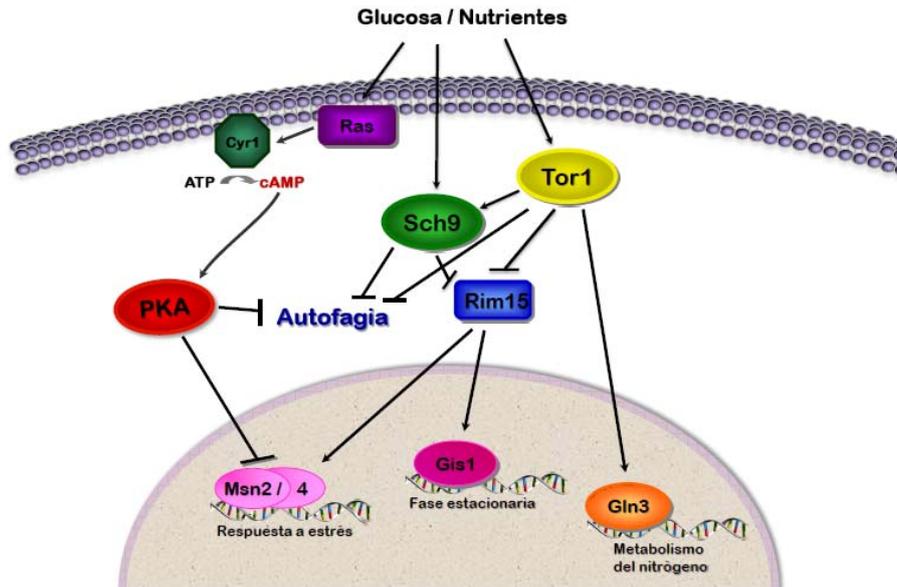


Figura I.4. Esquema de las rutas de señalización por nutrientes PKA, TOR y Sch9p y su efecto en los procesos que regulan la longevidad cronológica en *S. cerevisiae*.

2.3- Papel de la autofagia en la longevidad

La autofagia es un proceso catabólico muy conservado en eucariotas que permite reciclar componentes intracelulares mediante su degradación en compartimentos líticos (lisosomas o vacuolas) (Kiel, 2010; Nakatogawa *et al.*, 2009). Existen dos tipos de autofagia, la microautofagia y la macroautofagia. En la primera es la propia membrana de la vacuola la que se invagina y rodea de manera inespecífica una porción de citoplasma que se va a hidrolizar, la cual también puede contener orgánulos. En la macroautofagia se produce la formación de vesículas de doble membrana que rodean parte del citoplasma, llamadas autofagosomas y que se fusionan con la vacuola para hidrolizar su contenido. La formación de los autofagosomas es un proceso muy regulado, en el que intervienen una treintena de genes altamente conservados, la

mayoría englobados dentro del grupo de genes *ATG*, que codifican tanto para proteínas estructurales como reguladoras. Tradicionalmente se había considerado que la macroautofagia era un mecanismo no selectivo de degradación, pero diversos estudios demuestran, que al igual que ocurre con otros mecanismos específicos de degradación que actúan de forma constitutiva en la célula, como el mediado por el proteasoma o la ruta CVT (*Cytoplasm to Vacuole Targeting*), la macroautofagia puede conducir a la degradación de proteínas de manera específica, como ocurre con las proteínas vacuolares Ape1p y Ams1p o con la aldehído deshidrogenasa citosólica Ald6p, que han sido localizadas en los autofagosomas (Onodera y Ohsumi, 2004; Huang y Klionsky, 2002).

En *S. cerevisiae* la macroautofagia (a partir de ahora simplemente autofagia), se induce en respuesta al ayuno, y mediante este reciclaje de macromoléculas, la célula puede obtener nuevos nutrientes permitiendo la supervivencia en esas condiciones de escasez nutricional. En la regulación del proceso de autofagia intervienen mecanismos con un importante papel en longevidad, como las rutas de señalización por nutrientes TOR/Sch9p y Ras/cAMP/PKA (Yorimitsu *et al.*, 2007), que mediante su inactivación en condiciones de restricción dietaria, regulan de manera positiva la autofagia. También la maquinaria de acetilación/desacetilación celular tiene un importante papel en su regulación, ya que en mamíferos, la desacetilasa Sirt1p desacetila a Atg7p, proteína indispensable en la formación de los autofagosomas (Rubinsztein *et al.*, 2011). Determinados compuestos químicos, como la espermidina y la rapamicina, activan la autofagia y extienden la longevidad en condiciones de laboratorio (Alvers *et al.*, 2009; Eisenberg *et al.*, 2009; Neufeld, 2010).

Aunque el efecto positivo de la autofagia en longevidad está comúnmente aceptado, existen evidencias que demuestran que este efecto podría estar reducido a condiciones metabólicas concretas, de manera que su efecto dependería del estado fisiológico de la célula. Por ejemplo, en levadura, el estrés proteotóxico causado por una proteína autoagregante, la α -sinucleína, induce una activación descontrolada de la autofagia que lleva a

la muerte celular (Sampaio-Marques *et al.*, 2011) y en células de ratón, la autofagia se requiere para la muerte celular, ya que la falta de Atg7p provoca el bloqueo de la muerte celular programada por apoptosis (Yu *et al.*, 2004). Por ello, se está produciendo un interés creciente en la búsqueda de compuestos químicos que estimulen la autofagia, como inhibidores de la ruta TOR, que puedan utilizarse en la terapia contra el cáncer (Mathew *et al.*, 2007).

En levaduras vínicas, también se ha relacionado la autofagia con la autólisis celular (Cebollero *et al.*, 2005) ya que el alelo *csc1-1*, que presenta una autofagia constitutiva, acelera la autólisis durante el proceso de segunda fermentación que tiene lugar en la elaboración de vinos espumosos. En este proceso, la producción de una autólisis temprana es de gran importancia para las propiedades organolépticas del producto final (Albeliovich y González, 2009).

2.4- Papel de la respuesta a estrés en la longevidad

Numerosos trabajos demuestran una relación directa entre estrés y longevidad, además, su efecto negativo o positivo no depende únicamente del tipo de estrés, sino del estado fisiológico de la célula.

Uno de los estreses clave en longevidad es el estrés oxidativo. Numerosos estudios en *S. cerevisiae* demuestran que la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) causa daños en el DNA, en proteínas y en lípidos de membrana, provocando la activación de mecanismos de envejecimiento y apoptosis (Kaeberlein, 2010). De manera relacionada con este tipo de estrés, se ha propuesto la existencia de un mecanismo de envejecimiento altruista, que consiste en que determinados miembros de la colonia inducen la muerte celular por apoptosis para beneficiar de los nutrientes a los individuos más resistentes. Esta muerte altruista es dependiente de la presencia del ion superóxido, ya que la sobreexpresión del gen de la superóxido dismutasa (*SOD2*) afecta negativamente a este proceso

(Fabrizio *et al.*, 2004a). Respecto al proceso de apoptosis y su relación con el estrés oxidativo, la delección del gen de la proteína mitocondrial Aif1p, que es un factor inductor de dicho proceso de muerte celular, aumenta la resistencia a estrés oxidativo y alarga la longevidad cronológica (Wissing *et al.*, 2004). También se han detectado marcadores típicos de apoptosis, como fragmentación de la cromatina o aparición de fosfatidilinositol en el exterior de las células envejecidas cronológicamente, y estos marcadores se asocian con la presencia de ROS (Fabrizio *et al.*, 2004b; Herker *et al.*, 2004).

La interpretación tradicional de la relación entre estrés oxidativo y longevidad se formula como la teoría de los radicales libres, donde se afirma que el envejecimiento está causado principalmente por la acumulación de moléculas dañadas a causa del efecto de los radicales libres, producidos principalmente por un desequilibrio en la cadena de transporte electrónica mitocondrial a causa del metabolismo (Balaban *et al.*, 2005). Pero recientemente esta teoría está siendo desafiada por diversos autores que postulan que si la acumulación de moléculas dañadas no conduce necesariamente a la muerte celular, la activación de la respuesta a estrés oxidativo podría afectar positivamente a la longevidad debido a mecanismos de adaptación que provocan un fenotipo más resistente (Blagosklonny, 2008; Stanfel *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2008). En este sentido, el estrés oxidativo podría afectar positivamente a la longevidad debido al papel inhibitor que tiene sobre las rutas TOR/Sch9p y Ras/cAMP/PKA, que causarían la activación de la autofagia y de la respuesta general a estrés mediante los factores de transcripción Msn2/4p. Además, la actividad de Sod2p está regulada por Sch9p (Fabrizio *et al.*, 2003).

El etanol producido durante el metabolismo fermentativo se ha relacionado tradicionalmente como una condición de estrés inductora del envejecimiento y de la muerte celular (Fabrizio *et al.*, 2005). La actividad de la alcohol deshidrogenasa Adh2p al final de la fermentación causa una asimilación temprana del etanol en esta fase y por ello una mejor entrada en fase estacionaria, que conduciría a un aumento en la longevidad cronológica.

La sobreexpresión de otra isoenzima, la Adh1p, también posee un efecto beneficioso en la longevidad cronológica (Reverter-Branchat *et al.*, 2007).

En cuanto al efecto del pH, se ha propuesto que la acidificación del medio causada principalmente por la acumulación de ácido acético producido por el metabolismo fermentativo, es la causa principal del envejecimiento cronológico en medios de laboratorio (Burtner *et al.*, 2009). Esto apoya la idea de que diferentes procesos que provocan una disminución del metabolismo fermentativo, tales como la restricción calórica o el crecimiento en fuentes de carbono alternativas no fermentables, que causan una inhibición de las rutas de señalización por nutrientes Sch9p/TOR y Ras/cAMP/PKA, conllevan el aumento de la longevidad. Esto hace muy interesante el estudio de la longevidad cronológica en otros medios cuyo pH no varía durante el crecimiento fermentativo, como ocurre con el mosto de uva.

El estrés osmótico aumenta la longevidad cronológica, pero solo cuando dicho estrés es debido a una elevada osmolaridad independiente de la concentración de glucosa, es decir, que la longevidad aumenta con el estrés osmótico que provoca el sorbitol o sales como el cloruro de sodio, pero no cuando está producido por elevadas concentraciones de glucosa (Murakami *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2007).

2.5- Papel de la maquinaria de acetilación/desacetilación en la longevidad

2.5.1- La maquinaria de acetilación/desacetilación celular

Uno de los tipos más comunes de modificación postraduccional de las proteínas es la adición de residuos de acetilo a los grupos amino ϵ de los residuos de lisina. El ejemplo mejor caracterizado es la modificación de los residuos de lisina presentes en las colas de las histonas (Shahbazian y

Grunstein, 2007). Dicha modificación conlleva un cambio en la condensación de la cromatina, de manera que las acetiltransferasas se relacionan con una menor condensación de la cromatina y, por ello, con una activación transcripcional, mientras que las desacetilasas promoverían el efecto contrario. De particular interés es el estado de condensación de regiones particulares del genoma, como los télómeros, el DNA ribosómico y los locus de tipo sexual (*mating*) *HML/HMR* que se encuentran organizados en un tipo de heterocromatina particular en la que se considera que los genes están silenciados. Por ejemplo, la acción de la desacetilasa Sir2p sobre la lisina 16 de la histona H4 extiende el silenciamiento a las regiones subteloméricas, mientras que la acción de la acetiltransferasa Sas2p sobre el mismo residuo revierte dicho silenciamiento (Suka *et al.*, 2002). Actualmente, se dispone de una visión bastante amplia de la modificación postraduccional de las histonas y su impacto en la expresión génica (Krebs, 2007; Millar y Grunstein, 2006), que se resume en la Figura I.5 donde se muestran algunas de las enzimas implicadas.

El papel de la maquinaria de acetilación no se reduce al control del inicio de la transcripción. Por ejemplo, la acetiltransferasa Gcn5p forma parte del complejo SAGA (Spt-Ada-Gcn5-Acetiltransferasa), que además de controlar el inicio de transcripción de múltiples genes, también tiene un papel en la elongación de la transcripción y en el transporte de los RNA mensajeros (Rodríguez-Navarro, 2009).

Menos investigado ha sido el papel de desacetilasas y acetiltransferasas en el control directo de la actividad o función de otras proteínas. En la actualidad, se ha determinado el impacto generalizado de la acetilación en el control de la glicólisis en células humanas y en *Salmonella* (Norvell y McMahon, 2010). Se ha descrito que Sir2p actúa sobre la acetil CoA sintetasa en células humanas y bacterianas (Starai *et al.*, 2004).

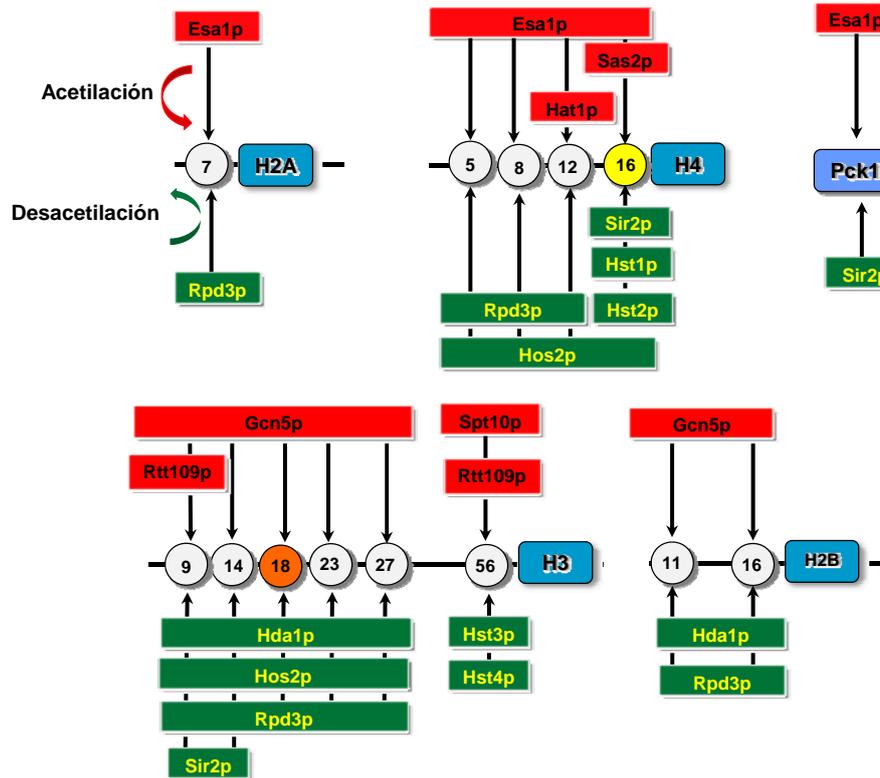


Figura I.5. Esquema de la acción de las desacetilasas y acetiltransferasas sobre las histonas y Pck1p. Basado en Millar y Grunstein, (2006) y Krebs, (2007). En amarillo se destacan los residuos implicados en longevidad.

En *S. cerevisiae* únicamente hay un caso perfectamente caracterizado de regulación enzimática por acetilación. Se ha descrito que el enzima gluconeogénico fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (Pck1p) es acetilado y activado por el complejo NuA4, donde actúa como subunidad catalítica Esa1p. Antagónicamente, la desacetilasa Sir2p disminuye la actividad enzimática (Lin *et al.*, 2009). La pareja Esa1p/Sir2p se ha asociado a la regulación del estado de acetilación de ciertos residuos de las histonas H3 y

H2A (ver Figura I.5), lo cual nos invita a pensar que muchas de estas modificaciones podrían trasladarse a otros sustratos celulares.

2.5.2- Las sirtuinas y la longevidad

Las sirtuinas son desacetilasas de clase III que poseen un mecanismo diferente al resto de desacetilasas, ya que en la reacción de desacetilación se consume una molécula de NAD⁺ produciendo nicotinamida y O-acetil ADP ribosa (Sauve *et al.*, 2006). La nicotinamida, además del producto de la reacción, es un inhibidor de la actividad de estas enzimas (Bitterman *et al.*, 2002). La nicotinamida es hidrolizada a ácido nicotínico, y ambas formas de la vitamina B2 son utilizadas como precursores del NAD⁺ (Lin y Guarente, 2003). *S. cerevisiae* también puede producir NAD⁺ a partir de triptófano, pero sólo en presencia de oxígeno, de manera que en anaerobiosis, la nicotinamida y el ácido nicotínico se comportan como vitaminas. El paradigma de esta familia de enzimas, y responsable de su nombre, es la proteína Sir2p de *S. cerevisiae*, que junto a Hst1-4p constituyen las cinco sirtuinas que existen en levadura. Ya se ha mencionado el papel fundamental de Sir2p en el control de la compactación de la cromatina. Sir2p es además clave en el control de la longevidad. Su delección disminuye la longevidad replicativa y su sobreexpresión la alarga (Steinkraus *et al.*, 2008). El papel de Sir2p en longevidad se ha asociado a su capacidad para aumentar la estabilidad genómica de las zonas silenciadas. Su actividad suprime la formación de círculos extracromosómicos (ERCs) que se han identificado como los principales causantes del envejecimiento replicativo. Conforme las células envejecen replicativamente disminuye la cantidad de Sir2p y la acetilación del residuo 16 de la histona H4, que es un marcador de envejecimiento, provocando la alteración de la cromatina de las regiones subteloméricas, y causando la reducción de la longevidad (Dang *et al.*, 2009). La acetiltransferasa Sas2p es la antagonista a la desacetilasa Sir2p en este proceso de envejecimiento. Se ha observado también que tras un estrés genotóxico causado por H₂O₂, Sir2p sufre una reordenación en el genoma,

abandonando las regiones heterocromáticas para participar en la reparación de las zonas dañadas (Oberdoerffer *et al.*, 2008), dando un cambio transcripcional similar al observado en células envejecidas. El papel de Sir2p en la longevidad cronológica ha resultado ser el contrario al observado en longevidad replicativa, ya que su actividad bloquea el aumento de longevidad causado por el ayuno extremo (Fabrizio *et al.*, 2005). Se ha determinado que dicho efecto es debido a la represión que Sir2p ejerce sobre la actividad de la Adh2p, un isoenzima que transforma el etanol en acetaldehído en condiciones de respiración. La delección de *SIR2* activa dicha enzima y reduce los niveles de etanol, que se considera por tanto un compuesto inductor del envejecimiento.

Las sirtuinas están en el centro de dos grandes polémicas en el campo del envejecimiento respecto a su papel en la restricción dietaria y en su potencial modulación por resveratrol. Tradicionalmente se ha identificado Sir2p y otras sirtuinas, como Hst2p, como proteínas esenciales para lograr la extensión de longevidad replicativa que se observa al disminuir el aporte de glucosa en el medio de cultivo (Lamming *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2000), aunque otros autores limitan dicho efecto a determinadas condiciones experimentales (Kaeberlein *et al.*, 2004). Dicha polémica es común a todos los organismos modelos utilizados para estudiar envejecimiento (Baur *et al.*, 2010; Burnett *et al.*, 2011). Respecto al resveratrol, se identificó como una molécula que extendía la longevidad replicativa, y que lo hacía por su capacidad de actuar como activador directo de las sirtuinas (Howitz *et al.*, 2003). Sin embargo, dichos resultados han sido puestos en duda, relacionando el efecto de activación con el sustrato artificial utilizado en esos ensayos (Pacholec *et al.*, 2010).

2.5.3- Adhesión en *S. cerevisiae*: el papel de la maquinaria de acetilación/deacetilación

La levadura *S. cerevisiae* puede alternar entre estilos de vida unicelulares y multicelulares en determinadas circunstancias, para

protegerse, diseminarse o colonizar sustratos nuevos. Estas capacidades dependen de la capacidad de adhesión a superficies abióticas o a otras células de levaduras que otorgan una serie de proteínas de pared llamadas floculinas (Bruckner y Mosch, 2011). Los estilos típicos de autoadhesión son la formación de agregados o flóculos, cuando las células crecen en medio líquido, agregan y dichos agregados decantan o floculan, o el caso particular de que dichos agregados presenten flotabilidad, dan lugar a la formación de una película sobre la superficie, el velo de las levaduras de flor. En cuanto a la adhesión a elementos externos, es requerida para los eventos de pseudofilamentación y formación de biofilms. Aunque *S. cerevisiae* no es un hongo filamentoso, en ocasiones adopta formas celulares alargadas, con gemaciones en los extremos que dan lugar a lo que se conoce como pseudohifas. Esta forma de crecimiento favorece que algunas de las células que forman la colonia penetren en el agar, en un fenómeno conocido como crecimiento invasivo. Los biofilms se definen como comunidades de microorganismos adheridos a una superficie. En placas de agar semi-sólidas, la levadura adopta la forma de grandes colonias adhesivas al agar o *mats* (Reynolds y Fink, 2001). La formación de *mats* es un proceso complejo, ya que se requiere que las células posean una cierta "movilidad deslizante" que les permita expandir la colonia, sin perder la capacidad de adherirse al agar. Además, es necesaria cierta capacidad de interacción célula-célula para mantener la integridad de este tipo de estructuras multicelulares (Bruckner y Mosch, 2011). Estos tipos de crecimiento resultan de gran importancia en determinados procesos industriales. Por ejemplo, la floculación es una forma rápida y económica de eliminar levaduras al final de la fermentación (Bauer *et al.*, 2010). Este proceso tiene una importancia histórica en la producción de cerveza y cava, pero su aplicación es de interés en todo tipo de fermentaciones vínicas y en la producción de bioetanol. La adhesión a superficies abióticas presenta múltiples aplicaciones en el campo de la encapsulación de microorganismos, de potencial uso en fermentaciones secuenciales, o para recuperar fermentaciones paradas, añadiendo levaduras inmovilizadas (Verbelen *et al.*, 2006).

La formación de este tipo de agregados multicelulares depende de ciertas proteínas de pared celular llamadas adhesinas o floculinas. En la floculación interviene una familia de floculinas homólogas denominadas Flo1p, Flo5p, Flo9p y Flo10p (Dietvorst y Brant, 2010). Los genes que codifican para estas proteínas se sitúan en zonas subteloméricas y su expresión es sensible al estado de condensación de la cromatina de las mismas. La floculación en condiciones de fermentación de maltosa típicas de la industria cervecera se ve aumentada por la delección de la desacetilasa Hda1p y la acetiltransferasa Gcn5p. La floculación inducida por elevada glucosa o etanol desaparece al deleccionar *SIR2* (Dietvorst y Brant, 2010). El silenciamiento de *FLO10* se ha determinado que depende de las sirtuinas Hst1/2p, mientras que la desacetilasa Hda1p es la que regula la floculina Flo11p (Halme *et al.*, 2004). El gen *FLO11*, al contrario que las otras floculinas, se encuentra alejado de los telómeros y su regulación es extraordinariamente compleja, así como los efectos fenotípicos de su delección, que afecta a la formación de biofilms, pseudofilamentos, flóculos y velo (Bauer *et al.*, 2010; Bruckner y Mosch, 2011). Recientemente se ha descrito que las levaduras son capaces de “mudar” sus proteínas Flo11p, liberándolas al medio y utilizándolas como lubricante sobre el cual incrementar su movilidad deslizante que les permite formar biofilms (Karunanithi *et al.*, 2010).

Objetivos

En este trabajo de tesis doctoral se plantean dos objetivos principales:

- 1- Determinar los factores ambientales y genéticos que regulan la longevidad de las levaduras vínicas durante la fermentación alcohólica.
 - 1.1- Analizar el efecto en la longevidad de factores físicos y nutricionales, de la presencia de ciertos polifenoles de la uva y de compuestos de dos átomos de carbono producidos durante la fermentación en la longevidad de levaduras vínicas.
 - 1.2- Identificar y comparar cepas industriales de larga y corta longevidad con el fin de caracterizar nuevos determinantes genéticos en el proceso de envejecimiento.
- 2- Analizar el efecto de la maquinaria de acetilación/desacetilación en el control de la longevidad de levaduras vínicas durante el proceso de vinificación.
 - 2.1- Estudiar el efecto de la mutación y de la sobreexpresión de genes codificantes de esta maquinaria en el patrón de envejecimiento y en la producción de metabolitos durante la vinificación.
 - 2.2- Analizar el impacto de la mutación y de la sobreexpresión de genes codificantes de esta maquinaria en la actividad de enzimas del metabolismo e investigar un mecanismo de regulación postraduccional de las mismas.
 - 2.3- Determinar el efecto de las actividades acetiltransferasa y desacetilasa en la formación de biofilm en levaduras vínicas.

Materiales y Métodos

1.- Materiales

1.1- Cepas de microorganismos

Las cepas vínicas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en este trabajo se detallan en la Tabla M.1.

Tabla M.1. Cepas vínicas de *S. cerevisiae*.

Cepa	Genotipo	Procedencia
C9	Mat a <i>ho::loxP</i>	JM Walker
C9 <i>sir2</i>	C9 <i>sir2::kanMX</i>	Este trabajo
C9 <i>hst1</i>	C9 <i>hst1::kanMX</i>	“ “
C9 <i>hst2</i>	C9 <i>hst2::kanMX</i>	“ “
C9 <i>hst3</i>	C9 <i>hst3::kanMX</i>	“ “
C9 <i>hst4</i>	C9 <i>hst4::kanMX</i>	“ “
C9 <i>hst3 sir2</i>	C9 <i>hst3::kanMX sir2::loxP</i>	“ “
C9 <i>hst4 sir2</i>	C9 <i>hst4::kanMX sir2::loxP</i>	“ “
C9 <i>hst3 hst4</i>	C9 <i>hst3::loxP hst4::kanMX</i>	“ “
C9 <i>sas2</i>	C9 <i>sas2::kanMX</i>	“ “
C9 <i>sir2 sas2</i>	C9 <i>sir2::loxP sas2::kanMX</i>	“ “
C9 <i>ald4</i>	C9 <i>ald4::kanMX</i>	“ “
C9 <i>gcn5 ald4</i>	C9 <i>gcn5::loxP ald4::kanMX</i>	“ “
C9 <i>sas2 ald4</i>	C9 <i>sas2::loxP ald4::kanMX</i>	“ “
C9 P _{SPI1} - <i>SIR2</i>	C9 P _{SPI1} - <i>SIR2</i> - <i>kanMX</i>	“ “
C9 P _{MET17} - <i>SIR2</i>	C9 P _{MET17} - <i>SIR2</i> - <i>kanMX</i>	“ “
C9 <i>uth4</i>	C9 <i>uth4::kanMX</i>	“ “
C9 <i>pub1</i>	C9 <i>pub1::kanMX</i>	“ “

Tabla M.1. (Continuación).

Cepa	Genotipo	Procedencia
C9 <i>puf3</i>	C9 <i>puf3::kanMX</i>	Este trabajo
C9 <i>hda1</i>	C9 <i>hda1::kanMX</i>	“ “
C9 <i>spt10</i>	C9 <i>spt10::kanMX</i>	“ “
C9 <i>gcn5</i>	C9 <i>gcn5::kanMX</i>	“ “
C9 <i>rdl1</i>	C9 <i>rdl1::kanMX</i>	“ “
C9 <i>rdl2</i>	C9 <i>rdl2::kanMX</i>	“ “
C9 <i>rdl1:2</i>	C9 <i>rdl1-rdl2::kanMX</i>	“ “
L2056	Cepa vínica	Lallemand
L2056 <i>sir2</i>	L2056 <i>sir2::loxP sir2::kanMX</i>	Este trabajo
L2056 <i>hst2</i>	L2056 <i>hst2::loxP hst2::kanMX</i>	“ “
L2056 <i>hst3</i>	L2056 <i>hst3::loxP hst3::kanMX</i>	“ “
L2056 <i>sas2</i>	L2056 <i>sas2::loxP sas2::kanMX</i>	“ “
L2056 <i>gcn5</i>	L2056 <i>gcn5::loxP gcn5::kanMX</i>	“ “
L2056 <i>spt10</i>	L2056 <i>spt10::loxP spt10::kanMX</i>	“ “
L2056 P _{SPI1} - <i>SIR2</i>	L2056 P _{SPI1} - <i>SIR2-loxP</i>	“ “
L2056 P _{MET17} - <i>SIR2</i>	L2056 P _{MET17} - <i>SIR2-loxP</i>	“ “
L2056 P _{SPI1} - <i>HST3</i>	L2056 P _{SPI1} - <i>HST3-kanMX</i>	“ “
L2056 P _{MET17} - <i>HST3</i>	L2056 P _{MET17} - <i>HST3-kanMX</i>	“ “
L2056 P _{MET17} - <i>GCN5</i>	L2056 P _{MET17} - <i>GCN5-kanMX</i>	“ “
EC1118	Cepa vínica	Lallemand
EC1118 <i>sir2</i>	EC1118 <i>sir2::loxP sir2::kanMX</i>	Este trabajo
EC1118 <i>sas2</i>	EC1118 <i>sas2::loxP sas2::loxP</i>	“ “
EC1118 <i>gcn5</i>	EC1118 <i>gcn5::loxP gcn5::kanMX</i>	“ “
EC1118 <i>pub1</i>	EC1118 <i>pub1::loxP pub1::kanMX</i>	Este trabajo

Tabla M.1. Continuación.

Cepa	Genotipo	Procedencia
EC1118 $\Delta\delta$	EC1118 2xLTR:: <i>loxP-CYR1</i>	Este trabajo
CSM	Cepa vínica	Lallemand
C flor	Cepa vínica	A. Querol
C flor <i>sir2</i>	C flor <i>sir2::loxP</i>	Este trabajo
C flor <i>sir2</i> (2X)	C flor <i>sir2::loxP sir2::kanMX</i>	“ “
C flor <i>sir2</i> (3X)	C flor <i>sir2::loxP (2X) sir2::kanMX</i>	“ “
C flor P _{SPI1} - <i>SIR2</i>	C flor P _{SPI1} - <i>SIR2-loxP</i>	“ “
C flor P _{MET17} - <i>SIR2</i>	C flor P _{MET17} - <i>SIR2-loxP</i>	“ “
T73	Cepa vínica	Lallemand
71B	Cepa vínica	Lallemand
BM45	Cepa vínica	Lallemand
M2	Cepa vínica	Lallemand
Fermichamp 67J	Cepa vínica	DSM
Fermirouge 7303	Cepa vínica	DSM
Fermiblanc Arom	Cepa vínica	DSM
Zymaflore VL3	Cepa vínica	Laffort
UCLM 5235	Cepa vínica	Institut Coopératif du Vin
ICV46	Cepa vínica	Institut Coopératif du Vin

La cepa de *Escherichia coli* utilizada fue DH5 α (Φ 80d, *lac ZAM15 endA1 secA1, hsdR17 supE44 thi-1, λ -, gyr A relA1, F-*).

1.2- Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este trabajo se detallan en la Tabla M.2.

Tabla M.2. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Procedencia
pUG6	Plásmido que contiene el gen marcador de resistencia a gentamicina <i>KanMX4</i> flanqueado por sitios <i>LoxP</i>	Güldener y col, 1996
pKanMX-SPI1p	Plásmido pUG6 en el que se ha clonado el promotor del gen <i>SPI1</i>	Cardona y col, 2007
pKanMX-MET17p	Plásmido pUG6 en el que se ha clonado el promotor del gen <i>MET17</i>	Este trabajo
PFA6a-13Myc-KanMX6	Plásmido que contiene 13 repeticiones en tándem de la secuencia que codifica para el epítipo Myc	Longtine y col, 1998

1.3- Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos que se han utilizado como cebadores en las reacciones de PCR fueron diseñados mediante el programa Gene Runner y fueron sintetizados por las casas comerciales Roche, Isogen y Integrate DNA Technologies, según el caso. Las secuencias, escritas en orientación 5'-3', y su uso concreto, se describen en la Tabla M.3., ordenados de acuerdo a su fecha de síntesis.

Tabla M.3. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Oligonucleótido	Secuencia	Uso
K2	GGGACAATTCAACGCGTCTG	Comprobación
K3	CCTCGACATCATCTGCCC	Comprobación
SIR2a	CATTCAAACCATTTTTCCCTCATCGGCACAT TAAAGCTGGTTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección
SIR2b	ATATTAATTTGGCACTTTTAAATTATTAAT TGCCTTCTAATAGGCCACTAGTGGATCTG	Delección
SIR2c	TTCTTTGCCTCTTTGGCCG	Comprobación
SIR2d	AGTTGGTTTGAGCTCCATCG	Comprobación
SIR2e	CTATTTGTGAGAGCCTTGCG	Comprobación
SAS2a	CCTATTTTCTAGTTGCTTTTTGTTTTCACTC GCAAAAAAATTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección
SAS2b	TGAAATACATATGCCATTAAGTTACATCCT GAATAGATTCATAGGCCACTAGTGGATCTG	Delección
SAS2c	TCAATACTCAGCTCATCGCC	Comprobación
SAS2d	AAACAGAGGAAAGCTGACCC	Comprobación
SAS2e	G TTCGCATCGAAAAACCGG	Comprobación
HST1a	CTCTCTTTTTTGTGTTTTGTGAGAAAA AAAATCTAATTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección
HST1b	TTTGGAATTTACTGTTGTTTCTTTCGTGGC TGTTTCTTAAATAGGCCACTAGTGGATCTG	Delección
HST1c	TGATGACTCAGTAAGACCGC	Comprobación
HST1d	ATTTGCCCGTCACCTTATCC	Comprobación
HST2a	AGCTACCAACCAGACGTACCGGATCTCTC CGTGTTTCGTTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección
HST2b	AATAAGGAAAAAAAAAGGGGACGGAAAA CATTGCAACCATAGGCCACTAGTGGATCTG	Delección
HST2c	TA ACTCTGTTAGCTTCGCCG	Comprobación
HST2d	ATGGCAAAGGATCCGATTGG	Comprobación
HST2e	AAGCCAAGCTCAATTACCGC	Comprobación

Tabla M.3. Continuación

Oligonucleótido	Secuencia	Uso
HST3a	GGGATTAATTTACATACAAGTAGATCCATC TTTCTCAAATTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección
HST3b	CCTCGATTATTTATCGTTAACTCAATTTTAA TAGTTAAGTATAGGCCACTAGTGGATCTG	Delección
HST3c	ACTCAACATCACGAACGACG	Comprobación
HST3d	GCGACTGTTGTGTTTTTCGTG	Comprobación
HST3e	TTCTCGGACATGCAGATCTC	Comprobación
HST4a	GTATTTTAAACTGTAAATAACTAAGCAG AACCACAAATTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección
HST4b	TTAATTTTATCTCCAACCTTTTTGGTAGGA CAAATACTTATAGGCCACTAGTGGATCTG	Delección
HST4c	AAACCTCTCCATTACCCGC	Comprobación
HST4d	AGGTTTCCTGTTACGGACAC	Comprobación
HDA1a	AGGGAAAGTTGAGCACTGTAATACGCCGAA CAGATTAAGCTTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección
HDA1b	GAAGGTTGCCGAAAAAATTATTAATGGC CAGTTTTTCCATAGGCCACTAGTGGATCTG	Delección
HDA1c	ACACTTGGTGAAGAACCAGC	Comprobación
HDA1d	AAGACCAGTTTTCAGCGGTG	Comprobación
HDA1e	ATCGATCTCTGAAGAGGCTG	Comprobación
GCN5a	AAAAGTCTTCAGTTAACTCAGGTTTCGTATT CTACATTAGTTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección
GCN5b	CTTCGAAAGGAATAGTAGCGGAAAAGCTT CTTCTACGCAATAGGCCACTAGTGGATCTG	Delección
GCN5c	AGGATTGGTAAGGGAAGACC	Comprobación
GCN5d	TTATTGGTCTCAGCCTGCTC	Comprobación
GCN5e	ATTGATCACATCGTCTCGCC	Comprobación
SPT10a	CCAAAGTGATTATCAACAAAATCGTAATAA TTAGCTTCATTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección

Tabla M.3. Continuación

Oligonucleótido	Secuencia	Uso
SPT10b	TTTCTAGGGTTGGTGATGTGACCGTCTCTG GCAGAGTCGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	Delección
SPT10c	AATTCGAGATGCGGATCGTG	Comprobación
SPT10d	AAAAGTTGATCTGGGACCGC	Comprobación
SPT10e	AGACTTGTCAACCCTGTTCC	Comprobación
ATG7a	TTCATTATATTTCAACAAATATAAGATAATC AAGAATAAATTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección
ATG7b	TGGCACCACAATATGTACCAATGCTATTAT ATGCAAATAATAGGCCACTAGTGGATCTG	Delección
ATG7c	GAAGAACAAGCCACCACATG	Comprobación
ATG7d	CACAGTAAGTGGTTGGCATG	Comprobación
ATG7e	CCAATTTCTTAGCCGTCAGC	Comprobación
TOR1a	AGTGAAACATACATCAACCGGCTAGCAGGT TTGCATTGATTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección
TOR1b	AAATAGTAAACAAAGCACGAAATGAAAAAT GACACCGCAGATAGGCCACTAGTGGATCTG	Delección
TOR1c	ACCTACTAGAAGTCAGACCG	Comprobación
TOR1d	GGTTCTCGCCATTTGAAGC	Comprobación
TOR1e	AGATGAGGACCTCAGTAAGG	Comprobación
CYR1a	TTCCTCTATCAAACCTAAATATTCAATCAT AACCTATTTTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección
CYR1b	TTCCTCTATCAAACCTAAATATTCAATCAT AACCTATTTTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección
CYR1c	TGCGTCATCTTCTAACACCG	Comprobación
CYR1d	GAATGGCAGACTGAACTGAG	Comprobación
CYR1e	TTCTTATGGTAAGTCCCCC	Comprobación
CYR1f	TGGTTCGGAAATTTCTGGCC	Comprobación
CYR1g	ATCGTGACTGTTTGACCCTG	Comprobación
CYR1h	ATAATGGTGCCGATGTTGCC	Comprobación

Tabla M.3. Continuación

Oligonucleótido	Secuencia	Uso
RDL1a	CGTTTATTTTCAGGGTTTGTGACTAAGAAACGA TATTAAATTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección
RDL1b	TTACGAAAATACACAGGGTACATACCTAGAG TATACAAGGATAGGCCACTAGTGGATCTG	Delección
RDL2a	TCTCACAAATGGAAGCGAGACAGAAGAAAA AGACCAACGTTTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección
RDL2b	TATATACAGGATATATCGATTATACTTGTTTC TTTTTGG CATAGGCCACTAGTGGATCTG	Delección
RDL1c	GAA TAT TAT TAC CCG CGG GG	Comprobación
RDL1d	AGT AAG AGC CAA AAC TGC CG	Comprobación
RDL2e	GAA TGA ATC GGA GAG GTG AC	Comprobación
SIR2f	CGCTAGTCTTTGATACGGCGTATTTTCATATGT GGGATGGTCATTGTATGGATGGGGGTAATAG	Sobreexpresión con <i>MET17</i>
SIR2g	ACCATCCCACATATGAAATACGCCGTATCA AAGACTAGCGTTTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Sobreexpresión
SIR2e'	CGCTAGTCTTTGATACGGCGTATTTTCATA TGTGGGATGGTCATTATTAGTAATAGTACTG	Sobreexpresión con <i>SPI1</i>
HST3f	CCGATCGACTGGCAGGTGGCGAGGGCG ATACTGAAGTCATTATTAGTAATAGTACTG	Sobreexpresión con <i>SPI1</i>
HST3g	TCTGTGGCGGGTATCCCTCAATTGCGGGTA ACAATAAGTATTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Sobreexpresión
HST3h	CCGATCGACTGGCAGGTGGCGAGGGCGAT ACTGAAGTCATTGTATGGATGGGGGTAATAG	Sobreexpresión con <i>MET17</i>
GCN5f	CATCCAAGTGATCCTCTTCAATCTGATGTT TTGTGACCATTGTATGGATGGGGGTAATAG	Sobreexpresión con <i>MET17</i>
GCN5g	TATTGAAATTCTTACGCAAGATTTTTTATA GTTGGATATTTTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Sobreexpresión
SPI1e	CTCGAAGTCCCAGATGCC	Comprobación
MET17a	GGGATATCGAATCCCTTAGCTCTC	Clonación
MET17b	GGGATATCATTGTATGGATGGGGG	Clonación
MET17c	CCT TGT CCA ATT GAA CAC GC	Comprobación
CYR1a'	AACTTGATCCCATGTCACCG	Sonda

Tabla M.3. Continuación

Oligonucleótido	Secuencia	Uso
CYR1b'	TGCGGTCTTGCTATCATTGG	Sonda
SPI1f	CGCTAAGCTCCTTCTATCATTGG	Sonda
SPI1g	GCTCCTGGGATTGCTCTTG	Sonda
ALD6a	ACGACACTGAATGGGCTACC	Sonda
ALD6b	CTTCAACATCTTGCCACCT	Sonda
Y'-F	ACACACTCTCTCACATCTACC	Sonda
Y'-R	TTGCGTTCCATGACGAGCGC	Sonda

2.- Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

2.1- Bacterias

Los cultivos de *E. coli* se realizaron en medio LB (extracto de levadura 0.5% (p/v), bacto triptona 1.0% (p/v), NaCl 1.0% (p/v). Para el crecimiento de bacterias con plásmidos se añadió al medio ampicilina (50 mg/L) como factor de presión selectiva. Los cultivos se realizaron a 37 °C, con agitación (200 rpm). Para los cultivos en placa el medio fue suplementado con agar bacteriológico al 2% (p/v).

2.2- Levaduras

2.2.1- Crecimiento en condiciones de laboratorio

Los medios y las condiciones de cultivo utilizados para el crecimiento de *S. cerevisiae* se describen en Adams *et al.* (1998). Las levaduras crecieron a 30 °C, en un agitador orbital a 200 rpm en el caso de los medios líquidos, o en una estufa en los medios sólidos. Para los cultivos en medio

sólido se añadió agar bacteriológico al 2% (p/v) y al 0.3% (p/v) para los semisólidos.

El medio rico (YP) se compone de extracto de levadura 1% (p/v), peptona bacteriológica 2% (p/v) y una fuente de carbono al 2% (p/v) dependiendo del caso: glucosa en el YPD, galactosa en el YPGal, glicerol en el YPG o etanol en el YPE. Para la selección de transformantes se suplementó el medio YPD con geneticina 200 mg/L o cicloheximida 1 mg/L.

El medio mínimo completo (SC) contiene base nitrogenada para levadura sin aminoácidos (YNB) 0.17% (p/v), sulfato amónico 0.5% (p/v), glucosa 2% (p/v) y 0.2% (p/v) de *drop out* (mezcla de todos los aminoácidos y bases nitrogenadas), según se describe en Adams y col. (1998). El medio mínimo (SD) es el SC sin *drop out*. El medio SD sin nitrógeno (SD-N) contiene solamente base nitrogenada para levadura sin aminoácidos (YNB) 0.17% (p/v) y glucosa 2% (p/v).

2.2.2- Crecimiento en condiciones de microvinificación

El crecimiento en condiciones de microvinificación se llevó a cabo en dos tipos de mosto, natural y sintético. El mosto natural fue tinto de la variedad Bobal cedido por bodegas Murviedro, suplementado con 10g/HL de metabisulfito potásico y parcialmente clarificado por sedimentación durante 1-2 días a 10 °C. Éste mosto fue congelado inmediatamente hasta su utilización. Tras su descongelación a 4 °C, y con el fin de prevenir el desarrollo de otros microorganismos, el mosto se desinfectó con dimetil dicarbonato (DMDC) 500µg/L, dejando actuar durante 12 horas. Previamente al inóculo de las levaduras se realizó una siembra directa de unos 10 µL de mosto en una placa de YPD, asegurando de esta manera que no existiera ningún microorganismo presente y por ello no se estudió la imposición de la cepa inoculada durante la vinificación. El mosto sintético MS300 se realizó de acuerdo a Riou y col. (1997) y se compone de glucosa 100 g/L, fructosa 100 g/L, ácido málico 6 g/L, ácido cítrico 6 g/L, KH₂PO₄ 0.75 g/L, K₂SO₄ 0.5 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.25 g/L, CaCl₂·2H₂O 0.155 g/L, NaCl 0.2 g/L. Como fuente de

nitrógeno se añade NH_4Cl 0.46 g/L y una mezcla que contiene los 20 aminoácidos. Dichas cantidades se dividieron a la mitad o cuarta parte para obtener los mostos con menor cantidad de nitrógeno MS150 y MS75. También contiene oligoelementos 1ml/L, (de una solución formada por $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 4g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1g/L, KI 1g/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g/L, H_3BO_3 1 g/L y $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 1 g/L), vitaminas 10 ml/L (de una solución formada por mioinositol 2 g/L, pantotenato de calcio 0.15 g/L, hidrocloreuro de tiamina 0.025 g/L, ácido nicotínico 0.79 mg/L, piridoxina 0.025 g/L y biotina 0.3 mg/L) y factores anaerobios 1 ml/L (de una solución formada por ergosterol 1.5 mL/100 mL de etanol puro y Tween 20 (1:1) y ácido oleico 0.5 ml/100 mL de la misma mezcla). El pH del mosto se ajustó a 3.3 con NaOH y se autoclavó tras su preparación.

Los experimentos en los dos tipos de mosto se realizaron a partir de precultivos líquidos en YPD procedentes de colonias aisladas y crecidos durante 48 horas, de manera que el estado metabólico de las células sea lo más parecido posible al que se encuentra en los inóculos que se realizan en las bodegas. Las vinificaciones se llevaron a cabo a 22 °C para los mostos naturales y a 24 °C para el mosto sintético en agitación muy suave a 50 r.p.m. en tubos cónicos de centrifuga desechables de 30 ó 50 mL, dependiendo del volumen necesario para cada experimento. El crecimiento del cultivo se siguió mediante el recuento en placas de YPD de células viables, tras efectuar la correspondiente dilución en agua con el fin de sembrar unas 10^6 células/mL.

2.2.3- Condiciones de envejecimiento cronológico

Los estudios de envejecimiento cronológico de las distintas cepas de levadura se realizaron según lo descrito por Fabrizio y Longo (2003). Para ello se inocularon células en 25 mL de medio SC a una D_{600} de 0.1, procedentes de un precultivo en medio YPD crecidas hasta saturación durante 48 h. Las cinéticas de envejecimiento se realizaron en un agitador orbital a 200 rpm a 30 °C. Estos cultivos se dejaron crecer durante 3 días,

tomando la viabilidad de este punto como referencia (t_0). Para ello se efectuó un recuento en placa de YPD de células viables, tras efectuar la correspondiente dilución en agua. Posteriormente se fueron tomando muestras a distintos tiempos procediendo de la misma manera, tomando el t_0 como 100% de viabilidad y representando la supervivencia en escala logarítmica, ajustando el valor mínimo de acuerdo a los valores obtenidos.

2.2.4- Condiciones de autofagia

Los experimentos de inducción de la autofagia se realizaron según lo descrito por Onodera y Ohsumi (2004), con algunas modificaciones. Para ello se inocularon células procedentes de un precultivo en medio YPD crecido durante toda la noche en 200 mL de YPD a D.O.₆₀₀ de 0.1 y se dejaron crecer hasta una D.O.₆₀₀ de 1. Entonces, las células se recogieron por centrifugación, se realizó un lavado en NaCl 0.8% y se resuspendieron en 20 mL de medio SD-N. Posteriormente se tomaron alícuotas de 3 mL a distintos tiempos, se recogieron las células por centrifugación, se lavaron en NaCl 0.8% y se guardaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior utilización.

2.2.5- Medida de la resistencia a estrés

El estudio de la respuesta a estrés de las diferentes cepas se llevó a cabo en diversas condiciones de crecimiento. En condiciones de laboratorio se utilizó medio rico YPD para las medidas en crecimiento exponencial (D.O.₆₀₀ de 0.5) y en estado estacionario (2 días de crecimiento a partir de un preinóculo). En condiciones de vinificación se utilizó tanto el mosto natural como el sintético, dependiendo del caso. El análisis de la resistencia a estrés se realizó mediante recuento de viables en placa con medio YPD.

Para determinar la resistencia a estrés oxidativo se añadió al medio de cultivo H_2O_2 5 mM ó hidroperóxido de terc-butilo 5 mM durante 1 hora. También se midió el halo de inhibición del crecimiento (tras 12 h de crecimiento en medio YPD), producido por la aplicación de 10 μL de H_2O_2 al

30% ó 10 μ L de hidroperóxido de terc-butilo al 70% sobre un disco de 0.5 cm de diámetro de papel de filtro colocado en el centro de la placa.

Para provocar un estrés por etanol se añadió un 10% al medio durante 1 hora.

Para provocar un estrés por alta concentración de glucosa las células se recogieron previamente por centrifugación (3500 rpm durante 3 min) y se resuspendieron en medio YPD con glucosa al 20% durante 1 hora.

En el estudio del efecto de los diferentes agentes estresantes en el envejecimiento cronológico, éstos se añadieron a tiempo 0 y se dejaron actuar durante todo el proceso. El acetaldehído se añadió a 112 mg/L, el acetato a 400 mg/L, el etanol a 800 mg/L, condiciones que entran dentro del rango normal de concentración presentes durante la vinificación. En el caso del efecto de los polifenoles y de los precursores del NAD⁺ en el envejecimiento cronológico o en el proceso de vinificación, se añadió resveratrol 2 mg/L, quercetina 9 mg/L, nicotinamida 1mM ó ácido nicotínico 1mM.

2.2.6. Medida de adherencia, formación de biofilm interfásico aire-líquido y morfología de colonia

En la medida de la adherencia se utilizó el protocolo de Fidalgo *et al.*, (2006). Las células se crecieron en YPD hasta una D.O.₆₀₀ de 1 y se transfirió una alícuota de 100 μ L a un pocillo de una placa de poliestireno de 96 pocillos y se incubó durante 1 h a 30 °C. Posteriormente las células se lavaron y se tiñeron con una solución de cristal violeta al 1 % durante 15 min, se lavaron los pocillos 5 veces con agua, eliminando las células no adheridas y se midió la D.O.₅₇₀.

En el estudio de la formación de velo se resuspendieron las células procedentes de un cultivo estacionario en YPD en un tubo de vidrio conteniendo 5 mL de medio de flor (medio SD que contiene un 2% (v/v) de etanol en lugar de glucosa) o en vino blanco con una concentración final de

15% de etanol. Las células se dejaron crecer durante una semana en condiciones estáticas.

Para el estudio de la morfología de biofilm (*mats*) se utilizó el procedimiento propuesto por Reynolds y Fink (2001). Para ello se cogió con un palillo células procedentes de una colonia fresca y se depositaron en el centro de una placa de agar semi-sólido (0.3% de agar) efectuando una única punción. Posteriormente se hizo un seguimiento progresivo del crecimiento durante 2 o 3 semanas a temperatura ambiente en condiciones estáticas. Posteriormente se colocó film transparente de plástico sobre el *mat* y con un aparato de réplica en placa se presionó ligeramente durante 5 segundos.

3.- Métodos de manipulación y análisis de ácidos nucleicos

3.1- Obtención de DNA

3.1.1- DNA plasmídico

Para la obtención de plásmidos de *E.coli* se utilizó un kit comercial (Perfectprep Plasmid Midi, Eppendorf) basado en la lisis alcalina según describe el protocolo de Sambrook y Russell (2001) y se siguieron las instrucciones del fabricante.

3.1.2- DNA genómico de levadura

Se utilizó el método de aislamiento de DNA genómico de levadura para análisis por PCR, descrito por Hoffman y Winston (1987), con ligeras modificaciones. Se llevó a cabo a partir de cultivos de 5 mL crecidos a saturación en medio rico YPD. Las células se rompieron en tampón de lisis (Triton X-100 2% (p/v), SDS 1% (p/v), NaCl 100mM, Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM) con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y un volumen de perlas de vidrio. La rotura se llevó a cabo por agitación en

un aparato FastPrep®-24 a 5.5 de intensidad durante 30 segundos con 3 repeticiones. Tras centrifugar, los ácidos nucleicos se precipitaron con etanol y posteriormente se resuspendieron en tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) y se realizó un tratamiento con RNasa A. 10 mg de DNA genómico se digirieron con la enzima de restricción *Xho*I para analizar la longitud de los telómeros.

3.2- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se utilizó la PCR para la construcción y comprobación de las diferentes modificaciones genéticas realizadas en las cepas de levadura, así como en la síntesis de sondas de DNA utilizadas en las hibridaciones de filtros de RNA. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25 μ L ó 100 μ L, según fuera la PCR analítica o preparativa, con 3.0 ng/ μ L de DNA molde genómico ó 0.4 ng/ μ L de DNA plasmídico, 1.0 pmol/ μ L de cada cebador, dNTPs 0.25 mM, 1.0 U de polimerasa BioTaq (Bio-21040, Boline), MgCl₂ 3.0 mM y el tampón suministrado por la casa comercial (Tween-20 0.01% (p/v), (NH₄)₂SO₄ 16 mM, Tris-HCl 67 mM pH 8.8). Las condiciones de reacción fueron: 1 ciclo de 3 min a 94 °C, 25-40 ciclos compuestos de 30 s a 94 °C, 30 s a la temperatura óptima de hibridación para cada par de oligonucleótidos y un tiempo variable (1 m por Kb) a 72 °C, y finalmente un ciclo de 10 min a 72 °C.

En algunos casos, para la comprobación de transformantes de levadura, se realizaron PCRs analíticas utilizando como molde una colonia de levadura disuelta en 3 μ L NaOH 0.01 M, previamente congelada a -80 °C durante unos segundos y calentada a 95 °C durante 10 min para provocar la lisis celular.

3.3- Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La separación de fragmentos de DNA se llevó a cabo en geles horizontales de agarosa a una concentración variable (0.8-1.2% (p/v)) según

el tamaño de los fragmentos a separar, preparados en tampón TBE 0.5X (Tris-HCl 44.5 mM, ácido bórico 44.5 mM, EDTA 1.25 mM), que también fue utilizado como tampón de electroforesis. Las muestras se disolvieron en tampón de carga (azul de bromofenol 0.25% (p/v), xilen cianol 0.25% (p/v), glicerol 30%) y las electroforesis se realizaron a voltaje constante entre 2.0-10 V/cm según la concentración de agarosa y la resolución requerida. Para la detección del DNA se añadió bromuro de etidio al gel a una concentración de 0.5 µg/ml.

Las imágenes de los geles con bromuro de etidio se capturaron con una cámara *Kodak Digital Science DC120*, y el análisis de la intensidad de las bandas se realizó con el software *ImageGauge 4.0* de Fujifilm.

3.4- Aislamiento de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa

Para aislar fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa se recortó la banda de interés y se utilizó el kit comercial Eazy Nucleic Acid Isolation (Omega Bio-Tek), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.5- Construcción de plásmidos

El plásmido pKanMX-MET17p utilizado para sobreexpresar determinados genes bajo el control del promotor *MET17* en las diferentes cepas de levadura, se construyó clonando el promotor de *MET17* en el sitio *EcoRV* del plásmido pUG6. Para ello se amplificó mediante PCR la zona del promotor del gen *MET17* utilizando los oligonucleótidos MET17a y MET17b (Tabla M.3). Este fragmento se introdujo en el sitio romo *EcoRV* del plásmido pUG6, que contiene el gen *kan^r* de *E. coli* flanqueado por secuencias *loxP* del fago P1. Las técnicas de clonaje molecular se siguieron de Sambrook y Russell (2001)

3.6- Obtención de RNA total de levadura

Las células se recogidas por centrifugación, lavadas en agua y congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, se resuspendieron en 0.5 mL de tampón TES (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, SDS 0.5% (p/v)) y se procedió a la extracción de RNA mediante la adición de 0.5 mL fenol ácido y un volumen de perlas de vidrio. La rotura se llevó a cabo por agitación en un aparato FastPrep[®]-24 a 5.5 de intensidad durante 30 segundos con 3 repeticiones. Tras centrifugar a 13000 rpm durante 5 min se repitió la extracción con fenol:cloroformo (5:1) y se volvió a centrifugar. Se realizó una última extracción con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y tras centrifugar, el RNA se precipitó con 0.1 V de LiCl 5 M y 2.5 V de etanol absoluto a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante al menos 3 horas. El precipitado se lavó con etanol al 70% (v/v) y se resuspendió en agua libre de RNasas. La concentración de RNA se determinó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 260 nm de una dilución adecuada de la solución de RNA. En la obtención de RNA para los experimentos con micromatrices de DNA, se efectuaron dos extracciones adicionales con fenol:cloroformo (5:1) y se realizaron dos precipitaciones, una con 1 volúmen de LiCl y otra con 0.1 V de NaOAc 3 M y 2 V de etanol absoluto.

3.7- Electroforesis de RNA en geles desnaturalizantes de agarosa

Las muestras se prepararon según se describe en Sambrook y Russell (2001), mezclando 2.0-10 μg de RNA disuelto en 2.5 μL agua con 1.2 μL de MOPS 10X (MOPS 20 mM pH 7, acetato sódico 8 mM, EDTA 1 mM), 2.1 μL de formaldehído y 6 μL de formamida desionizada. Se añadió 2 μL de tampón de carga 6X con bromuro de etidio (glicerol 50% (v/v), EDTA 1 mM, azul de bromofenol 0.25% (p/v), xilen cianol 0.25% (p/v), bromuro de etidio 0.01% (p/v)) y se desnaturalizaron a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min.

Las electroforesis se realizaron en geles horizontales de agarosa, a una concentración entre 0.75-1-2% (p/v), dependiendo del tamaño del mRNA del gen a estudiar, con formaldehído 2.2 M y tampón MOPS 1x.

Las imágenes de los geles se capturaron con una cámara *Kodak Digital Science DC120*, y el análisis de la intensidad de las bandas se realizó con el software *ImageGauge 4.0* de Fujifilm.

3.8- Transferencia de ácidos nucleicos a filtros

En la transferencia de ácidos nucleicos se utilizaron filtros de nylon *Hibond-N* (Amersham Pharmacia) y se siguió el protocolo descrito en Sambrook y Russell (2001). Para DNA se trató el gel durante 45 min en tampón de desnaturalización (NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M) y se neutralizó durante 30 min en tampón de neutralización (Tris-HCl 1 M pH 7.4, NaCl 1.5 M). Los geles de RNA se transfirieron directamente. Para ello se utilizó tampón SSC 20X (citrato sódico 0.3 M, NaCl 3 M, pH 7) y se efectuó la transferencia por capilaridad durante al menos 12 horas. Posteriormente, tras lavar el filtro en SSC 6X y dejarlo secar, el RNA se fijó a la membrana mediante su exposición a la luz UV durante 20 s a 120 Julios en un aparato BLX-254 (Vibler Lourmat, Francia).

3.9- Marcaje de fragmentos de DNA con digoxigenina-11-dUTP

Los fragmentos de DNA utilizados como sondas se sintetizaron mediante una reacción de PCR preparativa, utilizando una mezcla de nucleótidos (*PCR DIG Labeling Mix*, de Roche), que contiene además de los 4 desoxirribonucleótidos, digoxigenina-11-dUTP (DIG).

3.10- Hibridación de ácidos nucleicos

Para la prehibridación y la hibridación de los filtros de nylon se siguió el protocolo descrito por Sambrook y Russell (2001), con algunas

modificaciones. La prehibridación se llevó a cabo durante al menos 2 horas a 42 °C en 10 mL de solución de hibridación (SSC 5X, denhardts 5X, SDS 0.5X, formamida desionizada 50% (v/v), N-lauroylsarcosine 0.1% (p/v), DNA arenque 2 µg/mL previamente desnaturalizado). Posteriormente se añadió 20 µL de la sonda marcada con digoxigenina directamente a esta solución. Tras un período de hibridación de 16-20 h a 42 °C se procedió al lavado de los filtros. Se realizaron 2 lavados a temperatura ambiente con una solución de SSC 2X, SDS 0.1% (p/v) y otros 2 lavados a 65 °C con una solución de SSC 0.1X, SDS 0.1% (p/v).

3.11- Inmunodetección de ácidos nucleicos

La inmunodetección se llevó a cabo utilizando un kit comercial (*DIG Northern Starter Kit*, de Roche). Tras la hibridación y los lavados astringentes, se procedió al bloqueo de las membranas mediante una incubación de 30 min a temperatura ambiente en 10 mL de solución de bloqueo. Posteriormente se incubó otros 30 min con solución de bloqueo conteniendo el anticuerpo en una dilución 1/10000 (v/v) (Anti-DIG conjugado con fosfatasa alcalina). Tras la incubación se realizaron dos lavados de 15 min a temperatura ambiente con una solución de ácido maleico 0.1 M, NaCl 0.15 M pH 7.5, tween-20 0.3% (v/v). Las membranas se equilibraron durante 5 min en una solución que contenía Tris-HCl 0.1 M pH9.5, 0.1 M NaCl.

3.12- Revelado y cuantificación

La detección se realizó mediante quimioluminiscencia, cubriendo la membrana con unos 2 mL de reactivo CDP-*Star* (*DIG Northern Starter Kit*, de Roche) e incubando 15 min. Para la captación y el análisis de las imágenes se utilizó una cámara y software LAS-1000 de Fujifilm. Para la cuantificación de los niveles relativos de ácidos nucleicos se utilizó el software *ImageGauge 4.0* de Fujifilm.

3.13- Micromatrices de DNA

La obtención y marcaje de cDNA, así como la hibridación de las micromatrices fue realizado por el servicio de genómica y proteómica del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC).

3.13.1- Obtención y marcaje de cDNA

Se incubaron 20 µg de RNA con 1 µg de oligo dT (Roche) a 70 °C durante 5 min y se transfirió a hielo. Se añadieron 6 µL de tampón 5X para SuperScript III (Invitrogen), 1.5 µL de DTT 0.1 M, 1 µL de inhibidor de RNAsas, 2 µL de una mezcla de dNTPs (Invitrogen) a una concentración de 10 mM cada uno, 10 mM de aminoalil-dUTP (Fermentas) y 2 µL de SuperScript (200 U/mL, Invitrogen). La mezcla se incubó a 50 °C durante toda la noche. Posteriormente se inactivó térmicamente el enzima incubando a 70 °C durante 10 min. Para hidrolizar el RNA se añadió 10 µL de NaOH 1 M y 10 µL de EDTA 0.5 M pH 8.0 y se incubó a 70 °C 15 min. A continuación se neutralizó con 10 µL de HCl 1 M y se purificó el cDNA con columnas utilizando el kit MinElute PCR Purification (Qiagen), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para el marcaje se incubaron de 1.5 – 2 µg de aminoalil-cDNA (AA-cDNA) obtenido junto con 3 µL de los fluoróforos Cy3® y Cy5® (Amersham) a pH básico durante 2 h a temperatura ambiente. El cDNA marcado se purificó mediante el kit MinElute PCR Purification (Qiagen).

3.13.2- Hibridación y análisis de micromatrices de DNA

Los cristales se incubaron con 50 mL de solución de prehibridación (SSC 3X, SDS 0.1% (p/v), BSA 0.1% (p/v)) durante 1 h a 42 °C. A continuación se lavaron 15 s en agua miliQ, 2 s en isopropanol y 2 s en agua miliQ a temperatura ambiente y finalmente se secaron al aire.

Para la hibridación se resuspendieron 200 pmoles de AA-cDNA-Cy3[®]/Cy5[®] en solución de hibridación (formamida 50% (v/v), SDS 0.1% (p/v), DNA de esperma de salmón 0.1 g/mL). Se aplicó la mezcla sobre cada cristal y se incubaron durante 16 – 20 h a 42 °C en oscuridad en un baño de agua. Se realizó un lavado con una solución de SSC 2X, SDS 0.1% (p/v), a 42 °C durante 5 min, 5 lavados de 1 min con SSC 0.1X, SDS 0.1% (p/v) y un último lavado de 5 s con SSC 0.01X, SDS 0.1% (p/v). Finalmente los cristales se secan mediante centrifugación a 1200 rpm durante 10 min.

Las micromatrices se escanearon en un aparato GenePix[®] Personal 4100^a (Axon), utilizando el programa de imagen GenePixPro6. El análisis y normalización de los datos se llevó a cabo con el programa Aguity 4.0 (Axon Instruments), realizando previamente un prefiltrado de los valores obtenidos para eliminar todos aquellos que no superaban significativamente 2 veces el valor de fondo. Para la normalización de los datos se utilizó el ratio de todas las medias obtenidas a partir de los dos valores de intensidad existentes para cada gen y asumiendo un valor transcriptómico promedio cercano a 1. Finalmente el análisis de grupos funcionales se realizó utilizando los programas FuncAssociate (<http://llama.mshri.on.ca/cgi/func/funcassociate>) y GO term finder (<http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/GO/goTermFinder.pl>), de libre acceso en la web.

4.- Métodos de obtención y análisis de proteínas

4.1- Extracción de proteínas

Los extractos proteicos se prepararon siguiendo diversos protocolos en función de la utilización posterior de las muestras. En todos los casos se procedió a la rotura de las células de manera mecánica por agitación en un aparato FastPrep[®]-24 y añadiendo 1 volumen de tampón de lisis (de diferente composición dependiendo del caso) y 1 volumen de perlas de vidrio. Las muestras se centrifugaron 2 veces a 14000 rpm durante 5 y 10 min y se

recogió el sobrenadante. La cuantificación de proteína de los extractos se realizó utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando el reactivo comercializado por Bio-Rad y una recta patrón con seroalbúmina (BSA).

4.1.1- Preparación de extractos para estudiar los niveles de proteína mediante *Western blot*

En todos los experimentos donde se estudia el nivel de expresión de proteínas, (autofagia de Ald6p, expresión de Ald4/6p y Adh durante la vinificación, niveles de Adh1-2p y Sir2p), se recogieron células a distintos tiempos por centrifugación, se lavaron en agua fría o en NaCl 0.8% según el caso y se congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización. Las proteínas se extrajeron en 300 μL de tampón de lisis (Tris-HCl 1 M pH 7.5, NaCl 5 M, MgCl_2 1 M, NP40 10% (v/v), PMSF 0.1M y una tableta por cada 10 mL de una mezcla de inhibidores de proteasas comercial (complete Mini, EDTA-free de Roche). Tras centrifugar las muestras y cuantificar la concentración de proteína, se igualaron a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ con tampón de lisis y se añadió tampón de carga de proteínas 4X (Tris-HCl 240 mM pH 6.8, SDS 8% (p/v), glicerol 40% (v/v), β -mercaptoetanol 10% (v/v), azul de bromofenol 0.08% (p/v)). Las muestras se desnaturalizaron a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 min y se guardaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

4.1.2- Preparación de extractos proteicos para determinar la actividad enzimática

Para determinar las distintas actividades enzimáticas, se recogieron células por centrifugación, procedentes de distintos medios de cultivo y a diferentes tiempos, según el caso. Las células se lavaron en agua fría y se congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización. Las proteínas se extrajeron por agitación en tampón de lisis de actividad enzimática (tampón fosfato 100 mM pH 7.5, MgCl_2 2 mM, DTT 1 mM). Tras realizar las dos centrifugaciones, se

cuantificó la concentración de proteína y se ajustó la concentración de las diferentes muestras con tampón de lisis de actividad enzimática para minimizar el error al normalizar la actividad con respecto a la concentración de proteína. Los experimentos de medición de actividades enzimáticas se realizaron inmediatamente después de obtener los extractos proteicos.

4.1.2- Preparación de extractos proteicos para purificar mediante inmunoprecipitación

Las células se tomaron en las condiciones apropiadas y se lavaron en agua fría y se congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización. Los extractos se realizaron en $100\text{ }\mu\text{L}$ de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM pH $7,5$, NaCl 150 mM , nonidet p-40 $0,1\%$, glicerol 10% , EDTA 5 mM) conteniendo inhibidores de proteasas (PMSF $0,4\text{ mM}$ y una pastilla de coctel de inhibidores de Roche para 10 mL) e inhibidores de las desacetilasas (tricostatina 1 mM y nicotinamida 5 mM). Las proteínas se extrajeron por agitación con perlas de vidrio y se centrifugó dos veces 10 min a 14000 rpm .

4.2- Inmunoprecipitación de proteínas

500 mg de extracto total de proteínas se diluyeron en 1 mL de tampón de lisis con inhibidores de proteasas y de desacetilasas y se añadieron $20\text{ }\mu\text{L}$ de Proteína-A agarosa (Santa Cruz) y se incubó 20 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se centrifugó 15 min a 14000 rpm . Se tomó el sobrenadante y se añadieron $2,5\text{ }\mu\text{g}$ de anticuerpos anti-Adh y anti-Ald y se incubó a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 90 min . Se adicionaron $25\text{ }\mu\text{L}$ de proteína-A agarosa y se mantuvo de 2 a 4 horas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se centrifugó suavemente 5 min a 2500 rpm y se eliminó el sobrenadante y se lavó 3 veces en tampón de lavado (tampón de lisis con Tritón $0,5\%$ y NaCl $0,5\text{ mM}$) en frío y se resuspendió en $20\text{ }\mu\text{L}$ de tampón de carga 1X , se calentó a 3 min a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, se centrifugó 5 min a 2500 rpm y se cogió el sobrenadante.

4.3- Técnicas electroforéticas

4.3.1- Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

Las electroforesis en condiciones desnaturizantes se realizaron para el análisis de proteínas. Las electroforesis se realizaron en el sistema de mini geles X-Cell de Invitrogen. Los geles contienen 0.375 mM Tris-HCl pH 8, SDS 0.1% y cantidades variables de acrilamida a partir de un stock de acrilamida/bisacrilamida (19:1) del 40% de BioRad, según el tamaño de la proteína a analizar. Para separar Ald6p y Ald4 se utilizó un 8% de acrilamida. El gel concentrador (pregel) contiene TrisHCl 125 mM pH 6.8, SDS 0.1% y acrilabida/bisacrilamida al 5%. La gelificación se produjo añadiendo persulfato amónico 0.08% como iniciador y 5 μ L de TEMED (N,N, N', N'-tetrametilendiamina) como catalizador. Los geles se corrieron a 100 V / 20 mA durante un tiempo variable, dependiendo también de la proteína a analizar (2.5 h en la separación de Ald6p y Ald4p y alrededor de 1 h en las demás proteínas), en tampón de electroforesis (Tris-HCl 25 mM pH 8.8 y glicina 192 mM).

4.3.2- Transferencia del gel (*Western blot*) e inmunodetección de proteínas

Se transfirieron los geles de SDS-PAGE a membranas de polivinildenedifluoruro (PVDF) de *Amersan Biosciences*, mediante el sistema sistema X-Cell de *Invitrogen* de transferencia húmeda durante 1.5 h a 40 V, en tampón de transferencia (Tris-HCl 48 mM pH 8.0, glicina 39 mM, metanol 10% y SDS 0.0375%). Las membranas se equilibraron previamente en metanol 10% durante 10 s y posteriormente hidratadas en agua durante 10 min.

Para la inmunodetección, las membranas se lavaron 5 min con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄×7H₂O 4.4 mM, KH₂PO₄ 1.4 mM pH 7.3) a temperatura ambiente posteriormente se incubaron en solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C en PBS-T (PBS con 0,1% Tween 20

(v/v)), con 5 % (p/v) de agente bloqueante (*GE Lifesciences*). A continuación la membrana se incubó con el anticuerpo primario diluido convenientemente en tampón PBS-T durante 1 h a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 5 min en PBS-T y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con la peroxidasa de rábano (HRP) diluido en PBS-T. Por último se realizaron 5 lavados de 5 min en PBS-T y se procedió al revelado de la membrana. Los diferentes anticuerpos utilizados en este trabajo se detallan en la Tabla M.4.

Tabla M.4. Anticuerpos utilizados en este trabajo.

Ac 1°	Procedencia	Dilución	Ac 2°	Procedencia	Dilución
Anti-Ald	Rockland	1/500	Anti-conejo	Amersham	1/5000
Anti-Adh	Acris R1049	1/1000	Anti-conejo	Amersham	1/5000
Anti-Lys AC	Santa Cruz	1/200	Anti-ratón	Amersham	1/2500
Anti-Sir2	Santa Cruz	1/200	Anti-conejo	Amersham	1/2500
Anti-myc	Santa Cruz	1/1000	Anti-ratón	Amersham	1/4000

4.3.2- Revelado y cuantificación

La detección de proteínas se llevó a cabo mediante luminiscencia, utilizando el reactivo *Lumigen TMA-6* (Amersham Biosciences), con una dilución 1:1 de solución A y B. Para la captación de las imágenes se utilizó una cámara y software *LAS-1000* de Fujifilm. Para la cuantificación de los niveles de proteína se utilizó el programa de imagen Quantity One.

4.4- Determinación de actividades enzimáticas

4.4.1- Métodos espectrofotométricos

Para determinar actividades por métodos espectrofotométricos, los sedimentos celulares se descongelaron en hielo con 300-500 μ l de tampón

fosfato 100 mM con MgCl₂ 2mM y ditiotreititol 1mM. Las células se rompieron con un volumen de perlas de vidrio en un FastPrep®-24 y se centrifugaron 2x10 min a 13000 rpm. Se midió la concentración de proteínas en los sobrenadantes con el kit de cuantificación de proteínas de BioRad y se ajustaron las concentraciones de los diversos extractos a ensayar.

La piruvato descarboxilasa (PDC; EC 4.1.1.1) se ensayó en tampón imidazol-HCl 40 mM (pH 6.5), MgCl₂ 5mM, pirofosfato de tiamina 0.2 mM, NADH 0.15 mM y alcohol deshidrogenasa (88 U) en un volumen final de 1 mL (Postma *et al.*, 1989). Tras añadir el extracto (5-10 µL) se incubó a temperatura ambiente durante 5 min y se inició la reacción tras la adición de piruvato potásico 50 mM. La progresión de la reacción se midió a A₃₄₀ observándose el consumo de NADH.

La alcohol deshidrogenasa (ADH; EC 1.1.1.1) se ensayó en tampón glicina-KOH (pH 9.0) 50 mM con NAD⁺ 1 mM (Postma *et al.*, 1989). Se ensayaron 1-2 µL de extracto en un volumen final de 1 mL presencia de 100 mM de etanol a A₃₄₀. Para determinar la actividad Adh2p se calentó el extracto durante 15 min a 61 °C para eliminar el resto de actividades Adh .

La aldehído deshidrogenasa citosólica (Ald6p; EC 1.2.1.4) se ensayó en tampón Hepes (pH 7.5) 50 mM con 32.5 µM de NADP⁺, MgCl₂ 3.75 mM en un volumen final de 1 mL (Aranda and del Olmo MI, 2003). La reacción se inició con la adición de acetaldehído a 125 µM. La isoenzima mitocondrial (Ald4p; EC1.2.1.5) se analizó en tampón Tris-HCl (pH 8) 62.5 mM, NAD⁺ 375 mM, DTT 0.75 mM, KCl 62.5 mM, pirazol 1 mM, azida sódica 5 mM y acetaldehído 1.5 mM. Ambas se midieron siguiendo la aparición de NAD(P)H a A₃₄₀.

La acetil-CoA sintetasa (ACS; EC 6.2.1.1) se determinó utilizando los ingredientes del kit de determinación de ácido acético de r-Biopharm (Roche), utilizando como iniciador de la reacción acetato potásico 10 mM.

4.4.2- Zimogramas

Para el análisis de la alcohol deshidrogenasa en gel de poliacrilamida, se rompieron las células en presencia de un volumen de perlas de vidrio en tampón Tris-HCl 50 mM pH 6.8, 25% glicerol y β -mercaptoetanol 100 mM (Williamson *et al.*, 1980). Las muestras se cargaron en un gel no desnaturizante NuPAGE Tris-Acetato del 7% (Invitrogen) y la actividad se reveló en una mezcla de Tris-HCl pH 8.5 50 mM, etanol 4% (v/v), NAD⁺ 0.77 mg/mL, MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil)tiazolil-2,5-difenil tetrazolio) 0.192 mg/mL y PMS (fenazina etasulfato) 0.019 mg/mL.

5.- Medida de parámetros bioquímicos, enológicos y redox

5.1- Determinación de azúcares reductores

Este método es una adaptación del protocolo de Robyt y Whelan (1972). Las diluciones correspondientes de los sobrenadantes de las vinificaciones se mezclaron con un volumen de una mezcla de ácido dinitro-3,5-salicílico 0.1 g/mL, NaOH 16 mg/mL y tartato doble Na-K, 3 g/L y se hirvió 5 min a 100 °C. Se midió la A_{540} mM y se interpolaron las medidas de absorbancia con una curva patrón preparada a partir de glucosa 2 g/L.

5.2- Determinación de etanol

La cuantificación de etanol se realizó en se ensayó en tampón glicina-KOH (pH 9.7) 0.2 M y 0.3 M respectivamente con NAD⁺ 2 mM y alcohol deshidrogenasa de levadura 20 U/mL en un volumen final de 1 mL al cual se añaden 200 μ L de muestra (generalmente una dilución 1:5000 si medimos el final de una vinificación) o de una disolución de etanol patrón de 1.2 mM. Se midió la A_{340} tras 15 minutos de incubación y se interpoló con la curva patrón.

5.3- Determinación de ácido acético, acetaldehído y glicerol

Estos metabolitos se determinaron utilizando los kits de r-biopharm (Roche) según las instrucciones del fabricante.

5.4- Determinación de la peroxidación de lípidos

La determinación de peroxidación de lípidos se llevó a cabo mediante la reacción del ácido tiobarbitúrico con el malondialdehído (MDA) producido por la rotura de los ácidos grasos oxidados, según se describe en Gómez-Pastor *et al.* (2010b). 50 mg de células se rompieron mediante agitación con 0.3 g de perlas de vidrio en 0.5 mL de tampón fosfato sódico 50 mM pH 6.0 y 10% ácido tricloroacético. La rotura se llevó a cabo en un FastPrep®-24, con 3 series de 30 s a 5.5 de intensidad. Después de centrifugar 10 min a 13000 rpm, 300 μ L del sobrenadante se mezcló con 100 μ L de EDTA 0.1 M y 600 μ L de ácido tiobarbitúrico 1% en NaOH 0.05M y se incubó a 100°C durante 15 min. Después de enfriar en hielo y centrifugar para eliminar posibles precipitados, se midió mediante A_{535} el malondialdehído ($\epsilon=1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Los resultados se expresaron en nmoles de MDA por mg de células.

6.- Métodos de manipulación de microorganismos

6.1- Transformación de *Escherichia coli*

Las transformaciones de *E. coli* se realizaron según el protocolo descrito por Hanahan (1983). Se partió de células competentes obtenidas mediante el método del RbCl (Sambrook y Russell, 2001) descongeladas en hielo. Se añadió entre 1 y 20 ng de DNA en un volumen no superior al 5% (v/v) del volumen de competentes, se mezcló suavemente y se incubó durante 30 minutos en hielo. Seguidamente se dio un choque térmico a 42°C

durante 90 segundos y se dejó de nuevo en hielo 5 minutos. Las células fueron después recuperadas añadiendo 4 volúmenes de LB e incubando durante 1 hora a 37°C. Finalmente se plaquearon en medio selectivo LB con ampicilina.

6.2. Construcción de cepas de *S. cerevisiae*.

La manipulación genética de levaduras se realizó mediante la estrategia de recombinación homóloga de fragmentos cortos, presentes en oligonucleótidos con los cuales se amplifican genes de selección. En el caso de la disrupciones de utilizó el marcador reciclable *loxP-kanMX-loxP* presente en el plásmido pUG6 (Guldener *et al.*, 1996). Como norma general se amplificó el cassette de disrupción utilizando 100 pmoles de los oligos de 60 nucleótidos llamados a y b (Tabla M3) y 50 ng del plásmido en un volumen de 100 µL. Se purificaron los fragmentos con un kit de purificación de fragmentos de PCR (Sigma) y se transformó directamente según el protocolo del apartado siguiente. Las colonias capaces de crecer en medio selectivo se aislaron, y se analizaron por PCR utilizando el oligonucleótido llamado c (situado en el promotor del gen a disrumpir) y el oligonucleótido K2 que hibrida con el gen *kanMX*. Para detectar si hay copias adicionales se utilizó el par de oligos c/d, donde d corresponde a una zona de la ORF del gen que se ha eliminado durante la disrupción.

El gen marcador está flanqueado por sitios *loxP*, reconocibles por la recombinasa Cre del fago P1. Para eliminar el marcador con el fin de disrumpir las copias adicionales que llevan las cepas industriales se transformó con el plásmido YEp-cre-cyh (Delneri *et al.*, 2000). Este plásmido posee el gen Cre bajo el control del promotor *GAL1*, y utiliza un sistema de selección por un antibiótico diferente, la cicloheximida. Los transformantes se crecieron toda la noche en medio YPD + cicloheximida y se lavaron con YPGalactosa, incubándose durante tres horas para permitir la expresión de la recombinasa, de diluyó en cultivo sembrándose en placas de YPD. Se seleccionaron aquellas colonias incapaces de crecer en placas conteniendo geneticina, y se comprobó la eliminación del gen reportero mediante el par de

oligos c/e, donde e es un oligo que hibrida con la región 3'-UTR del gene en cuestión, de manera que la PCR da una banda de tamaño reducido cuando el gen reportero es eliminado.

Para la construcción de sobreexpresantes se utilizaron como moldes para la PCR los plásmidos pKanMX-SPI1p y pKanMX-MET17p (Tabla M2), con los oligos pertinentes capaces de amplificar estos moldes y de integrarse en la región promotora de los genes de interés (Cardona *et al.*, 2007). Para el etiquetado con Myc-18 se utilizó en plásmido PFA6a-13Myc-KanMX6 (Longtine *et al.*, 1998) y se procedió de manera similar.

6.3. Transformación de levadura

Las transformaciones de *S. cerevisiae* se realizaron siguiendo el método del acetato de litio descrito por Ito *et al.* (1983), con las modificaciones introducidas por Gietz *et al.* (2002). A partir de cultivos de una noche en YPD las células se diluyeron en 50 ml de este mismo medio de cultivo hasta una absorbancia a 600 nm de 0.2. Cuando se alcanzó una absorbancia entre 1-2 se recogieron 10^8 células por transformación y se lavaron una vez con 25 mL de agua destilada estéril y otra vez con 1 mL. Seguidamente se resuspendieron en 1 mL de agua y se separaron alícuotas de 100 μ l. Se centrifugaron y se resuspendieron en una mezcla de 240 μ l de una solución de polietilenglicol (peso molecular medio 3350, 50% (p/v), 25 μ l de LiAc (1 M), 50 μ l de DNA carrier (2 mg/mL) y 34 μ L del DNA para transformar completado el volumen con agua. El tubo se agitó de forma vigorosa con vortex durante 1 minuto, se incubó a 30°C durante 20 minutos y seguidamente se realizó un choque térmico de 20 minutos a 42°C. Se plaqueó en YPD y se incubó a 30 °C durante la noche para replicar a la mañana siguiente en placas selectivas, YPD + geneticina o SD + cicloheximida.

7.- Técnicas microscópicas

Para la tinción con yoduro de propidio, 500 μL de cultivo se lavaron en tampón PBS y se añadieron 5 μL de una solución stock de 1 mg/mL y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 30 min. Las células se lavaron con PBS y se visualizaron. Dihydrorodamina 123 se añadió a 5 $\mu\text{g/mL}$ de un stock de 2.5 mg/mL en etanol. Después de 2 horas de incubación en oscuridad a temperatura ambiente, las células se visualizaron. Se utilizó un filtro de rodamina en un microscopio de fluorescencia Nikon eclipse 90i.

8.- Tratamiento estadístico de los resultados

En todos los resultados numéricos en los que se muestra un análisis estadístico de los datos, la significatividad estadística se obtuvo mediante un *test t de student*, de una cola con 2 grados de libertad, que compara las medias de dos categorías dependientes a través de la desviación típica (DT). Se ha considerado significativo aquellos valores con un valor de p (*p-value*) menor o igual a 0.05, que corresponde a un intervalo de confianza del 95%.

Resultados y discusión

1.- Determinantes ambientales de la longevidad en levaduras vínicas

La longevidad cronológica viene determinada por numerosos factores de distinta naturaleza, que pueden ser de origen genético o de origen ambiental. En este primer apartado se ha abordado el estudio del efecto que tienen ciertos determinantes ambientales, tanto físicos como químicos, en la longevidad de las levaduras vínicas. Para ello se han realizado experimentos de longevidad cronológica para estudiar el efecto en la misma de los determinantes físicos, como el pH y la temperatura. También se han realizado microvinificaciones en mosto sintético para estudiar el efecto que producen ciertos determinantes químicos presentes en el mosto de uva, como algunos polifenoles y los precursores del NAD⁺, en el comportamiento de las células durante la fermentación vínica. El efecto promotor del

envejecimiento que causan los compuestos de dos carbonos que surgen en el metabolismo fermentativo también se ha abordado en este apartado. Por último, se ha comprobado el efecto que causa un tipo de restricción dietaria, la restricción por nitrógeno, en el crecimiento celular durante la fermentación vínica y en el proceso de envejecimiento cronológico.

1.1- Determinantes físicos de la LC

Entre los determinantes físicos que tienen efecto en la longevidad de las levaduras, el pH y la temperatura del medio son de especial relevancia en el proceso de elaboración del vino.

1.1.1- Efecto del pH

Como se ha descrito en la Introducción, el pH del medio es un factor clave en la longevidad celular. Se ha descrito que la acidificación del medio causada por el metabolismo fermentativo promueve el envejecimiento celular (Burtner *et al.*, 2009), debido fundamentalmente a la acumulación de ácido acético.

Con el fin de estudiar el efecto del pH en levaduras vínicas, y para determinar si el carácter ácido del mosto de uva respecto a los medios de laboratorio puede ser un factor relevante para la longevidad, se investigó si se producen cambios en la longevidad cronológica de la cepa vínica comercial EC1118, en función del pH del medio. Con este propósito, se realizaron experimentos de LC en medio rico SC a tres pH distintos, 3.5, 4.5 y 5.5 y se determinó la viabilidad a lo largo del tiempo. Para ello se inocularon células en medio SC a 0.1 de D.O.₆₀₀, procedentes de un precultivo en medio rico YPD y a partir del tercer día, donde se asume que todos los cultivos han entrado en fase estacionaria, se comenzó a tomar alícuotas de células a lo largo del tiempo, y sembrarlas en placas con medio YPD tras realizar las

diluciones oportunas, tomando ese día como tiempo 0, con un 100% de viabilidad (ver Materiales y Métodos, Apartado 2.2.3).

Como puede observarse en la Figura 1.1, de manera general, la longevidad disminuye a medida que disminuye el pH del medio, tal y como se había descrito para levaduras de laboratorio. Sin embargo, se observa que a pH 3.5, que está en el rango de pH al que se han adaptado las levaduras vínicas, el perfil de la fase de muerte es diferente, siendo la viabilidad inicial (a tiempos 1 y 2 días) mayor que a pH más altos. Esto podría deberse a diversos motivos. Por un lado, el pH ácido del medio, y por tanto la mayor diferencia de potencial de membrana ocasionado, podría estar actuando de manera positiva facilitando el transporte de moléculas y por ello la supervivencia a corto plazo mientras quedan recursos en el exterior. También, este mayor crecimiento podría ser debido a que el pH ácido conduce a la activación de rutas de señalización que promueven el crecimiento y activan el metabolismo, como la ruta dependiente de cAMP, que activa a la quinasa PKA (Burhans *et al.*, 2009). A tiempos más largos, sin nutrientes en el medio, la activación de estas rutas causaría un elevado estrés en la célula, que conllevaría la muerte celular por apoptosis (Kaeberlein *et al.*, 2010).

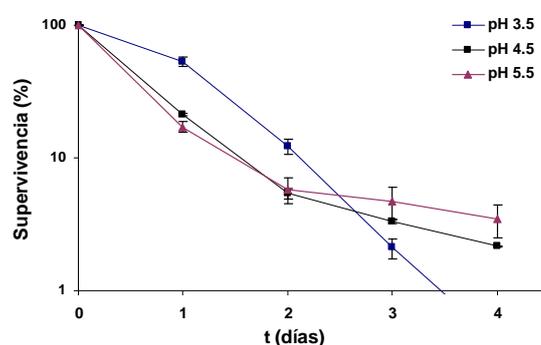


Figura 1.1. Experimentos de LC en la cepa EC1118 a distintos pH (3.5, 4.5 y 5.5). Se determinó el número de células viables (cfu/mL) por recuento en placa a distintos tiempos del experimento de envejecimiento, representándose la supervivencia en escala logarítmica. Los experimentos se realizaron como mínimo por triplicado y las barras de error muestran la desviación típica (DT).

1.1.2- Efecto de la temperatura

En el metabolismo celular interviene de manera muy importante la temperatura del medio, ya que la velocidad de los procesos bioquímicos depende directamente de ésta, siempre que no se alcancen temperaturas de desnaturalización térmica de las proteínas. La temperatura es un factor físico variable durante la vinificación y, como se ha mencionado en la Introducción, y en cepas de laboratorio, el estrés térmico disminuye la LC (Smith *et al.*, 2007).

Para estudiar el efecto de la temperatura en la longevidad de las levaduras vínicas, se han realizado experimentos de LC en la cepa EC1118 a distinta temperatura (24, 30 y 37 °C), y como se puede observar en la Figura 1.2, la longevidad disminuye conforme aumenta la temperatura del medio, cayendo dramáticamente cuando superamos los 30°C. Así pues, las temperaturas más altas, fuera del rango normal de vinificación, aceleran la muerte celular de las cepas vínicas de manera muy acusada. Disminuir la temperatura es por tanto una intervención razonable cuando se pretenda minimizar la muerte y lisis celular durante la producción de vino.

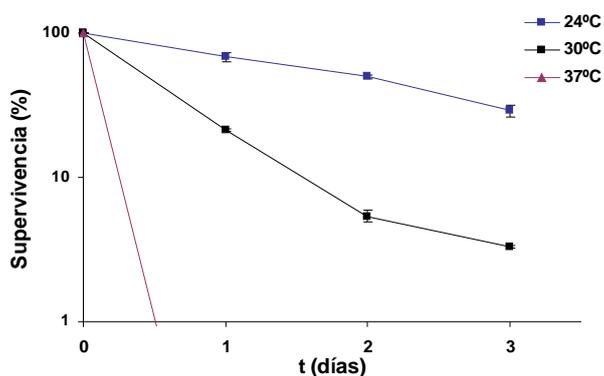


Figura 1.2. Experimentos de LC de la cepa EC1118 a distinta temperatura (24, 30 y 37 °C). Se determinó el número de células viables (cfu/mL) por recuento en placa a distintos tiempos del experimento de envejecimiento. Los experimentos se realizaron como mínimo por triplicado y las barras de error muestran la desviación típica (DT).

1.2- Determinantes químicos de la LC

Debido al enorme interés que suscita la búsqueda de drogas anti-envejecimiento, son numerosos los estudios que describen la existencia de moléculas de muy diverso origen que podrían estar afectando a la longevidad celular. Como se ha descrito en la Introducción, el efecto de estas moléculas es muy variado, ya que pueden actuar como antioxidantes, anticancerígenos, antiapoptóticos, antiinflamatorios, etc. Los polifenoles presentes en el mosto de uva, especialmente el estilbeno resveratrol, se han estudiado como potenciales moléculas anti-envejecimiento. También se ha descrito que la composición del medio de cultivo es determinante en la longevidad de las levaduras, por ejemplo en lo que respecta a la restricción dietaria. Los subproductos del metabolismo celular (como etanol y ácido acético), también afectan al modo en que discurre el proceso de envejecimiento.

Con el fin de estudiar el efecto de la composición química del entorno en la longevidad de levaduras vínicas, se ha escogido la utilización de diversos componentes relacionados con el proceso de vinificación, como los presentes de manera natural en el mosto o los producidos por la célula durante el proceso de fermentación.

1.2.1 Efecto de los polifenoles resveratrol y quercetina en la longevidad de levaduras vínicas

En el mosto de uva abundan los polifenoles, siendo de especial interés el resveratrol (un estilbeno) y la quercetina (un flavonoide), que son compuestos cuya relación con la longevidad celular ha sido ampliamente estudiada en condiciones de laboratorio (Belinha *et al.*, 2007; Howitz *et al.*, 2003).

Para estudiar el efecto que causan estos dos compuestos en el crecimiento y en la longevidad cronológica de levaduras vínicas, se realizaron experimentos de vinificación con la cepa EC1118 a escala de laboratorio. Para controlar la concentración de estos dos compuestos, las

microvinificaciones se realizaron en mosto sintético, preparado en el laboratorio tal y como se describe en el Apartado 2.2.2 de Materiales y Métodos. A este mosto se le adicionó resveratrol (Sigma) a 2 mg/L ó quercetina (Sigma) a 9 mg/L, concentraciones habituales en el mosto de uva natural (Gambutí *et al.*, 2004). Las células, procedentes de precultivos incubados en medio rico YPD durante 48 horas, se inocularon en el mosto a una densidad de 10^6 células/mL, inóculo comúnmente utilizado en la industria vínica. Para seguir la evolución de la fermentación vínica, se tomaron muestras a distintos tiempos y se determinó la viabilidad celular mediante el recuento en placa con medio rico YPD, y también el nivel de azúcares reductores.

En la Figura 1.3 A se muestran las curvas de crecimiento y muerte celular que tienen lugar durante el proceso de vinificación. Como puede observarse, el resveratrol causa un aumento en la densidad celular máxima que se alcanza, sin embargo, la cinética de muerte es más rápida, por lo que este compuesto disminuye la longevidad en condiciones de vinificación. Este

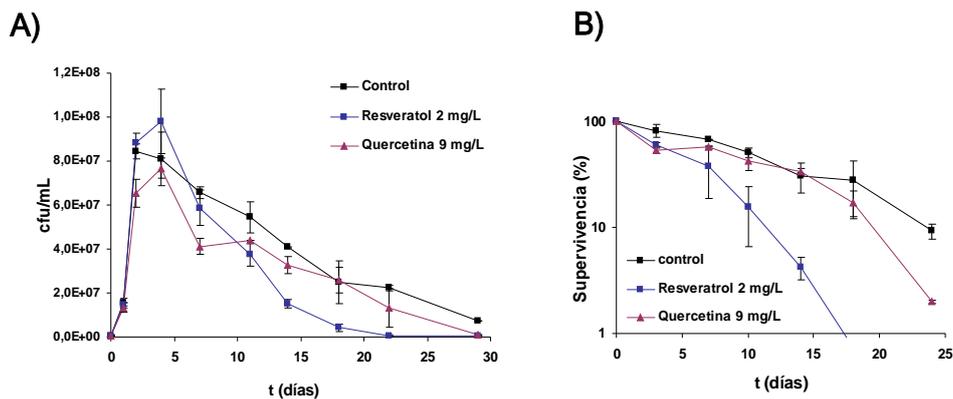


Figura 1.3. Curvas de crecimiento y muerte celular (A) y curvas de longevidad cronológica (B) en la cepa EC1118 durante el proceso de vinificación en mosto sintético, en la condición control y con la adición de 2 mg/L de resveratrol ó 9 mg/L de quercetina. Se determinó el número de células viables (cfu/mL) por recuento en placa a distintos tiempos de vinificación. Los experimentos se realizaron como mínimo por triplicado y las barras de error muestran la desviación típica (DT).

resultado se puede observar mejor si se representa la muerte celular con respecto al punto máximo de crecimiento (día 4, Figura 1.3 B), obteniéndose una curva de supervivencia similar a las realizadas para los experimentos de LC.

También se realizaron experimentos de microvinificación con una concentración de resveratrol de 14 mg/L (en el rango superior de concentración presente en la uva), observándose resultados similares en cuanto a crecimiento y longevidad celular (resultados no mostrados), lo que parece indicar que este compuesto tiene efecto a dosis bajas, sugiriendo una actuación como molécula reguladora de procesos celulares.

El efecto de la quercetina en estas condiciones es menor, observándose una ligera disminución en el crecimiento al principio de la fermentación y un pequeño descenso de la longevidad a tiempos finales.

En cuanto al consumo de azúcares reductores y la producción de etanol al final de la vinificación, no se observó diferencias significativas entre las diferentes condiciones, y todas las vinificaciones se completaron sobre los 11 días (resultados no mostrados).

En un intento de encontrar determinantes moleculares que expliquen los efectos negativos que provoca el resveratrol sobre la LC en las condiciones ensayadas y dado que este compuesto ha sido descrito como un agente antioxidante con potenciales efectos beneficiosos, se realizó un estudio transcriptómico con la cepa EC1118 a los 6 días de fermentación en mosto sintético MS300 en presencia y en ausencia de resveratrol. Se eligió este fondo genético porque actualmente se dispone de su secuencia, lo que facilita la búsqueda de genes y de grupos funcionales (Novo *et al.*, 2009). Pero en nuestro estudio, no se observaron apenas cambios de expresión génica, únicamente se expresaron diferencialmente una docena de genes en un factor de 2 o más (Tabla 1.1), y sin ninguna conexión funcional entre ellos. Parece entonces evidente que el resveratrol no está afectando a la transcripción génica, y que posiblemente tenga un modo de acción postranscripcional, por lo que se decidió no continuar con estos estudios.

Tabla 1.1. Genes cuya expresión se ve modificada por encima de un factor de 2 tras 6 días en vinificaciones en mosto sintético MS300 por la adición de 2 mg/mL de resveratrol. Los niveles del cambio de expresión respecto a la vinificación control se muestran entre paréntesis.

	Genes
Inducidos	<i>ALD6</i> (3.17), <i>ATG27</i> (2.35), <i>YKR075C</i> (2.21), <i>JLP1</i> (2.14), <i>SCM3</i> (2.06), <i>NSR1</i> (2.06), <i>SCY1</i> (2.04), <i>CLB1</i> (2.0), <i>LEE1</i> (2.0)
Reprimidos	<i>SIP18</i> (2.43), <i>INO1</i> (2.33), <i>HSP12</i> (2.26)

Se ha descrito que el resveratrol afecta a la actividad de la alcohol deshidrogenasa de levadura (Miura *et al.*, 2002) y que el resveratrol y la quercetina afectan a la aldehído deshidrogenasa ovina (Kitson *et al.*, 2001). Aunque en nuestras condiciones no se observó diferencias en cuanto a la producción de etanol, se llevó a cabo la determinación de la actividad enzimática de tres proteínas clave del metabolismo fermentativo, la actividad alcohol deshidrogenasa (Adh) y las actividades aldehído deshidrogenasa citoplasmática (Ald6) y mitocondrial (Ald4). Para ello se midió la actividad de estos enzimas en extractos de células procedentes de un cultivo en fase estacionaria en medio rico YPD, en la condición control y con la adición de 2 mg/L de resveratrol ó 9 mg/L de quercetina. Como puede observarse en la Figura 1.4, el resveratrol parece afectar negativamente a las actividades Adh y Ald6, y de manera positiva a la actividad Ald4, aunque las diferencias entre los resultados obtenidos carecían de validez estadística. Sin embargo, el efecto inhibitorio de la quercetina sí que parece ser contundente y afecta a las tres actividades enzimáticas, sobre todo a la Ald4. El efecto de inhibición sobre estos enzimas del metabolismo fermentativo sugiere una regulación que podría afectar de manera general a reacciones que utilizan el dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) como cofactor. El efecto negativo de la quercetina sobre estos enzimas podría explicar el defecto en cuanto al crecimiento y la longevidad observados a tiempos iniciales y finales de la vinificación (Figura 1.3), aunque no podemos afirmar lo mismo para el resveratrol, que mostró un comportamiento más variable. Así pues, parece

evidente que estos compuestos pueden afectar a la actividad de diversas enzimas y también al envejecimiento, si bien su impacto en la longevidad dependerá del efecto de múltiples factores.

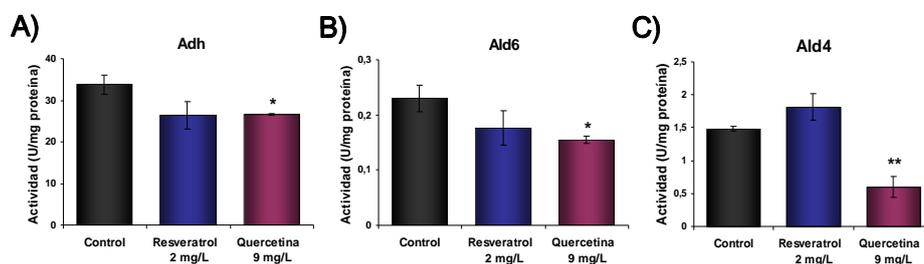


Figura 1.4. Determinación de actividades enzimáticas, Adh (A), Ald6 (B) y Ald4 (C) en la condición control y con 2 mg/L de resveratrol ó 9 mg/L de quercetina en extractos celulares en fase estacionaria de crecimiento en YPD. Se indica con asteriscos las diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las distintas condiciones as medias con respecto a la cepa wt (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Aunque en los experimentos descritos no se ha encontrado un efecto beneficioso del resveratrol sobre el envejecimiento, existen diversos estudios que describen su efecto antioxidante. Uno de los daños celulares más comunes durante el estrés oxidativo consiste en el ataque de los ROS a los ácidos grasos de membrana, provocando la oxidación de los lípidos y la desesterificación de los fosfolípidos, generando un aumento en el nivel de peroxidación lipídica. El nivel de peróxidos lipídicos es uno de los marcadores más importantes del estrés oxidativo, para cuya determinación se utiliza habitualmente la medición del malondialdehído (MDA) producido por la interacción de los lípidos dañados con el tiobarbitúrico. Para determinar si el grado de peroxidación lipídica varía con el uso de resveratrol en la cepa EC1118, se analizó mediante espectrofotometría los niveles de MDA presentes a los 6 días de la vinificación en mosto sintético (al principio de la fase de muerte celular). Como puede observarse en la Figura 1.5, en la condición con 2 g/L de resveratrol los niveles de MDA son mayores que en la

condición control, por lo que en nuestras condiciones, este polifenol no solo no estaría protegiendo a las células de la peroxidación de lípidos provocada por las ROS, sino que en su presencia ésta sería mayor.

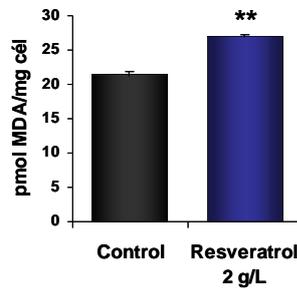


Figura 1.5 Niveles de peroxidación de lípidos, expresados como pmol de malondialdehído (MDA) por mg de células. Se indica con asteriscos la diferencia estadísticamente significativa de la media entre la condición control y con resveratrol (** p<0.01).

Así pues, en condiciones de vinificación el efecto del resveratrol no se corresponde con el patrón esperado de un antioxidante que protege contra el daño oxidativo retrasando el envejecimiento, sino que actúa más bien como una molécula capaz de inducirlo. Tampoco la quercetina presenta un efecto positivo en la longevidad. La disparidad con lo observado en condiciones de laboratorio podría estar relacionada con las condiciones que se producen durante la fermentación vínica, donde la presencia de oxígeno es menor y donde las elevadas concentraciones de azúcares imponen un metabolismo fermentativo. En esta situación, la actividad de la mitocondria debe ser por fuerza diferente a la que se produce en un crecimiento en medio bien oxigenado, donde posiblemente la producción y eliminación de las ROS sea diferente, y el efecto de un antioxidante clásico distinto. El resveratrol parece ejercer un ligero efecto positivo en la proliferación celular (Figura 1.3 A), indicando que sí puede tener un efecto positivo en alargar la LR, pero con efectos negativos en la LC. Ese patrón se correspondería con un posible

efecto sobre Sir2p, que se sabe que juega papeles opuestos en ambos tipos de longevidad (ver Introducción).

1.2.2 Efecto de los precursores del NAD⁺ en la longevidad

Como se ha descrito anteriormente en la Introducción, la concentración de NAD⁺ es determinante en la actividad de las sirtuinas, puesto que interviene directamente como sustrato en la reacción que catalizan (además de modular potencialmente todas las enzimas que lo usan como cofactor, como las ya mencionadas), de ahí la relevancia de sus precursores, las vitaminas ácido nicotínico y nicotinamida, que se engloban bajo el nombre genérico de niacina o vitamina B3. La nicotinamida, además, es el producto de la actividad de las sirtuinas, que es capaz de actuar como un represor no competitivo de las mismas.

Para estudiar el efecto de estas moléculas sobre el crecimiento y la LC de levaduras vínicas, se realizaron microvinificaciones en mosto sintético suplementado con diversas cantidades de ácido nicotínico y nicotinamida. Las levaduras en condiciones aeróbicas son capaces de sintetizar NAD⁺ a partir de triptófano, pero en condiciones de baja concentración de oxígeno como la vinificación, el ácido nicotínico y la nicotinamida son los únicos precursores de la síntesis del NAD⁺ y se comportan como vitaminas. En cualquier caso, en nuestras vinificaciones añadimos triptófano a 1 mg/L, que es la concentración más baja en la que este aminoácido se encuentra presente en los mostos naturales (Henschke *et al.*, 1992; Fleet *et al.*, 1993), para minimizar su potencial efecto en la biosíntesis de NAD⁺. En la receta estándar del mosto sintético, la vitamina B3 se añade únicamente en forma de ácido nicotínico a una concentración de 2 mg/L (Riou *et al.*, 1997). El rango de concentración de ácido nicotínico en los mostos es de entre 0.79 y 3.75 mg/L (Castor, 1953), por ello se eligió utilizar la concentración superior para nuestros experimentos. En cuanto a la nicotinamida, se utiliza a una concentración de 5 mM en los experimentos de inactivación de las sirtuinas

(Bitterman *et al.*, 2002). En nuestro caso se ha empleado como concentración máxima 1 mM (122 mg/L).

Como puede observarse en la Figura 1.6, el efecto de estos precursores del NAD⁺ en el crecimiento y en la LC durante la vinificación es muy similar a una concentración de 3.75 mg/L. En ambas condiciones se produce una cinética inicial de muerte celular muy rápida con respecto a la condición control, pero a tiempos más largos se produce una ralentización y se igualan las LC con respecto al control. Además, se produce una ligera

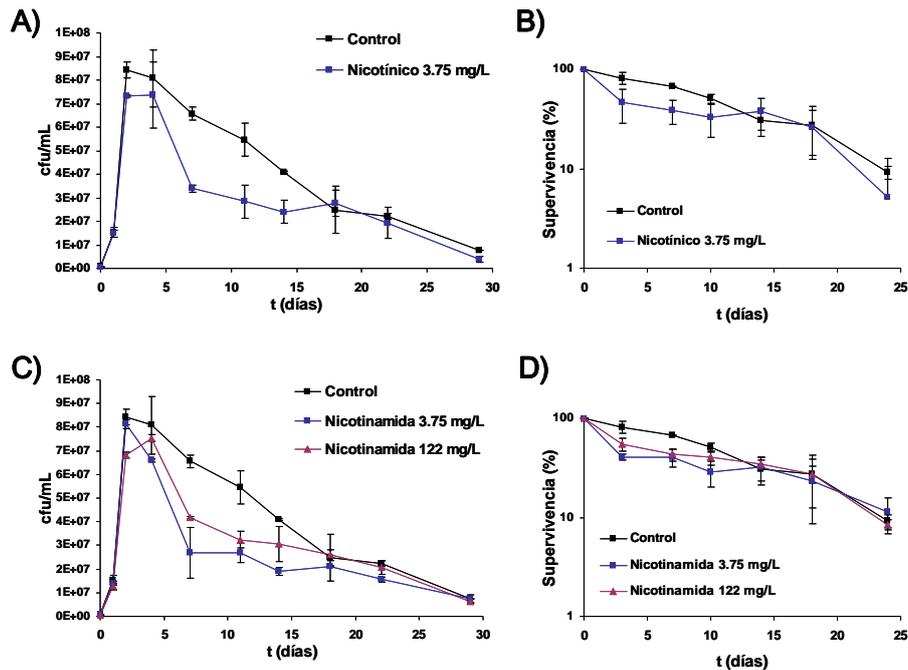


Figura 1.6. Curvas de crecimiento y muerte celular (A) y (C) y curvas de longevidad cronológica (B) y (D) en la cepa EC1118 durante el proceso de vinificación en mosto sintético, en la condición control y con la adición de ácido nicotínico (3.75 mg/L) ó nicotinamida (3.75 y 122 mg/L). Se determinó el número de células viables (cfu/mL) por recuento en placa a distintos tiempos de vinificación. Los experimentos se realizaron como mínimo por triplicado y las barras de error muestran la desviación típica (DT).

disminución en la densidad celular máxima alcanzada con el ácido nicotínico. El aumento de la concentración de nicotinamida a 122 mg/L no produce un cambio apreciable en el perfil de crecimiento y muerte celular.

El patrón similar de viabilidad celular que producen el ácido nicotínico y la nicotinamida sugiere que sería su función común como precursores del NAD⁺ la que condiciona el perfil de longevidad, y que la capacidad de la nicotinamida como represor de las sirtuinas, que no comparte con el ácido nicotínico, no parece tener relevancia en estas condiciones. Eso se podría deber a que la actividad represora de la nicotinamida se ha descrito en condiciones de laboratorio a concentraciones mucho más elevadas que las que de manera natural están presentes en el mosto.

Nuestros datos sugieren que el aumento de la concentración de NAD⁺ que producirían estos compuestos no es beneficioso para la LC, y eso quizás se deba a que no todas las sirtuinas tienen un efecto positivo en longevidad (ver Apartado 3) y posiblemente su efecto pueda ser, en global, negativo. Una elevada concentración de NAD⁺ podría ser beneficiosa para estimular la glicólisis, pero requeriría también una elevada actividad alcohol deshidrogenasa para ser reoxidado en las etapas finales de la fermentación. Un desequilibrio entre ambas concentraciones causaría un efecto negativo debido a la acumulación de acetaldehído intracelular. Nuestros datos sugieren que en condiciones de vinificación, la levadura regula los niveles de NAD⁺ en una concentración óptima, y su aumento no resulta beneficioso. Alternativamente, puede que la presencia de estas moléculas esté actuando como represor de alguna ruta metabólica que en condiciones de vinificación sea necesaria para alcanzar una longevidad máxima.

1.2.3 Efecto en la longevidad de los compuestos de dos carbonos producidos por el metabolismo fermentativo

Diversos estudios demuestran que los compuestos de dos carbonos que aparecen durante el metabolismo fermentativo tienen un efecto en la longevidad celular. Se ha descrito que la concentración de etanol presente

durante la entrada en fase estacionaria es clave para determinar la duración de la LC (Fabrizio *et al.*, 2005). En cuanto al ácido acético, el pH ácido que su acumulación provoca en el medio al final de la fermentación parece una de las principales causas del envejecimiento celular (Burtner *et al.*, 2009). Una vez en el medio, la toxicidad del ácido acético induce la apoptosis (Kaeberlein *et al.*, 2010).

Con el fin de estudiar el efecto del etanol, del acetato y del acetaldehído en la LC de levaduras vínicas, se realizaron experimentos de envejecimiento cronológico con la cepa vínica T73, que como se verá más adelante en este trabajo (Figura 2.1), presenta una longevidad intermedia. En este experimento, a diferencia del resto de experimentos de medida de longevidad realizados en este trabajo, se utilizó el agua como medio para inducir el envejecimiento con el fin de poder controlar la concentración exacta de etanol, acetato y acetaldehído presentes en el medio. Por ello, una vez transcurridas las 72 h de crecimiento en medio SC, (tiempo que se toma como t₀ en los experimentos de LC), las células se recogieron, se lavaron en agua y se volvieron a resuspender en agua y con 0.122 g/L de acetaldehído, 0.4 g/L de acetato potásico, o con 8 g/L de etanol, y se fueron tomando muestras a lo largo del tiempo para determinar la viabilidad mediante el recuento en placa. Las concentraciones elegidas para estos metabolitos están dentro del rango de concentración que se alcanzan durante la fermentación vínica, excepto la de etanol, que se eligió la concentración utilizada en condiciones de laboratorio y que sirvió de referencia. Se eligió acetato potásico en vez de ácido acético para estudiar el efecto tóxico de la molécula en sí, de manera independiente a la acidificación que produce el ácido acético en el medio, ya que el mosto de uva es un medio ácido y muy tamponado, por lo que el pH permanece estable a lo largo de la vinificación.

En la Figura 1.7 se muestran las curvas de LC de las distintas condiciones. El efecto negativo que causan en la longevidad estos compuestos de dos carbonos es claro, sobre todo el efecto del acetaldehído, el cual disminuye considerablemente la LC. El efecto negativo que producen el acetato y el etanol también es notable. En la curva en presencia de etanol

se observa que se produce un ligero crecimiento a tiempos iniciales, lo que significaría que a esta concentración, el etanol se estaría consumiendo, y el efecto negativo observado se debería posiblemente a su transformación en acetaldehído o acetato. En las curvas de LC de estos últimos no se observaría este efecto porque la baja concentración utilizada no promovería el crecimiento celular. Estos resultados indican que los compuestos de dos carbonos que se producen tras la fermentación promueven el envejecimiento celular de las levaduras vínicas, y por primera vez se identifica el acetaldehído como un agente promotor del envejecimiento. Por lo tanto, en un proceso metabólico normal, el flujo entre estas tres moléculas puede ser determinante para la longevidad. El mayor efecto del acetaldehído, incluso a menores dosis, posiblemente se deba a su elevada reactividad química.

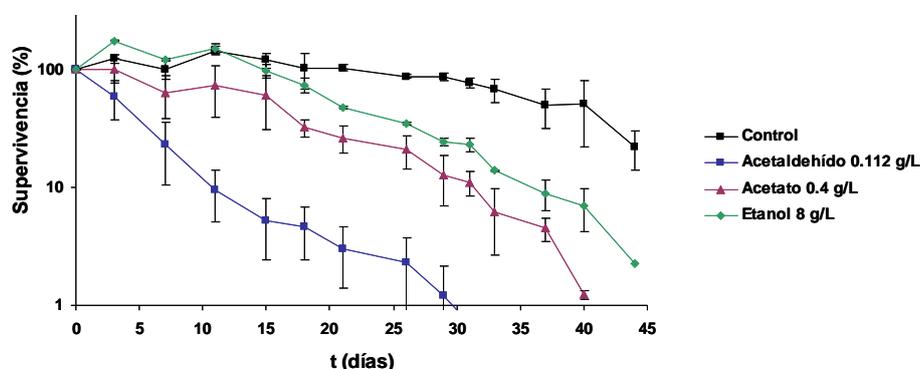


Figura 1.7. Experimentos de LC en la cepa T_{73} en la condición control (agua) y con la adición de distintos compuestos de dos carbonos; acetaldehído 0.112 g/L, acetato 0.4 g/L ó etanol 8 g/L. Se determinó el número de células viables (cfu/mL) por recuento en placa a distintos tiempos del experimento de envejecimiento. Los experimentos se realizaron como mínimo por triplicado y las barras de error muestran la desviación típica (DT).

Como se ha descrito en la Introducción, las levaduras son incapaces de consumir la elevada concentración de etanol que se alcanza durante la fermentación vínica y por ello su toxicidad parece ser la causa de la muerte

celular. Para profundizar en el estudio del efecto negativo del etanol en la longevidad celular durante el proceso de vinificación, se realizó un experimento de LC utilizando, como medio de envejecimiento, vino procedente de una fermentación vínica en mosto sintético. Para ello se realizaron microvinificaciones en mosto sintético y una vez consumidos los azúcares, las células se eliminaron del medio por centrifugación, obteniendo el medio de cultivo “vino” para la condición control. Este medio se sometió a un proceso de evaporación (con un aparato *speed vac*), mediante el cual se logró reducir la concentración de etanol de 107 g/L a 6 g/L y la de acetaldehído de 0.022 g/L a 0.009 g/L. Finalmente a este medio (“vino evaporado”) se le añadió etanol al 10% ó al 2% (p/v) y se realizó un experimento de LC tras la inoculación de células de la cepa EC1118 procedentes de otra vinificación independiente, una vez se habían consumido los azúcares.

Como puede observarse en la Figura 1.8, al someter a evaporación el vino, se produce un significativo aumento en la LC con respecto al no evaporado, siendo la cinética de muerte muy similar entre el medio de vino evaporado y al que se le ha añadido 20 g/L de etanol. En este último caso se observa un pequeño crecimiento a tiempos iniciales (la supervivencia aumenta un 13% a los 2 días), posiblemente debido al consumo del etanol, indicando que para las levaduras vínicas, este nivel de etanol no es en absoluto inductor de envejecimiento. En la condición a la que se le había añadido etanol al 10% (p/v) se produce una notable disminución de la LC, lo cual apoya la idea de la toxicidad del etanol a esta elevada concentración, la cual imposibilita su consumo. La condición control sin evaporar (“vino”) es la que menor longevidad presenta, sugiriendo que en la muerte celular que se produce tras la fermentación vínica intervienen, además de la elevada concentración de etanol alcanzada, otros compuestos, como el acetato y el acetaldehído, que como se ha descrito en el apartado anterior, tienen un importante papel en la longevidad.

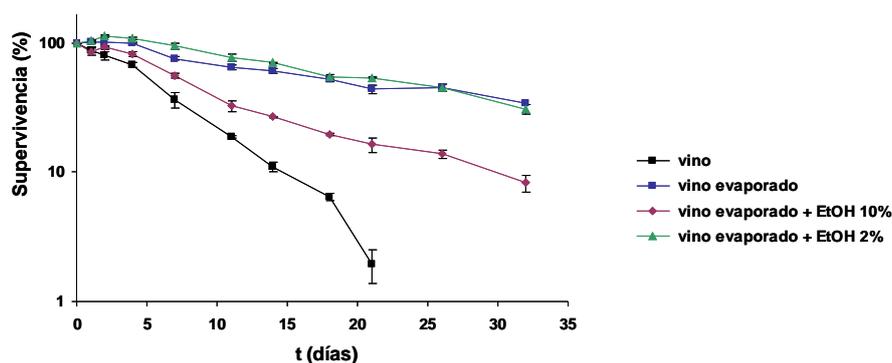


Figura 1.8. Experimentos de LC en la cepa EC1118 en vino procedente de una vinificación en mosto sintético. La condición control es el vino obtenido tras la fermentación y para las demás condiciones se eliminó el etanol mediante evaporación y se le añadió etanol al 10% ó al 2% (p/v). Los experimentos se realizaron tal y como se describe en la Figura 1.7.

Es importante señalar que entonces las células en el momento de agotar los azúcares no están predeterminadas a morir, ya que al eliminar el factor principal que induce el envejecimiento, el etanol, las células extienden su longevidad, incluso al añadir pequeñas concentraciones de etanol son capaces de reiniciar la proliferación celular utilizándolo como fuente de carbono. Esto indicaría que el mecanismo de muerte celular al final de la fermentación no es una forma de muerte celular que quede fijada en estadios tempranos de la fermentación.

1.2.4 Efecto de la restricción dietaria en la longevidad de levaduras vínicas

Como se ha mencionado en la Introducción, la restricción dietaria es el factor más importante descrito hasta el momento en la extensión de la longevidad celular. Dentro de la restricción dietaria se distingue entre la restricción calórica, ocasionada por bajas concentraciones de glucosa, y la restricción causada por falta de nitrógeno. Durante el proceso de vinificación,

la concentración de nitrógeno en el medio condiciona de manera importante el crecimiento celular, y diversos trabajos han relacionado un defecto en el crecimiento y, por ello, las paradas de vinificación con la limitación de este compuesto. Con el fin de profundizar en el papel del nitrógeno en la LC durante la vinificación, se realizaron microvinificaciones con la cepa EC1118 en mosto sintético con diferentes concentraciones de nitrógeno, y se estudió el comportamiento de crecimiento y muerte celular. El mosto sintético estándar (MS300), contiene 300 mg/L de nitrógeno asimilable. Esta concentración de nitrógeno soluble está dentro del rango que se encuentra de forma natural en los mostos, entre 60 y 1000 mg/L (Henschke *et al.*, 1992), y por encima de las que se consideran limitantes, que son por debajo de 140 mg/L (Bell *et al.*, 2005). Por lo tanto, el mosto de referencia MS300 es un medio rico, y lo compararemos con mostos con la mitad y un cuarto de nitrógeno (MS150 y MS75; con 150 y 75 mg/L de nitrógeno asimilable), que ya suponen un déficit del mismo.

En la Figura 1.9 puede observarse el importante efecto de la concentración de nitrógeno en el crecimiento y en la longevidad. A medida que disminuye la concentración de este compuesto en el medio, la velocidad

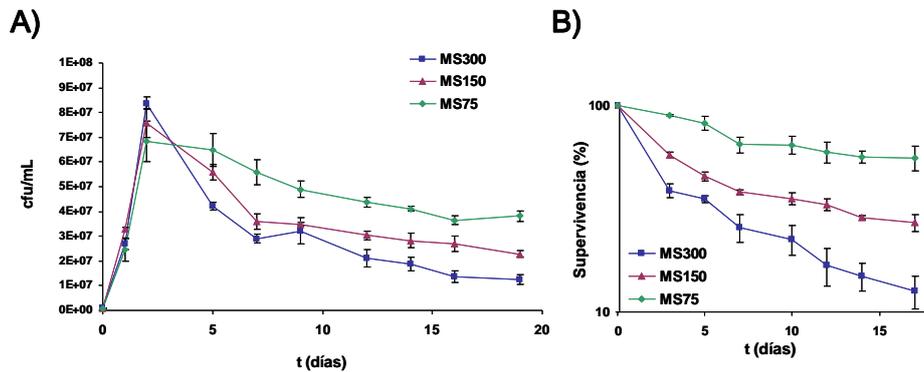


Figura 1.9. Curvas de crecimiento y muerte celular (A) y curvas de longevidad cronológica (B) en la cepa EC1118 durante el proceso de vinificación en mosto sintético, en la condición control, donde el mosto tiene 300 mg/L de fuente de nitrógeno (MS300), con la mitad de nitrógeno (MS150) y con la cuarta parte de nitrógeno (MS75). Los experimentos se realizaron tal y como se describe en la Figura 1.7.

de crecimiento disminuye, alcanzándose una densidad celular menor, sin embargo, la longevidad aumenta de manera significativa, apoyando la idea del efecto positivo de la restricción por nitrógeno en la longevidad celular.

En cuanto al consumo de azúcares, la velocidad disminuye conforme disminuye la concentración de nitrógeno, pero en los tres casos acaban por consumirse, sin observarse paradas en la vinificación (resultados no mostrados).

Debido a la enorme variación en cuanto a la concentración de nitrógeno en los mostos naturales, y su importante efecto en la longevidad celular durante la fermentación vínica, la determinación del contenido en este metabolito parece ser relevante no sólo para determinar la vigorosidad de crecimiento durante la fase de fermentación, sino también para prever si la fase de muerte celular y posterior lisis va a alargarse mucho en el tiempo. La deficiencia en nitrógeno es una de las causas principales de paradas en la fermentación y de fermentaciones lentas, y la respuesta de las levaduras ante este tipo de situaciones de estrés nutricional implica alargar la longevidad cronológica, por lo tanto, la comprensión de los determinantes de la longevidad puede ser de gran interés en la industria vínica.

Como se ha mencionado previamente en este trabajo (ver Introducción), el efecto de la restricción de nitrógeno está controlado principalmente por la ruta TOR, por ello cada vez hay más evidencias que relacionan la longevidad cronológica directamente con la ruta TOR (Fontana *et al.*, 2010). El efecto de la ruta TOR en la LC se estudiará con más detalle en el Apartado 3.6.

Con todo lo descrito anteriormente se puede concluir que, en muchas ocasiones, las levaduras vínicas responden a las condiciones externas de manera similar a como lo hacen las cepas de laboratorio, (como ocurre con la reducción de la LC al aumentar la temperatura y la concentración de etanol y ácido acético, o el aumento de la LC al disminuir los nutrientes). Pero las condiciones de fermentación vínica suponen condiciones diferentes a las de laboratorio, las cuales hacen que, por ejemplo, los polifenoles resveratrol y quercetina tengan un efecto negativo en la LC, al contrario de lo que se ha

demostrado que ocurre en algunas en condiciones de laboratorio (Belinha *et al.*, 2007).

Por último, se ha identificado el acetaldehído como un potente agente inductor del envejecimiento Además, durante las fermentaciones pobres en nitrógeno las levaduras alargan notablemente su longevidad. Todo ello indica el importante potencial que presenta el uso biotecnológico de los mecanismos reguladores del envejecimiento.

2.- Determinantes genéticos de la longevidad celular en levaduras vínicas

Con el fin de profundizar en el conocimiento de la longevidad cronológica de las levaduras vínicas, en este apartado se pretende identificar determinantes genéticos que regulan la viabilidad celular durante el proceso de envejecimiento que tiene lugar en la fermentación vínica. Para ello se ha estudiado la longevidad de diversas cepas vínicas, muchas de ellas comerciales, y se han observado patrones de longevidad muy diferentes. Posteriormente se ha continuado con el estudio comparado entre dos de estas cepas, con patrones extremos de larga y corta longevidad, y se ha realizado un estudio global de expresión génica con el fin de identificar determinantes genéticos que puedan condicionar distintos comportamientos en cuanto a envejecimiento.

2.1- Caracterización de la variabilidad natural de la longevidad de levaduras vínicas

Con el fin de determinar la existencia de distintos patrones de longevidad cronológica en levaduras vínicas industriales, se ha comparado el comportamiento de LC en condiciones de laboratorio de una batería de cepas de diferentes orígenes, la mayoría de ellas comerciales (ver Tabla M.1). Para ello se realizaron experimentos estándar de LC en medio mínimo completo SC, y se determinó la viabilidad a lo largo del tiempo, tal y como se describe en Materiales y Métodos (Apartado 2.2.3).

En la Figura 2.1 se observa la gran variabilidad en cuanto a longevidad que presentan distintas cepas vínicas. Las cepas EC1118, UCLM 5235, L2056, Zymaflore VL3 y Fermichamp 67J, presentan una baja longevidad, siendo extrema la de EC1118 y UCLM 5235 (que alcanza el 0.1% de viabilidad a 3.5 y 7 días respectivamente). Además, se observa la existencia de una gran heterogeneidad en cuanto al perfil que muestran las

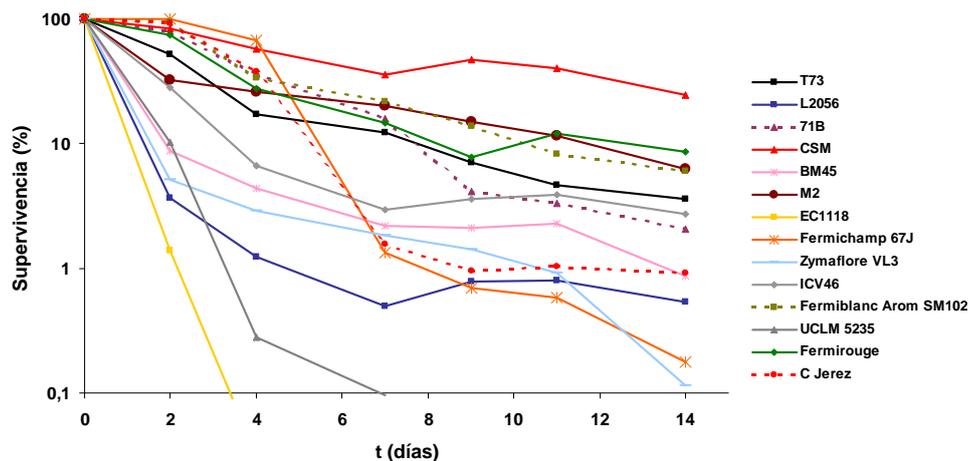


Figura 2.1. Experimentos de LC en las distintas cepas vínicas industriales. Se determinó el número de células viables (cfu/mL) por recuento en placa a distintos tiempos del experimento de envejecimiento.

curvas de longevidad ya que, por ejemplo, la cepa Fermichamp 67J parece ser más longeva durante los primeros 5 días, pero posteriormente sufre una caída brusca en su curva de supervivencia. Las cepas T73, 71B, BM45, ICV46 y C Jerez presentan una longevidad intermedia. Cabe resaltar el comportamiento intermedio en cuanto a longevidad de la cepa C Jerez, ya que se trata de una cepa utilizada en la producción de finos de Jerez, con características fisiológicas muy distintas al resto y, sin embargo, tiene una curva de LC similar a las demás cepas vnicas. Por último, las cepas CSM, M2, Fermiblanc Arom SM102 y Fermirouge presentan una longevidad mayor, siendo CSM la cepa más longeva de todas las analizadas en este trabajo.

Como se ha mencionado en la Introducción, existen numerosos estudios que demuestran la existencia de una relación directa entre la longevidad celular y la resistencia a estrés, siendo la respuesta al estrés oxidativo clave en la supervivencia celular. En cepas de laboratorio se ha demostrado que las especies reactivas del oxígeno (ROS), como el ión superóxido, tienen un gran impacto sobre la LC (Fabrizio *et al.*, 2004). Por ello, una vez caracterizada la longevidad de las distintas cepas vnicas, se realizaron experimentos de resistencia a estrés oxidativo, con la finalidad de establecer una posible relación entre ambos aspectos en las cepas bajo estudio. Para ello se midió el halo de inhibición de crecimiento que produce la adición de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), tal y como se explica en Materiales y Métodos (Apartado 2.2.5). Posteriormente se comparó la vida media de las cepas con respecto a la resistencia a estrés oxidativo, y como puede observarse en la Figura 2.2, existe una cierta correlación negativa entre ambos parámetros, de manera que cuanto menor es la longevidad que presenta la cepa, menor es su resistencia a estrés oxidativo (el diámetro del halo de inhibición es mayor). Es decir, de manera general, las cepas más resistentes a estrés oxidativo son más longevas, por lo que la tolerancia a este tipo de estrés podría ser un factor clave en la longevidad, aunque evidentemente no el único.

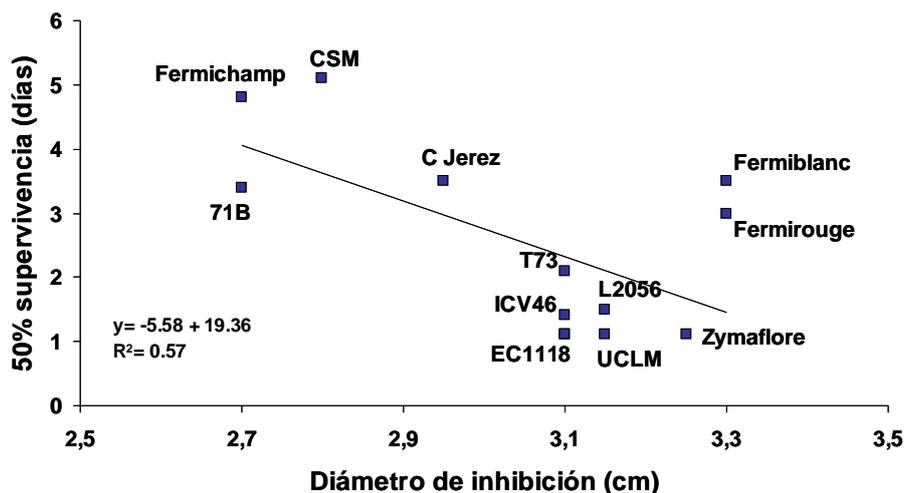


Figura 2.2. Correlación entre la vida media de las distintas cepas vínicas industriales en experimentos de LC y el diámetro de inhibición del crecimiento causado por H₂O₂.

En los estudios posteriores para caracterizar determinantes genéticos de longevidad, se utilizaron dos de estas cepas como modelo para realizar los experimentos, la cepa poco longeva EC1118 y la cepa muy longeva CSM.

En primer lugar, se estudió la tolerancia a otros tipos de estrés en condiciones estándar de laboratorio para las cepas escogidas como modelos de alta y baja longevidad. Para ello se realizaron experimentos sometiendo a las células en fase exponencial (Figura 2.3 A) y en fase estacionaria (Figura 2.3 B) de crecimiento en medio rico YPD a diversos tipos de estrés. En la situación de crecimiento exponencial, que es la condición estándar para determinar el nivel de tolerancia a un determinado estrés, ambas cepas presentaron elevada sensibilidad a altas concentraciones de etanol (10%), y no se observó diferencias entre ellas. La cepa más longeva CSM presentó más sensibilidad a los demás estreses aplicados, choque hiperosmótico (producido por altas concentraciones de glucosa, 20%), estrés oxidativo (producido por peróxido de hidrógeno 5mM) y por choque térmico (42 °C),

(Figura 2.3 A). Resulta sorprendente y también interesante que la cepa más longeva sea más sensible a todos los estreses aplicados en estas condiciones, indicando que tiene una tolerancia basal a estrés menor. Por ello, también se estudió la sensibilidad a estrés por etanol y oxidativo que tiene lugar al final de la fermentación, en fase estacionaria tras dos días de crecimiento en YPD (Figura 2.3 B). En este caso la cepa longeva CSM sí que presentó más tolerancia a ambos estreses, apoyando la idea de que la resistencia a estrés es un factor positivo en la longevidad celular. La elevada tolerancia a etanol en fase estacionaria de la cepa CSM podría estar actuando de manera positiva aumentando su LC.

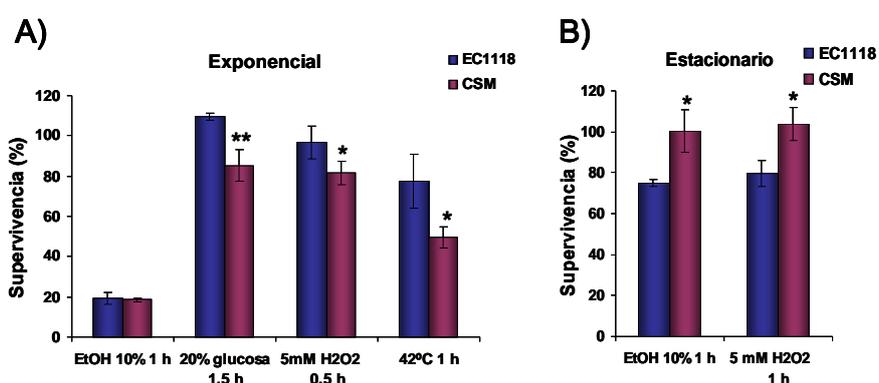


Figura 2.3. Determinación de la resistencia a estrés por etanol, osmótico, oxidativo y por choque térmico de las cepas vínicas industriales EC1118 y CSM. (A) Resistencia a estrés por etanol 10 % (v/v) 1 h, glucosa 20% (p/v) 1.5 h, H₂O₂ 5 mM 0.5 h y 42 °C 1 h de células procedentes de un cultivo en estado exponencial en medio rico YPD. (B) Resistencia a estrés por etanol al 10 % 1 h y H₂O₂ mM 0.5 h de células procedentes de un cultivo en fase estacionaria en medio rico YPD. Se indica con asteriscos la diferencia estadísticamente significativa entre las cepas EC1118 y CSM (* p<0.05, ** p<0.01).

2.2- Análisis del comportamiento en vinificación de las cepas vínicas industriales EC1118 y CSM

2.2.1- Medida del crecimiento y de la viabilidad celular durante la vinificación

Se comparó el comportamiento durante la fermentación vínica de las cepas escogidas como modelos de baja y elevada longevidad, EC1118 y CSM. Para ello se realizaron microvinificaciones en mosto natural de la variedad bobal (Requena, España) con ambas cepas, tal y como se describe en Materiales y Métodos (Apartado 2.2.2). Las células procedentes de precultivos incubados en medio rico YPD durante 48 horas se inocularon en el mosto a una densidad de 10^6 células/mL, y se fueron tomando muestras a lo largo del tiempo para determinar el crecimiento celular mediante el recuento en placa con medio rico YPD.

En la Figura 2.4 A se muestran las curvas de crecimiento y muerte celular que tienen lugar durante el proceso de vinificación. Como se puede observar, la velocidad de crecimiento de la cepa EC1118 es notablemente mayor, alcanzando un número máximo de células superior al observado en CSM (1.7 veces más). La velocidad de muerte celular es también mayor en la cepa EC1118 ya que el número de células cae rápidamente una vez alcanzado la máxima densidad celular, sin embargo, en la cepa CSM la fase de máxima densidad celular se mantiene, permaneciendo las células viables a lo largo del tiempo analizado. Por ello la longevidad de la cepa CSM es significativamente superior a la de EC1118 también en condiciones de vinificación. Este resultado se puede observar mejor si se representa la muerte celular con respecto al punto máximo de crecimiento, a día 5, obteniéndose una curva de supervivencia similar a las realizadas para los experimentos de longevidad cronológica (Figura 2.4 B). En esta figura se observa claramente la elevada longevidad de la cepa CSM, muy superior a la de EC1118, tal y como ocurría también en medios de laboratorio (Figura 2.1).

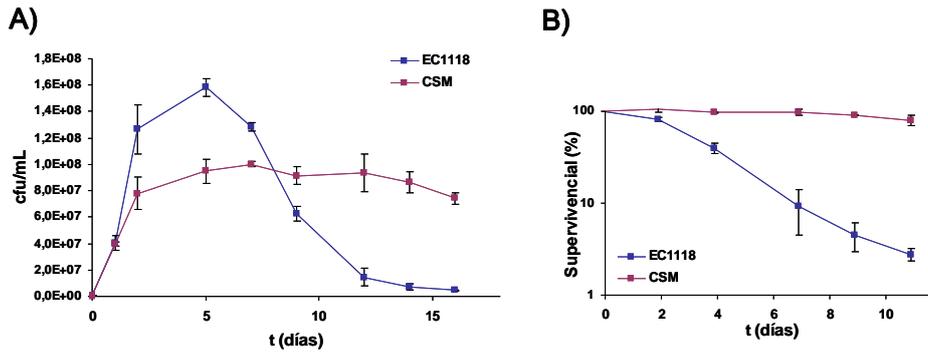


Figura 2.4. Curvas de crecimiento y muerte celular (A) y curvas de longevidad cronológica (B) de las cepas EC1118 y CSM durante el proceso de vinificación en mosto natural. Se determinó el número de células viables (cfu/mL) por recuento en placa a distintos tiempos de vinificación. Los experimentos se realizaron como mínimo por triplicado y las barras de error muestran la desviación típica (DT).

Para seguir la evolución de la fermentación vínica, se tomaron muestras a distintos tiempos y se determinó el nivel de azúcares reductores tal y como se explica en Materiales y Métodos (Apartado 5.1). La vinificación se da por terminada cuando la concentración de azúcares es menor de 2 g/L.

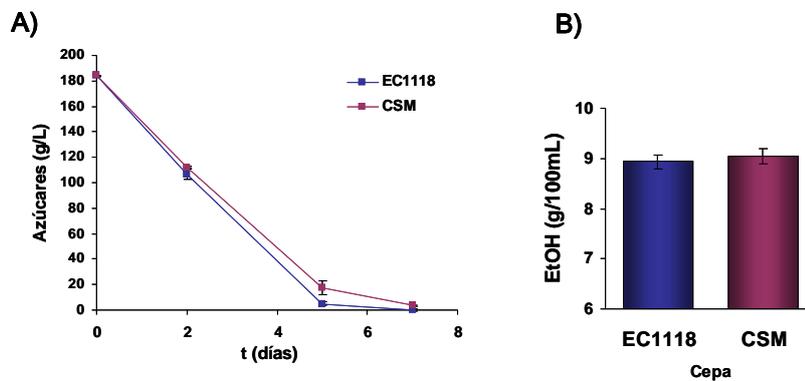


Figura 2.5. Determinación de azúcares reductores (A) y de la concentración de etanol (B) durante el proceso de vinificación en mosto bobal de las cepas EC1118 y CSM. Las medidas se realizaron por triplicado y se muestra las medias y la DT.

Como puede observarse en la Figura 2.5 A, la cepa EC1118 presenta una velocidad de consumo de azúcares ligeramente superior a la cepa CSM, pero ambas cepas terminan con éxito la vinificación y producen una concentración de etanol similar (Figura 2.5 B).

También se realizaron microvinificaciones en mosto sintético para estudiar si el comportamiento tan distinto observado en cuanto a longevidad entre las cepas EC1118 y CSM es reproducible en un medio de cultivo más estandarizado. Como puede observarse en la Figura 2.6 A, el perfil de las curvas de crecimiento en las vinificaciones en mosto sintético presentan ligeras diferencias con respecto a las observadas para el mosto bobal. La velocidad de crecimiento en mosto sintético es menor y se alcanza una densidad celular inferior a la observada en mosto bobal. Además, las células permanecen viables durante más tiempo, dando lugar a cinéticas de muerte menos pronunciadas. Esto podría significar que existen determinados compuestos, posiblemente micronutrientes o polifenoles, que parecen ser importantes para el crecimiento celular y que no se ha conseguido reproducir en el mosto sintético.

En mosto sintético la cepa CSM también muestra una longevidad muy superior a la de EC1118 (Figura 2.6 A), por lo que la elevada longevidad de esta cepa es independiente del medio de cultivo. En cuanto al consumo de azúcares, en mosto sintético se observan diferencias mayores entre las cepas (Figura 2.6 B), ya que aunque ambas terminan la fermentación, la velocidad de consumo de la cepa CSM es notablemente inferior. El aumento en la mortalidad de la cepa EC1118 no viene determinada por su mayor producción o consumo de etanol, ya que la concentración de este metabolito es similar a la producida por la cepa CSM (Figura 2.6 C) y además permanece constante durante el período de LC analizado (resultados no mostrados), por lo que el efecto del etanol vendría determinado por una mayor sensibilidad a este metabolito en fase estacionaria, tal y como se ha mostrado en la Figura 2.3 B.

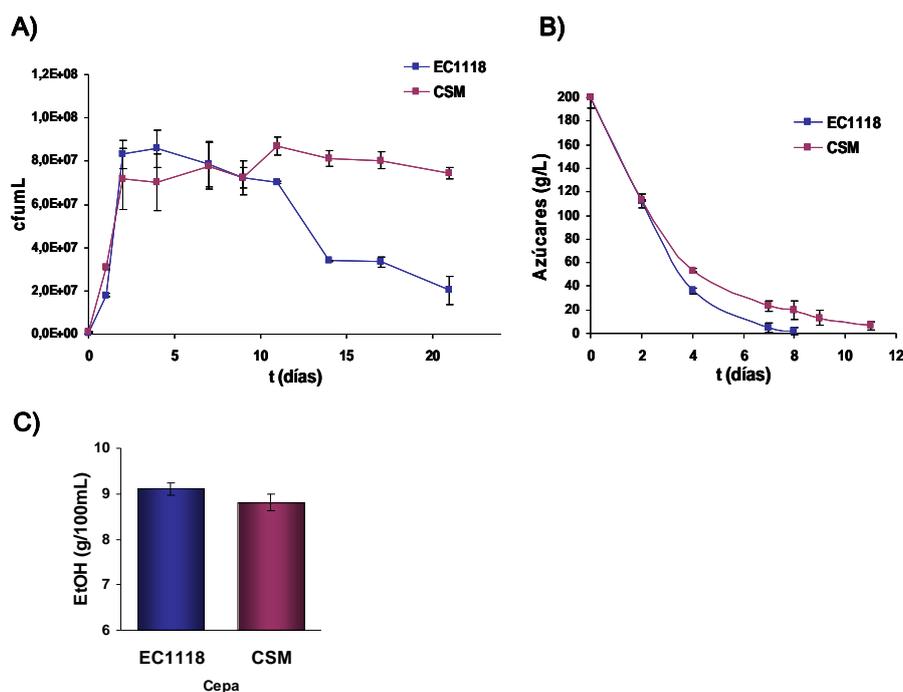


Figura 2.6. Curvas de crecimiento y muerte celular (A) en vinificaciones en mosto sintético. Se determinó el número de células viables (cfu/mL) por recuento en placa a distintos tiempos de vinificación. (B) Determinación de azúcares reductores y cuantificación de etanol (C) de las cepas EC1118 y CSM durante el proceso de vinificación en mosto sintético. Los experimentos se realizaron como mínimo por triplicado y las barras de error muestran la desviación típica (DT).

El método utilizado para realizar las curvas de crecimiento mediante el recuento en placa, permite conocer el número de células capaces de entrar en estado replicativo, pero no distingue entre células viables incapaces de replicarse y células muertas que han perdido la integridad celular. Para estudiar si se existe una relación entre la medida de la viabilidad basada en división celular y la viabilidad dependiente del daño celular entre las cepas EC1118 y CSM durante el proceso de vinificación, se realizaron experimentos de tinción con yoduro de propidio, según se describe en el Apartado 7 de Materiales y Métodos (Deere *et al.*, 1998), que permiten diferenciar las

células dañadas de las íntegras mediante visualización al microscopio de fluorescencia. Para ello se tomaron muestras a distintos tiempos tras haberse consumido los azúcares (tiempo 0) en vinificaciones con las cepas EC1118 y CSM. Las vinificaciones se realizaron en mosto sintético para evitar posibles interferencias de fluorescencia con determinados componentes presentes en el mosto tinto.

Como puede observarse en la Figura 2.7, la cepa EC1118 muestra mayor porcentaje de células dañadas que la cepa CSM en los tiempos analizados, por lo que la viabilidad determinada por el recuento en placa se correlaciona con la integridad celular. Como muestran nuestros resultados, durante el envejecimiento también existe una lisis celular que afecta en mayor medida a la cepa poco longeva EC1118. Esta cepa se emplea, además de en primera fermentación, en la fabricación de cava, y se ha descrito que posee una elevada tasa de autólisis en condiciones de segunda fermentación típica de este tipo de vinos (Martínez-Rodríguez *et al.*, 2001).

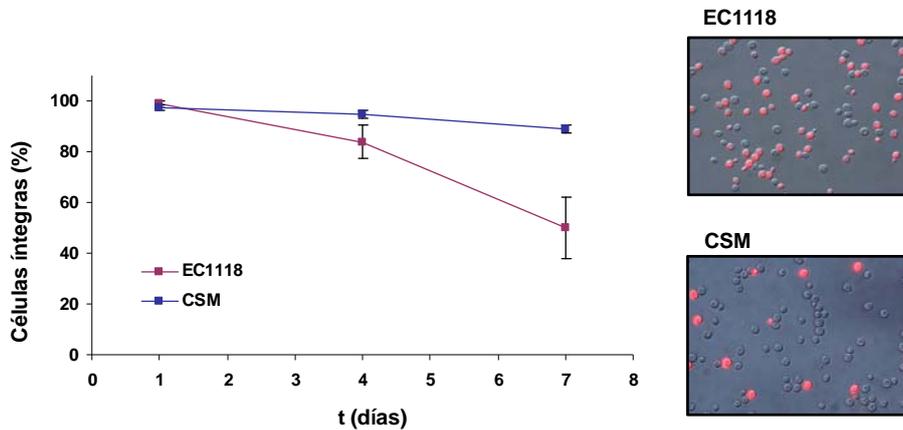


Figura 2.7. Determinación del porcentaje de células teñidas (dañadas) con respecto a las células no teñidas (íntegras) de las cepas EC1118 y CSM a distintos tiempos de la vinificación en mosto sintético, una vez se ha consumido los azúcares reductores (tiempo 0). Los experimentos se realizaron como mínimo por triplicado y las barras de error muestran la desviación típica (DT). En la parte de la derecha se muestra, como ejemplo, dos imágenes tomadas con el microscopio de fluorescencia de las cepas EC1118 y CSM.

Nuestros resultados indican que también existe una cantidad apreciable de autólisis al final de la fermentación del mosto. Se ha descrito que en el envejecimiento cronológico en condiciones de laboratorio actúan mecanismos de apoptosis (Fabrizio y Longo, 2008). Al final de este apartado se analizará el impacto de este proceso en vinificación.

2.2.2- Medida del estrés oxidativo y del daño celular

El estrés oxidativo parece ser clave en la longevidad celular y, tal y como se mostró en la Figura 2.3 B, la cepa menos longeva EC1118 mostró mayor sensibilidad a estrés oxidativo en fase estacionaria en condiciones de laboratorio. Para determinar el daño oxidativo presente en las cepas EC1118 y CSM, y si existe diferencias entre ellas, se realizaron determinaciones del nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS) al principio de la fase de muerte celular que tiene lugar al final de la vinificación en mosto sintético (a los 13 días). Para ello las células se incubaron con 123-dihidrorodamina (DHR), compuesto que al interaccionar con las ROS se oxida a rodamina emitiendo fluorescencia, y se visualizaron en el microscopio de fluorescencia. En la Figura 2.8 A puede observarse un aumento significativo del nivel de ROS en la cepa EC1118.

Como ya se ha comentado anteriormente, uno de los daños celulares más comunes durante el estrés oxidativo es consecuencia del ataque de las ROS a los ácidos grasos de membrana, provocando la oxidación de los lípidos y la desesterificación de los fosfolípidos, lo que genera un aumento en el nivel de peroxidación lipídica. Para determinar el grado de peroxidación lipídica en nuestras cepas modelo de longevidad, se analizó mediante espectrofotometría los niveles de MDA presentes a los diez días de finalizar la fermentación. Como puede observarse en la Figura 2.8 B, de nuevo la cepa EC1118 presenta una acumulación mayor de daño celular por peroxidación de lípidos, provocado por la acumulación de ROS.

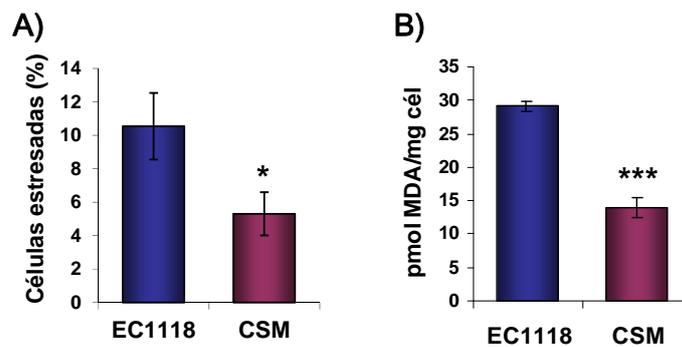


Figura 2.8. Determinación de los niveles de ROS y del daño oxidativo en las cepas EC1118 y CSM al final de la vinificación en mosto sintético. (A) Producción de ROS mediante la sonda 123 dihidroxirodamina. (B) Nivel de peroxidación de lípidos, expresado como pmol de malondialdehído (MDA) por mg de células. Se indica con asteriscos la diferencia estadísticamente significativa entre la cepa EC1118 y CSM (* $p < 0.05$, *** $p < 0.005$).

Estos resultados parecen indicar que la cepa EC1118 está peor adaptada que la cepa CSM a la eliminación de las ROS durante la vinificación, por ello su grado de daño celular podría estar aumentado. Además, esta cepa es más sensible al estrés oxidativo (Figura 2.3 B) contribuyendo todo ello a la pérdida de viabilidad celular.

2.2.3- Estudio de la autofagia durante la vinificación

En diversos estudios se ha demostrado que el proceso de autofagia es necesario para alargar la longevidad cronológica, y se ha descrito que este mecanismo ocurre en levaduras vínicas durante la segunda fermentación que tiene lugar en la producción de cava (Cebollero y González, 2006). La aldehído deshidrogenasa citosólica (Ald6p), ha sido identificada como un marcador selectivo del proceso de autofagia en respuesta al ayuno de nitrógeno, y se ha descrito que en estas condiciones de restricción dietaria, Ald6p se degrada exclusivamente por macroautofagia, no estando implicados

otros procesos de degradación proteica como la vía del proteasoma (Onodera *et al.*, 2004).

Para determinar si existe una relación entre la distinta longevidad encontrada en nuestras cepas modelo EC1118 y CSM y el proceso de autofagia, se determinó el nivel de Ald6p durante el proceso de vinificación en mosto sintético. Para ello se realizaron vinificaciones con ambas cepas, se tomaron muestras celulares a distintos tiempos y se analizó el nivel de Ald6p mediante *Western blot*, tal y como se describe en Materiales y Métodos (Apartado 4.3), utilizando un anticuerpo anti-ALDH, que reconoce tanto a Ald6p como a Ald4p, la isoenzima mitocondrial.

Como se puede observar en la Figura 2.9, los niveles de Ald4p permanecen relativamente constantes durante todo el proceso de vinificación y muestra un patrón de expresión muy similar entre las dos cepas. Sin embargo, Ald6p desaparece rápidamente en la cepa EC1118, siendo indetectable en el día 5, al contrario de lo que ocurre en la cepa CSM, en la que el nivel de Ald6p se mantiene a lo largo de la vinificación, siendo detectables a día 18. Esto significa que la cepa menos longeva EC1118 presenta una mayor activación de la ruta de autofagia que la cepa longeva CSM.

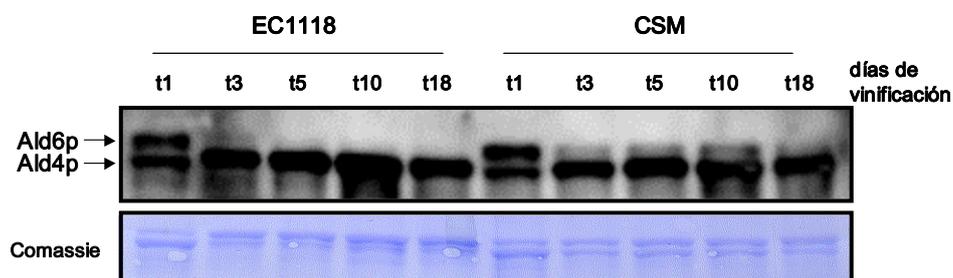


Figura 2.9. Determinación de los niveles de Ald4p y Ald6p en las cepas EC1118 y CSM durante el proceso de vinificación en mosto sintético mediante *Western blot* y posterior detección con el anticuerpo anti-ALDH. En la parte inferior se muestra la tinción de la membrana con azul Coomassie como control de carga de proteínas.

De acuerdo con el fabricante, la cepa EC1118 es una cepa con bajo requerimiento de nitrógeno, mientras que la cepa CSM posee alto requerimiento (www.lallemandwine.us/products/yeast_chart.php). Esto podría indicar que la cepa EC1118 posee una tasa de recambio proteico elevada, pero a expensas de una baja longevidad, ya que durante la vinificación estaría supliendo las necesidades de nitrógeno a costa de estructuras celulares necesarias para la supervivencia a largo plazo. Como hemos visto anteriormente, la cepa EC1118 también es capaz de responder a los niveles de nitrógeno presentes en el medio de cultivo (Figura 1.9), aumentando su LC a medida que disminuye la concentración de este compuesto, e indicando que no presenta un defecto en la detección de la cantidad de nitrógeno del medio, ni en el efecto de ella sobre la longevidad. Se ha descrito en diversos modelos experimentales que para aumentar la longevidad celular se requiere una activación de la autofagia (Levine *et al.*, 2005), sin embargo, en condiciones de vinificación este mecanismo podría estar eliminando algunos elementos requeridos para mantener la viabilidad en el tiempo. También se ha descrito en este estudio que la autofagia está relacionada de manera positiva con la apoptosis, por lo que es posible que el bajo nivel de autofagia observado en la cepa CSM, pudiera estar también ocasionando una baja tasa de un mecanismo de carácter apoptótico iniciado al final de la vinificación, aumentando su longevidad. En las condiciones de segunda fermentación que tiene lugar en la producción de cava, se ha determinado que la autofagia precede a la muerte y lisis celular (Cebollero *et al.*, 2008), y que la inducción constitutiva de la autofagia causada por el mutante *csc1-1* induce estos procesos de muerte (Cebollero *et al.*, 2005). Nuestros datos indican que este mecanismo también opera de manera similar al final de la fermentación alcohólica del mosto de uva, causando también lisis celular una vez agotados los azúcares (Fig. 2.7).

Debido a que Ald6p es la principal aldehído deshidrogenasa citosólica, y la responsable principal de la producción de ácido acético durante la fermentación vínica (Remize *et al.*, 2000), se midió la concentración de este metabolito al final de la vinificación para determinar si

existen diferencias entre las cepas EC1118 y CSM que pudieran corresponderse con la diferencia en los niveles de Aldp6 encontrados. Para ello, se llevaron a cabo microvinificaciones con ambas cepas en mosto sintético y en mosto bobal, y como puede comprobarse en la Figura 2.10, tanto en mosto sintético (MS) como en bobal (MB), la cepa CSM produce significativamente mayor cantidad de acetato, por lo que el nivel de este metabolito estaría regulado por la degradación de Ald6p por autofagia (Figura 2.9).

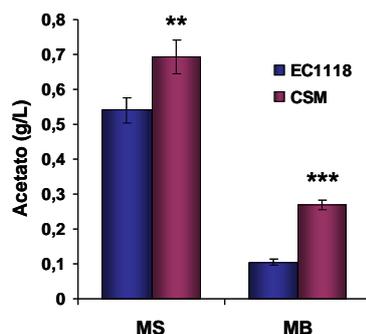


Figura 2.10. Determinación del nivel de acetato en las cepas EC1118 y CSM al final de la vinificación en mosto sintético (MS) y en mosto bobal (MB). Se indican con asteriscos las diferencias estadísticamente significativas entre las cepas EC1118 y CSM (** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$).

Se ha descrito que la disminución del pH del medio causada por la acumulación de ácido acético disminuye la longevidad (Burtner *et al.*, 2009). Pero en nuestras condiciones, la cepa CSM es más longeva aún produciendo mayor cantidad de acetato, y esto podría ser debido a que el mosto contiene una elevada concentración de ácidos que además de conferirle un pH bajo (3,2 en el mosto bobal utilizado en este trabajo), le dota de una gran capacidad tamponadora. Por ello, y como puede comprobarse más adelante en este trabajo, (Figura 3.8), el pH del medio se mantiene entre 3.2 y 3 durante todo el proceso de vinificación, indicando que el acetato no tiene un papel clave en el control del LC en condiciones de vinificación.

2.3- Análisis transcriptómico de las cepas vínicas industriales EC1118 y CSM

Con el fin de identificar determinantes moleculares de carácter transcripcional que regulan la longevidad natural de las células durante el proceso de fermentación vínica, se ha realizado un estudio transcriptómico con nuestras cepas modelo de longevidad, EC1118 y CSM. Para ello se ha escogido el tiempo 6 días de vinificación en mosto sintético, donde las células se encuentran al principio de la fase estacionaria, y donde podrían estar expresándose de manera diferencial entre ambas cepas genes relacionados con el proceso de envejecimiento.

A partir de los resultados obtenidos, y utilizando los programas de análisis de datos GenePix Pro 6.0, se escogieron aquellos genes que presentaron una significancia estadística (p -valor <0.05) entre las diferentes réplicas analizadas y una variación de la expresión superior o inferior a 2 veces entre las cepas. De esta forma se han encontrado 35 genes con mayor tasa de expresión en la cepa CSM y 87 genes con mayor tasa de expresión en la cepa EC1118. Estos genes fueron analizados mediante la herramienta *Funcassociate 2.0*, para la identificación de posibles grupos funcionales.

Entre los genes sobreexpresados en CSM aparecen 3 categorías funcionales diferentes (Tabla 2.1 A), relacionados con la biosíntesis de tiamina (genes *THI*), genes relacionados con la aril alcohol deshidrogenasa (genes *AAD*) y genes relacionados con la actividad oxidorreductasa. Tanto los genes *THI* como los *AAD* son familias con una alta homología y de localización subtelomérica (Delneri *et al.*, 1999). La tiamina es un cofactor común de diversos enzimas relacionados con el metabolismo del carbono, como la piruvato deshidrogenasa y la piruvato descarboxilasa, y su mayor abundancia en esta cepa podría dotarla de alguna ventaja selectiva en estados tardíos de la fermentación, teniendo un efecto positivo en cuanto a longevidad. La adición de tiamina estimula la velocidad de la fermentación vínica (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). La sobreexpresión de genes que

codifican para proteínas con actividad oxidorreductasa, como los genes relacionados con la biosíntesis de ergosterol (*ERG5* y *ERG11*), podría también proporcionar una mayor tolerancia a estrés oxidativo y por etanol a esta cepa (Landolfo *et al.*, 2010). Además, en esta tabla también se han incluido otros genes que aparecen muy inducidos en la cepa CSM, y cuya expresión podría afectar a la longevidad celular, como los genes homólogos *RDL1* y *RDL2* (*Rhodanase like proteins*), que codifican para dos proteínas mitocondriales homólogas a las proteínas rodanasas y cuya función se ha relacionado con la protección antioxidante, y sobre las que hablaremos más adelante.

La mayoría de genes sobreexpresados en la cepa EC1118 corresponden a categorías funcionales relacionadas con el metabolismo (Tabla 2.1 B), como la glicólisis o el metabolismo de aminoácidos (sobre todo aminoácidos de azufre). Esta inducción de genes del metabolismo podría ser la causa de la elevada velocidad de crecimiento y consumo de azúcares de esta cepa, comparada con la cepa CSM. Otros genes que se encuentran sobreexpresados también podrían contribuir a este elevado metabolismo de crecimiento, como el gen *PMA1*, que codifica para la bomba de protones de la membrana plasmática, y que junto a las proteínas quinasa que codifican *HRK1* y *PTK2*, también más expresados en EC1118, estimulan su actividad (Goossens *et al.*, 2000). La mayor actividad de esta bomba, mediante el consumo del ATP producido por una glicólisis sobreactivada, podría causar un elevado potencial de membrana que facilitarían el transporte, promoviendo por ello el crecimiento celular. Otro gen interesante relacionado con el metabolismo que aparece sobreexpresado en esta cepa es *CYR1*, que codifica para la adenilato ciclasa. Se ha descrito que este enzima activa a la proteína quinasa A (PKA), estimulando el crecimiento celular y reduciendo la longevidad (Fabrizio *et al.*, 2001).

Tabla 2.1. Distribución en categorías funcionales de los genes sobreexpresados más de 2 veces en la cepa CSM (A) y en la cepa EC1118 (B) a t6 días de vinificación en mosto sintético. Los experimentos fueron realizados por triplicado, utilizando 3 réplicas biológicas.

A)

Categoría	Genes sobreexpresados en la cepa CSM
Biosíntesis de tiamina (p = 1.04e-6)	<i>THI12</i> (10.88), <i>THI11</i> (8.44), <i>THI13</i> (6.71), <i>THI15</i> (2.65)
Anil alcohol deshidrogenasa (p = 5.19e-3)	<i>AAD15</i> (3.42), <i>AAD10</i> (2.86), <i>AAD6</i> (2.30), <i>AAD14</i> (2.24), <i>AAD4</i> (2.05), <i>AAD3</i> (2.04)
Actividad oxidorreductasa (p = 4.82e-10)	<i>ERG11</i> (2.70), <i>ERG5</i> (2.66), <i>FRE7</i> (2.28), <i>MET12</i> (2.22), <i>GTT1</i> (2.15), <i>COX8</i> (2.15)
Otros	<i>HPA2</i> (4.16), <i>RDL1</i> (3.92), <i>SPG4</i> (3.55), <i>RIM4</i> (2.97), <i>YOR348c</i> (2.94), <i>RDL2</i> (2.82)

B)

Categoría	Genes sobreexpresados en la cepa EC1118
Metabolismo de glucosa (p = 4.1e-12)	<i>ENO2</i> (4.55), <i>TDH3</i> (3.65), <i>PFK1</i> (3.38), <i>ENO1</i> (2.98), <i>TDH2</i> (2.91), <i>PGK1</i> (2.74), <i>TPI1</i> (2.54)
Metabolismo de aminoácidos (p = 8.1e-14)	<i>ADH3</i> (4.50), <i>ARG4</i> (4.09), <i>ADH5</i> (4.06), <i>MET16</i> (3.86), <i>MET17</i> (3.71), <i>SER33</i> (3.37), <i>CYS3</i> (3.35), <i>CPA1</i> (3.31), <i>BAT1</i> (3.04), <i>MET22</i> (2.92), <i>ARO3</i> (2.59), <i>MET14</i> (2.55)
Otros	<i>YIL060w</i> (3.74), <i>YCT1</i> (3.43), <i>SPT4</i> (3.00), <i>PMA1</i> (2.88), <i>YCR023c</i> (2.79), <i>POL2</i> (2.63), <i>HXT3</i> (2.62), <i>JLP1</i> (2.60), <i>ROG3</i> (2.56), <i>PDR12</i> (2.54), <i>CYR1</i> (2.49), <i>HRK1</i> (2.37), <i>PTK2</i> (1.65)

Como puede comprobarse mediante el análisis transcriptómico comparado de las dos cepas modelo de longevidad, las diferencias observadas en la tolerancia a estrés no se basan en grandes cambios en la regulación de la transcripción génica, ya que en este estudio no aparecen grupos de genes relacionados con la respuesta a estrés oxidativo que estén significativamente inducidos o reprimidos (Tabla 2.1), por lo que las

diferencias de tolerancia a estrés observadas podrían deberse a mecanismos de regulación de carácter postranscripcional.

2.3.1- Estudio de la longitud de los telómeros durante la vinificación

Como se ha mencionado anteriormente, diversos genes de la familia *THI* y *AAD* aparecen inducidos en la cepa CSM. Estos genes tienen una localización subtelomérica, y esta localización particular podría ser la causa de su inducción conjunta, ya que podrían estar actuando mecanismos implicados en la regulación de la estructura de la cromatina que afectarían a la integridad de los telómeros, y por ello provocando cambios en la transcripción de genes próximos, reprimidos por la estructura heterocromatínica asociada a las regiones próximas a los telómeros. Para profundizar en este aspecto, se realizó un experimento para comprobar si existen diferencias en la longitud de los telómeros durante el proceso de vinificación entre nuestras cepas modelo. Distintas longitudes teloméricas podrían afectar la extensión de la heterocromatina asociada a telómeros. Para ello, se realizaron microvinificaciones en mosto bobal, se tomaron muestras celulares a distintos tiempos y posteriormente se digirió el DNA total de las muestras con el enzima de restricción *XhoI*, que corta en la proximidad de los telómeros con secuencias consenso Y' (Ashafi *et al.*, 1999). Posteriormente se realizó un experimento de *Southern blot*, tal y como se describe en Materiales y Métodos (Apartado 3), y se realizó una hibridación con una sonda complementaria de la región telomérica Y', que identifica una banda con un tamaño de unos 1300 pb.

Como puede observarse en la Figura 2.11, la longitud de los telómeros varía dependiendo de la cepa, siendo más largos en la cepa EC1118 (de unas 200 pb aproximadamente). A tiempos largos resultó imposible extraer DNA genómico en buenas condiciones para identificar los telómeros, pero no se observó un cambio de tamaño a lo largo de los puntos analizados. Se ha descrito que en cepas de laboratorio tampoco hay modificación de la longitud de los telómeros al envejecer las células durante

la LC (Ashafi *et al.*, 1999). En nuestras condiciones no hay ninguna relación entre el acortamiento de los telómeros y un envejecimiento acelerado. Respecto a la inducción de ciertos genes subtelméricos en la cepa CSM, eso podría significar que estructuralmente esta zona está menos protegida al ser más corta en dicha cepa, y por ello más accesible transcripcionalmente.

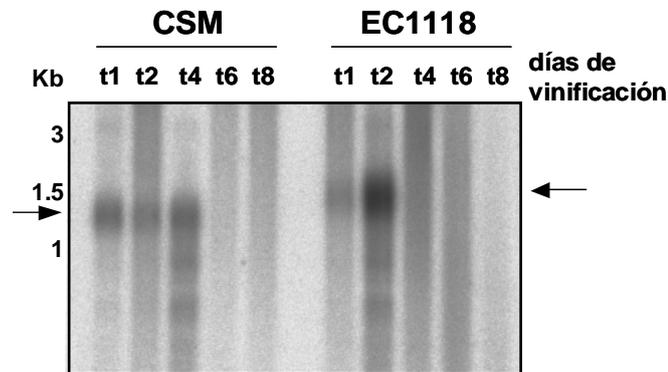


Figura 2.11. Determinación de la longitud telomérica mediante *Southern blot* de las cepa CSM y EC1118 durante la vinificación en mosto bobal. Se muestra con flechas la zona del gel donde migra la región telomérica Y.

2.4- Estudio de la función de los genes *RDL1* y *RDL2*

Como se ha mencionado anteriormente, en la cepa CSM están sobreexpresados los genes homólogos *RDL1* (3.92 veces) y *RDL2* (2.82 veces), cuya secuencia está contigua en el genoma y que codifican para dos proteínas mitocondriales homólogas relacionadas potencialmente con la protección antioxidante. Estas proteínas, junto a Uba4p, poseen actividad enzimática del tipo rodanasa, y catalizan la transferencia del grupo sulfuro del tiosulfato a la cianida (Foster *et al.*, 2009). Se ha descrito que los enzimas del tipo rodanasas tienen un papel importante en la defensa oxidativa en bacterias (Cereda *et al.*, 2009) y mamíferos (Nandi *et al.*, 2000), y que en

humanos su presencia aumenta conforme las células del epitelio de colon envejecen (Yi *et al.*, 2010).

Para estudiar el papel que tienen estas proteínas en la respuesta a estrés oxidativo en cepas vínicas, se construyeron los mutantes simples de delección de los genes *RDL1*, *RDL2* y el doble mutante en la cepa vínica haploide C9, y se realizaron experimentos de resistencia a estrés oxidativo ocasionado por la adición de H₂O₂ 5 mM durante 1 hora a un cultivo en medio rico YPD en fase estacionaria. Como puede observarse en la Figura 2.12, los tres mutantes presentan un aumento en la sensibilidad al estrés oxidativo, siendo el mutante *rdl2Δ* el más sensible. El doble mutante presenta una sensibilidad similar a la de los simples, por lo que ambas proteínas podrían estar actuando en la misma ruta de protección antioxidante.

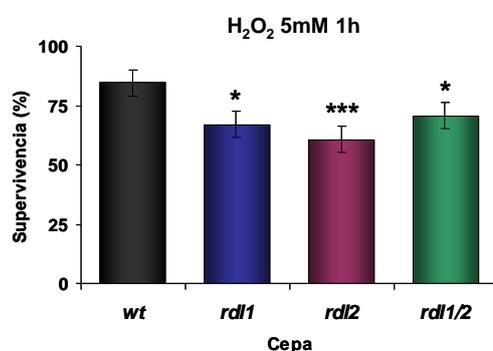


Figura 2.12. Determinación de la resistencia a estrés oxidativo ocasionado por la adición de H₂O₂ a un cultivo en fase estacionaria en medio YPD de los mutantes *rdl1Δ*, *rdl2Δ* y *rdl1Δrdl2Δ* en la cepa C9. Se indican con asteriscos las diferencias estadísticamente significativa entre el wt y los mutantes (* p<0.05, *** p<0.005).

Dado que la expresión de estas proteínas mitocondriales (Rdl1p y Rdl2p) estaba aumentada en la cepa longeva CSM, y los mutantes presentaron una mayor sensibilidad a estrés oxidativo, se continuó con el estudio del comportamiento en vinificación de estos mutantes para estudiar si

el papel de las rodanasas en el estrés oxidativo tiene algún efecto en la longevidad celular durante el proceso de vinificación. Para ello se escogió el mutante *rdl2Δ*, que presentaba mayor sensibilidad a estrés oxidativo, y se realizaron microvinificaciones en mosto sintético. Se utilizó este medio debido a que también se estudió en estas vinificaciones la presencia de ROS mediante la incubación con DHR y la posterior visualización con el microscopio de fluorescencia. De esta manera se analizó el daño oxidativo presente en el mutante *rdl2Δ* y en la cepa silvestre durante la fase de fermentación vínica. Se decidió no estudiar los niveles de ROS a tiempos más largos debido a que la muerte celular observada a partir de esta fase podría interferir en los resultados.

En la Figura 2.13 (A) puede comprobarse que el mutante *rdl2Δ* crece bien, incluso mejor que la cepa silvestre, y empieza a consumir eficientemente los azúcares (Figura 2.13 B), pero sufre una caída en la viabilidad cuando se encuentra en un estado avanzado de la fermentación (a 5 días de vinificación), coincidiendo con una bajada en la velocidad de

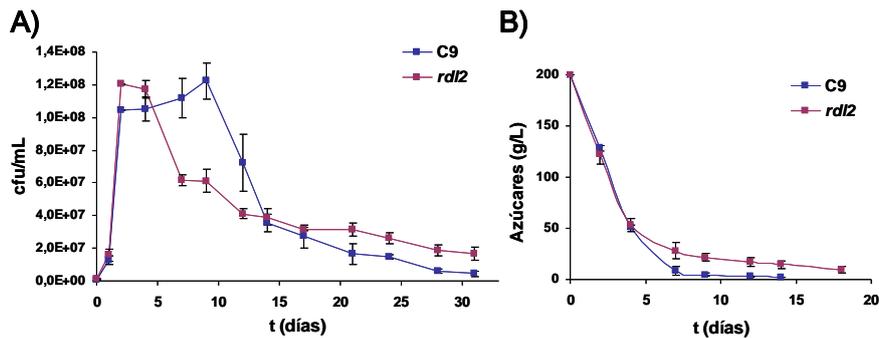


Figura 2.13. Curvas de crecimiento y muerte celular (A) y determinación de azúcares reductores (B) en el mutante *rdl2Δ* y en el wt de la cepa C9 durante el proceso de vinificación en mosto sintético. Se determinó el número de células viables (cfu/mL) por recuento en placa a distintos tiempos de vinificación. Los experimentos se realizaron como mínimo por triplicado y las barras de error muestran la desviación típica (DT).

consumo de azúcares. Sin embargo, aunque de forma más tardía, es capaz de terminar con éxito la vinificación y muestra una longevidad mayor.

En la Figura 2.14 se muestra cómo los niveles de ROS van aumentando conforme avanza el proceso de fermentación, y puede observarse que este aumento es significativamente mayor en el mutante *rdl2* Δ .

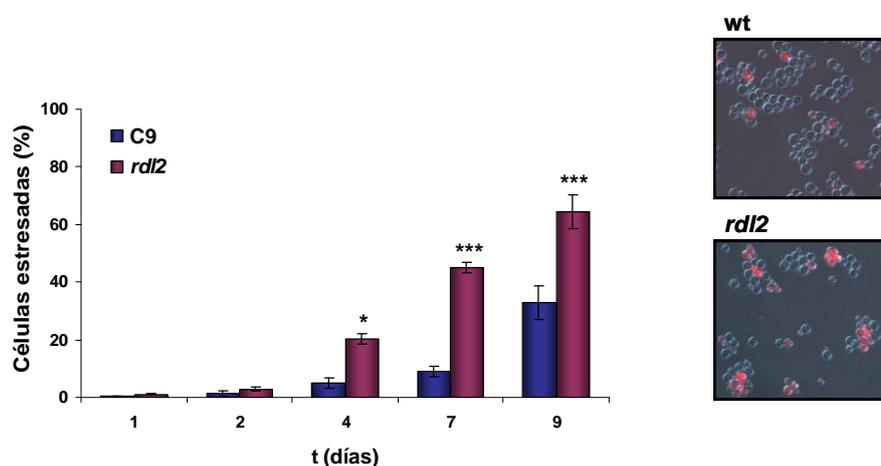


Figura 2.14. Determinación de los niveles de ROS del wt y del mutante *rdl2* Δ en la cepa C9 durante la fermentación vinica en mosto sintético. Se indica con asteriscos la diferencia estadísticamente significativa entre el wt y el mutante (* $p < 0.05$, *** $p < 0.005$). En la parte derecha de la figura se muestra, como ejemplo, dos imágenes tomadas con el microscopio de fluorescencia de la cepa silvestre y del mutante *rdl2* Δ .

No hay evidencias de que el papel de las rodanasas en la detoxificación de la cianida pueda ser relevante durante la vinificación, pero estas proteínas podrían estar relacionadas con otros procesos que intervienen en la detoxificación del daño oxidativo durante este proceso. Existen diversos estudios que demuestran este aspecto, por ejemplo, la rodanasa RhdA del género *Acetobacter* es necesaria en la respuesta a estrés oxidativo, y se le ha relacionado con la reparación de los clusters Fe-S de

ciertas proteínas, ya que el mutante de esta proteína es incapaz de reparar estos agregados y se produce una liberación del hierro, produciéndose un incremento de los ROS vía reacciones de Fenton. Además, una isoforma de la rodanasa mitocondrial bovina es capaz de oxidar a las tiorredoxinas, actuando como mecanismo de detoxificación de los ROS intramitocondriales (Nandi *et al.*, 2000). Las tiorredoxinas son proteínas oxidorreductasas altamente conservadas y necesarias para mantener la homeostasis redox de la célula (Trotter y Grant, 2005). De acuerdo con los análisis globales de localización subcelular, Rdl1p y Rdl2p son proteínas mitocondriales (Sickmann *et al.*, 2003). Rdl1p se ha localizado en la membrana mitocondrial externa (Zahedi *et al.*, 2006), pero también en el retículo endoplásmico (Hu *et al.*, 2003). Así pues, Rdl2p podría actuar en conjunción con la tiorredoxina mitocondrial Trx3p, mientras que Rdl1p potencialmente podría interaccionar también con las isoenzimas citosólicas Trx1p y Trx2p (Trotter y Grant, 2005). Sería necesario determinar la localización exacta y la posible interacción de estos distintos factores para determinar sus funciones exactas.

El mutante *rdl2Δ* presenta un adelanto en la fase de muerte celular que coincide con una mayor acumulación de ROS, sin embargo, su longevidad se ve aumentada al final de la vinificación. Esto parece sugerir que el efecto de la función de Rdl2p podría ser distinto dependiendo del estado fisiológico de la célula. Hay un cambio fisiológico una vez se alcanza la densidad celular máxima, donde Rdl2p tendría un papel positivo en la contención del daño oxidativo, y otro cambio fisiológico al final de la fase estacionaria, donde Rdl2p estaría actuando de manera negativa en el proceso de muerte celular y por ello en la longevidad. El papel positivo de esta proteína al final de la fermentación sugiere una función mitocondrial en la detoxificación de los ROS durante el metabolismo fermentativo. El aumento de ROS en el mutante podría desencadenar una mayor inducción de los mecanismos de respuesta anti-estrés que podrían, a la larga, favorecer la viabilidad de aquellas células que superan el estrés inicial, justificando la mayor longevidad a largo plazo del mutante *rdl2Δ*.

Como se ha mencionado anteriormente, en la cepa longeva CSM no se produce una gran variación en la expresión de genes relacionados con la respuesta a estrés oxidativo, aunque sí que presenta una inducción de dos genes mitocondriales, *RDL1* y *RDL2*, los cuales tienen un papel importante en la respuesta a estrés oxidativo, ya que los mutantes de delección de estos genes, particularmente *rdl2* Δ , son más sensibles a estrés oxidativo (Figura 2.12), y además acumula mayores niveles de ROS durante la fermentación vínica (Figura 2.14), debido a un defecto en el metabolismo de detoxificación de radicales libres o a un incremento en su producción. Este aumento en el nivel de ROS podría conllevar a la gran caída en la viabilidad observada a los 5 días de vinificación, la cual coincide con una bajada en la velocidad de consumo de azúcares (Figura 2.13 B).

2.5- Estudio de la estructura y de la función del gen *CYR1* en levaduras industriales

Como se ha descrito en el Apartado 2.3, el gen *CYR1*, que codifica para la adenilato ciclasa, se encuentra sobreexpresado en la cepa EC1118 (2.49 veces). Se ha descrito que el cAMP activa a la proteína quinasa A (PKA), estimulando el crecimiento celular y reduciendo la longevidad (Fabrizio *et al.*, 2001). Por ello, y debido a la importancia de la adenilato ciclasa en el metabolismo, se ha continuado el estudio de este gen, y su efecto en la longevidad en las levaduras vínicas.

Gracias a que el genoma de la cepa industrial EC1118 está actualmente secuenciado, se ha podido estudiar la estructura de este gen y se ha comprobado que en su promotor existe una secuencia de 336 pares de bases (pb) localizada 117 pb delante de la secuencia de inicio de la transcripción (Nagalakshmi *et al.*, 2008), que corresponde a una secuencia LTR (*L*ong *T*erminal *R*epeat). Esta secuencia, llamada secuencia δ , indica la existencia de un evento de transposición llevada a cabo por un transposón

Ty2. En la Figura 2.15 se describe con mayor detalle la estructura del promotor del gen *CYR1* de la cepa EC1118.

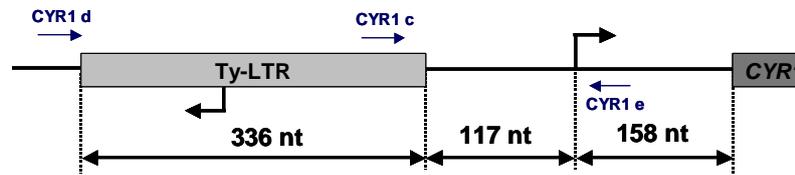


Figura 2.15. Esquema de la secuencia δ presente en el promotor del gen *CYR1* en determinadas cepas vínicas industriales. Se indica con flechas horizontales la posición de los oligonucleótidos utilizados para comprobar la existencia de la secuencia y las flechas verticales apuntan hacia la dirección de transcripción.

Debido a que esta secuencia no está en la cepa de laboratorio S288c, modelo del proyecto de secuenciación inicial del genoma de levadura, se procedió a analizar si esta secuencia estaba presente en las demás cepas vínicas industriales estudiadas en este trabajo. Para ello se amplificó mediante PCR la región de dicha secuencia (utilizando los oligonucleótidos *CYR1c*, *CYR1d* y *CYR1c*, marcados con flechas en la Figura 2.15) y se comprobó que las cepas UCLM 5235, ICV46 y C Jerez poseen también esta secuencia canónica en el promotor del gen *CYR1*. La cepa UCLM 5235 presentaba una LC muy corta (Figura 2.1), el siguiente tras EC1118, por lo que este elemento podría ser común entre cepas con una longevidad extremadamente corta, aunque como se ha visto, también puede aparecer en otras cepas de longevidad intermedia, como ICV46 y C Jerez.

El promotor que contiene la secuencia δ está apuntando en dirección opuesta a la del promotor de *CYR1* (Figura 2.15), por lo que el alto nivel de expresión encontrado en este gen se debería a procesos estructurales de la cromatina, o por la eliminación o el distanciamiento de algún elemento represor de la transcripción. Para profundizar en el efecto de la secuencia δ en la expresión de *CYR1* y su posible efecto en la longevidad celular a

través de la regulación del metabolismo de crecimiento, se llevó a cabo la eliminación de dicha secuencia en la cepa EC1118 y se estudió su comportamiento durante la fermentación vínica. La disrupción de la secuencia se llevó a cabo en las dos copias del gen *CYR1* mediante la utilización del cassette reciclable *kanMX*, por lo que al final quedaron reemplazadas las secuencias δ por la secuencia mucho más corta, (de 71 pb) correspondiente al elemento *loxP*. Posteriormente se comprobó la expresión del gen *CYR1* durante la vinificación en mosto sintético en la cepa mutante para la secuencia canónica ($\delta\Delta$) y en la cepa silvestre, mediante el análisis del nivel de RNA por *Northern blot*. Además, se comprobó la expresión de este gen en la cepa CSM, como control de expresión disminuida que se había observado en el estudio global (Apartado 2.3). En la Figura 2.16 se observa la expresión de *CYR1* que tiene lugar a los 6 días de la vinificación en mosto sintético (mismo tiempo utilizado en el estudio global del Apartado 2.3).

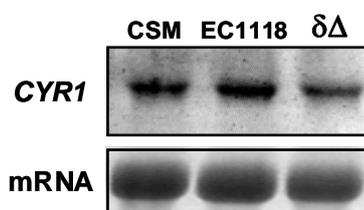


Figura 2.16. Expresión de *CYR1* en la cepas CSM, EC1118 y en el mutante de la secuencia δ reemplazada con el elemento *loxP* ($\delta\Delta$) a t 6 días de vinificación en mosto sintético (A) y en las muestras de mRNA procedentes del experimento de análisis global mediante chips (B).

En la cepa EC1118 con la secuencia δ eliminada ($\delta\Delta$), el nivel de expresión del gen de la adenilato ciclasa disminuye con respecto a la cepa parental, por lo que el reemplazamiento de dicho elemento con la secuencia corta del *loxP* podría estar restaurando, al menos parcialmente, la estructura cromatínica del promotor de *CYR1*, y por ello disminuyendo su expresión. En esta figura también se comprueba que la cepa CSM tiene una expresión menor del gen

CYR1, (Figura 2.16) tal y como se había comprobado en el estudio global realizado en el Apartado 2.3.

Una vez comprobada la expresión del gen *CYR1* en el mutante $\delta\Delta$ se procedió a realizar microvinificaciones en mosto bobal para estudiar su comportamiento. En la Figura 2.17 A puede observarse que el mutante $\delta\Delta$ crece de forma parecida la cepa silvestre, aunque a un ritmo menor que ésta, y que extiende su fase estacionaria, lo cual se traduce en un aumento de su longevidad (Figura 2.17 B).

En cuanto al consumo de azúcares (Figura 2.17 C), aunque ambas cepas lo completan, el mutante presenta una velocidad ligeramente inferior a la del tipo silvestre, indicando que podría tener una menor actividad metabólica.

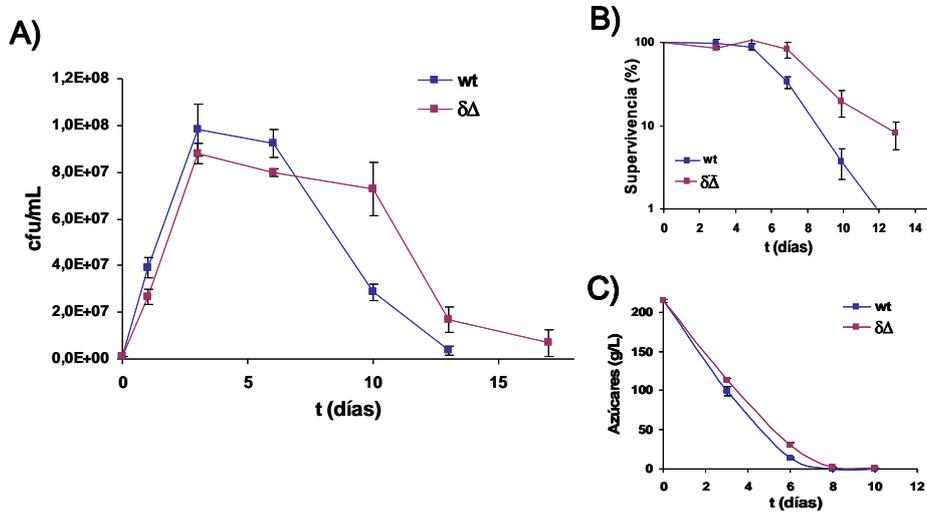


Figura 2.17. Curvas de crecimiento y muerte celular (A) y determinación de azúcares reductores (B) en el mutante $\delta\Delta$ y en el wt de la cepa EC1118 durante el proceso de vinificación en mosto bobal. Se determinó el número de células viables (cfu/mL) por recuento en placa a distintos tiempos de vinificación. Los experimentos se realizaron como mínimo por triplicado y las barras de error muestran la desviación típica (DT).

Por tanto, mediante la eliminación de la secuencia δ del promotor de *CYR1* de la cepa poco longeva EC1118, se ha conseguido disminuir la expresión de dicho gen. Como se ha mencionado anteriormente, la adenilato ciclasa estimula el crecimiento vía activación de la PKA, produciendo una disminución en la LC. Esto explicaría la menor velocidad metabólica y de crecimiento del mutante $\delta\Delta$, junto con el ligero aumento en su longevidad. Esto apoya la idea de que además del papel de los radicales libres, en el control de la LC estarían participando otros mecanismos que pueden actuar de manera independiente de la respuesta a estrés oxidativo. En la Figura 2.9 se mostró que la cepa EC1118 presentaba una mayor activación de la autofagia, medida por la degradación de la proteína Ald6p. Como se ha mencionado en la Introducción, la inactivación de la ruta PKA activa este proceso de degradación en cepas de laboratorio, sin embargo, esta cepa tiene una mayor actividad de la ruta PKA y una mayor actividad autofágica, lo cual podría resultar contradictorio. En las condiciones que se dan en la elaboración de cava, las cepas heterocigóticas con la delección de *BCY1*, subunidad represora de la PKA, inducen la autólisis (lo que concuerda con lo observado en nuestros estudios, donde se observa una mayor actividad de PKA y de autólisis en la cepa EC1118), pero de manera contraria a nuestros resultados, la degradación por autofagia de Ald6p está bloqueada en estas condiciones (Tabera *et al.*, 2006). Sin embargo, no hay que olvidar las condiciones de crecimiento utilizadas en nuestro estudio, el proceso de vinificación, muy distintas a los ejemplos anteriores. En este caso, las células dejan de crecer cuando quedan en el medio grandes cantidades de azúcares, por lo que las rutas de señalización de nutrientes no responderían a la falta de fuente de carbono, sino a otro factor limitante, como el nitrógeno. En este caso la ruta de señalización más determinante sería la ruta TOR, por lo que esta ruta podría ser clave en el control de la autofagia en condiciones de vinificación. Por ello, podría resultar muy interesante la búsqueda de inhibidores de la ruta TOR que provocaran un incremento en la autofagia y una mejor adaptación a condiciones de restricción por nitrógeno.

La idea de que un crecimiento vigoroso podría estar afectando de manera negativa a la longevidad, y por ello aumentar la lisis celular, puede resultar de gran interés a la hora de la selección de cepas de levadura para llevar a cabo la fermentación vínica. En relación a esto, la identificación del alelo con el elemento δ en el promotor del gen *CYR1* podría ser un marcador útil.

2.6- Estudio del impacto de la apoptosis en la longevidad durante la vinificación.

Una vez comparados los comportamientos de nuestras cepas modelo de alta y baja longevidad, se decidió profundizar en el mecanismo que causa el envejecimiento en fase estacionaria. Se ha descrito que en cepas de levadura en medios de laboratorio se desencadenan procesos de tipo apoptótico durante el envejecimiento cronológico (Fabrizio y Longo, 2008). Para estudiar este aspecto se analizó el efecto que produce en la cepa poco longeva EC1118 la eliminación de un factor determinante en la apoptosis, el gen *AIF1* (*Apoptosis Inducing Factor*), que codifica para una proteína mitocondrial que se transloca al núcleo en respuesta a estímulos que desencadenan apoptosis (Wissing *et al.*, 2004).

Se realizaron vinificaciones en mosto natural bobal con la cepa *aif1* Δ y la parental EC1118 (Fig. 2.18). La cepa mutante presentó un perfil de crecimiento muy similar a la cepa silvestre (Fig. 2.18 A), sin embargo, al final de la vinificación sí que presentó un ligero aumento en la viabilidad. Cuando se representó el perfil de envejecimiento (Fig. 2.18 B) se apreció que la delección de *AIF1* extiende la longevidad al final de la vinificación. El consumo de azúcares es muy similar entre ambas cepas (Fig. 2.18 C), lo que indicó que dicha mutación no tiene impacto en el metabolismo normal de la levadura. Así pues, parece que efectivamente se producen fenómenos apoptóticos al final de la fermentación vínica, pero la relevancia de éstos en

la muerte parece ser modesta, lo que indicaría la existencia de otros procesos adicionales, posiblemente de carácter necrótico, que contribuyen a la muerte celular al final del proceso de vinificación.

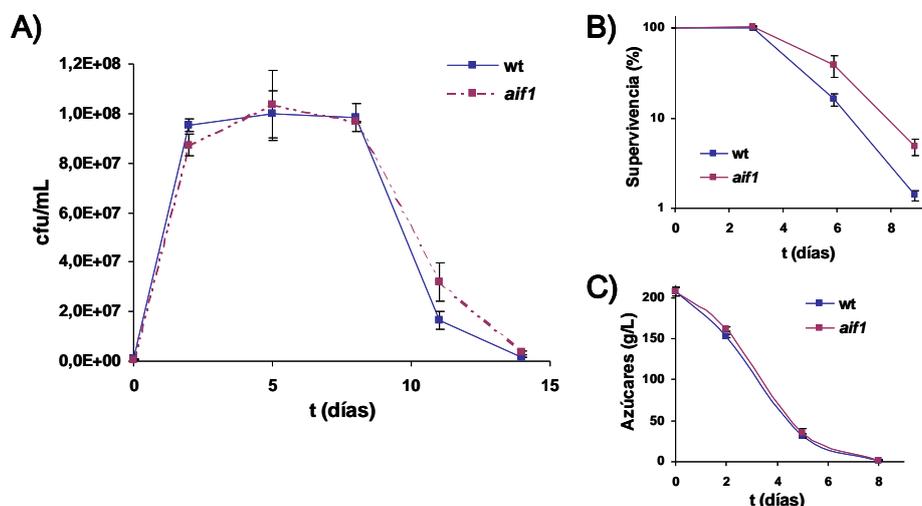


Figura 2.18. Curvas de crecimiento (A), muerte celular (B) y determinación del consumo de azúcares reductores (C) en el mutante *aif1* Δ y en la cepa EC1118 durante el proceso de vinificación en mosto bobal. Se determinó el número de células viables (cfu/mL) por recuento en placa a distintos tiempos de vinificación. Los experimentos se realizaron como mínimo por triplicado y las barras de error muestran la desviación típica (DT).

Todos estos resultados confirman que la longevidad celular es el resultado de múltiples mecanismos que actúan de manera coordinada. Las rutas de señalización por nutrientes, como la PKA, controlan los flujos metabólicos y la respuesta a estrés. La tolerancia a estrés oxidativo y por etanol son determinantes en la supervivencia en fase estacionaria. Una elevada tasa metabólica puede conducir a una mayor producción de radicales libres que dañe la célula. La PKA también regula procesos que pueden modular la longevidad, como la autofagia o los mecanismos de apoptosis mediados por la mitocondria (Leadsham y Gourlay, 2010).

De acuerdo con el objetivo propuesto, en este apartado se han identificado nuevos determinantes moleculares de la longevidad en levaduras vínicas, como la proteína mitocondrial Rdl2p y un alelo del gen de la adenilato ciclasa, *CYR1*, el cual promueve el envejecimiento cronológico.

3.- Estudio de la función de la maquinaria de acetilación/desacetilación en la formación de biofilm

Como se ha descrito previamente en la Introducción, la adhesión entre células de levadura y con superficies exógenas es un proceso complejo y poco conocido. Por ejemplo, la formación de velo en los finos de Jerez es un proceso influenciado por diversos factores, como la flotabilidad, la interacción célula-célula y la hidrofobicidad. En este apartado se ha estudiado el efecto de la modificación genética de genes relevantes de la maquinaria de acetilación/desacetilación en las interacciones célula-entorno y célula-célula en cepas vínicas de primera fermentación y en cepas de flor.

3.1- Papel de las sirtuinas y de las acetiltransferasas en la formación de *mats* en la cepa vínica haploide C9

En primer lugar, se realizó una serie de ensayos dirigidos a estudiar las diferentes formas de adhesión en las levaduras vínicas. Las cepas vínicas y los mutantes derivados de ellas que se han utilizado en este trabajo no muestran capacidad de floculación ni de pseudofilamentación (datos no mostrados). Así pues, la aproximación utilizada para estudiar la función de las desacetilasas y de las acetiltransferasas en la capacidad de las células para interaccionar con el medio ha sido la formación de *mats*, que son complejos multicelulares que se forman al inocular levaduras en el centro de una placa de YPD semi-sólido (con agar al 0.3%). En estas condiciones, las células crecen formando unas estructuras multicelulares complejas en forma de esterilla, debido a la capacidad de “movilidad deslizante” que posee *S. cerevisiae* (Reynolds y Fink, 2001), y que depende de la capacidad de adhesión de las células al agar, además de cierta capacidad de interacción célula-célula (Bruckner y Mosh, 2011). La formación de *mats* depende de la floculina de pared Flo11p. Esta capacidad de interacción con el medio de las cepas vínicas puede resultar de interés en procesos de inmovilización de levaduras en soportes sólidos.

Se realizaron experimentos de formación de *mats* con distintos mutantes de desacetilasas en la cepa C9. Dichos mutantes se han construido para estudiar el efecto que tienen en cuanto a longevidad y comportamiento en vinificación, aspectos que se detallarán en el apartado siguiente. En la Figura 3.1 A se puede observar el aspecto que presentan los *mats* tras dos semanas de crecimiento a temperatura ambiente. La cepa silvestre forma un *mat* típico, con radios que parten desde el centro. En estas condiciones, además de la capacidad de deslizamiento se puede determinar la adhesión al agar y la adhesión célula-célula cubriendo el *mat* con un film de plástico comercial y realizando una ligera presión con un dispositivo de réplica de placas. El patrón característico en este proceso de adherencia es la formación de una estructura en anillo (Reynolds *et al.*, 2008), ya que sólo las

células del borde exterior del *mat*, que se encuentran en continuo proceso de división celular y crecimiento, interaccionan menos con el agar y entre ellas y se adhieren al plástico. Este es el patrón que se observa en la cepa de referencia C9 (Figura 3.1 B). El mutante *sir2* Δ presenta un *mat* de menor tamaño (en todos los experimentos se inocularon al menos tres placas), y siempre de bordes más irregulares y lobulados. Además, todas las células del *mat*, incluidas las del centro de la estructura que ya no se dividen, se adhieren al plástico, indicando defectos en la interacción celular con el medio. Dicho patrón es similar al observado en el mutante de delección de *FLO11* (Reynolds *et al.*, 2008). Con el fin de confirmar la implicación de Sir2p en la capacidad de adhesión de las células, se realizó la sobreexpresión del gen *SIR2* mediante la técnica de reemplazamiento de promotores optimizada en nuestro laboratorio (Cardona *et al.*, 2007), tanto bajo el control del promotor de expresión específica en fases tardías de vinificación *SP11* (P_{SP11} -*SIR2*) como bajo el control del promotor de expresión temprana *MET17* (P_{MET17} -*SIR2*) (Rossignol *et al.*, 2003). Ambos mutantes producen un *mat* ligeramente menor que el de la cepa parental y de aspecto más denso. Las dos formas de sobreexpresión del gen *SIR2* causaron una disminución de la adhesión al agar, ya que se observa un aumento en el espesor del halo transferido a plástico, sin que el centro del *mat* se vea afectado. Este comportamiento intermedio sugiere que dichos promotores, o no funcionan a pleno rendimiento en las condiciones de formación de biofilm, o la excesiva producción de la proteína Sir2p produce algún tipo de desequilibrio que tiene como resultado un fenotipo intermedio entre el tipo silvestre y la cepa de delección. En cualquier caso, parece que la dosis exacta de actividad Sir2p es esencial para la correcta formación de este tipo de estructuras.

Se ha descrito que en condiciones de fermentación propias de la industria cervecera, la delección de *SIR2* impide la floculación de cepas que tienden a agregar con alta concentración de azúcares en el medio (Dietvorst y Brandt, 2010). Esto sugiere que la formación de *mats* y la floculación, son procesos relacionados molecularmente a través de Sir2p.

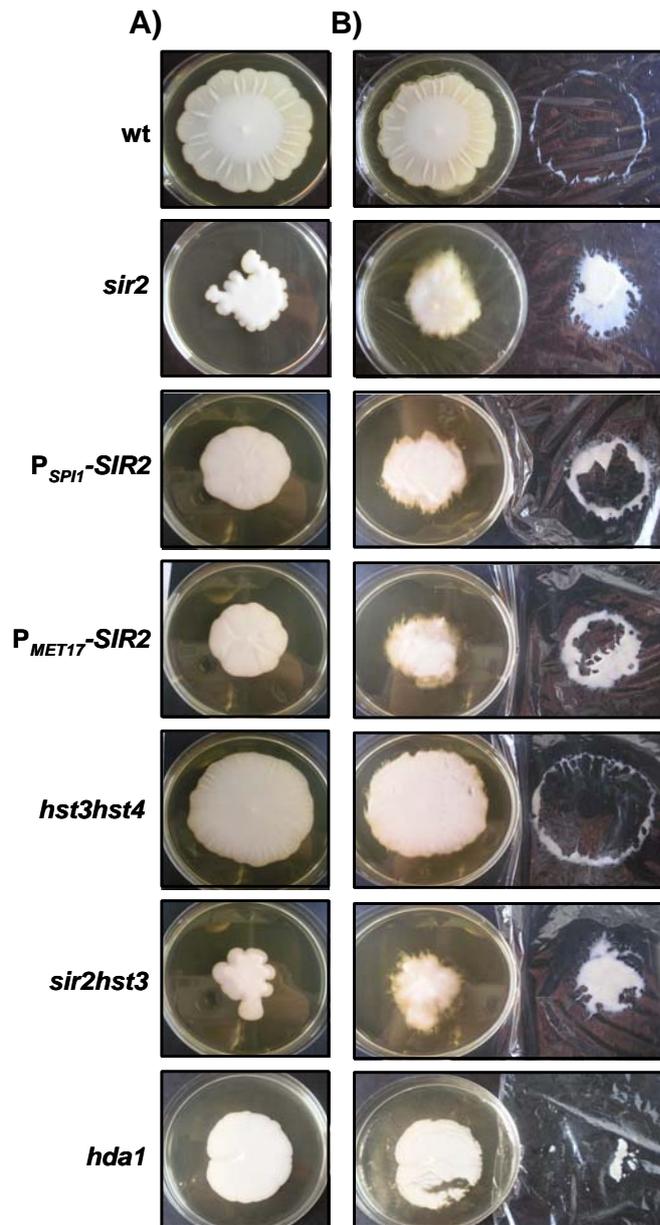


Figura 3.1. Experimentos de formación de *mats* en los mutantes de genes de sirtuinas y de las cepas que sobreexpresan *SIR2* en la cepa C9 (A) y de análisis de la adhesión a plástico (B). Se inocularon las cepas en el centro de placas de YPD con 0.3% de agar y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 días.

Respecto al resto de sirtuinas *HST1-4*, su delección no causó un fenotipo claro en cuanto al tamaño de los *mats* y ni en la adherencia del mismo (datos no mostrados). Hst1p y Hst2p tienen un papel negativo en la pseudofilamentación inhibiendo la expresión del gen *FLO10* (Halme *et al.*, 2004), pero la formación de *mats* en C9 discurre por mecanismos diferentes según nuestros resultados. La delección combinada de *HST3* y *HST4* tampoco muestra un fenotipo visible (Figura 3.1), mientras que la combinación de *sir2Δ* con *hst3Δ* o *hst4Δ* da lugar a un fenotipo equivalente al de *sir2Δ* (ver por ejemplo el doble mutante *sir2Δ hst3Δ* en la Figura 3.1). Por último, la delección de una desacetilasa no sirtuina de clase II como *HDA1*, no presenta ningún fenotipo en la formación y adherencia de *mats*, a pesar de que su delección incrementa la floculación en condiciones de fermentación cervecera (Dietvorst y Brandt, 2010) y la pseudofilamentación debida a la expresión de *FLO11* (Halme *et al.*, 2004), lo que sugiere que no son procesos comparables con la formación de *mats* en cuanto a la implicación de Hda1p.

En cepas de laboratorio, se ha identificado a la proteína de pared Flo11p como el factor esencial para la formación de biofilm. La delección de *FLO11* da lugar a una adhesión total del *mat* al film de plástico que recuerda a lo observado en el mutante *sir2Δ* (Reynolds y Fink, 2001). Se intentó detectar por *Northern blot* la expresión de su transcrito en crecimiento en medio rico YPD líquido y no se pudo detectar la expresión de dicho gen en ninguno de los mutantes y fondos genéticos usados (datos no mostrados). Por ello, se procedió a extraer RNA de los *mats* de ciertos mutantes de interés, resuspendiendo los mismos en agua con el fin de recoger las células. En este caso, sí que se logró detectar la expresión del mensajero de *FLO11* en la cepa C9, y como puede observarse en la Figura 3.2, el mutante *sir2Δ* sufre una drástica bajada en los niveles de RNA mensajero de *FLO11*, lo que posiblemente justifica el menor tamaño de su *mat*. En estas condiciones, la escasa cantidad de Flo11p en la pared puede desencadenar que las células tiendan a adherirse a un sustrato exterior. En cepas de laboratorio la disrupción de *SIR2* no produce un cambio significativo en la expresión de *FLO11* (Palecek *et al.*, 2000). La sobreexpresión de *SIR2* bajo los dos

promotores mencionados no supone un aumento de la cantidad de mensajero de *FLO11*, lo que parece indicar que la cantidad de proteína de Sir2p no parece ser el factor limitante en la expresión de este gen. También se estudió la expresión de *FLO10*, que posee relevancia en procesos de pseudofilamentación (Bruckner y Mosch, 2011), pero los niveles de RNA mensajero resultaron indetectables en estas condiciones (datos no mostrados).

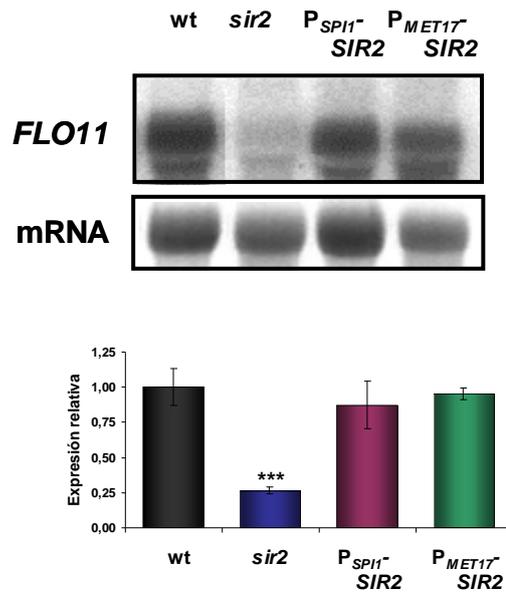


Figura 3.2. Determinación de los niveles de mRNA de *FLO11* mediante *Northern blot* del wt, del mutante de delección *sir2* Δ y de las cepas sobreexpresantes de *SIR2* derivadas de la cepa C9. En la parte inferior se muestra la cuantificación del mRNA tras la realización de tres experimentos independientes y se muestra las medias y la desviación típica (DT). Se indica con asteriscos las diferencias estadísticamente significativas de los mutantes con respecto a la cepa wt (***) $p < 0,005$).

Finalmente, se analizó el efecto de la deficiencia en las acetiltransferasas *SAS2*, *GCN5* y *SPT10* en la formación de biofilm en este mismo fondo genético (Figura 3.3). La delección de *SAS2* no altera las

cualidades de formación de *mats* o adherencia a plástico. Sin embargo, el mutante *gcn5* Δ sí que muestra la formación de *mats* de tamaño ligeramente menor, y una capacidad de adhesión a plástico notablemente mayor.

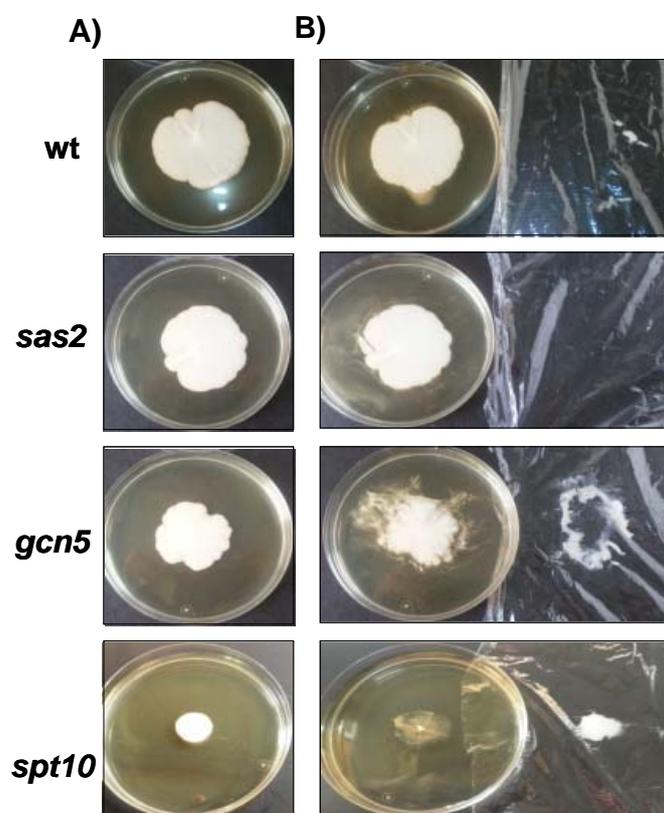


Figura 3.3. Experimentos de formación de *mats* en los mutantes de genes de acetiltransferasas en la cepa C9 (A) y de análisis de la adhesión a plástico (B). Los experimentos se realizaron según lo descrito en la Figura 3.1.

La delección de *GCN5* también estimula la floculación en las condiciones de fermentación utilizadas en la industria cervecera (Dietvorst y Brandt, 2010), indicando que ambos procesos de interacción comparten

algunos reguladores, aunque como hemos visto en el caso de *SIR2* y *HDA1*, no son procesos basados en el mismo grupo de desacetilasas.

Por último, la delección de *SPT10* da lugar a *mats* de tamaño reducido. El mutante C9 *spt10* Δ presenta un defecto acusado de crecimiento en medio YPD, tanto líquido como en placas con 2% de agar (datos no mostrados), de manera que es difícil determinar si el efecto de la mutación es sobre el tamaño del *mat* o si genera un defecto de crecimiento. Sin embargo, la adhesión a plástico está muy incrementada, demostrando que efectivamente la proteína Spt10p está implicada en la formación de biofilm.

3.2- Papel de las sirtuinas y de las acetiltransferasas en la formación de *mats* en la cepa comercial L2056

A continuación, se estudió la formación de *mats* en mutantes seleccionados en la cepa diploide industrial L2056, parental de la cepa haploide C9 (Figura 3.4). La cepa silvestre da lugar a un *mat* más irregular que la cepa C9, y que al ponerse en contacto con el plástico deja adherido el perímetro exterior, pero de una forma más irregular. En esta cepa se deleccionaron los genes de varias sirtuinas seleccionadas según su relevancia en longevidad (ver Apartado 4). La delección de *SIR2* provocó una reducción del tamaño del *mat*, además de disminuir de manera dramática la interacción célula-célula y célula-agar, ya que se transfieren muy eficazmente al plástico. Por lo tanto, el papel de Sir2p en la formación de este tipo de biofilm es equivalente a lo observado en la cepa haploide C9. La delección de *HST2* produjo un *mat* de tamaño similar, pero con un aspecto consistentemente más lobulado y con menor adherencia en los bordes, de manera que este gen posee un defecto en la capacidad de las células en proliferación para adherirse al film. La delección de *HST3* no alteró de forma determinante ni el tamaño ni la adherencia del *mat*, de manera similar a lo observado en C9.

Por último, se comprobó el efecto de la delección del gen de la desacetilasa Hda1p respecto a este fenotipo, y se observó la producción de un *mat* que crecía con mayor rapidez que el parental durante los primeros días de crecimiento (datos no mostrados), llegando a un diámetro final ligeramente mayor que la cepa silvestre y con una adhesión en los bordes irregular.

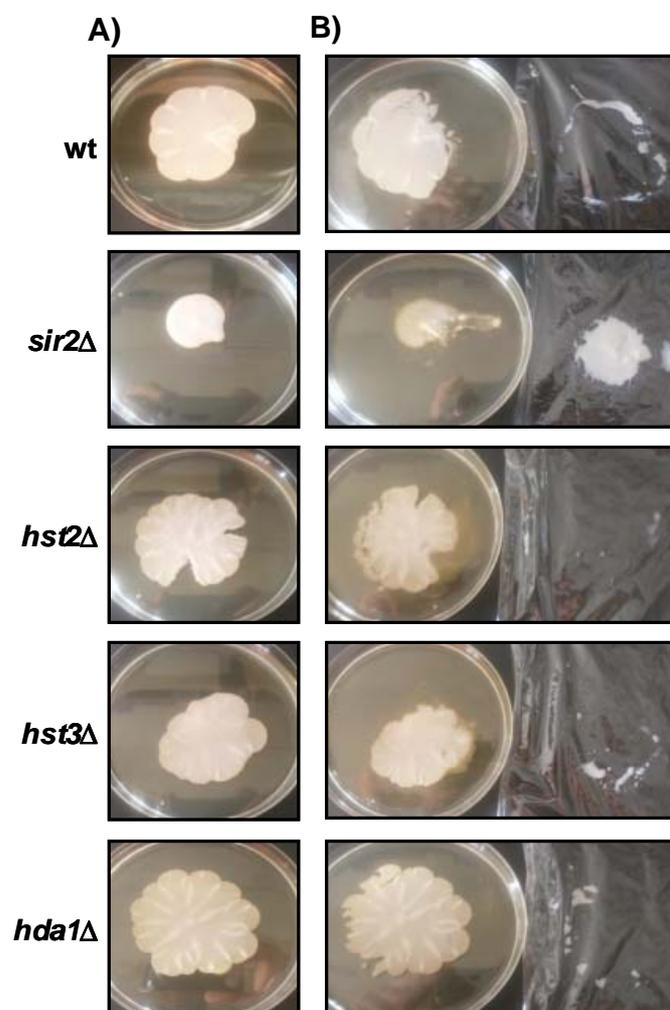


Figura 3.4. Experimentos de formación de *mats* en los mutantes de genes de desacetilasas en la cepa L2056 (A) y de análisis de la adhesión a plástico (B). Los experimentos se realizaron según lo descrito en la Figura 3.1.

Respecto a las acetiltransferasas, los resultados son por lo general comparables a lo observado en la cepa haploide C9. La delección de *SAS2*, *GCN5* y *SPT10* conlleva la formación de un *mat* de menor tamaño (Figura 3.5). El mutante *sas2* Δ mostró un patrón de adhesión a film similar a su cepa parental, pero con un borde ligeramente más grueso. El mutante *gcn5* Δ mostró una adhesión al plástico muy aumentada en toda la superficie del *mat*, mayor aún de lo observado en el fondo genético haploide. La delección de *SPT10* causó un aumento considerable de la adhesión a plástico, con una morfología similar a lo observado en el mutante *gcn5* Δ , efecto similar al observado en la cepa C9. Así pues Gcn5p y Spt10p parecen presentar papeles similares en el control de la interacción de las células con el entorno.

Los experimentos de caracterización de las estructuras *mat* han permitido describir, por primera vez, la implicación de los componentes de la maquinaria de acetilación/desacetilación, como Sir2p, Gcn5p y Spt10p en la formación de biofilm, medido a través de la capacidad de formación de dichas estructuras. A pesar de poseer diferentes dianas en cuanto a la acetilación de histonas (ver Introducción), las mutaciones en los tres genes generan un fenotipo similar, consistente en la pérdida de adhesión de las células a la colonia. Una posible explicación para ese fenotipo compartido por las tres mutaciones sería su efecto común sobre mecanismos de regulación a nivel transcripcional que serían esenciales en el control de la capacidad de las cepas para formar este tipo de estructuras, dependiente probablemente de múltiples mecanismos de manera que la pérdida de cualquiera de ellos puede afectar considerablemente al proceso. Además, podría existir alguna(s) proteína(s) con función clave en la formación de estas estructuras que sea postraduccionalmente modificada y regulada por acetilación/desacetilación. El conocimiento y modificación de este comportamiento puede resultar de utilidad para obtener levaduras con facultades aumentadas de encapsulamiento en soportes exógenos.

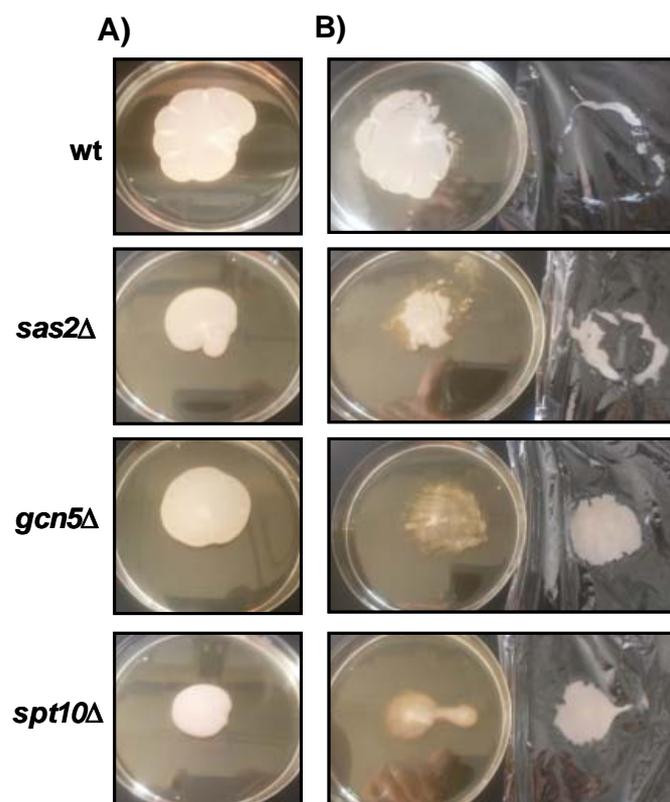


Figura 3.5. Experimentos de formación de *mats* en los mutantes de genes de acetiltrasferasas en la cepa L2056 (A) y de análisis de la adhesión a plástico (B). Los experimentos se realizaron según lo descrito en la Figura 3.1.

3.3- Papel de Sir2p en la interacción con el medio de las cepas de flor

Como se ha mencionado en la Introducción, determinadas cepas de levadura, las denominadas de flor, tienen capacidad de flotabilidad y pueden formar en la superficie del medio una película o velo. Este proceso depende de la expresión de gen *FLO11* (Fidalgo *et al.*, 2006). Con el fin de estudiar el

posible efecto de Sir2p en la formación de velo, se procedió a la delección y sobreexpresión del gen *SIR2* en la cepa de flor aislada de velo denominada C (Esteve-Zarzoso *et al.*, 2004). Esta cepa resultó ser triploide para el gen *SIR2*, por lo que se procedió a la triple disrupción del gen mediante la utilización del cassette reciclable *kanMX*.

Se comenzó con el estudio de la formación de *mats*, pero esta cepa de flor forma *mats* muy pequeños al ser inoculada en placas semisólidas con 0.3% de agar (datos no mostrados), lo cual impidió estudiar la capacidad de movilidad deslizante de las mismas. Este efecto se debe quizás a que se trata de células que en su entorno natural de velo interaccionan fuertemente entre sí, por lo que no poseerían esta capacidad. Alternativamente, se realizaron ensayos de adhesión a placas multipocillo de poliestireno. Para ello se depositó en los diferentes pocillos una alícuota procedente de cultivos estacionarios en medio YPD, se lavó con agua y se procedió a la tinción de las células con violeta cristal, tal y como se describe en el Apartado 5.4 de Materiales y Métodos. Los derivados de la cepa de flor mostraron diferencias entre los mutantes y la cepa parental, ya que las primeras delecciones del gen *SIR2* no alteran la adherencia al plástico, pero cuando se elimina la última copia de este gen se incrementa notablemente la capacidad de la cepa de flor para adherirse a la placa (Figura 3.6 A). Sin embargo, la sobreexpresión de *SIR2* bajo los promotores *SPI1* y *MET17* no alteró la capacidad de adhesión. Así pues, la actividad de Sir2p previene la interacción de las cepas de flor con el medio en las placas de poliestireno, de manera similar al efecto que tenía en la adhesión al agar en la formación de film en cepas de primera fermentación, como la cepa haploide C9 y la diploide L2056.

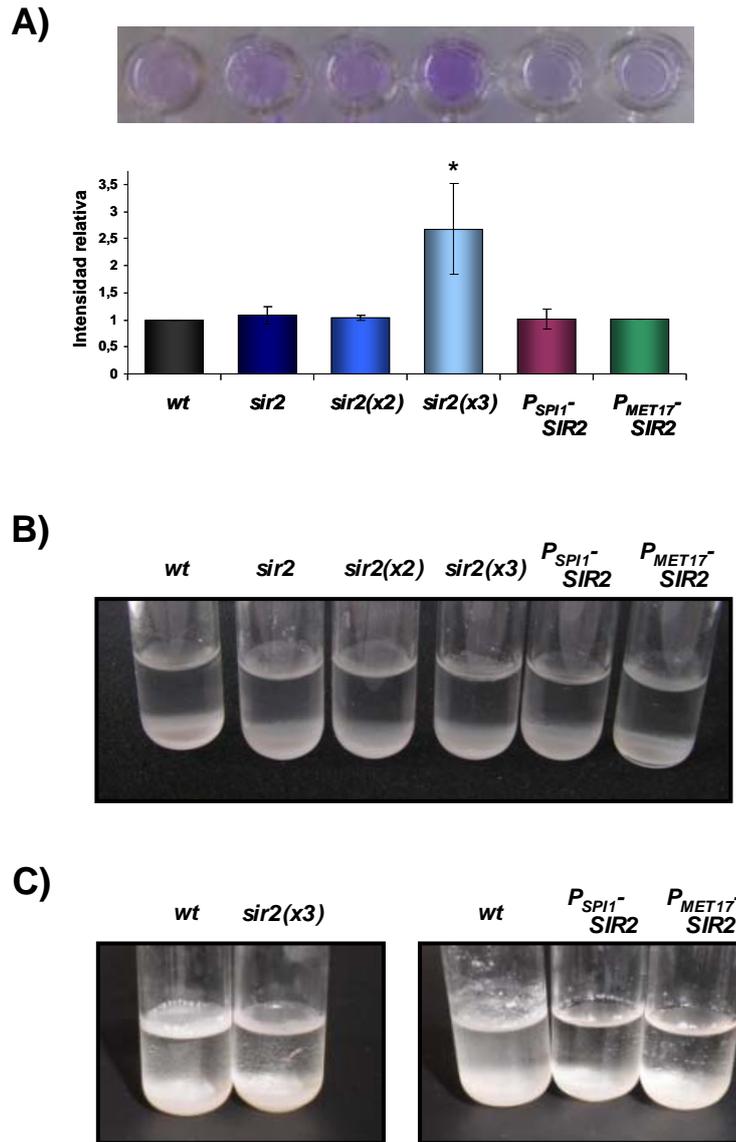


Figura 3.6. Experimentos de adherencia a plástico y formación de velo en el wt y en los distintos mutantes de *SIR2* de la cepa C de flor C. A) Adherencia a placas multipocillo de poliestireno. En la parte inferior se muestra la cuantificación de la intensidad de la tinción obtenido mediante espectrofotometría (D.O.₅₇₀) tras la realización de tres experimentos independientes y se muestra las medias y la desviación típica (DT). Determinación de la formación de velo en medio de flor de laboratorio (B) y en vino blanco de la variedad Palomino (C).

Seguidamente se analizó el efecto de la delección de esta sirtuina en la capacidad de formar velo. Para ello, se utilizó un medio mínimo de laboratorio con un 2% (v/v) de etanol, denominado medio de flor, donde se resuspendieron células procedentes de un cultivo en estado estacionario en medio YPD. Posteriormente se incubaron en condiciones estáticas en tubos de ensayo durante una semana. En la Figura 3.6 B puede observarse que ni la delección progresiva de *SIR2*, ni la sobreexpresión del mismo, impide la formación de velo, de manera que Sir2p no parece ser un factor determinante o limitante en el proceso de interacción célula-célula, necesaria para la formación del velo en estas condiciones.

Con el fin de realizar el ensayo de manera más fiel a las condiciones que se dan en el envejecimiento de los finos de Jerez, se procedió a repetir el experimento en vino blanco de la variedad Palomino, encabezado hasta un 15% (v/v) de etanol. En estas condiciones, la delección y sobreexpresión tampoco impedían la formación de velo (Figura 3.6 C). No obstante, el velo obtenido en el triple mutante *sir2* Δ resultó consistentemente menos denso y espeso, indicando que la delección de *SIR2* tiene un efecto parcialmente negativo en la formación de dicha estructura. Esto podría deberse al efecto observado en la expresión de *FLO11* en este mutante (Figura 3.2), ya que se ha determinado que Flo11p es esencial en la formación de velo (Ishigami *et al.*, 2004).

Estos resultados indican una compleja red de regulación de los diferentes procesos de adhesión en los cuales interviene la maquinaria de acetilación/desacetilación, aunque su papel no es equivalente en los distintos modos de crecimiento alternativos que presenta *S. cerevisiae*. La delección de la desacetilasa *SIR2* y de las acetiltransferasas *GCN5* y *SPT10* altera la capacidad de formar biofilms del tipo *mat*. Este hecho sugeriría una disminución de la capacidad de adhesión al agar y a una bajada en la intensidad de las interacciones célula-célula que se dan en este tipo de biofilm. Sin embargo, la delección de *SIR2* aumenta la capacidad de las levaduras de flor a adherirse a un sustrato exógeno como el poliestireno, lo que sugiere que cambios en estas enzimas pueden condicionar el sustrato

preferido con el que las células interaccionan. En el caso de *SIR2* hemos determinado que controla un proceso transcripcional como la expresión de la floculina *FLO11*. Hasta la fecha no hay evidencias de que la acetilación pueda actuar como una forma de regulación postranscripcional de este tipo de procesos, aunque dicho mecanismo no es descartable.

4.- Estudio de la función de la maquinaria de acetilación en el metabolismo y en la longevidad

Como se ha comentado anteriormente, el envejecimiento celular está condicionado por numerosos factores, tanto ambientales como genéticos. El componente genético de la longevidad se basa en múltiples y muy diversos mecanismos de regulación de la fisiología celular, que en numerosas ocasiones están relacionados entre sí y convergen en las mismas rutas metabólicas. Como se ha descrito en la Introducción, cada vez existen más evidencias de que el metabolismo actúa sobre el envejecimiento celular mediante el control de las rutas de señalización por nutrientes TOR/Sch9p y RAS/PKA (Fontana *et al.*, 2010). Un mismo mecanismo de regulación puede controlar procesos celulares totalmente distintos, incluso separados espacialmente, como ocurre con la maquinaria de acetilación y desacetilación

celular, que regula en el núcleo la transcripción génica modificando el estado de acetilación de las histonas, pero también controla el metabolismo mediante modificación directa de las enzimas metabólicas (Norwell *et al.*, 2010). Con el fin de estudiar si la maquinaria de acetilación/desacetilación celular tiene algún papel en la regulación de la longevidad cronológica a través de la modulación del metabolismo en levaduras vínicas, se estudió el efecto que produce la delección de diversos genes que codifican para proteínas relacionadas con dicha maquinaria, y se determinó si se producen cambios en su longevidad. En una primera aproximación se construyeron los mutantes en la cepa vínica haploide C9 y se realizaron ensayos de envejecimiento cronológico en medio de laboratorio para caracterizar el efecto fenotípico de dichos mutantes. Posteriormente, se construyeron mutantes de los genes más relevantes en su cepa parental L2056 (diploide en todos los genes estudiados en este trabajo). Con dichas cepas se realizaron experimentos de vinificación en mosto bobal natural o en mosto sintético, cuando las condiciones lo requieran, con el fin de estudiar el comportamiento de los mutantes en condiciones naturales de vinificación. En estas condiciones, también se ha determinado la concentración de metabolitos de interés enológico relevantes para la longevidad y se han medido diversas actividades enzimáticas de proteínas clave del metabolismo, cuya función podría afectar a la LC. Una vez caracterizadas las diferencias obtenidas entre los mutantes, se ha intentado describir un mecanismo molecular de regulación de las proteínas de la maquinaria de acetilación/desacetilación sobre determinadas proteínas del metabolismo.

4.1- Papel de las sirtuinas y de las acetiltransferasas en el envejecimiento cronológico en condiciones de laboratorio

Con el fin de caracterizar proteínas clave en la longevidad en cepas vínicas, se realizaron experimentos de envejecimiento cronológico en medio

de laboratorio con diversos mutantes implicados en la maquinaria de acetilación/desacetilación celular. Los experimentos de LC se realizaron en medio rico SC, y determinando la viabilidad a lo largo del tiempo, tal y como se describe en Materiales y Métodos (Apartado 2.2.3).

En primer lugar, se comprobó si la delección en la cepa haploide C9 del gen de la desacetilasa *SIR2*, de su acetil transferasa antagónica *SAS2* (Dang *et al.*, 2009) y la doble delección, ocasiona algún cambio en la longevidad en este fondo genético. Como puede observarse, (Figura 4.1 A y B) el mutante *sir2* Δ , aunque muestra un mayor descenso en la supervivencia durante los 6-7 primeros días, es notablemente más longevo que la cepa silvestre, tal y como se ha descrito anteriormente en cepas de laboratorio en células que se encuentran en condiciones de restricción calórica extrema (Fabrizio *et al.*, 2005). En un estudio global realizado por Matecic *et al.*, (2010) también encuentran que el mutante *sir2* Δ incrementa ligeramente su LC en condiciones no restrictivas. El mutante *sas2* Δ (Figura 4.1 A) tiene un comportamiento similar al de *sir2* Δ , aunque la velocidad de muerte inicial es aún mayor y el aumento de longevidad no es tan acusado. La similitud de los perfiles de la curvas de supervivencia de los mutante *sas2* Δ y *sir2* Δ parece indicar que estas proteínas no tienen un papel antagónico en el envejecimiento cronológico, contrariamente a lo descrito para el envejecimiento replicativo (Dang *et al.*, 2009). Además, el doble mutante *sir2* Δ *sas2* Δ (Figura 4.1 A) es menos longevo que los mutantes simples, lo que podría indicar que ambas proteínas controlan aspectos diferentes de la LC.

Tras el efecto observado en la longevidad del mutante *sir2* Δ , se continuó con el estudio del resto de miembros de la familia de sirtuinas presentes en el genoma de la levadura, *HST1-4*, observándose distintos comportamientos (Figura 4.1 B). El mutante *hst1* Δ presenta un perfil de supervivencia similar al silvestre, por lo que esta sirtuina no parece tener efecto en el control de la LC en estas condiciones. Sin embargo, el mutante *hst2* Δ es menos longevo, mientras que los mutantes *hst3* Δ y *hst4* Δ presentan una longevidad mayor que la cepa silvestre, lo que indica que todas las

sirtuinas descritas en levadura, excepto Hst1p, tienen una posible función en la regulación de la LC en el fondo genético de esta levadura vínica.

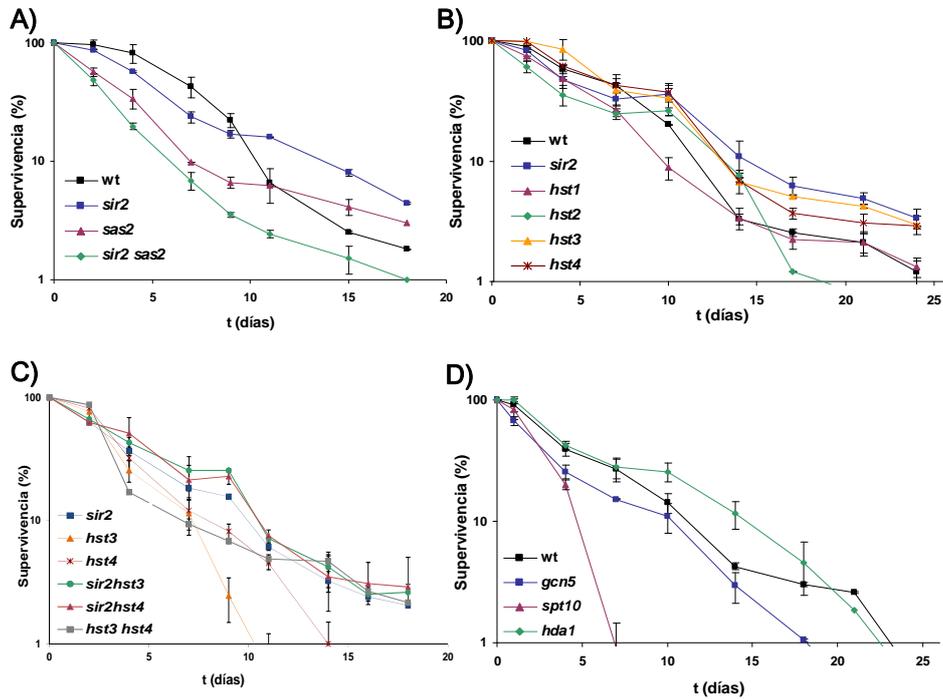


Figura 4.1. Experimentos de LC en los mutantes de genes de sirtuinas y de acetiltransferasas en la cepa C9. Se determinó el número de células viables (cfu/mL) por recuento en placa a distintos tiempos del experimento de envejecimiento. Los experimentos se realizaron como mínimo por triplicado y las barras de error muestran la desviación típica (DT).

Estudios previos con cepas de laboratorio presentan diferencias de longevidad con respecto a estos mutantes, ya que Smith *et al.*, (2007) encuentra que el mutante *hst1Δ* y *hst3Δ* tienen disminuida su longevidad, mientras los mutantes *hst2Δ* y *hst4Δ* se comportan como la cepa silvestre. Esta diferencia observada entre las cepas de laboratorio y las vínicas podría deberse a la adaptación de estas últimas a un medio natural que, como se ha descrito previamente, es mucho más complejo en cuanto a composición.

Además, la domesticación de las cepas de laboratorio podría haber dado lugar a cambios en la regulación de la expresión de las sirtuinas durante el proceso de envejecimiento. Un aspecto que parece clave en dicha domesticación de las cepas de laboratorio es la presencia de auxotrofías, ya que se ha descrito que la recuperación de la prototrofia de *LEU2* incrementa la longevidad en cepas de laboratorio (Alvers *et al.*, 2009).

Para profundizar en el papel de las sirtuinas en la LC y su relación entre ellas, se construyeron los dobles mutantes *sir2Δhst3Δ*, *sir2Δhst4Δ* y *hst3Δhst4Δ*, ya que los mutantes sencillos provocaban una extensión de la longevidad, y se estudió su comportamiento en condiciones de laboratorio (Figura 4.1 C). La delección adicional de *HST3* y de *HST4* al mutante *sir2Δ*, provoca un ligero aumento en su longevidad, sugiriendo un efecto aditivo de estas sirtuinas, aunque la función de Sir2p parece ser más relevante. El doble mutante *hst3Δhst4Δ* es más longevo que los simples parentales, lo que puede indicar, tal y como se ha descrito en cepas de laboratorio, que actúan sobre las mismas dianas. Estas dos proteínas relativamente homólogas, desacetilan los mismos residuos de las histonas y su función se ha relacionado con la regulación de la acetil-CoA sintetasa, como hacen sus homólogos en humanos y en *Salmonella*, porque el doble mutante (y no los mutantes sencillos) es incapaz de crecer con acetato y propionato como únicas fuentes de carbono (Starai *et al.*, 2004). Para comprobar si en el fondo genético de las cepas vínicas este doble mutante es incapaz de crecer en medio con acetato o propionato como única fuente de carbono, se comprobó su fenotipo de crecimiento en medio sólido mediante el goteo de diluciones seriadas (Figura 4.2). Como puede observarse en esta figura, todos los mutantes analizados son capaces de crecer en medio con acetato (YPA, panel B) y con propionato (YPP, panel C) como única fuente de carbono, y únicamente se aprecia una ligera reducción en el crecimiento del doble mutante *hst3Δhst4Δ* en propionato, mientras que crece bien en acetato, y un crecimiento ligeramente mayor de los mutantes que contienen *sir2Δ*, pero sólo en propionato, sugiriendo sutiles diferencias entre ambos metabolitos. Este resultado apoya la idea de que la domesticación de las levaduras de

laboratorio puede haber alterado la regulación o la función de las sirtuinas, haciendo muy interesante, aunque también más complicado, estudiar la regulación en cepas vínicas, donde parece subsistir una mayor variedad de vías metabólicas.

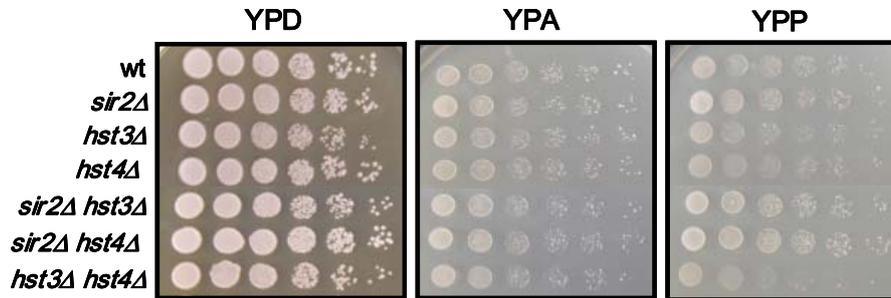


Figura 4.2. Crecimiento en placa de las cepas wt y mutantes de sirtuinas en medio YPD (A), YPA (B) e YPP (C). Las distintas diluciones fueron inoculadas procedentes de cultivos en medio rico YPD durante 12 h. Las placas se incubaron a 30 °C durante 24 h (YPD) o 72 h (YPA e YPP).

Se intentó llevar a cabo la construcción del triple mutante *sir2Δhst3Δhst4Δ*, pero no fue posible a partir de ninguno de los dobles mutantes. Esto podría significar que la delección conjunta de estas tres sirtuinas es letal en nuestro fondo genético, como ocurre en algunas cepas de laboratorio donde la delección de las cinco sirtuinas solo es posible en el mutante *fab1Δ*, una proteína implicada en la formación de círculos de rDNA (Tsuchiya *et al.*, 2006).

Finalmente, se estudió el efecto de la delección de otros genes que codifican para otras proteínas relacionadas con la maquinaria de acetilación/desacetilación. Se comenzó con el estudio del mutante de la acetil transferasa Gcn5p, que en cepas de laboratorio tiene disminuida su longevidad (Eisenberg *et al.*, 2009; Laschober *et al.*, 2010), y como puede observarse en la Figura 4.1 D, también en nuestro fondo genético se muestra menos longevo. En diversos procesos de desacetilación de las histonas, se

ha descrito a la desacetilasa Hda1p, un tipo de desacetilasa diferente a las sirtuinas, como antagonista de Gnc5p (Millar *et al.*, 2006). Además, en dos estudios globales (Powers *et al.*, 2006; Eisenberg *et al.*, 2009) se ha descrito que el mutante *hda1Δ* es más longevo que la cepa parental, y como puede observarse en nuestros experimentos (Figura 4.1 D), también la delección de *HDA1* muestra un fenotipo más longevo en cepas vínicas durante la mayor parte del período de tiempo analizado en el experimento. Se concluyó con la delección de la acetil transferasa Spt10p, que acetila el residuo H3K56, diana de las desacetilasas Hst3p y Hst4p y cuyo mutante de delección es menos longevo en el estudio global de Eisenberg *et al.*, (2009). Como puede observarse, (Figura 4.1 D), al deleccionar este gen en nuestro fondo genético se produce un notable descenso en la LC, ya que el mutante *spt10Δ* es hasta 4 veces menos longevo que la cepa parental.

Nuestros resultados indican que el papel que ejerce la maquinaria de acetilación/desacetilación en el envejecimiento cronológico es similar cuando se comparan cepas vínicas con cepas de laboratorio, aunque la regulación de alguna de estas proteínas puede ser distinta debido a la adaptación de las levaduras industriales al medio natural, observándose por ello un patrón diferente de LC en algunos mutantes de cepas vínicas cuando se estudian en medios de laboratorio.

4.2- Papel de las sirtuinas y de las acetiltransferasas en el envejecimiento cronológico durante el proceso de vinificación

Los resultados obtenidos con los mutantes de las sirtuinas y de las acetiltransferasas que mostraron una relación con la longevidad en medios de laboratorio, nos llevaron a estudiar el comportamiento de los mutantes más relevantes en condiciones de vinificación. De esta forma se pretendió

saber si estas proteínas también regulan la longevidad en el medio natural de las levaduras vínicas, el mosto de uva.

Para abordar este estudio se realizaron microvinificaciones a escala de laboratorio, tanto en la cepa vínica haploide C9, la cual permite el estudio de mutantes múltiples, como en su cepa parental comercial L2056, que posee una longevidad intermedia (Figura 2.1). En algunos casos también se recurrió a la utilización de la cepa vínica comercial EC1118, que como se ha descrito anteriormente, es muy poco longeva tanto en medios de laboratorio como en condiciones de vinificación, lo que la hace muy interesante para estudiar determinados genes que afecten a la LC.

4.2.1- Análisis del comportamiento en vinificación de mutantes de sirtuinas y acetil transferasas en la cepa vínica C9

Se realizaron microvinificaciones en mosto tinto natural de la variedad bobal con algunos de los mutantes de sirtuinas y acetiltransferasas caracterizados en el apartado anterior, tal y como se describe en Materiales y Métodos (Apartado 2.2.2). Todos los mutantes analizados presentaron una curva de consumo de azúcares similar, fermentándolos en su totalidad antes del octavo día y por ello acabando sin paradas el proceso de vinificación (resultados no mostrados). En estas condiciones, las células realizan unas 6-7 divisiones hasta alcanzar la saturación, (por ejemplo, en la Figura 4.3 A, la cepa parental se duplica 6.76 veces), donde las células dejan de dividirse aunque quedan altas concentraciones de azúcares en el medio (por ejemplo, aproximadamente el 10% en el silvestre, (Figura 4.3 A), lo que ratifica que el factor limitante en el proceso de vinificación es probablemente la fuente de nitrógeno, y no la de carbono.

El mutante *sir2* Δ (Figura 4.3 A) alcanza un número de células ligeramente superior al silvestre y su cinética de muerte es más rápida, por lo que es menos longevo. Este resultado se puede observar mejor si se representa la muerte celular con respecto al punto máximo de crecimiento (Figura 4.3 B), obteniéndose una curva de supervivencia similar a las

realizadas para los experimentos de longevidad cronológica en SC (Apartado 4.1). El mutante *sas2Δ* presenta un crecimiento notablemente inferior al del silvestre y al igual que *sir2Δ* su cinética de muerte también es más rápida que la del silvestre, por lo que también es menos longevo. Sin embargo, en el doble mutante *sir2Δsas2Δ*, aunque alcanza un número de células incluso menor que las del simple *sas2Δ*, el inicio de la fase de muerte se retrasa considerablemente (hasta los 20 días, el doble que el de resto de cepas), y por ello su longevidad no se ve afectada (Figura 4.3 B). Al igual que lo descrito anteriormente en medio de laboratorio (Figura 4.1 A), tanto el mutante *sir2Δ* como *sas2Δ* presentan un perfil de longevidad parecido, y el doble mutante se comporta de manera contraria a los simples, lo que significa que la función de Sir2p y Sas2p en la LC durante la vinificación tampoco sería antagónica y ambas proteínas estarían controlando aspectos diferentes del envejecimiento. Resulta muy interesante que el efecto sobre la longevidad en los mutantes simples *sir2Δ* y *sas2Δ* sea el contrario al observado en medios de laboratorio (Figura 4.1), es decir, que el papel de estas proteínas en la LC durante la vinificación es positivo. Estos resultados indican la existencia de grandes diferencias en la regulación de la longevidad dependiente de las condiciones de cultivo. El papel positivo de Sir2p en la LC durante la vinificación coincide con lo descrito para la longevidad replicativa en condiciones de laboratorio (Longo *et al.*, 2006). Estos resultados apuntan a lo importante y atractivo que resulta estudiar determinantes de longevidad en el medio natural de crecimiento de las levaduras vínicas.

Los mutantes *hst3Δ* y *hst4Δ* presentan un perfil de crecimiento y muerte celular similar al de la cepa silvestre, aunque *hst3Δ* alcanza un número de células inferior (Figura 4.3 B). Tal y como ocurría en la LC en condiciones de laboratorio (Figura 4.1 B), los mutantes *hst3Δ* y *hst4Δ* también presentan una longevidad ligeramente mayor que la cepa silvestre en condiciones de vinificación (Figura 4.3 D).

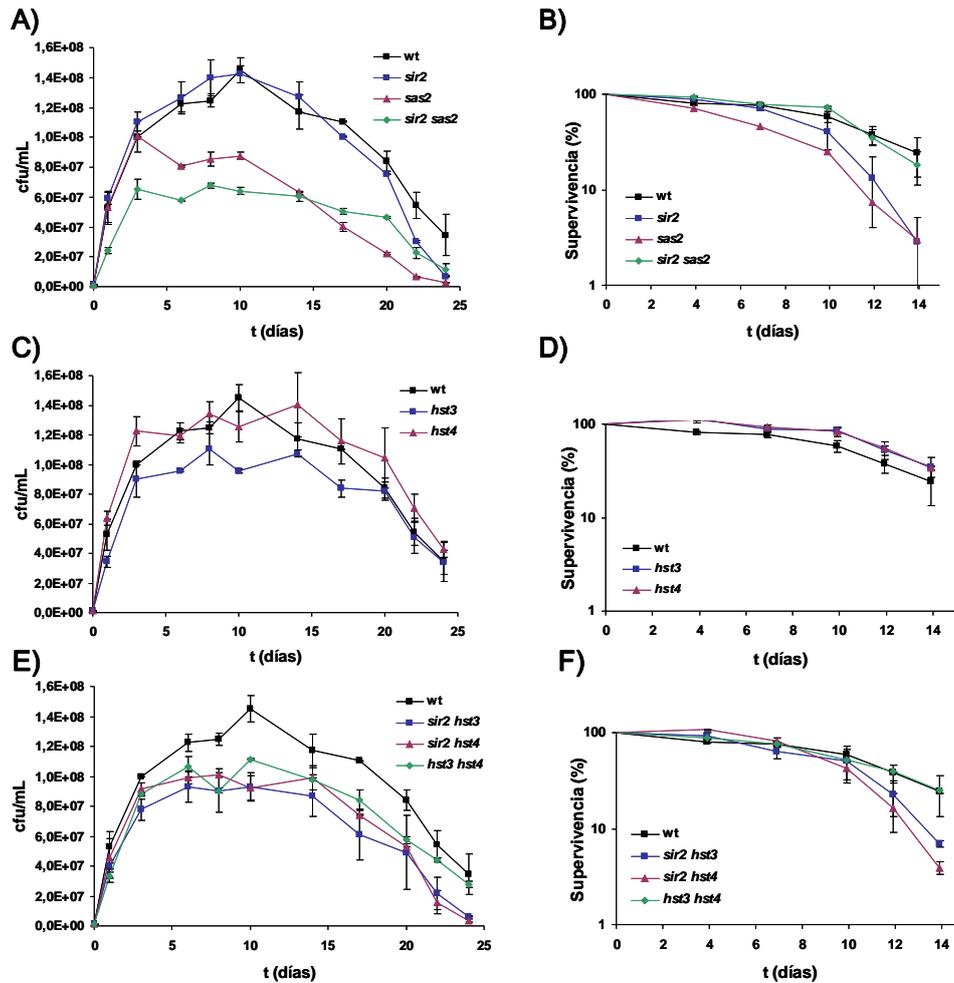


Figura 4.3. Curvas de crecimiento y muerte celular durante el proceso de vinificación (A, C, E) y curvas de longevidad cronológica (B, D, F) del wt y de los mutantes de genes de sirtuinas en la cepa C9. Se determinó el número de células viables (cfu/mL) por recuento en placa a distintos tiempos de vinificación. Los experimentos se realizaron como mínimo por triplicado y las barras de error muestran la desviación típica (DT).

La delección adicional de *HST3* y de *HST4* al mutante *sir2Δ*, provoca que los dobles mutantes alcancen un número inferior de células, tal y como se observó en el mutante simple *hst3Δ* e igual que se observa en el doble

mutante *hst3Δhst4Δ*, lo que parece indicar que Hst3p es el factor determinante en este aspecto. Sin embargo, los dobles mutantes *sir2Δhst3Δ* y *sir2Δhst4Δ* se comportan como el simple *sir2Δ*, viendo disminuida su longevidad, por lo que la función de Sir2p parece ser más relevante en LC en condiciones naturales de vinificación, como se observó también en condiciones de laboratorio (Figura 4.1 C). El comportamiento del doble mutante *hst3Δhst4Δ* es más difícil de interpretar, ya que su longevidad es similar a la de la cepa silvestre, por lo que no es más longevo que los simples parentales tal y como se observó en condiciones de laboratorio (Figura 4.1 B y C). Así pues, la influencia de las sirtuinas en la LC en condiciones de vinificación depende en la mayor parte de los casos del medio de cultivo en la que ésta se analiza. Para obtener una visión más amplia se ampliarán este tipo de análisis a cepas industriales comerciales.

4.2.2- Análisis del comportamiento en vinificación de mutantes de sirtuinas y acetiltransferasas en cepas vónicas comerciales

Tras la aproximación realizada con los diversos mutantes en la cepa vónica haploide C9, se escogieron algunas proteínas cuya función parecía más interesante en el la LC y se construyeron los mutantes de delección en la cepa vónica comercial L2056, diploide para todos los genes estudiados en este trabajo. Los mutantes se construyeron tal y como se describe en Materiales y Métodos (Apartado 6.2), mediante la utilización del cassette reciclable *kanMX* flanqueado por dos sitios *loxP*, escindible mediante el uso de la recombinasa cre. De esta forma se construyeron mutantes para las desacetilasas *SIR2*, *HST2*, *HST3* y *HDA1* y mutantes para las acetil transferasas *SAS2*, *GCN5* y *SPT10*. Con todos ellos se realizaron microvinificaciones en mosto tinto natural de la variedad bobal y, cuando las circunstancias lo requerían, también en mosto sintético, tal y como se describe en el apartado anterior y en Materiales y Métodos (Apartado 2.2.2). Para comprobar determinados resultados en otra cepa comercial, también se

construyeron algunos de los mutantes en la cepa poco longeva EC1118, diploide para los genes estudiados en este apartado.

Para seguir la evolución de la fermentación vínica, se tomaron muestras a distintos tiempos y se determinaron los niveles de azúcares reductores y la producción de metabolitos de importancia enológica para los que se ha descrito un papel en el envejecimiento. También se procedió a medir la actividad enzimática de proteínas clave del metabolismo en los mutantes con distinta producción de dichos metabolitos y cuya función podría afectar a la LC.

4.2.2.1- Determinación de la viabilidad y de la longevidad cronológica

Como puede observarse en la Figura 4.4 A, el mutante *sir2Δ* alcanza un número mayor de células y su cinética de muerte es más rápida, por lo que es notablemente menos longevo, lo cual puede observarse mejor al representar una curva de longevidad cronológica tomando como punto de partida el tiempo donde se alcanza la mayor densidad de células, en este caso el día 6 (Figura 4.4 B). Este comportamiento es similar al observado para la cepa haploide C9 (Figuras 3.3 A y B), aunque en este caso las diferencias eran menores, y como se ha comentado anteriormente, totalmente opuesto al observado durante el envejecimiento cronológico en condiciones de laboratorio (Figura 4.1 A). Para comprobar si esta disminución en la longevidad del mutante *sir2Δ* también se produce en otros fondos genéticos de levaduras vínicas, se realizó un experimento equivalente con la cepa comercial EC1118. Como puede comprobarse en la Figura 4.5 A y B, esta cepa es menos longeva en condiciones de vinificación (el final de la fase de muerte se adelanta a 14 días, en comparación de los 29 días de la cepa L2056, (véase la Figura 4.4 C). En esta cepa, el mutante *sir2Δ* alcanza un número de células superior al de la cepa parental y su longevidad es menor, por lo que esta sirtuina también ejerce su papel en cepas muy poco longevas, acortando aún más su LC.

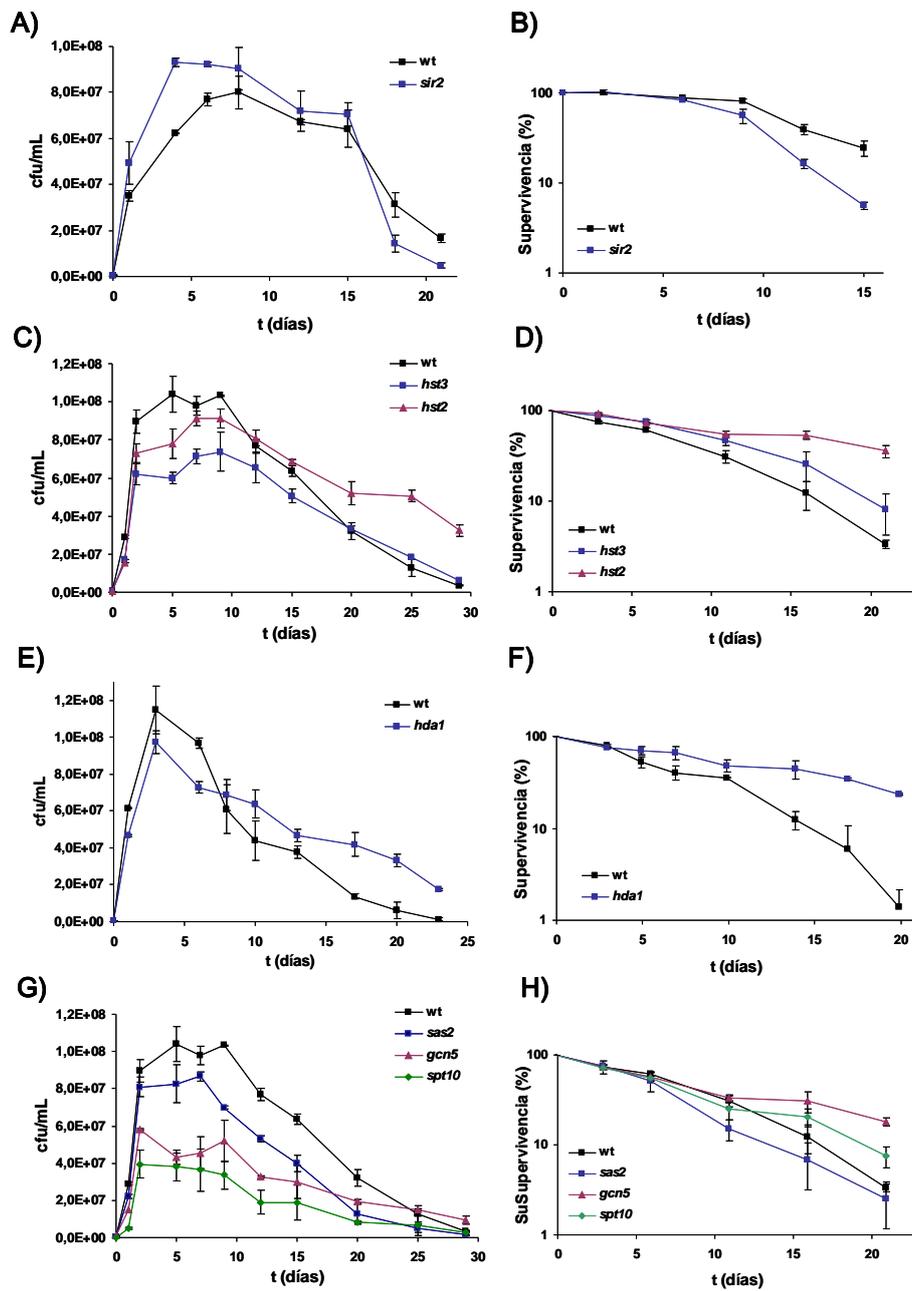


Figura 4.4. Curvas crecimiento y muerte celular durante el proceso de vinificación en mosto bobal (A, C, E, G) y curvas de longevidad cronológica (B, D, F, H) del wt y de los mutantes de genes de sirtuinas y acetiltransferasas en la cepa L2056. Los experimentos ser realizaron según lo descrito en la Figura 4.3.

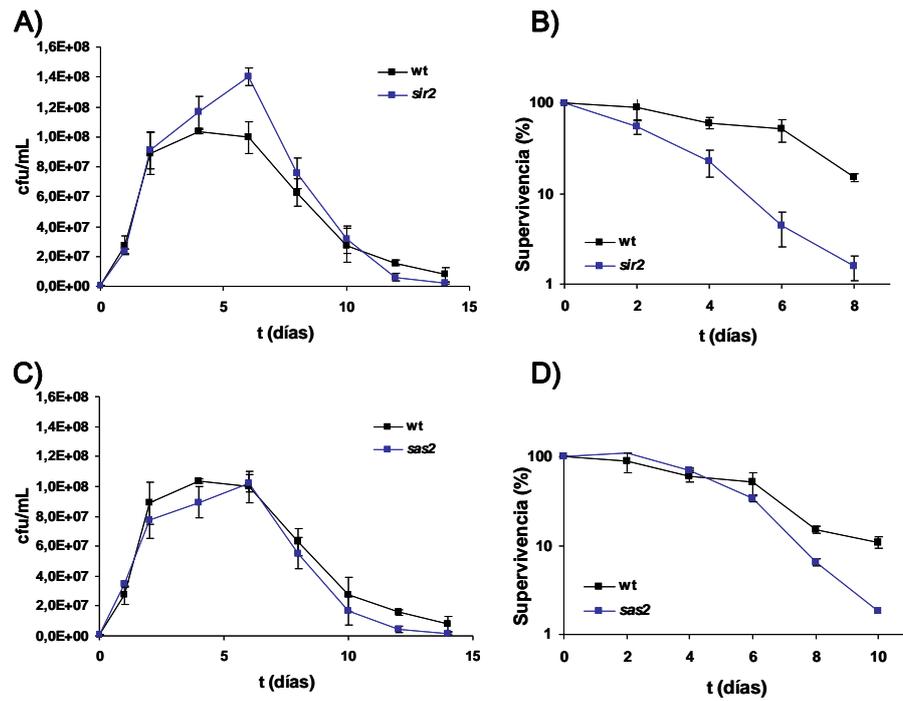


Figura 4.5 Curvas crecimiento y muerte celular durante el proceso de vinificación (A, C) y curvas de longevidad cronológica (B, D) del wt y los mutantes *sir2* y *sas2*Δ en la cepa EC1118. Los experimentos ser realizaron según lo descrito en la Figura 4.3.

Los mutantes de las sirtuinas *hst2*Δ y *hst3*Δ tienen un comportamiento contrario al de *sir2*Δ, ya que alcanzan un número menor de células (Figura 4.4 C) y presentan un perfil de muerte celular menos acusado, por lo que son más longevos (Figura 4.4 D). En este caso el resultado también coincide con lo visto en la cepa haploide C9 con respecto al mutante *hst3*Δ, y su aumento de longevidad coincide con lo visto en los experimentos de envejecimiento cronológico en condiciones de laboratorio (Figura 4.4 B). Sin embargo, el mutante *hst2*Δ, que no se había incluido en los experimentos de vinificación en C9, mostró un comportamiento de longevidad muy interesante, ya que al igual que *sir2*Δ, su longevidad es opuesta dependiendo

de las condiciones de estudio, siendo más longevo en condiciones de vinificación, y menos longevo en condiciones de laboratorio. Como ya se ha mencionado en el Apartado 4.2.1, estudios previos con cepas de laboratorio muestran diferencias de longevidad con respecto a estos mutantes, ya que Smith *et al.*, (2007) encuentra que el mutante *hst3Δ* tiene disminuida su longevidad, mientras el mutantes *hst2Δ* se comporta como la cepa silvestre.

El mutante de la desacetilasa Hda1p alcanza un número de células ligeramente inferior al de la cepa silvestre (Figura 4.4 E), pero su cinética de muerte celular es más lenta, y por lo tanto su longevidad está aumentada (Figura 4.4 F). Entonces, el patrón de longevidad en vinificación de este mutante es el mismo que en condiciones de laboratorio.

En cuanto a los mutantes de las acetiltransferasas, el mutante *sas2Δ* alcanza un número de células inferior y su longevidad se ve ligeramente disminuida en algunos puntos de la cinética de envejecimiento (Figura 4.4 G y H), tal y como se observó en la cepa haploide C9. El mutante *sas2Δ* también se estudió en la cepa EC1118 (Figura 4.5 C y D), observándose un patrón de crecimiento y longevidad similar al que se observa en L2056, aunque en este caso el acortamiento de la LC es más evidente. La disminución en el número máximo de células que se observa en los mutantes *gcn5Δ* y *spt10Δ* es mucho más clara, ya que alcanza un 45% y en un 62% respectivamente con respecto al parental (Figura 4.4 G). Sin embargo, su longevidad se ve claramente aumentada (Figura 4.4 H).

En conclusión, al igual que se ha observado con los mutantes de las sirtuinas Sir2p y Hst2p, los mutantes de las acetiltransferasas Sas2p, Gcn5p y Spt10p presentan un comportamiento opuesto en cuanto a su longevidad dependiendo de las condiciones de cultivo.

En muchos de los experimentos realizados en este apartado del trabajo, el resultado respecto a la longevidad es contrario en medios de laboratorio y en mosto natural, lo que indica que el crecimiento en condiciones diferentes tiene efectos determinantes sobre el proceso de envejecimiento. La composición del medio resultaría muy importante para comprender cómo se entra en el estado postmitótico, donde comienza la fase

de envejecimiento. Las diferencias entre un medio rico en nitrógeno y pobre en glucosa (SC) y un mosto rico en azúcares (con elevada presencia de fructosa) y limitante en fuentes nitrogenadas, pueden resultar fundamentales. Como se ha mencionado en diversas ocasiones, la composición del mosto de uva es mucho más compleja que la de los medios de laboratorio, pudiéndose encontrar compuestos naturales que regulen la función de determinadas proteínas implicadas en la longevidad. Un ejemplo que apoya esta idea es que los polifenoles presentes en el cacao inducen la expresión de *HST3* (Martorell *et al.*, 2011), por lo que determinados polifenoles presentes en el mosto podrían modular de manera diferencial la expresión y actividad de las sirtuinas durante el proceso de envejecimiento. La diferente oxigenación causada por la elevada producción de CO₂ durante la fermentación vínica también impone un estado metabólico radicalmente distinto en ambas condiciones. Respecto a la mitocondria, cabe indicar que existe la llamada respuesta retrógrada, que señala la disfunción de la mitocondria al núcleo vía una serie de factores transcripcionales que son regulados por Gcn5p, y que es responsable del aumento de la longevidad replicativa mediada por dicha respuesta retrógrada (Kim *et al.*, 2004). Esto podría explicar el diferente papel en longevidad de Gcn5p en condiciones de baja aireación.

En condiciones de laboratorio, el etanol y el glicerol producidos durante la fermentación se consumen durante la fase estacionaria (ver Introducción), mientras que al final de la vinificación esto no se produce y las células se encuentran en un medio con elevadas cantidades de etanol y glicerol, dos compuestos con un demostrado impacto en longevidad. Además, se ha demostrado que el pH del medio tiene un claro efecto en la longevidad en medios no tamponados, como el medio SC (Burtner *et al.*, 2009), mientras que el mosto contiene elevadas concentraciones de ácidos (tartárico, cítrico y málico), su pH permanece bajo y tamponado durante todo el proceso de vinificación (ver Figura 4.7), por lo que los procesos dependientes del pH que desencadenan el envejecimiento en condiciones de laboratorio, podrían no estar afectando a la longevidad en condiciones de vinificación.

Alternativamente, como las levaduras vínicas son protótrofas, podrían tener una regulación distinta de las rutas de biosíntesis de aminoácidos, lo cual daría lugar a patrones de longevidad muy distintos entre cepas de laboratorio y cepas vínicas, sobre todo en medios naturales, deficientes en nitrógeno, haciéndolas un modelo interesante y más versátil para estudiar aspectos metabólicos. Estos resultados nos llevan a la importancia de estudiar el proceso de envejecimiento celular durante la vinificación, que es la condición de crecimiento natural de las levaduras vínicas

4.2.2.2- Estudio transcripcional a nivel genómico del mutante *sir2Δ*

Con el fin de tener una visión más amplia del impacto de la delección de *SIR2*, se realizó un estudio transcripcional en condiciones de vinificación (6 días en mosto sintético MS300) de la cepa EC1118 y en el mutante *sir2Δ*. Se eligió este fondo genético porque actualmente se dispone de su secuencia genómica completa (Novo *et al.*, 2009). En este estudio, 110 genes aparecieron más expresados y 437 genes menos expresados en un factor de 2 o más en el mutante *sir2Δ* respecto a la cepa silvestre (Tabla 3.1). En cuanto a los genes más expresados en el mutante *sir2Δ*, únicamente estaba sobrerrepresentada una categoría funcional, la de reguladores transcripcionales implicados en el *mating*. Como era de esperar, al eliminar Sir2p se desreprimen los locus del *mating HML* y *HMR*, que se encuentran normalmente silenciados por acción de esta desacetilasa. Así pues, la mutación está ejerciendo la función esperada. Se ha observado que entre los genes más expresados muchos poseen una localización subtelomérica, lo que vendría a sugerir otra vez una regulación a nivel de zonas de heterocromatina antes que una regulación mediada por un sistema tradicional basado en factores de transcripción específicos. En cuanto a los genes menos expresados, no se encontró ninguna categoría específica, lo que vuelve a sugerir que no hay un cambio a nivel transcripcional detrás de los efectos de esta delección, y que posiblemente su efecto en longevidad haya que buscarlo a nivel postranscripcional. No obstante, no podemos descartar

el potencial efecto de la expresión de genes individuales. El transcrito más inducido en el mutante es el del gen *RAD57*, implicado en el proceso de reparación génica, y que interacciona genéticamente con *SIR2*, y cuya sobreexpresión podría alterar la capacidad de mantener la integridad genética de la célula.

Tabla 4.1. Genes expresados diferencialmente en el mutante *sir2Δ* durante la vinificación. A) Genes más expresados en el mutante respecto al silvestre. Se indican todos los genes inducidos por encima de un factor de 2.5. B) Genes menos expresados en el mutante respecto a la cepa parental. Se indican los diez genes más reprimidos.

A)

Categoría	Genes
Locus de <i>mating</i>	<i>HMLα2</i> (2.77), <i>HMRa1</i> (2.73), <i>HMRa2</i> (2.35), <i>MATa2</i> (2.68)
Genes subteloméricos	<i>GIN11</i> (3.03), <i>JLP1</i> (2.90), <i>VBA5</i> (2.88), <i>VBA3</i> (2.78), <i>AAD3</i> (2.59)
Otros	<i>RPS23B</i> (2.61), <i>SWP1</i> (2.59), <i>PET18</i> (2.55), <i>YPL277c</i> (2.55), <i>YDJ1</i> (2.54), <i>RFC4</i> (2.54), <i>RDH54</i> (2.51)

B)

Categoría	Genes
Otros	<i>RAD57</i> (3.60), <i>COG3</i> (3.51), <i>SEC2</i> (3.41), <i>AIM43</i> (3.35), <i>HXK1</i> (3.32), <i>ARP3</i> (3.25), <i>MND2</i> (3.25), <i>CDC21</i> (3.23), <i>SWE21</i> (3.22), <i>IRC7</i> (3.21)

4.2.2.3- Consumo de azúcares

Para determinar el impacto de las deleciones realizadas en el avance de la fermentación, se tomaron muestras a distintos tiempos y se determinaron los niveles de azúcares reductores. La vinificación se consideró terminada cuando la concentración de azúcares era inferior a 2 g/L. Como puede observarse en la Figura 4.6, todos los mutantes son capaces de fermentar por completo los azúcares presentes en el mosto, y por ello

terminar la vinificación, aunque se observan diferencias en cuanto a la velocidad de consumo. El mutante *sir2* Δ no presenta diferencias con respecto al tipo silvestre, habiendo consumido todos los azúcares a día 8 (Figura 4.6 A). El mutante *hst3* Δ (Figura 4.6 B) también consumen los azúcares con un perfil similar a su cepa parental (a los 9 días de la vinificación mostrada), mientras que el mutante *hst2* Δ presenta una velocidad de consumo ligeramente inferior a lo largo de la vinificación. El mutante *hda1* Δ (Figura 4.6 C) también consume los azúcares a una velocidad ligeramente menor que la

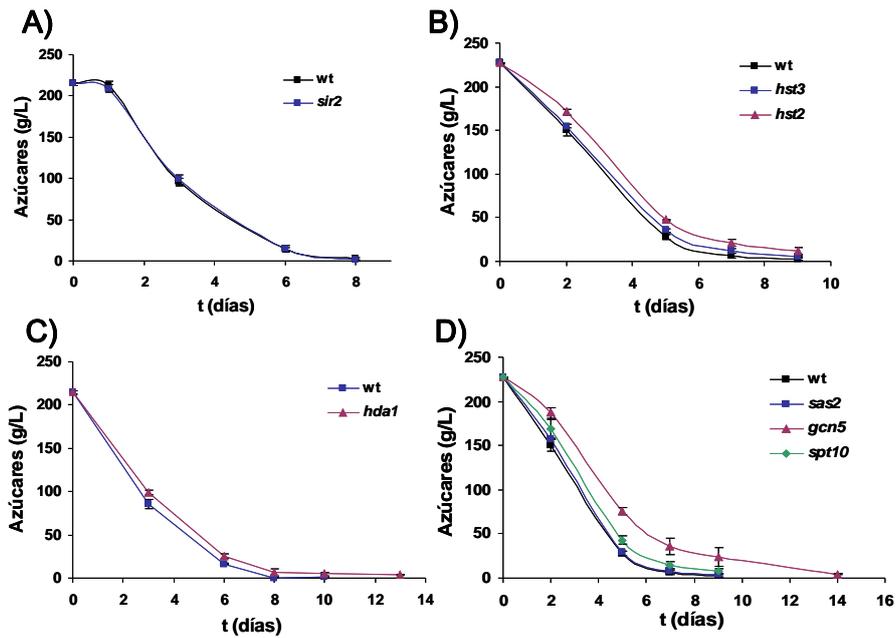


Figura 4.6. Determinación de azúcares reductores durante el proceso de vinificación de la cepa wt y los mutantes de genes de sirtuinas y acetiltransferasas en la cepa L2056. Las medidas se realizaron por triplicado y se muestra las medias y la DT.

cepa silvestre. Respecto a las acetiltransferasas, el mutante *sas2Δ* (Figura 4.6 D) consume los azúcares hacia el día 9, como la cepa silvestre, y el mutante *spt10Δ* presenta una velocidad de consumo ligeramente inferior al parental. El mutante que más diferencias muestra es *gcn5Δ*, cuya velocidad de consumo es notablemente inferior a la del parental y retrasa la totalidad del consumo hasta el día 14 (Figura 4.6 D).

Resulta interesante la comparación de estos resultados con los obtenidos en cuanto a la longevidad, ya que muchos de los mutantes que presentan una menor velocidad de consumo, son los más longevos (*hst2Δ*, *gcn5Δ* y *spt10Δ*). Esto concuerda con lo descrito en numerosos estudios que demuestran que bajas tasas metabólicas incrementan la longevidad cronológica.

4.2.2.4- Determinación de metabolitos

Como se ha descrito previamente en este trabajo, existen determinados metabolitos de importancia enológica que están directamente relacionados con la longevidad. Para determinar el impacto de la maquinaria de acetilación/desacetilación en su producción y la relevancia que tienen estos metabolitos en la LC en condiciones de vinificación, se ha determinado la concentración de etanol, glicerol, acetato y acetaldehído al final de cada una de las fermentaciones vínicas realizadas con los mutantes, tal y como se describe en Materiales y Métodos (Apartado 5). En la Figura 4.7 se muestran las concentraciones, relativas a la cepa silvestre, de estos metabolitos.

La concentración de etanol que se alcanza en las vinificaciones es de alrededor del 10-12 % (p/v), según la fermentación. Todos los mutantes producen esta elevada concentración de etanol, aunque se observan algunas diferencias entre los mutantes (Figura 4.7 A). Los mutantes *sir2Δ* y *hda1Δ* producen más etanol que la cepa silvestre (6 g/L y 7 g/L más respectivamente), y el mutante *hst3Δ* produce 7 g/L menos. En un principio estas diferencias pueden parecer sutiles, pero no lo son, ya que biotecnológicamente la producción de etanol por las levaduras está muy

optimizada. Como se ha descrito anteriormente en el Apartado 1.2.3 y en diversos estudios (Fabrizio *et al.*, 2005; Burtner *et al.*, 2009), el etanol ejerce un papel negativo sobre la LC y en cuanto a los mutantes *sir2Δ* y *hst3Δ* su producción se correlaciona con su longevidad, aunque esta concordancia no se observa en todos los mutantes, puesto que el mutante *hda1Δ* acumula significativamente más etanol, pero es también más longeva.

En cuanto al glicerol, también se considera muy significativo que se produzca un pequeño incremento en su producción, ya que se trata de un compuesto muy valorado en la industria vínica porque otorga el cuerpo al vino. En cuanto a su papel en la LC, se ha descrito que una variación de sólo 40 mg/L de glicerol en el medio aumenta la longevidad en cepas de laboratorio (Wei *et al.*, 2009). En nuestras condiciones, la cepa parental produce alrededor de 6 g/L de glicerol, que es la concentración que normalmente se encuentra presente en los vinos. Como puede observarse en la Figura 4.7 B los mutantes *hda1Δ*, *gcn5Δ* y *spt10Δ* aumentan significativamente el contenido en glicerol del medio, sobre todo *gcn5Δ* y *spt10Δ*, que aumentan su concentración más de 1 g/L. Este aumento del contenido en glicerol de estos mutantes podría ser la causa de su extensa longevidad. La acumulación de glicerol puede ser importante al principio de la vinificación, puesto que se trata de un osmolito compatible que protege frente al estrés osmótico causado por la alta concentración de azúcares en el mosto. Diversos trabajos demuestran que el estrés osmótico aumenta la longevidad debido a la activación de mecanismos de protección frente al estrés (Smith *et al.*, 2007; Murakami *et al.*, 2008), y estos mecanismos podrían estar relacionados con la biosíntesis del glicerol.

El ácido acético y el acetaldehído también tienen importancia enológica debido a su efecto no deseado en el aroma del vino y, en relación con la longevidad, se ha descrito que el ácido acético la reduce (Fabrizio *et al.*, 2005; Burtner *et al.*, 2009). Como hemos visto en el Apartado 1, el acetaldehído también posee la capacidad de reducir la LC. En nuestras condiciones, la cepa L2056 produce alrededor de 0.4 g/L de acetato y como puede observarse en la Figura 4.7 C existe una gran variedad en cuanto a la

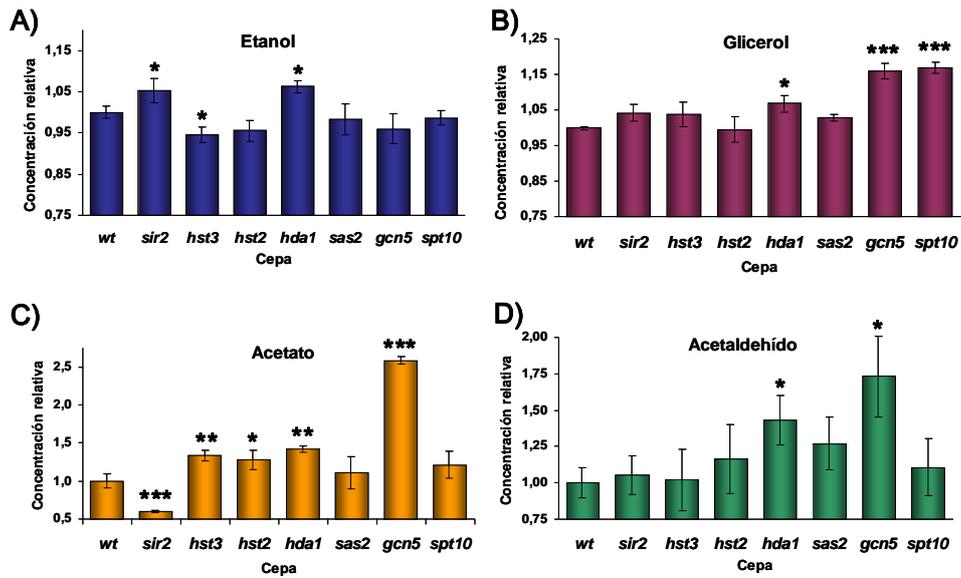


Figura 4.7. Determinación de la concentración relativa de metabolitos al final del proceso de vinificación en mosto bobal en el wt y en los mutantes de genes de sirtuinas y acetiltransferasas en la cepa L2056. (A) Determinación de etanol, (B) Determinación de glicerol, (C) Determinación de acetato, (D) Determinación de acetaldehído. Se indica con asteriscos las diferencias estadísticamente significativas de las medias de los mutantes con respecto a la cepa wt (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$).

producción de este ácido en los mutantes. El mutante *sir2* Δ produce la mitad de acetato que la cepa parental y los mutantes *hst3* Δ , *hst2* Δ , *hda1* Δ y *gcn5* Δ presentan una producción de acetato incrementada, siendo extremadamente alta la producción observada en *gcn5* Δ (hasta 2.5 veces más). La determinación de acetaldehído presenta más variabilidad experimental debido a las bajas concentraciones de este metabolito que complican su medida (en torno a 0.04 g/L en la cepa silvestre). Sin embargo, resulta evidente que los mutantes *hda1* Δ y *gcn5* Δ producen también concentraciones elevadas de este compuesto (Figura 4.7 D).

Estos resultados indican que en condiciones de vinificación, el ácido acético no parece ser un agente inductor del envejecimiento, ya que las

cepas con mayor producción de acetato son las más longevas, y el mutante *sir2Δ* es menos longevo a pesar de producir menos acetato. El efecto del acetato en el envejecimiento se ha relacionado con la disminución del pH del medio ocasionado por el metabolismo (Burtner *et al.*, 2009). Como se ha mencionado anteriormente, el mosto contiene una elevada concentración de ácidos que le confieren un pH bajo (de 3.2 en el mosto bobal utilizado en este trabajo) y además una gran capacidad tamponadora. Como puede observarse en la Figura 4.8, el pH del medio se mantiene entre 3.2 y 3 durante todo el proceso de vinificación. Esto también se observa en el mutante *gcn5Δ*, que mantiene el pH del medio constante a pesar de su elevada producción de acetato. Esto indica que el acetato no tiene un papel clave en el control de la LC en un medio tamponado.

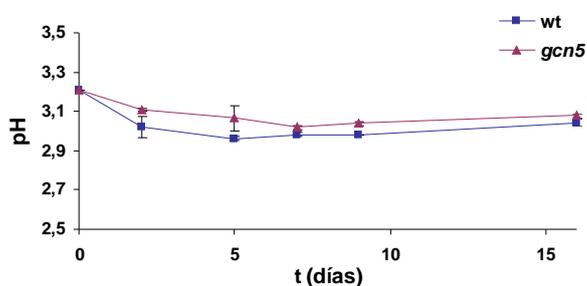


Figura 4.8. Determinación del pH del medio en la cepa wt y el mutante *gcn5Δ* durante el proceso de vinificación en la cepa L2056. Las medidas se realizaron por triplicado y se muestra las medias y la DT.

La baja producción de acetato del mutante *sir2Δ* resulta muy interesante biotecnológicamente, ya que como se ha mencionado anteriormente, provoca consecuencias negativas en las propiedades organolépticas del vino. Por ello también se determinó su concentración en la cepa comercial EC1118 para ver si este resultado se extiende de manera general independientemente de la cepa, y como se observa en la Figura 4.9,

también en este fondo genético el mutante produce significativamente menos acetato. La producción de etanol y glicerol no muestra diferencias significativas (datos no mostrados).

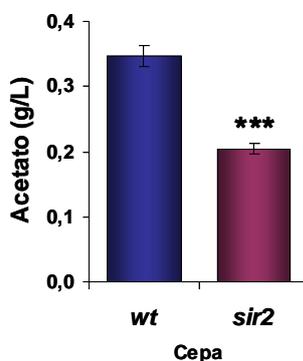


Figura 4.9. Determinación de acetato en el wt y el mutante *sir2* en la cepa EC1118 durante el proceso de vinificación. Se indica con asteriscos la diferencia estadísticamente significativa de la media del mutante con respecto a la cepa wt (***) $p < 0.005$.

Debido a que la delección de *GCN5* causó un gran efecto en el metabolismo, produciendo un importante incremento en glicerol y acetato, se estudió más detalladamente la producción de estos metabolitos a lo largo de la fermentación vínica. Durante la vinificación, la producción de acetato y de glicerol se produce al principio de la vinificación y no se consumen una vez termina la fase fermentativa, siendo su concentración constante a lo largo del tiempo (Figura 4.10 A y B). El mutante *gcn5*Δ acumula acetato a una velocidad mayor al de la cepa silvestre, alcanzando la alta concentración propia de este mutante a los 6-7 días. Con respecto al glicerol, la producción inicial en el mutante *gcn5*Δ es más baja, pero a partir del segundo día su velocidad aumenta y por ello acumula significativamente más que el parental.

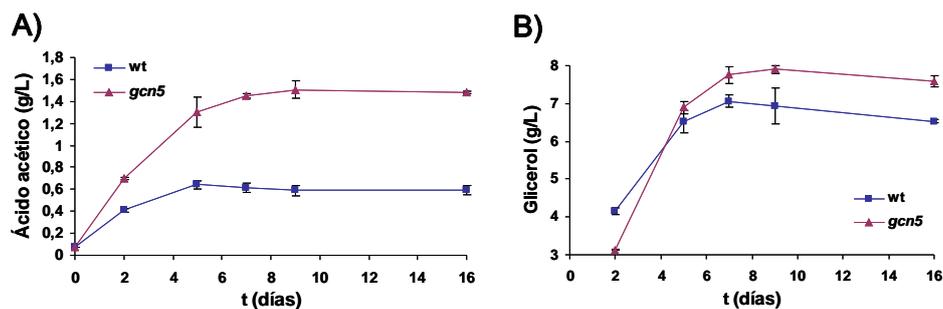


Figura 4.10. Determinación de ácido acético (A) y glicerol (B) en el wt y el mutante *gcn5* Δ de la cepa L2056 durante el proceso de vinificación en mosto bobal. Las medidas se realizaron por triplicado y se muestra las medias y la DT.

Para comprobar si la elevada producción de acetato y de glicerol del mutante *gcn5* Δ es una característica general que también manifiesta en otras condiciones de crecimiento, se determinó la concentración de estos metabolitos en medio de laboratorio SC a tiempo 1 día de envejecimiento cronológico (t1 de LC) (condiciones descritas en el Apartado 4.1). Como puede observarse en la Figura 4.11 A, el mutante *gcn5* Δ también acumula una mayor cantidad de acetato en estas condiciones, de manera que en este caso la elevada producción de acetato sí que se relaciona con su menor longevidad (Figura 4.1 D). La producción de glicerol en medio SC es muy inferior a la producida durante el proceso de vinificación (Figura 4.11 B), pero no hay diferencias entre el mutante y la cepa parental, por lo que la mayor acumulación en el mutante *gcn5* Δ parece ser algo específico del proceso de vinificación y provocada por el estrés osmótico inicial, como se ha mencionado anteriormente.

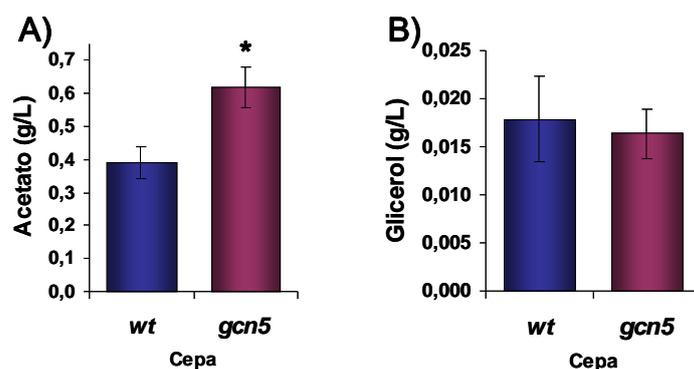


Figura 4.11. Determinación de ácido acético y glicerol en el wt y el mutante *gcn5* Δ de la cepa L2056 en medio de laboratorio SC a tiempo 1 día de envejecimiento cronológico. Se indica con asteriscos las diferencias estadísticamente significativas de las medias del mutante con respecto a la cepa wt (* $p < 0,05$).

4.2.2.5- Determinación de actividades enzimáticas

A continuación se estudió si las diferencias observadas en la producción de metabolitos entre los mutantes son debidas a cambios en la actividad enzimática de proteínas clave del metabolismo de compuestos de dos carbonos. Para ello se escogieron dos mutantes de sirtuinas (*sir2* Δ y *hst3* Δ) y dos mutantes de acetiltransferasas (*sas2* Δ y *gcn5* Δ) que resultaron más interesantes en la producción de estos metabolitos y se realizaron experimentos de vinificación. En este caso se escogió la utilización de mosto sintético para evitar efectos de los polifenoles presentes en el mosto natural sobre la actividad de enzimas como la alcohol o la aldehído deshidrogenasas ya que se ha descrito que se ven afectadas por la presencia de algunos de ellos, como el resveratrol o la quercetina (Kitson *et al.*, 2001; Miura *et al.*, 2002; Apartado 1.2.1) Las vinificaciones se realizaron tal y como se describe en el Apartado (2.2.2) de Materiales y Métodos, y se fueron tomando muestras a distintos tiempos para determinar los niveles de azúcares reductores con el fin de seguir la evolución de las fermentaciones y comprobar que el adecuado comportamiento de los mutantes. Se escogieron

dos puntos de estudio (señalados con una flecha en la Figura 4.12), uno al principio de la vinificación, cuando las células se están dividiendo exponencialmente, t_1 (24 horas tras el inóculo de las células en el mosto), y otro punto que corresponde a la entrada en fase estacionaria y el comienzo de la fase de muerte celular, t_5 (5 días tras el inóculo). El perfil de crecimiento y muerte celular durante la vinificación en mosto sintético es muy similar al que ocurre en el mosto bobal (Figura 4.12) y el comportamiento en cuanto a longevidad de los mutantes es el mismo (resultados no mostrados, pero puede comprobarse la longevidad del mutante *gcn5* Δ en mosto bobal de la Figura 4.4 G con la del mosto sintético de la Figura 4.27).

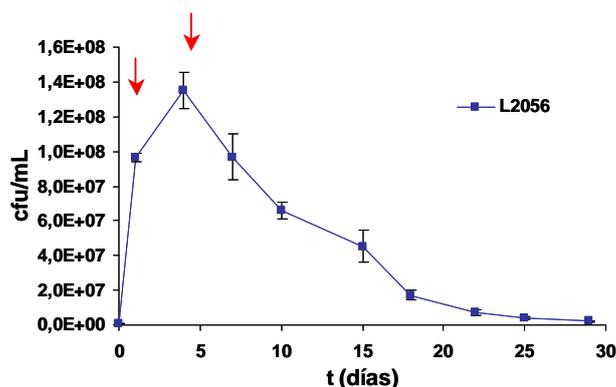


Figura 4.12. Curva de crecimiento y muerte celular durante el proceso de vinificación de la cepa L2056 en mosto sintético. Se determinó el número de células viables (cfu/mL) por recuento en placa a distintos tiempos de vinificación. Los experimentos se realizaron como mínimo por triplicado y se muestra las medias y la (DT).

En la fermentación alcohólica, la molécula de piruvato producido en la glicólisis es escindida en acetaldehído y dióxido de carbono por el enzima piruvato descarboxilasa (Pdc), (ver Anexo 1, donde se muestra un esquema de las reacciones metabólicas estudiadas en este trabajo). Tal y como se muestra en Figura 4.13 A y B, no se observaron diferencias importantes en la actividad Pdc, aunque los mutantes *hst3* Δ y *gcn5* Δ presentan un ligero

aumento tanto en t1 como en t5. Esto podría explicar el aumento en la concentración de acetaldehído encontrado en el mutante *gcn5Δ*.

El acetaldehído es principalmente transformado en etanol por las alcohol deshidrogenasas (Adh) durante la fermentación, aunque parte se desvía a la formación de acetato por las aldehído deshidrogenasas (Ald). La actividad Adh es similar en t1 en todos los mutantes (Figura 4.13 C). A t5 únicamente el mutante *hst3Δ* muestra un aumento significativo con respecto a los demás mutantes (Figura 4.13 D). El mutante *sir2Δ* también muestra un aumento en la actividad Adh tanto a t1 como a t5, (aunque no se ha conseguido obtener un valor significativo estadísticamente). Este aumento en

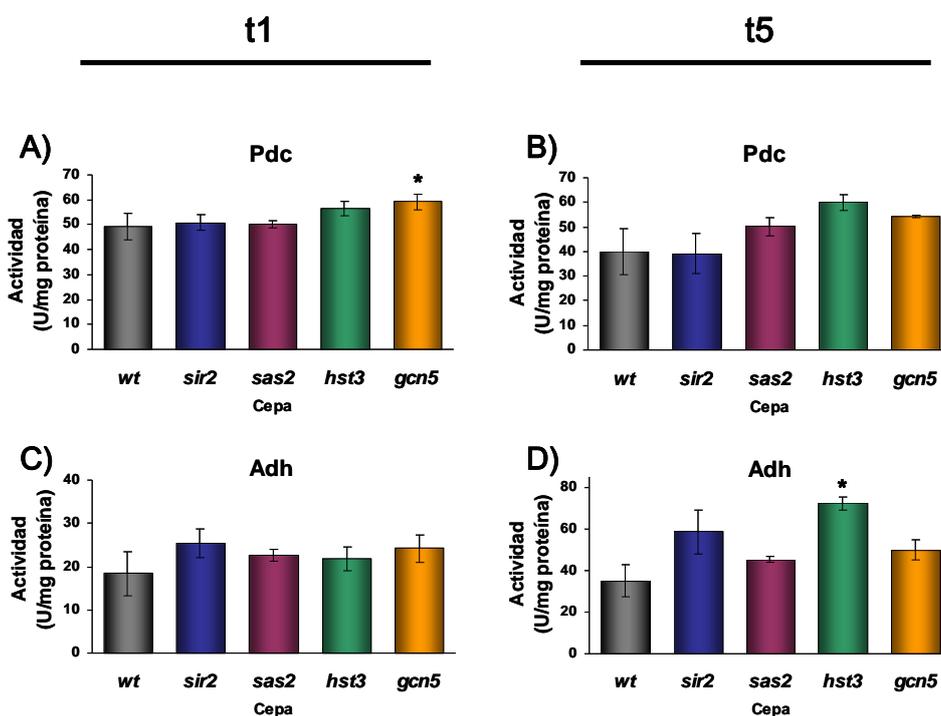


Figura 4.13. Determinación de actividades enzimáticas Pdc y Adh, a t1 y a t5 de vinificación en mosto sintético del wt y de los mutantes de las sirtuinas *sir2Δ* y *hst3Δ* y de las acetiltransferasas *sas2Δ* y *gcn5Δ* en la cepa L2056. Se indica con asteriscos las diferencias estadísticamente significativas de las medias de los mutantes con respecto a la cepa wt (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$).

la actividad puede reflejar el hecho de que este mutante tiene mayor actividad Adh2 en condiciones de laboratorio (Fabrizio *et al.*, 2006), enzima relacionada con la respiración del etanol en estos medios.

Para comprobar si el aumento de la actividad Adh en el mutante es debido a su efecto sobre Adh2p, se procedió a medir la actividad de esta enzima individualmente, inactivando térmicamente a Adh1p (tal y como se describe en Materiales y Métodos, Apartado 4.4.1), y como puede observarse en la Figura 4.14 A, el mutante *sir2* Δ tiene mayor actividad Adh2p tanto a t1 como a t5.

Debido a que tras la vinificación el etanol no se consume, como ocurre en condiciones de laboratorio, donde el papel de Adh2p consiste principalmente en el consumo de este metabolito, estos resultados indican que Adh2p, al igual que Adh1p, tiene un importante papel en la producción de etanol durante la vinificación. Esto podría explicar que la mayor actividad Adh2 provoque el aumento en la concentración de etanol descrita para el mutante *sir2* Δ (Figura 4.6 A).

Para obtener una visión más detallada de la actividad de ambas isoenzimas en cepas vínicas durante la fermentación, se realizó un zimograma para detectar la actividad Adh en los mutantes en *SIR2* y *SAS2* en los fondos C9, EC1118 y L2056 (Figura 4.14 B). La cepa comercial EC1118 presenta una única banda de actividad, mientras que en la otra cepa comercial, L2056, la actividad ADH se resuelve en un quintuplete de bandas. Teniendo en cuenta que las isoenzimas mayoritarias adoptan la forma de tetrámero, parece que en la cepa L2056 hay dos alelos de diferentes características que se combinan para dar 5 complejos diferentes. La cepa C9 es haploide y por ello presenta un solo tipo de agregado, el de mayor migración. En las cepas industriales no se detectó ningún cambio en el patrón de bandas en los mutantes probados. Sin embargo, en el mutante *sir2* Δ de la cepa C9 sí que aparece una banda minoritaria de menor migración, que según estudios en cepas de laboratorio (Fabrizio *et al.*, 2005), debería corresponder con una activación de Adh2p.

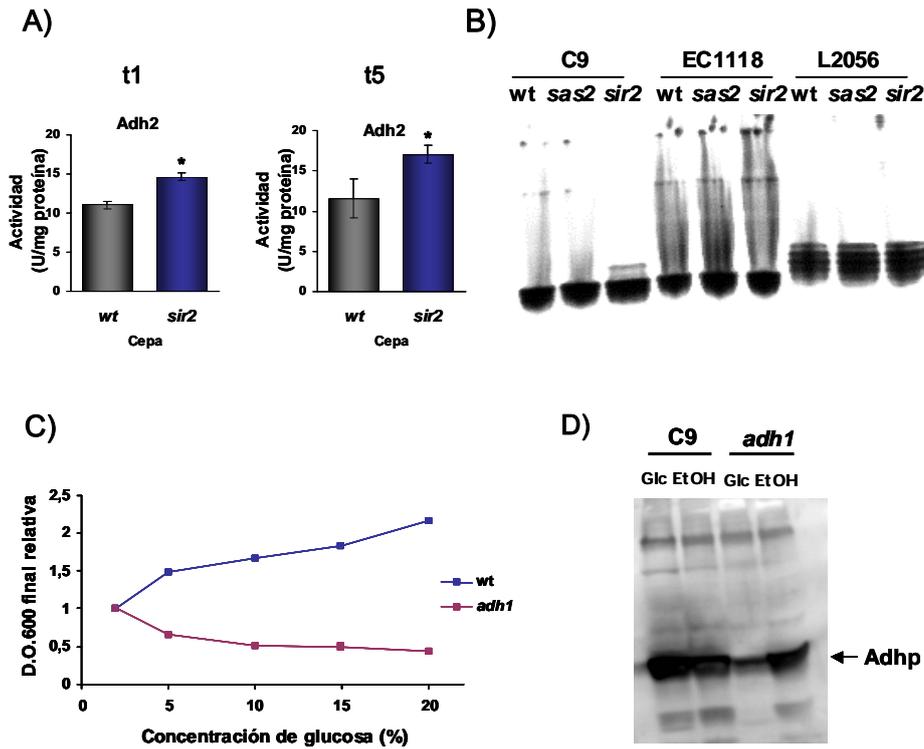


Figura 4.14. Estudio de los isoenzimas de Adhp. (A) Determinación de la actividad enzimática Adh2 a t1 y a t5 de vinificación en mosto sintético del wt y del mutante *sir2* Δ en la cepa L2056. Se indica con asteriscos las diferencias estadísticamente significativas de la media del mutante con respecto a la cepa wt (* $p < 0.05$). (B) Determinación de la actividad ADH mediante zimograma en los mutantes *sir2* Δ y *sas2* Δ en C9, EC1118 y L2056. (C) DO₆₀₀ final relativa a 2% de glucosa después del crecimiento en YPD con cantidades crecientes de glucosa para las cepas C9 y C9 *adh1* Δ . (D) Determinación de los niveles de Adhp mediante *Western blot* y posterior inmunodetección con el anticuerpo anti-Adh, en diversas condiciones de crecimiento: en YPD (GLC) e YPEtanol (EtOH) para las cepas C9 y C9 *adh1* Δ .

Para continuar con el estudio del papel de las Adh durante la vinificación, se procedió a deleccionar el gen de la principal isoenzima implicada en la fermentación alcohólica, *ADH1* (de Smidt *et al.*, 2008), en la cepa C9, pero este mutante fue incapaz de crecer en mosto (datos no

mostrados), demostrando el papel esencial de esta proteína en la fermentación alcohólica, que no puede ser sustituido por el resto de actividades Adh (existen hasta siete genes *ADH* en el genoma de levadura). Entonces, se realizó un estudio de crecimiento con este mutante en YPD con diversas concentraciones de glucosa, del 2% al 20% y se midió la D.O.₆₀₀ final tras una semana de crecimiento. A 2% la densidad óptica fue similar, 7 en la cepa C9 y 5,7 en el mutante *adh1Δ*. Pero conforme aumenta la concentración de azúcares, la cepa parental es capaz de producir más biomasa que el mutante (se tomó el valor de 2% de glucosa como referencia y se hicieron relativos a él el resto de medidas, Figura 4.14 C). Esto indicaría que la excesiva producción de acetaldehído o el grave desequilibrio redox durante la fermentación, es negativo para el crecimiento de la cepa sin Adh1p.

Por último, se analizó mediante *Western blot* los niveles de Adh1p del mutante cultivado en YP con glucosa (GLC) o etanol (EtOH) como fuente de carbono. Se observó que en el crecimiento con etanol, otras isoenzimas (posiblemente Adh2p) son capaces de compensar la pérdida de Adh1p, pero en el crecimiento con glucosa, el déficit es notable (Figura 3.14 D), y como se ha visto en este estudio, nocivo para la célula. Así pues, el patrón de isoenzimas de las Adh es variado en cepas vínicas, pero Adh1p es la principal responsable de la fermentación alcohólica y no puede ser sustituida por Adh2p, aunque la modulación de la actividad Adh2p por Sir2p puede tener un impacto menor, pero significativo en la producción final de etanol. Estos datos sugieren que es interesante identificar y estudiar el comportamiento de los diversos alelos de *ADH* que presenta la cepa L2056 para caracterizar cuales podrían ser más relevantes para modular la producción de etanol en vinificación.

Se continuó con el estudio de las actividades enzimáticas en condiciones de vinificación. La actividad aldehído deshidrogenasa que se produce cuando las células crecen en glucosa es debida principalmente a la isoenzima citosólica Ald6p, dependiente de K⁺, mientras que la actividad de la isoenzima mitocondrial Ald4p dependiente de Mg²⁺ es menos importante

durante la fermentación (Remize *et al.*, 1998). Se midió la actividad Ald6 y se observó que en el mutante *gcn5* Δ se produce un aumento tanto a t1 (Figura 4.15 A) como a t5 (Figura 4.15 B), siendo muy importante en este último tiempo. Este gran incremento en la actividad de la enzima Ald6p, podría

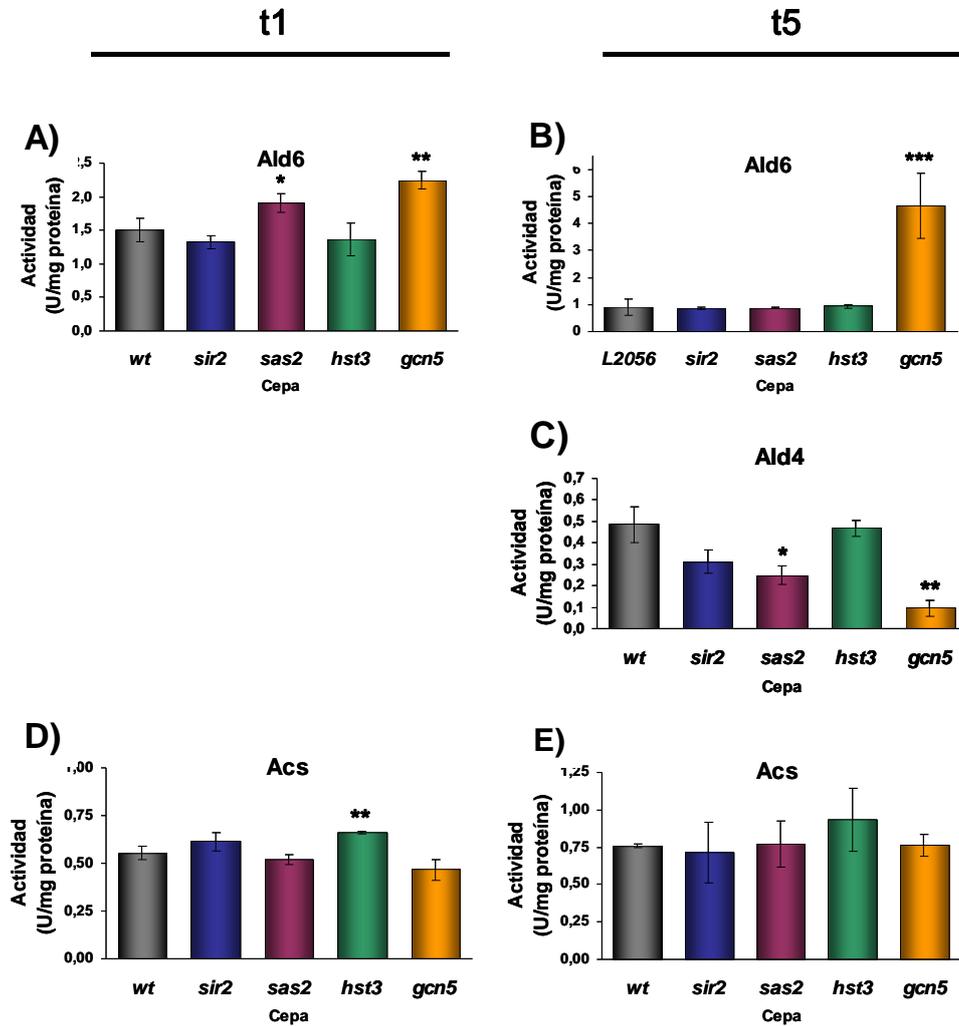


Figura 4.15. Determinación de actividades enzimáticas Ald6, Ald4 y Acs, a t1 y a t5 de vinificación en mosto sintético del wt y de los mutantes de las sirtuinas *sir2* Δ y *hst3* Δ y de las acetiltransferasas *sas2* Δ y *gcn5* Δ en la cepa L2056. Se indica con asteriscos las diferencias estadísticamente significativas de las medias de los mutantes con respecto a la cepa wt (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$).

explicar los altos niveles de acetato producidos por este mutante. Sin embargo, al medir la actividad Ald4p a t5, (a t1 se comprobó que no se detecta actividad de este enzima reprimible por glucosa), se observó un comportamiento contrario (Figura 4.15 C), reforzando la idea de que la actividad citosólica es más determinante que la mitocondrial en cuanto a la producción de acetato durante la fermentación alcohólica. Cabe destacar con respecto a la actividad Ald6p que se produce una inactivación del enzima a t5 con respecto a t1, pero el mutante *gcn5Δ* presenta un comportamiento totalmente contrario, ya que incluso aumenta su actividad. Esto parece indicar que el papel de Gcn5p está relacionado con la inactivación del enzima. Estos resultados demuestran que la elevada actividad de Ald6p y la elevada producción de ácido acético no impiden al mutante *gcn5Δ* tener una mayor longevidad en condiciones de vinificación. Quizás, en estas condiciones, la represión de la función de Ald4p sea más significativa. Se ha determinado que en condiciones de laboratorio la delección de *ALD4* extiende la longevidad (Laschober *et al.*, 2010). Así pues, la concentración de ácido acético localizada en la mitocondria podría ser más relevante que su producción global, que se debe mayoritariamente a la función citosólica de Ald6p.

El mutante *sas2Δ* también presenta mayor actividad de Ald6p a t1 y menor de Ald4p a t5, (Figura 4.15 A y C), aunque su impacto es menor que el mutante *gcn5Δ* (y no repercute en cambios en la producción de acetato ni de acetaldehído).

Finalmente, el acetato puede ser asimilado mediante la formación de acetyl-CoA por las acetyl-CoA sintetasas (Acs). No se observaron diferencias en esta actividad entre los mutantes, excepto un pequeño aumento en *hst3Δ* (Figura 4.15 D y E), probablemente debido a que existe algún tipo de redundancia en el control de estos enzimas por parte de las sirtuinas y no se ha podido detectar con mutantes simples.

Debido al cambio tan importante en la actividad Ald observado en el mutante *gcn5Δ* a t5 del proceso de vinificación, se procedió a comprobar si este efecto se producía también durante experimentos de LC en medio de

laboratorio SC, ya que en estas condiciones también se observó que se producía un aumento en la concentración de acetato (Figura 4.11 A). Se midió la actividad Ald4p y Ald6p a t1 de LC (condición descrita en el Apartado 4.1), encontrando también un incremento en la actividad Ald6p y un descenso en la actividad Ald4p en el mutante *gcn5* Δ , aunque las diferencias son menores respecto a lo observado en vinificación (Figura 4.16 A y B). Esto parece indicar que el control sobre la actividad Ald se realiza independientemente de las condiciones de cultivo.

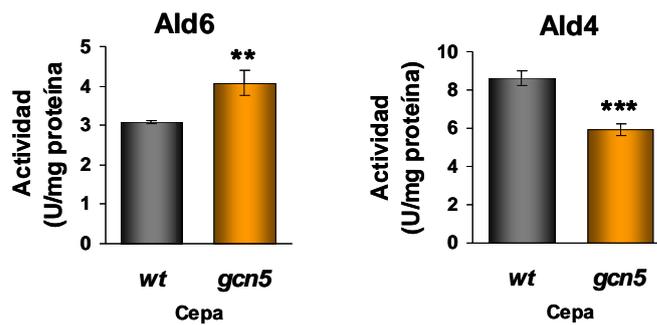


Figura 4.16. Determinación de la actividad enzimática Ald4 y Ald6 en medio de laboratorio, a t1 de CLS del wt y del mutante *gcn5* Δ en la cepa L2056. Se indican con asteriscos las diferencias estadísticamente significativas de la media del mutante con respecto a la cepa wt (** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$).

Como el aumento en la concentración de acetato del mutante *gcn5* Δ se corresponde con un aumento en su actividad Ald6p, se estudió si esta relación se da también para el glicerol, cuya concentración también se ve notablemente aumentada durante el proceso de vinificación (Figura 4.7 B) y la actividad de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, que cataliza el primer y limitante paso en la biosíntesis del glicerol. Sin embargo, la determinación de esta actividad enzimática no mostró diferencias significativas entre el mutante y la cepa parental (resultados no mostrados).

Los resultados obtenidos con el estudio de las actividades enzimáticas revelan la existencia de una compleja regulación del metabolismo fermentativo por parte de las sirtuinas y las acetiltransferasas, regulación que afecta a la síntesis de metabolitos implicados en estas rutas, y que están relacionados con la longevidad. En esta compleja regulación, Gcn5p parece ser clave.

4.3- Estudio de la acetilación de proteínas distintas a las histonas por las sirtuinas y las acetiltransferasas

Como se ha mencionado anteriormente, cada vez hay más evidencias de que la maquinaria de acetilación y desacetilación celular puede controlar el metabolismo mediante modificación directa de los enzimas metabólicos. Por ello, y debido al importante efecto en la actividad enzimática observado previamente en nuestros estudios con determinados mutantes de sirtuinas y acetiltransferasas, se ha pretendido caracterizar si los enzimas metabólicos Adh, Ald4p y Ald6p son susceptibles de sufrir modificación postraducciona por acetilación por parte de alguna de las sirtuinas o acetiltransferasas estudiadas en este trabajo.

Se realizó una primera aproximación para describir si se producen cambios en el nivel de acetilación global en alguno de los mutantes de sirtuinas y acetiltransferasas. Para ello se realizó un experimento de vinificación en mosto bobal con los mutantes de sirtuinas *sir2Δ*, *hst3Δ*, *hst4Δ* y los dobles *sir2Δhst3Δ*, *sir2Δhst4Δ* y *hst3Δhst4Δ* y con el mutante de acetiltransferasa *sas2Δ* en la cepa C9. Se recogieron células a los 5 días de vinificación, se realizó una extracción de proteína total y se analizó el patrón de acetilación de las muestras mediante *Western blot* con un anticuerpo anti-acetil lisinas (anti-Lys AC), que reconoce las lisinas acetiladas en ϵ .

En la Figura 4.17 (A) puede observarse que el patrón de acetilación general difiere entre los mutantes. La banda que corresponde a las histonas

se encuentra en la parte inferior de la imagen (señalado con una **H**), y también muestra diferencias entre mutantes, ya que en el mutante *sas2* Δ está muy disminuida, lo cual se relaciona con la importante función que realiza esta acetiltransferasa en la regulación del nivel de acetilación de las histonas. Respecto a proteínas no-histona, se produce un aumento considerable en el nivel de acetilación de proteínas de entre 25 y 50 kDa en los mutantes de sirtuinas, sobre todo en *hst4* Δ . Es particularmente curioso el caso de un doblete de alrededor de 24 kDa, que se presenta muy disminuido en el mutante *sas2* Δ , pero también en menor medida en el mutante *hst3* Δ y sus combinaciones. Con este resultado, se podría especular que estas proteínas son acetiladas directamente por Sas2p, pero el efecto de Hst3p debe de ser indirecto, lo que sugiere una compleja red de regulación postraduccional. Estas proteínas que aparecen en los mutantes de sirtuinas con un mayor nivel de acetilación podrían tener su actividad regulada mediante procesos de acetilación/desacetilación por parte de las sirtuinas y acetiltransferasas, por lo que se hizo interesante continuar con los estudios para describir este proceso.

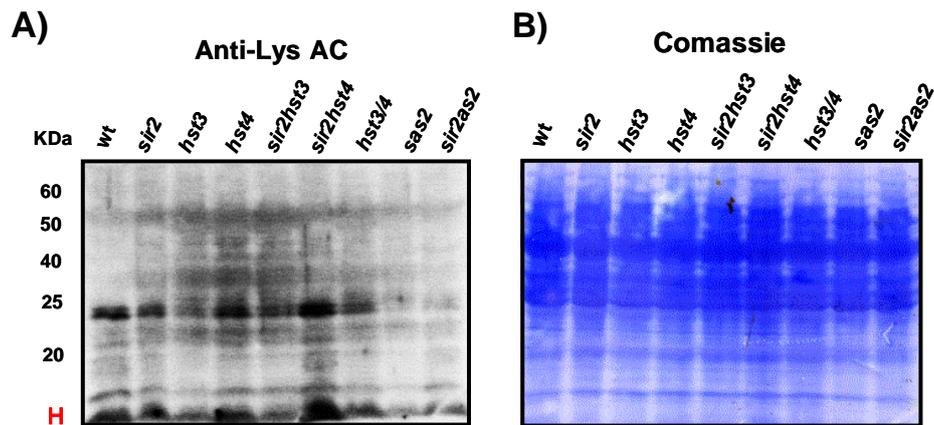


Figura 4.17. Patrón de acetilación de mutantes de sirtuinas y de la acetiltransferasa Sas2p en la cepa C9 a los 5 días de la vinificación en mosto bobal. Panel A, *Western blot* anti-Lys AC, Panel B, tinción de la membrana con azul Comassie utilizado como control de carga de proteínas.

Para estudiar si se produce alguna modificación específica por acetilación en las enzimas Adh1/2p o Ald4/6p, se procedió a realizar experimentos de inmunoprecipitación con muestras proteicas obtenidas en las mismas condiciones del punto anterior, con los mutantes de sirtuinas y acetil transferasas de la cepa C9. Para ello se utilizó la técnica *pull down*, donde se utilizan microesferas de agarosa (proteinA-Agarose) y anticuerpos específicos contra las proteínas que se quieren inmunoprecipitar (anti-Adh y anti-Ald), tal y como se describe en Materiales y Métodos (Apartado 4.3). Posteriormente, mediante la realización de *Western blot*, se analiza la existencia de bandas de acetilación mediante la hibridación con un anticuerpo anti-Lys AC, que reconoce las lisinas acetiladas en ϵ . De esta forma se realizaron numerosos experimentos con los distintos mutantes y en diferentes condiciones, tanto de vinificación, como en condiciones de laboratorio. Únicamente en el mutante *hst3Δhst4Δ* pudo detectarse en diversas ocasiones una banda de acetilación diferencial con respecto a la cepa control que inmunoprecipitaba con el anticuerpo anti-Ald. En la Figura 4.18 A se muestra el patrón de acetilación de la cepa silvestre y el mutante *hst3Δhst4Δ*, al incubarse con anti-LysAC. Puede observarse que en el mutante se produce un incremento en la señal de acetilación de una banda (señalada con *) que migra próxima, pero por encima de la banda correspondiente a Ald (señalada con un °) (Figura 4.18 C). Esto nos está indicando que al inmunoprecipitar la proteína Ald, aparece otra banda correspondiente a otra proteína distinta que sí que parece estar hiperacetilada en el mutante *hst3Δhst4Δ*. Esta proteína podría estar interaccionando con alguna de las proteínas Ald, y quizá modulando su actividad, por lo que parecía interesante caracterizar de qué proteína se trataba. Por este motivo se intentó secuenciar la banda correspondiente, pero como puede observarse en la Figura 4.18 B, al teñir el gel con plata para proceder a su secuenciación, la cantidad de proteína es mínima y fue imposible su análisis tras repetidos intentos de mejora.

Así pues, con las técnicas utilizadas en este trabajo no ha sido posible detectar ninguna modificación por acetilación de los enzimas

metabólicos por parte de la maquinaria de acetilación/desacetilación celular. Pero no se descarta que con la realización de otras técnicas que puedan funcionar mejor en estas condiciones se pueda caracterizar dichas modificaciones, como por ejemplo la utilización de electroforesis bidimensionales, que gracias a su poder resolutivo y al mismo tiempo de concentración de la muestra, podría hacer más fácil la identificación de proteínas acetiladas y su posterior secuenciación.

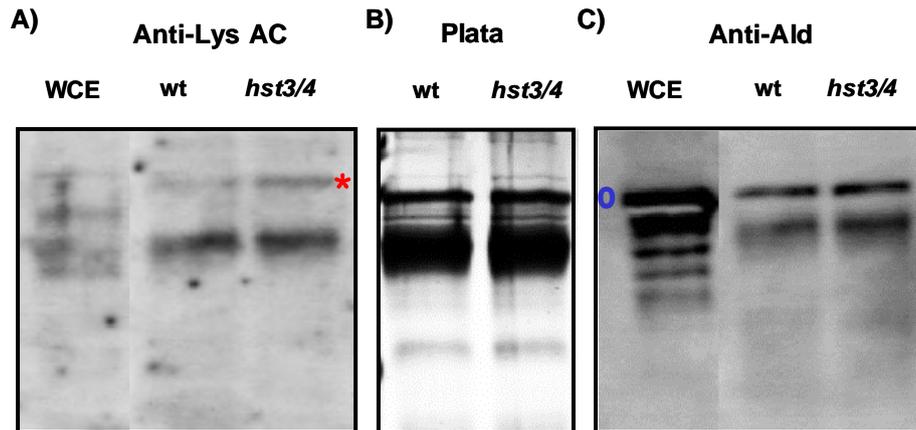


Figura 4.18. Análisis del patrón de acetilación de la cepa wt y del mutante *hst3Δhst4Δ* en la cepa C9 tras realizar un experimento de inmunoprecipitación de Aldp y del extracto total sin inmunoprecipitar (WCE). Panel A, *Western blot* anti-Lys AC. Panel B, tinción del gel con plata. Panel C, *Western blot* anti-Ald.

4.4- Estudio de la función de Sas2p y Gcn5p en la regulación de la expresión de las proteínas Ald4p y Ald6p

En el estudio descrito en el apartado anterior (Apartado 4.3), no se ha podido caracterizar la existencia de una regulación de la actividad Adh y Ald por modificación directa de los enzimas metabólicos por parte de las sirtuinas

o acetiltransferasas estudiadas en este trabajo, por ello se continuó con la caracterización de la existencia de algún otro tipo de regulación postraduccional, responsable de la modulación diferencial de la actividad enzimática descrita en los mutantes de sirtuinas y acetiltransferasas (Figura 4.13 y 4.15). Esta regulación podría ejercerse a través del control de los niveles de proteína, tanto de su expresión, como de su estabilidad.

Dado que los mutantes *sas2Δ* y *gcn5Δ* son los que presentaron las diferencias más significativas en cuanto a la actividad enzimática Ald, se continuó con el estudio del efecto de la delección de los genes de las acetiltransferasas *SAS2* y *GCN5* en los niveles de los enzimas Ald4p y Ald6p.

4.4.1- Determinación de los niveles de Ald4p y Ald6p en los mutantes *sas2Δ* y *gcn5Δ* en condiciones de vinificación

Con el fin de comprobar si los cambios en la actividad Ald observados en los mutantes *sas2Δ* y *gcn5Δ* se debían a variaciones en la acumulación de las proteínas Ald4p y Ald6p se procedió a cuantificar ambas proteínas durante el proceso de vinificación mediante *Western blot*, utilizando un anticuerpo anti-Ald comercial capaz de reconocer a ambas (Onodera *et al.*, 2004). Se realizaron vinificaciones en mosto sintético y se tomaron muestras para extraer proteínas (según se describe en el Apartado 4.1.1 de Materiales y Métodos) a los mismos tiempos en los que se determinó las actividades enzimáticas, a t1 y t5 de vinificación (Figura 4.13 y 4.15). A pesar de realizar los geles a baja concentración de poliacrilamida (8%) ambas proteínas quedan muy cerca debido a que poseen un peso molecular y un punto isoeléctrico muy parecido (54,4 KDa – pI 5,2 y 56,7 KDa – 6,7 pI, respectivamente), lo cual ha dificultado su estudio.

En la Figura 4.19 pueden observarse los niveles de Ald6p y Ald4p a t1 (panel A) y a t5 (panel B) en la cepa silvestre y en los mutantes *sas2Δ* y *gcn5Δ*. A t1, el nivel de Ald6p de los mutantes es similar al del silvestre, por lo que los cambios observados en la actividad Ald6 en los mutantes (Figura

4.15 A), no puede correlacionarse con los niveles de proteína. Es destacable que a t1 se observa altos niveles de Ald4p en todas las cepas, sin embargo no fue posible detectar actividad Ald4 en este tiempo de vinificación (datos no mostrados), lo que sugiere la existencia de algún mecanismo de regulación postraducciona del enzima.

A t5, el nivel de Ald4p también es similar entre los mutantes y el parental L2056 (Figura 4.19 B), sin embargo los mutantes presentaron una actividad muy reducida con respecto al silvestre (Figura 4.15 C), en especial *gcn5* Δ . Esto refuerza la idea de la existencia de algún mecanismo postraducciona de regulación de Ald4p, en el que las acetiltransferasas Sas2p y Gcn5p podrían estar implicadas. El nivel de Ald6p a t5 también resulta muy interesante (Figura 4.19 B), puesto que en el mutante *gcn5* Δ , y parcialmente en *sas2* Δ , hay una mayor concentración, lo cual se relaciona directamente con el aumento de actividad Ald6p descrito anteriormente (Figura 4.15 B), indicando que Gcn5p podría estar implicado en la regulación enzimática de Ald6p mediante la regulación de los niveles de proteína.

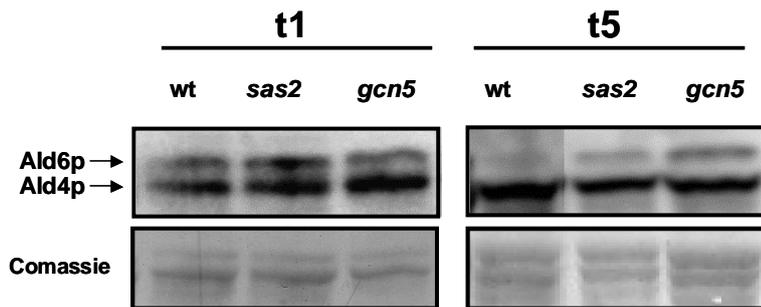


Figura 4.19. Determinación de los niveles de Ald4p y Ald6p mediante *Western blot* y posterior detección con el anticuerpo anti-Ald, en la cepa L2056 y los mutantes *sas2* Δ y *gcn5* Δ a t1 (A) y t5 (B) del proceso de vinificación en mosto sintético. En la parte inferior se muestra la tinción de la membrana con azul Comassie como control de carga de proteínas.

Debido a la observación de que el mutante *gcn5Δ* presenta mayor acumulación de Ald6p a t5, y dado que esto correlaciona con el aumento de su actividad, se estudió de forma más detallada la expresión de esta proteína a lo largo de la vinificación, con el fin de determinar si su mayor acumulación a t5 es debida a cambios en su cinética de expresión. Por ello, se llevó a cabo una vinificación en mosto sintético y se obtuvieron muestras a distintos tiempos (1, 3, 5, 10 y 18 días de vinificación). En la Figura 4.20 puede observarse que los niveles de Ald6p disminuyen rápidamente a partir del t1 de vinificación en el silvestre, siendo indetectable a t3. Sin embargo, en el mutante *gcn5Δ*, aunque el nivel de Ald6p disminuye de t1 a t3, la proteína no desaparece y puede detectarse durante todos los tiempos del experimento de vinificación estudiados. La Figura 4.20 también demuestra una inducción de la expresión de Ald4p de t1 a t3 de vinificación, tanto en la cepa silvestre como en el mutante *gcn5Δ*, permaneciendo posteriormente los niveles constantes a lo largo de todos los puntos estudiados. Posteriormente, se eliminó el anticuerpo Anti-Ald y la membrana se incubó con el anticuerpo Anti-Adh, cuyo nivel permanece constante a lo largo de los puntos de vinificación estudiados y puede utilizarse como control de carga (Onodera y Ohsumi, 2004).

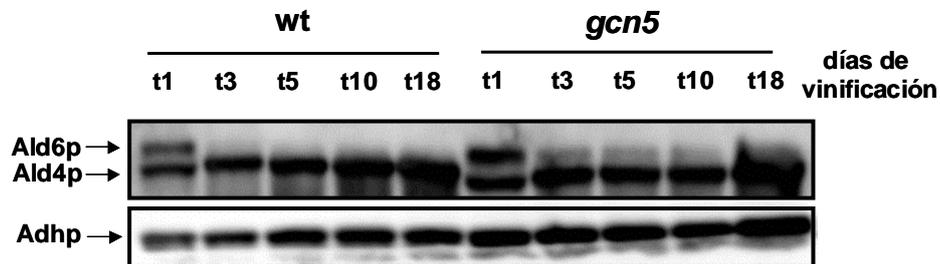


Figura 4.20. Determinación de los niveles de Ald4p y Ald6p mediante *Western blot* y posterior detección con el anticuerpo anti-Ald, en la cepa L2056 y el mutante *gcn5Δ* durante el proceso de vinificación en mosto sintético. En la parte inferior se muestra la detección con el anticuerpo anti-Adh como control de carga de proteína.

Este resultado indica que la acetilasa Gcn5p está implicada en la regulación de los niveles de Ald6p, promoviendo su degradación durante el proceso de vinificación.

4.4.2- Determinación de los niveles de Ald4p y Ald6p en el mutante *gcn5Δ* en condiciones de autofagia

Como ya se ha comentado, Ald6p ha sido identificada como un marcador selectivo del proceso de autofagia que tiene lugar como respuesta al ayuno de nitrógeno. De acuerdo con estos datos, el descenso observado de la concentración de Ald6p hasta su total desaparición en la cepa silvestre, podría reflejar la baja concentración de nitrógeno a la que están sometidas las células desde tiempos muy iniciales del proceso de vinificación.

Se estudió si el mutante *gcn5Δ* mantiene los niveles de Ald6p más altos (a partir del t3 de vinificación), debido a que por alguna razón no está activando el proceso de autofagia. Para ello se realizó un experimento de autofagia con la cepa silvestre y el mutante, mediante un procedimiento estándar (descrito con mayor detalle en Materiales y Métodos, Apartado 2.2.4) consistente en cambiar las células de medio rico YPD a medio mínimo sin ninguna fuente de nitrógeno, SD-N. Posteriormente se toman muestras a distintos tiempos y se determina el nivel de proteína.

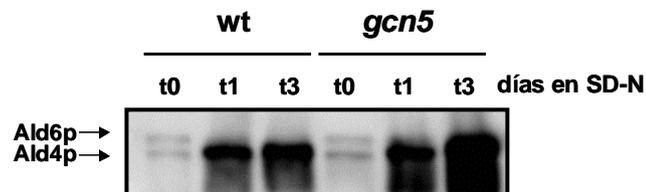


Figura 4.21 Determinación de los niveles de Ald6p mediante *Western blot* y la posterior detección con el anticuerpo anti-Ald, en la cepa L2056 y el mutante *gcn5Δ* en el cambio de medio rico YPD a medio mínimo sin fuente de nitrógeno SD-N.

Como se observa en la Figura 4.21, cuando se cambia a medio sin fuente de nitrógeno, se produce un importante aumento en la expresión de Ald6p, tanto en la cepa silvestre como en el mutante *gcn5Δ*, que hizo muy difícil detectar Ald6p.

Con la finalidad de poder detectar Ald6p evitando la interferencia con Ald4p, se procedió a etiquetarla en el extremo C-terminal con el epítipo Myc para detectarla con un anticuerpo Anti-myc, pero esta modificación causó un bloqueo en la degradación de la proteína por autofagia (Figura 4.22), posiblemente porque el epítipo causa algún tipo de interferencia en la señalización de la proteína hacia la ruta de degradación.

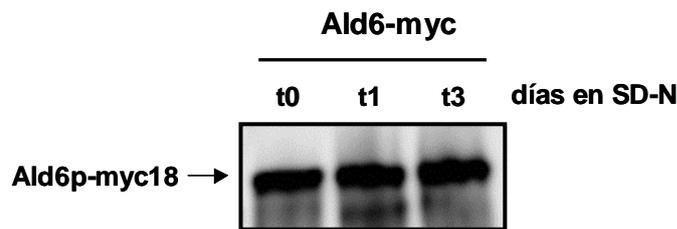


Figura 4.22. Determinación de los niveles de Ald6p mediante *Western blot* y la posterior detección con el anticuerpo Anti-myc, en la cepa L2056 Ald6-myc18 en condiciones de autofagia.

Debido a la imposibilidad de detectar Ald6p sin interferencia de Ald4p en condiciones de autofagia, se procedió a la construcción de un mutante del gen *ALD4* en la cepa haploide C9 y a su combinación con la delección en *GCN5* y se realizó un experimento en condiciones de autofagia. Como puede observarse en la Figura 4.23, se produce un importante descenso del nivel de Ald6p a las 15 horas del cambio de medio rico YPD a medio mínimo SD-N en la cepa parental, siendo casi indetectable a tiempos posteriores (entre 48-72 horas). Sin embargo, en el mutante *gcn5Δ* el nivel de Ald6p permanece alto durante todo el periodo de tiempo analizado, indicando un grave defecto en la degradación de Ald6p por autofagia en este mutante. Como ha sido descrito,

las proteínas Adh no son susceptibles de degradarse por autofagia (Onodera *et al.*, 2004) y su nivel permanece constante a lo largo del experimento, por lo que pudo utilizarse también en estas condiciones como control de carga.

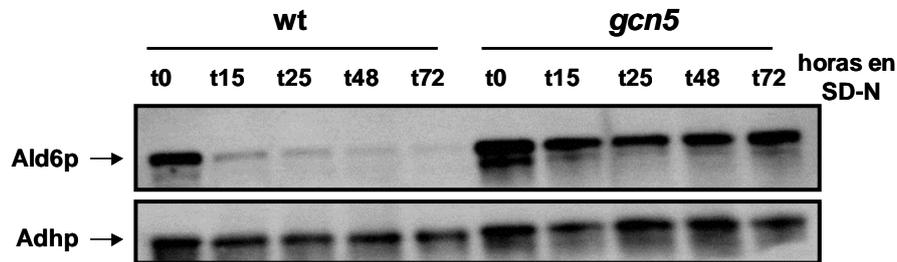


Figura 4.23. Determinación del nivel de Ald6p mediante *Western blot* y la posterior detección con el anticuerpo anti-Ald, en el wt y en el mutante *gcn5Δ* en la cepa C9 *ald4Δ* en condiciones de autofagia.

4.4.3- Determinación de los niveles de mRNA de *ALD6* en el mutante *gcn5Δ* en condiciones de autofagia

La Figura 4.23 muestra una mayor acumulación de Ald6p a t0 en el mutante *gcn5Δ* que en la cepa silvestre, así como un ligero descenso en la cantidad de proteína de t0 a t15 horas en el mutante. Dado que estas diferencias de acumulación de la proteína Ald6p podrían también deberse a efectos transcripcionales de Gcn5p sobre el gen *ALD6*, se procedió a determinar el nivel de su transcrito en estas muestras mediante *Northern blot*.

Como se observa en la Figura 4.24, el nivel basal del transcrito de *ALD6* es mayor en el mutante *gcn5Δ*, pero al igual que ocurre en el silvestre, rápidamente disminuye en los tiempos más largos tras la eliminación de nitrógeno (t48 y t72), mientras que los niveles de proteínas permanecen altos (Figura 4.23). Por tanto, la mayor acumulación de la proteína Ald6p en el mutante *gcn5Δ* en los experimentos de autofagia no puede justificarse por

efectos transcripcionales de la acetilasa sobre el gen *ALD6*, reforzando la hipótesis de la existencia de un mecanismo de regulación postraduccional de Gcn5p sobre Ald6p y en el que está implicado el proceso de autofagia.

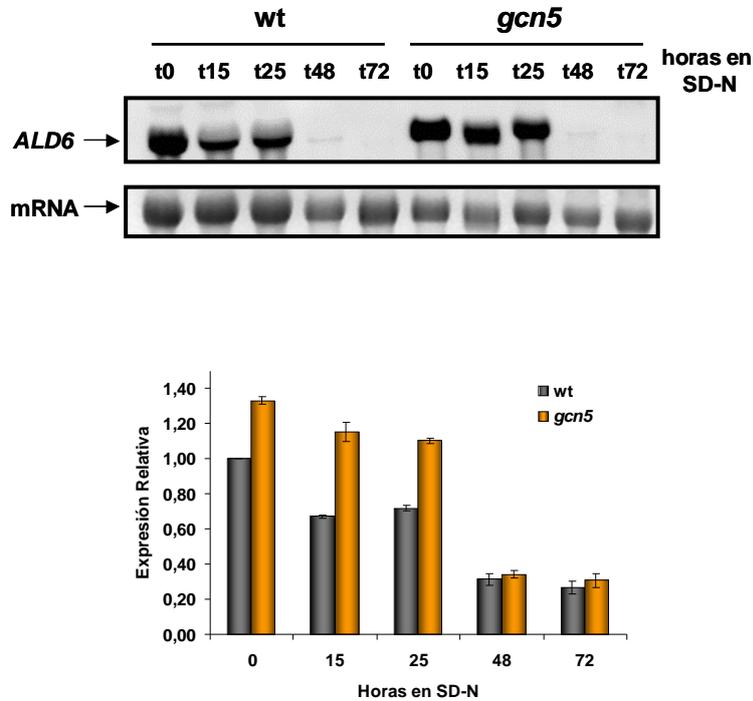


Figura 4.24. Determinación del nivel de mRNA de *ALD6* mediante *Northern blot* del wt y del mutante *gcn5* Δ en la cepa C9 *ald4* Δ en condiciones de autofagia. En la parte inferior se muestra la cuantificación de los niveles tras la realización de tres experimentos independientes y se muestra las medias y la (DT).

Se ha descrito la degradación de Ald6p durante la segunda fermentación en cepas de levaduras elaboradoras de cava, donde se produce la inducción del proceso de autofagia (Cebollero *et al.*, 2006). Los resultados descritos anteriormente en este trabajo (Apartado 4.3.2), demuestran el papel

de Gcn5p en la regulación de la degradación de Ald6p por autofagia en respuesta al ayuno de nitrógeno en condiciones de laboratorio. Debido a la disminución de los niveles de Ald6p observados en condiciones de vinificación (Apartado 4.3.1), donde las células también se encuentran en condiciones de limitación de nitrógeno, es posible que durante el proceso de fermentación vínica también se active el proceso de autofagia, donde Gcn5p también estaría ejerciendo un papel importante. La incapacidad de degradar Ald6p mediante autofagia en el mutante *gcn5Δ* durante el proceso de vinificación explicaría el elevado nivel de proteína (Figura 4.20), el incremento en la actividad Ald6 (Figura 4.15 A) y la elevada concentración de acetato (Figura 4.7 C y 3.10 A).

Por primera vez se ha descrito la implicación de la acetilasa Gcn5p en el control de la autofagia inducida por ayuno de nitrógeno. De manera simultánea a la realización de estos experimentos, se ha descrito que Gcn5p y las histonas desacetilasas Hda1p y Rpd3p están relacionadas con el control de la degradación por autofagia de la proteína de recombinación Sae2p en condiciones de daño en el DNA (Robert *et al.*, 2011).

Como se ha descrito anteriormente, en este trabajo no ha sido posible caracterizar mediante inmunoprecipitación la existencia de alguna modificación directa por acetilación de Ald6p, por lo que la proteína Gcn5p podría regular su degradación por autofagia mediante otras vías de regulación. Por ejemplo, Gcn5p podría regular la acumulación de Ald6p a través de la regulación por acetilación de la actividad otras proteínas de la maquinaria de autofagia, como ocurre con la acetiltransferasa humana p300 que es capaz de acetilar directamente a Atg7p (Lee y Finkel, 2009). También podría ocurrir que el papel de Gcn5p en el control de la degradación de Ald6p por autofagia fuera independiente a su actividad acetiltransferasa y que estuviera participando en otros mecanismos de regulación, de manera equivalente a lo que ocurre en la regulación de la actividad quinasa de Snf1p. Esta quinasa, además de estar sometida a modificaciones por fosforilación, también se modifica por ubiquitilación, y la subunidad Ubp8 del complejo SAGA (Spt-Ada-Gcn5 Acetiltransferasa) al que pertenece Gcn5p, la protege

de su degradación en el proteasoma (Wilson *et al.*, 2011) mediante su actividad desubiquitilasa.

4.5- Estudio del papel de la autofagia en la longevidad de cepas vínicas

Se ha descrito que defectos en el proceso de autofagia causan una disminución de la longevidad en la mayoría de organismos modelo estudiados (ver Introducción). Sin embargo, en este trabajo se ha descrito que el mutante *gcn5Δ*, con defectos en la activación de esta ruta, ve incrementada su longevidad en condiciones de vinificación. Para profundizar en el estudio del proceso de autofagia y su efecto contrario en la longevidad cronológica durante el proceso de vinificación, se procedió a estudiar el efecto que causa la inactivación de los mecanismos de autofagia en la longevidad de las cepas vínicas. Para ello se llevó a cabo en la cepa vínica L2056 la construcción del mutante de delección de la proteína Atg7p, una enzima con similitudes a la proteína activadora E1 en el proceso de ubiquitilación que es necesaria para la formación de los autofagosomas, y se realizaron experimentos de longevidad en condiciones de laboratorio y en condiciones de vinificación.

4.5.1- Estudio del papel de Atg7p en la longevidad de la cepa vínica L2056 en condiciones de laboratorio

Para estudiar la función de Atg7p en la LC en cepas vínicas, se realizaron experimentos de longevidad cronológica con el mutante de delección de *ATG7* en L2056, tal y como se hizo con los mutantes de sirtuinas y acetiltransferasas en el Apartado 4.1. También se incluyeron en los experimentos el mutante *gcn5Δ* y el doble mutante *gcn5Δatg7Δ* para establecer posibles relaciones en cuanto a su función.

Como se puede observar en la Figura 4.25, el mutante *gcn5Δ* también muestra un descenso en la longevidad con respecto al silvestre, tal y como se observó previamente en este trabajo para la cepa haploide C9 (Figura 4.1 D). La delección de *ATG7* también causa un descenso en la longevidad cronológica, tal y como se ha descrito en cepas de laboratorio (Alvers *et al.*, 2009). Y de forma muy interesante, el doble mutante *gcn5Δatg7Δ* es menos longevo que los mutantes simples, lo cual sugiere que en la regulación que ejerce Gcn5p sobre la autofagia y su efecto en la longevidad, estarían actuando otras proteínas y que ambas proteínas actuarían, al menos parcialmente, en rutas distintas con impacto en la longevidad cronológica.

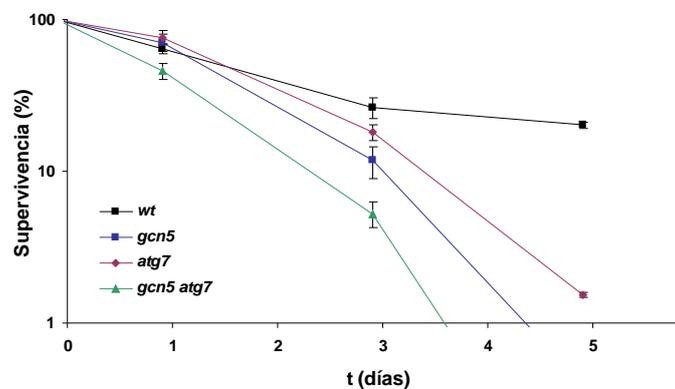


Figura 4.25. Experimentos de LC en los mutantes *gcn5Δ*, *atg7Δ* y *gcn5Δatg7Δ* en la cepa L2056. Se determinó el número de células viables (cfu/mL) por recuento en placa a distintos tiempos del experimento de envejecimiento. Los experimentos se realizaron como mínimo por triplicado y las barras de error muestran la desviación típica (DT).

4.5.2- Estudio del papel de Atg7p en la longevidad de la cepa vínica L2056 en condiciones de vinificación

Para continuar con el estudio del papel de Atg7p en la longevidad cronológica, se realizaron experimentos de vinificación para estudiar su

efecto en condiciones naturales, ya que como se ha descrito anteriormente en este trabajo, determinadas proteínas presentan un comportamiento de longevidad opuesto según las condiciones de cultivo.

Las vinificaciones en mosto bobal se llevaron a cabo tal y como se hizo en el Apartado 4.2 de este trabajo. Como muestra la Figura 4.26 A, el mutante *atg7* Δ presenta un número máximo de células similar al de la cepa silvestre, sin embargo, el doble mutante *gcn5* Δ *atg7* Δ , al igual que ocurre con *gcn5* Δ , alcanza un número de células menor que el silvestre. Esto indica que el papel de Atg7p en la fase de crecimiento podría ser menos importante que el de Gcn5p. En cuanto a la longevidad, el mutante *atg7* Δ es notablemente más longevo, también en las fases iniciales de la vinificación (Figura 4.26 B), incluso más que el mutante *gcn5* Δ y el doble *gcn5* Δ *atg7* Δ . Esto estaría indicando que el proceso de autofagia durante la fermentación vínica no está causando un efecto positivo en la LC, sino todo lo contrario. Cabe destacar que el doble mutante *gcn5* Δ *atg7* Δ se comporta como el simple *gcn5* Δ , indicando que en estas condiciones Gcn5p podría ser un regulador clave de la maquinaria de autofagia.

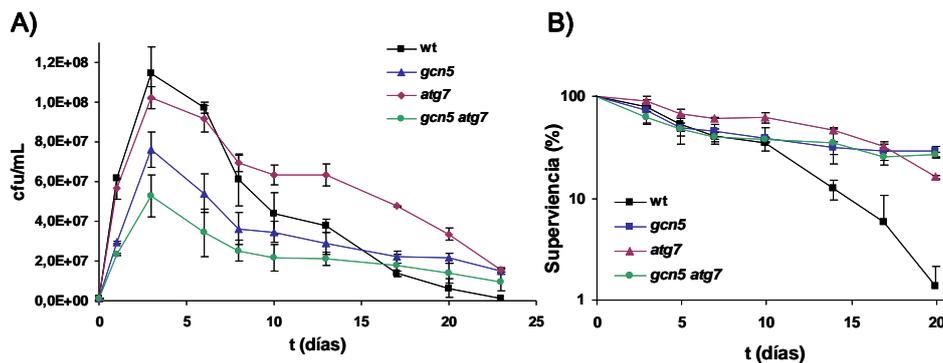


Figura 4.26. Curvas de crecimiento y muerte celular durante el proceso de vinificación (A) y curvas de longevidad cronológica (B) de los mutantes *gcn5* Δ , *atg7* Δ y *gcn5* Δ *atg7* Δ en la cepa L2056. Se determinó el número de células viables (cfu/mL) por recuento en placa a distintos tiempos de vinificación. Los experimentos se realizaron como mínimo por triplicado y las barras de error muestran la desviación típica (DT).

Así pues, la delección de *ATG7*, al igual que ocurre con muchos miembros de la familia de desacetilasas/acetiltransferasas descritos en este trabajo, produce en condiciones de vinificación un efecto contrario al obtenido en condiciones de laboratorio. Ya se había detectado en cepas de laboratorio que el impacto de la autofagia en la longevidad es extremadamente dependiente de las condiciones nutricionales. Al igual que ocurre en nuestros estudios, la delección de *ATG7* disminuye la longevidad cronológica de cepas de laboratorio en medio mínimo SC (Alvers *et al.*, 2009). Sin embargo, esta mutación no tiene ningún efecto en un medio rico como es el YPD. En mosto, que es aún un medio más rico y con presencia de múltiples nutrientes aportados por la vid, el efecto de la autofagia es perjudicial. Sorprendentemente, la restricción calórica que supone la reducción de glucosa de 2% al 0.5% también elimina el efecto de la delección de factores de la maquinaria de la autofagia (Alvers *et al.*, 2009). Así pues, el efecto positivo de la autofagia en longevidad podría estar reducido a condiciones metabólicas muy concretas. Es evidente que el mosto de uva es pobre en nitrógeno y que efectivamente se produce una autofagia durante la fermentación (Figura 4.20), proceso posiblemente beneficioso para la supervivencia porque aportaría nutrientes, pero nuestros resultados indican que la autofagia está degradando alguna molécula que es esencial para la viabilidad en fases tardías. En levadura, el estrés proteotóxico causado por una proteína autoagregante, la α -sinucleína, induce una activación descontrolada de la autofagia que lleva a la muerte celular (Sampaio-Marques *et al.*, 2011). Entonces, un control equilibrado de la autofagia es requerido para obtener beneficios en la longevidad. En células de ratón, la falta de Atg7p provoca el bloqueo de la muerte celular causada por apoptosis debida a la inhibición de caspasas (Yu *et al.*, 2004). Nuestros resultados sugieren que es posible que un evento de tipo apoptótico tenga lugar al final de la vinificación, y que dicho evento dependa de la autofagia como forma de promover la muerte celular. Finalmente, estudios recientes han establecido una relación bidireccional entre la autofagia y el estado de la mitocondria, ya que el potencial redox de ésta, modula la actividad autofágica en levaduras

(Graef y Nunnari, 2011), mientras que defectos en la autofagia causan la disfunción mitocondrial (Suzuki *et al.*, 2011). Así pues, la situación particular de baja oxigenación de la fermentación vínica podría también alterar completamente el papel de la autofagia respecto a las condiciones estándar de laboratorio.

4.6- Estudio de la función de la ruta TOR en el control de la longevidad en cepas vínicas

Como se ha mencionado previamente en este trabajo (ver Introducción), la ruta TOR controla la respuesta al ayuno de nutrientes actuando sobre diversas rutas, siendo muy importante la regulación que ejerce sobre el proceso de autofagia. Cada vez hay más evidencias que relacionan la longevidad directamente con la ruta TOR, debido al efecto que produce la restricción calórica en la longevidad (Fontana *et al.*, 2010).

Para determinar el efecto que tiene la ruta TOR en las levaduras vínicas en respuesta al ayuno de nitrógeno y su implicación en la longevidad cronológica, se analizó el efecto que produce la inhibición de esta ruta en condiciones de vinificación. Para ello se procedió a la utilización de L-metionina sulfoximina (MSX), un inhibidor de la glutamina sintetasa que provoca una restricción dietaria intracelular de glutamina, y que conduce a una inactivación parcial de la ruta TOR (Crespo *et al.*, 2002), produciendo una extensión de la longevidad cronológica en condiciones de laboratorio (Powers *et al.*, 2006). Esta represión modula la actividad del factor transcripcional Gln3p, que controla el metabolismo del nitrógeno y la respuesta retrógrada vía los factores Rtg1/3p. Sin embargo, no afecta a la respuesta general a estrés mediada por los factores de transcripción Msn2/4p, que se activa cuando la ruta TOR se inhibe en su totalidad, y que podría afectar al crecimiento celular al principio de la vinificación (Cardona *et al.*, 2007). Por todo ello, se consideró apropiado el uso de este compuesto en

nuestras condiciones, ya que nos interesaba principalmente la relevancia del metabolismo del nitrógeno en la longevidad en condiciones de vinificación.

Para este estudio, se realizaron microvinificaciones en mosto bobal con la cepa L2056 y se añadió MSX (400 mM) en el momento de inocular las células. Como puede observarse en la Figura 4.27 A, el número máximo de células que se alcanza al añadir MSX es inferior al de la condición control, pero su cinética de muerte es más lenta, y por lo tanto la longevidad se ve aumentada de manera importante (Figura 4.27 B). Por lo tanto, en condiciones de vinificación, la inactivación parcial de la ruta TOR con MSX extiende la longevidad, tal y como se describe para condiciones de laboratorio (Powers *et al.*, 2004).

En cuanto al consumo de azúcares reductores, se observó un ligero descenso en la velocidad en las muestras con MSX, aunque se agotan aproximadamente a los 9-10 días de vinificación, al igual que ocurre con la condición control (Figura 4.27 C). Se procedió a determinar la concentración de glicerol y se pudo comprobar que en las muestras de MSX se produce un significativo incremento (Figura 4.27 D), lo que es consistente con otros experimentos que describen la implicación de la ruta TOR en la síntesis de glicerol (Wei *et al.*, 2009). Estos resultados demuestran que el efecto causado al inhibir la parte de la ruta TOR relacionada con la restricción de glutamina por adición de MSX, es suficiente para incrementar de manera importante la LC durante la vinificación. Este aumento en la longevidad se correlaciona también con un notable incremento en la producción de glicerol, tal y como se ha descrito previamente en este trabajo que ocurre con el mutante *gcn5Δ*. Cabe destacar el interés biotecnológico en cuanto al aumento del contenido en glicerol del vino que puede ocasionarse por la adición al mosto de MSX en concentraciones no perjudiciales para la salud humana, así como la búsqueda de otros compuestos químicos que provoquen un efecto parecido mediante la inhibición de la ruta TOR.

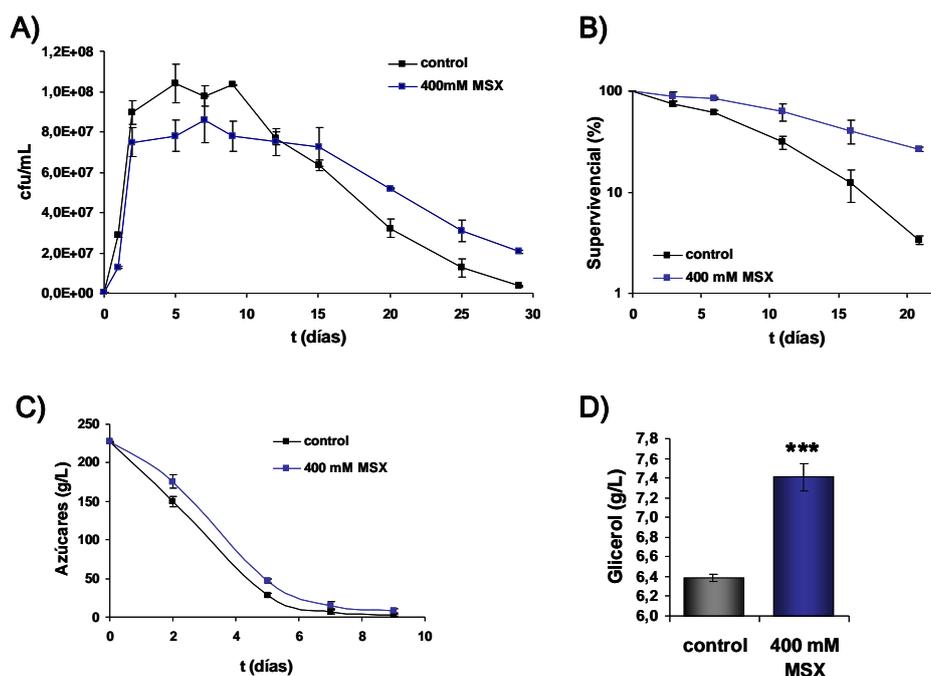


Figura 4.27. Curvas de crecimiento y muerte celular (A) y curvas de CLS (B) de la cepa L2056 en la condición control y con 400 mM de MSX durante el proceso de vinificación en mosto bobal. Se determinó el número de células viables (cfu/mL) por recuento en placa a distintos tiempos de vinificación. (C) Determinación de azúcares reductores en la condición control y con 400 mM de MSX. (D) Cuantificación de glicerol en la condición control y con 400 mM de MSX. Las medidas se realizaron por triplicado y se muestra las medias y la DT. Se indica con asteriscos la diferencia estadísticamente significativa de la media entre la condición con MSX con respecto a la condición control (***) $p < 0.005$.

Debido al efecto de Gcn5p sobre el proceso de autofagia en respuesta al ayuno de nitrógeno y en la longevidad cronológica, se prosiguió con la caracterización de una posible relación entre Gcn5p y la ruta TOR en el contexto del ayuno de nitrógeno. En primer lugar, se estudió el efecto que produce en el mutante *gcn5Δ* la restricción por ayuno de nitrógeno y la inhibición parcial de la ruta TOR en condiciones de vinificación. Para ello se

realizaron microvinificaciones en la cepa L2056 y con el mutante *gcn5Δ* en mosto sintético, en medio rico de nitrógeno (MS300; con 300 mg/L de nitrógeno asimilable) y en medio con restricción de nitrógeno (MS75; con 75 mg/L de nitrógeno asimilable) y con MSX a una concentración de 400 mM. En la Figura 4.28 A se observa que tanto la restricción por nitrógeno (MS75), como la inactivación parcial de la ruta TOR (MSX 400 mM), provocan un descenso en el crecimiento celular, siendo mayor el efecto de la restricción de nitrógeno. La velocidad de muerte disminuye en todas las condiciones con respecto al control (MS300), y como puede observarse en la Figura 4.28 B, y se había descrito previamente en este trabajo con la cepa EC1118 (Apartado 1.2.4), la restricción de nitrógeno (MS75) incrementa de manera excepcional la LC de la cepa L2056.

La inhibición parcial de la ruta TOR (MSX 400 mM) también incrementa de manera importante la longevidad, aunque en menor medida que la causada por la restricción de nitrógeno, lo cual indica que la MSX está actuando en una parte de la respuesta causada por la deficiencia en nitrógeno. Al añadir MSX al MS75 (MS75 + MSX 400 mM) aún aumenta ligeramente la longevidad, lo que parece indicar que la elongación de la longevidad por inhibición de la glutamina sintetasa y por ayuno de nitrógeno forman parte, al menos parcialmente, de rutas distintas.

La delección de *GCN5* causa un descenso en el número máximo de células y un incremento en la longevidad en mosto sintético (Figura 4.28 C y D), tal y como se demostró que ocurría en mosto natural (Figura 4.4 G y H). El efecto de la restricción por nitrógeno (MS75) en el mutante *gcn5Δ* también es evidente, incrementando aún más su longevidad, pero el efecto es un poco menor al que se observa en la cepa silvestre, luego *Gcn5p* no parece ser determinante en la respuesta al ayuno de nitrógeno global (Figura 4.28 B). Sin embargo, el efecto de la MSX en el mutante es nulo, tanto en condiciones ricas como en restrictivas de nitrógeno, lo cual estaría indicando que el incremento de la longevidad causado por la inhibición de la ruta TOR, al menos en la parte que responde a la inhibición de la glutamina sintetasa, estaría mediado por *Gcn5p*. Esto concuerda con que el incremento de la

longevidad por MS75 en el mutante no sea tan elevado como en el parental, ya que no estaría actuando la rama de la ruta TOR regulada por MSX. Se ha descrito que la MSX produce la activación de los factores de transcripción Gln3p, Rtg1p y Rtg3p (Crespo *et al.*, 2002). Además, la respuesta retrógrada entre la mitocondria y el núcleo, mediada por Rtg1/3, está controlada vía Gcn5p (Kim *et al.*, 2004). Esto parece indicar que durante el envejecimiento, la transcripción de genes regulados por nitrógeno a través de Gln3p, depende de Gcn5p.

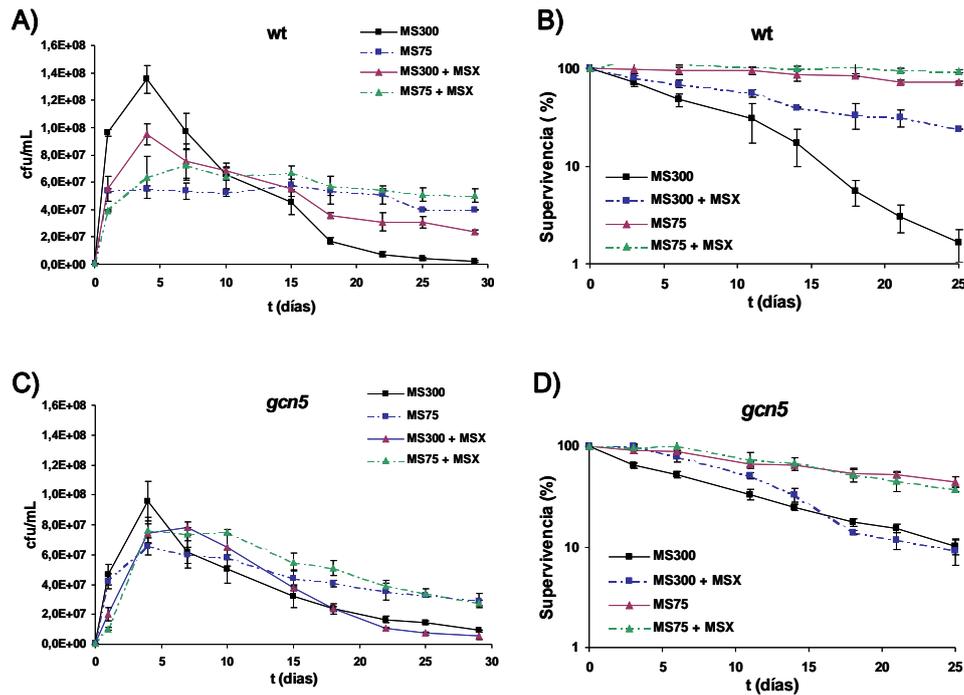


Figura 4.28. Curvas de crecimiento y muerte celular durante el proceso de vinificación (A, C) y curvas de LC (B, D) de la cepa L2056 en el wt y en el mutante *gcn5Δ* durante el proceso de vinificación en mosto sintético, sin limitación de fuente de nitrógeno (MS300) y en condiciones de restricción de nitrógeno (MS75), y con la adición de MSX 400 mM. Se determinó el número de células viables (cfu/mL) por recuento en placa a distintos tiempos de vinificación. Los experimentos se realizaron como mínimo por triplicado y las barras de error muestran la desviación típica (DT).

La evolución de las vinificaciones se siguió tomando muestras y comprobando el consumo de azúcares reductores (Figura 4.29). La mutación en *GCN5* ralentiza el consumo de azúcares en MS300, pero la vinificación termina por completarse. Se observó que la adición de MSX no afecta al consumo de azúcares en condiciones de abundancia de nitrógeno, ni en la cepa silvestre ni en el mutante *gcn5Δ*, por lo tanto, la inhibición parcial de TOR no inhibe el consumo de azúcares. Curiosamente, en el mosto pobre en nitrógeno (MS75), la adición de MSX provoca un aumento en la velocidad del consumo de azúcares. Esto podría ser debido a que la activación del proceso de autofagia que produce la inhibición de TOR, podría beneficiar la tasa metabólica de las levaduras en condiciones de escasez de nitrógeno.

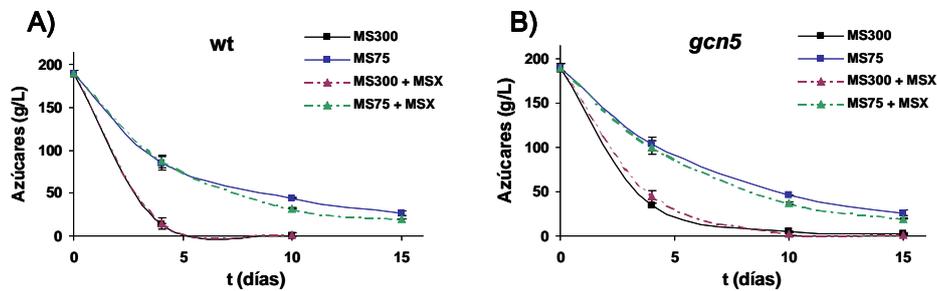


Figura 4.29. Determinación de azúcares reductores de la cepa L2056 en el wt y en el mutante *gcn5Δ* durante el proceso de vinificación en mosto sintético, sin limitación de fuente de nitrógeno (MS300) y en condiciones de restricción de nitrógeno (MS75), y con la adición de MSX 400 mM. Las medidas se realizaron por triplicado y se muestra las medias y la DT.

Para estudiar si el efecto de inhibir la ruta TOR de manera más general, mediante la inactivación del complejo TORC1, es similar al observado con la inhibición parcial mediante MSX, se procedió a construir el mutante *tor1Δ* en la cepa L2056 y se realizaron microvinificaciones en mosto sintético. Además, se comprobó el efecto que tiene la delección durante el ayuno de nitrógeno utilizando MS75. Como puede observarse en la Figura

4.30 A, el número máximo de células que alcanza el mutante *tor1Δ* es inferior al del silvestre, y lo mismo ocurre en condiciones de restricción de nitrógeno (*tor1Δ* MS75). La cinética de muerte es más lenta en el mutante, por lo que su longevidad es mayor, sobre todo en medio MS75 (Figura 4.30 B). Esto parece indicar que el complejo TORC1 está implicado en la regulación de la longevidad no solo en la respuesta a la restricción de nitrógeno, y a su vez, esta restricción dietaria tendría efecto en la LC a través de otras rutas distintas a la de TORC1, que podría ser vía TORC2.

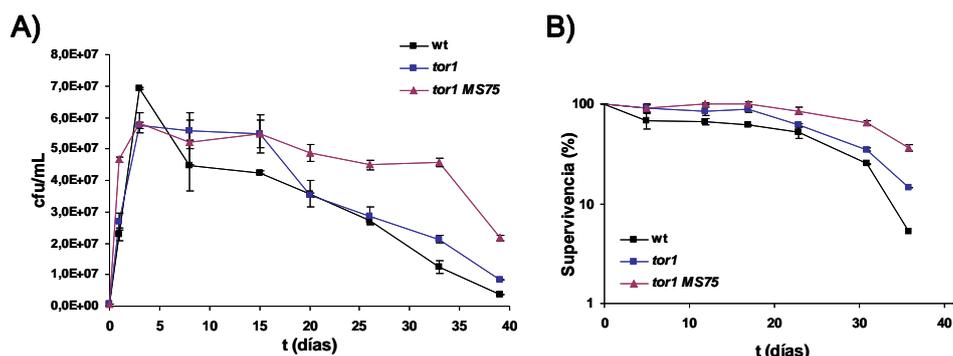


Figura 4.30. Curvas de crecimiento y muerte celular durante el proceso de vinificación (A) y curvas de CLS (B) del mutante *tor1Δ* en la cepa L2056. Se determinó el número de células viables (cfu/mL) por recuento en placa a distintos tiempos de vinificación. Los experimentos se realizaron como mínimo por triplicado y las barras de error muestran la desviación típica (DT).

A continuación, se resume mediante un modelo (Figura 4.31), los resultados obtenidos en cuanto a la función de la ruta TOR/Sch9p, la acetilasa Gcn5 y los procesos de regulación en los que están implicados en la determinación de la LC en condiciones de vinificación, y se compara con lo descrito en este trabajo y en otros previos en condiciones de laboratorio. Nuestros resultados demuestran el papel central que ejerce en la LC la ruta TOR/Sch9p en condiciones de vinificación, de manera similar a lo descrito en condiciones de laboratorio (ver Introducción). Este importante papel se ejerce

en parte a través de la acetilasa Gcn5p, la cual regula el proceso de degradación de Ald6p por autofagia. Sin embargo, la acidificación del medio causada por la acumulación de ácido acético, no es relevante en la LC en condiciones de vinificación, contrariamente a lo descrito para condiciones de laboratorio. Nuestros resultados sugieren que la acumulación del glicerol (controlada por TOR/Sch9p) sí que es importante para promover la LC en ambas condiciones de crecimiento. El papel de Gcn5p y de la autofagia en la regulación de la LC en condiciones de vinificación, es el contrario a lo descrito en condiciones de laboratorio.

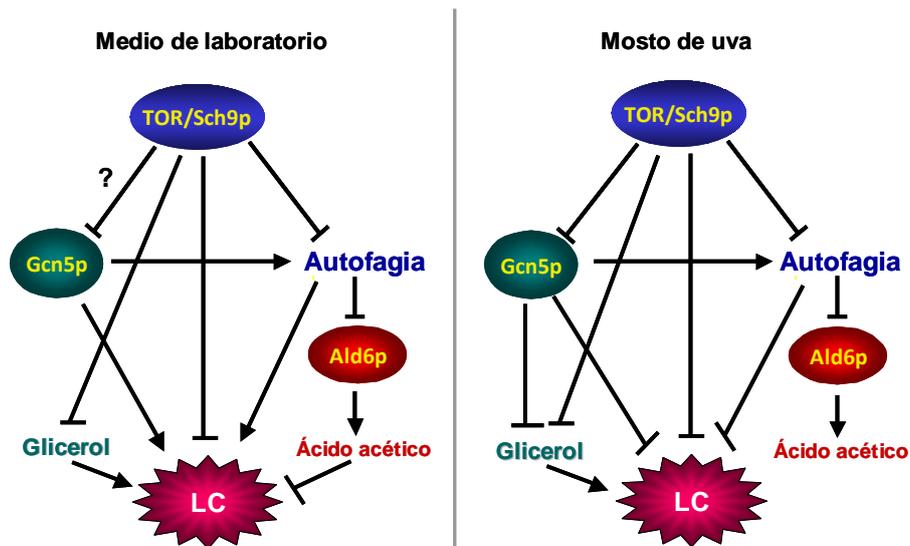


Figura 4.31. Modelo representativo del papel de la ruta TOR/Sch9p y de Gcn5p en la regulación de los procesos que modulan la LC en condiciones de laboratorio y en condiciones de vinificación.

4.7- Efecto de la sobreexpresión de las sirtuinas Sir2p y Hst3p y de la acetilasa Gcn5p durante la fermentación vínica

En el Apartado 4.2.2 se comprobó que la disrupción de determinados genes de sirtuinas y de acetiltransferasas ocasionaba un claro efecto en la longevidad cronológica y en la producción de compuestos del metabolismo fermentativo, por ello, en este apartado se ha pretendido estudiar el efecto de la sobreexpresión de algunos de estos genes para comprobar si se produce el efecto contrario a la disrupción, con la finalidad de conseguir cepas de interés biotecnológico. Se ha elegido sobreexpresar los genes de las sirtuinas *SIR2* y *HST3*, y de la acetilasa *GCN5*, ya que el comportamiento en cuanto a longevidad y concentración de metabolitos durante la vinificación en mosto bobal de los mutantes de delección de estos genes resultó tecnológicamente interesante.

Se construyeron los mutantes de sobreexpresión de estas sirtuinas mediante el cambio de su promotor nativo por los promotores regulables de los genes *MET17* y *SPI1*, que se ha comprobado que producen una sobreexpresión regulada en determinados momentos de la vinificación. El promotor de gen *MET17* dirige la sobreexpresión durante la fase exponencial de crecimiento de la fermentación vínica (Rossignol *et al.*, 2003), y el del gen *SPI1* durante la fase estacionaria (Cardona *et al.*, 2007; Puig y Pérez Ortín, 2000). Para realizar el reemplazamiento de secuencias de los promotores se utilizó el sistema de transformación mediante el cassette reciclable *kanMX* tal y como se describe en Materiales y Métodos (Apartado 6.2), al igual que se construyeron los mutantes de delección, pero en este caso el promotor se encuentra clonado delante del marcador y es dirigido a integrarse en 5' del gen a sobreexpresar (Cardona *et al.*, 2007). El plásmido con el promotor de *SPI1* estaba disponible en el laboratorio (pKanMX-SPI1p), pero el de *MET17* se construyó en este trabajo (pKanMX-MET17p).

Para comprobar que la construcción estaba funcionando correctamente y que se sobreexpresaba el gen de interés, se realizó un

experimento de vinificación en mosto bobal con la cepa $P_{SPI1-SIR2}$ y $P_{MET17-SIR2}$ y se estudió el nivel de proteína Sir2p durante la fase exponencial de crecimiento (t1 día) y en fase estacionaria (t5 días). En la Figura 4.32 se puede comprobar que la proteína Sir2p se expresa tal y como se esperaba dependiendo del momento de crecimiento y del promotor. Con el promotor nativo no se observa cambios en su expresión de t1 a t5 días de vinificación, sin embargo en la cepa con el promotor de *SPI1* su expresión se ve disminuida a t1 día y aumentada a t5 días. Con el promotor de *MET17* se sobreexpresa a t1 día, permaneciendo altos los niveles también a t5 días, quizá porque también se expresa más que con el promotor nativo a t5 días o porque la proteína es muy estable y su nivel permanece alto desde el primer día. De esta forma, se ha conseguido sobreexpresar *SIR2* durante todo el proceso de vinificación. La sobreexpresión de Hst3p o Gcn5p no pudo comprobarse puesto que no se dispuso de los anticuerpos necesarios, pero se asumió que los promotores también funcionaban sobre estos genes.

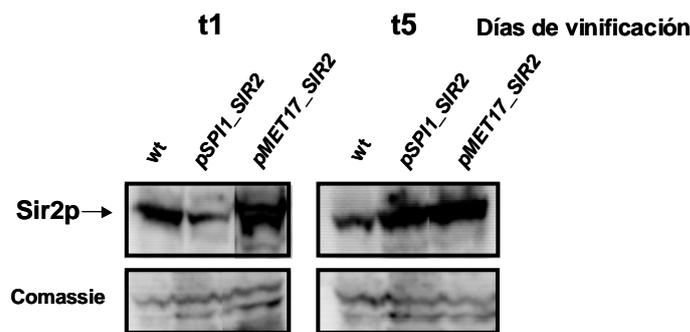


Figura 4.32. Determinación de los niveles de Sir2p mediante *Western blot* y la posterior detección con el anticuerpo anti-Sir2, del wt y de los mutantes sobreexpresantes de *SIR2*, $P_{SPI1-SIR2}$ y $P_{MET17-SIR2}$, en la cepa L2056 a tiempo 1 y 5 días de la vinificación en mosto bobal.

A continuación, se procedió a realizar microvinificaciones en mosto bobal para estudiar su comportamiento. Como puede observarse en la Figura

4.33 A y B, las cepas sobreexpresantes de *SIR2* alcanzan un número máximo de células inferior al de la cepa silvestre y su cinética de muerte es más lenta, por lo que su longevidad se ve aumentada. Con las cepas sobreexpresantes de *HST3* el comportamiento es el contrario (Figura 4.33 C y D), ya que alcanzan un número máximo de células superior y la velocidad de muerte es mayor al del silvestre, por lo que su longevidad disminuye ligeramente.

El comportamiento de ambos tipos de cepas sobreexpresantes de Sir2p y Hst3p es el contrario al que se observó con los mutantes de delección de estos genes (Figura 4.4), por lo que, desde el punto de vista de la longevidad, con ambas modificaciones se han logrado efectos contrapuestos, lo que indica que las funciones de las sirtuinas Sir2p y Hst3p en la LC son clave y dependen de sus niveles. Sin embargo, no se observó ningún efecto en la cepa sobreexpresante de Hst3p respecto del número máximo de viables, mientras que su delección tiene un efecto de disminución (Figura 3.3).

En cuanto a *GCN5*, su sobreexpresión no solo no provoca el efecto contrario a su delección, sino que ocasiona el mismo efecto que ésta, y la cepa sobreexpresante es más longeva que la cepa parental. Esto podría explicarse si el nivel de proteína Gcn5p no es el factor limitante de su función, y su sobreexpresión pudiera dar lugar a la formación de complejos inactivos o parcialmente activos que secuestren otras subunidades de los complejos de los que forma parte esta acetilasa. Por ejemplo, Gcn5p forma parte del complejo SAGA, pero también de otro complejo llamado SLIK para ejercer su función en la respuesta retrógrada (Kim *et al.*, 2004). Niveles anómalamente altos de Gcn5p podrían provocar un desequilibrio en la proporción de estos diferentes complejos, la cual sería responsable de la alteración de la fisiología de la cepa modificada.

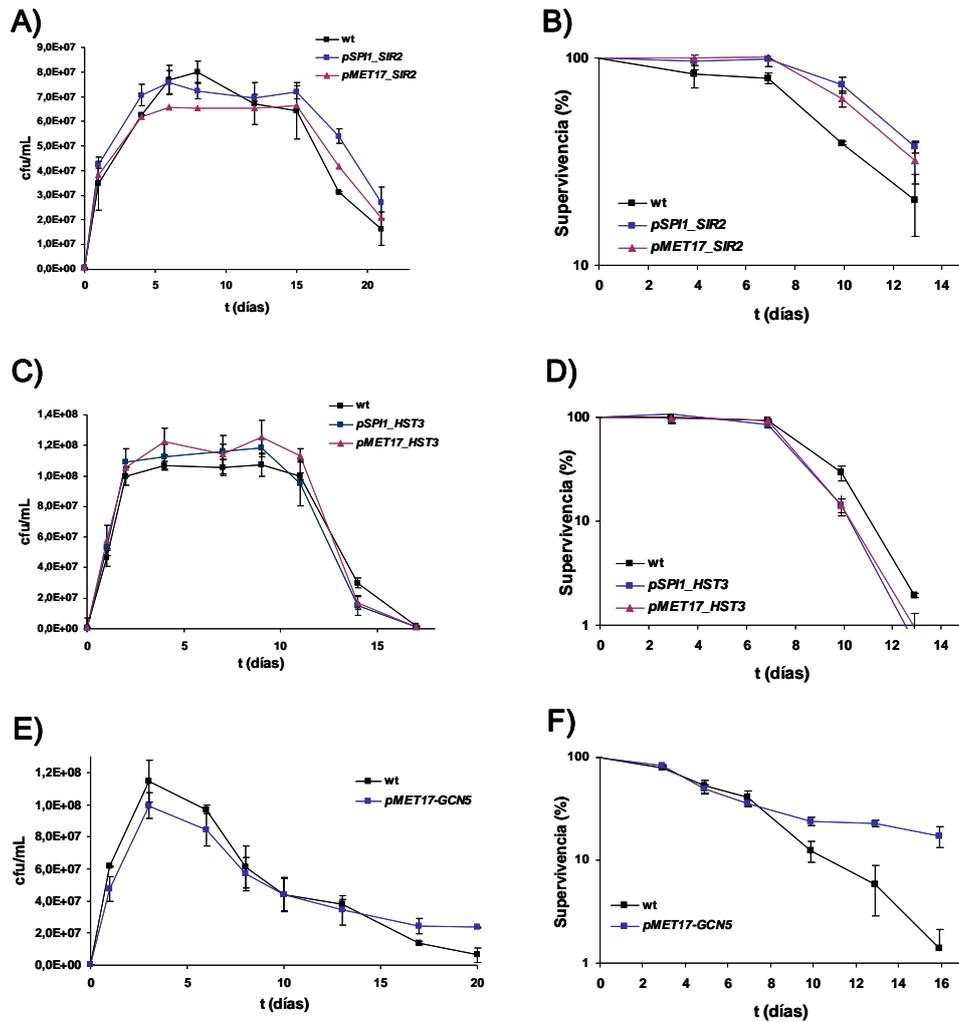


Figura 4.33. Curvas de crecimiento y muerte celular durante el proceso de vinificación (A, C y E) y curvas de CLS (B, D y F) del wt y de los mutantes sobreexpresantes de *SIR2*, *HST3* y *GCN5* en la cepa L2056. Se determinó el número de células viables (cfu/mL) por recuento en placa a distintos tiempos de vinificación. Los experimentos se realizaron como mínimo por triplicado y las barras de error muestran la desviación típica (DT).

Para seguir la evolución de la fermentación vínica se tomaron muestras a distintos tiempos y se determinó el nivel de azúcares reductores. Todos los mutantes presentaron una curva de consumo de azúcares similar

al del silvestre, fermentándolos en su totalidad alrededor del octavo día de fermentación y acabando sin paradas el proceso de vinificación (resultados no mostrados). En la Figura 4.6 D se mostró que el mutante *gcn5Δ* consumía los azúcares a una velocidad inferior al silvestre, por lo que en cuanto a este aspecto metabólico, la sobreexpresión de *GCN5* no altera el metabolismo en la misma dirección que la delección.

Posteriormente, se analizó la concentración de etanol, acetato y glicerol al final de cada una de las fermentaciones vínicas realizadas con los mutantes sobreexpresantes. En la Figura 4.34 A se muestra la concentración de etanol alcanzada al final de la vinificación, y como se puede comprobar, en las cepas sobreexpresantes de *SIR2* no se aprecian diferencias.

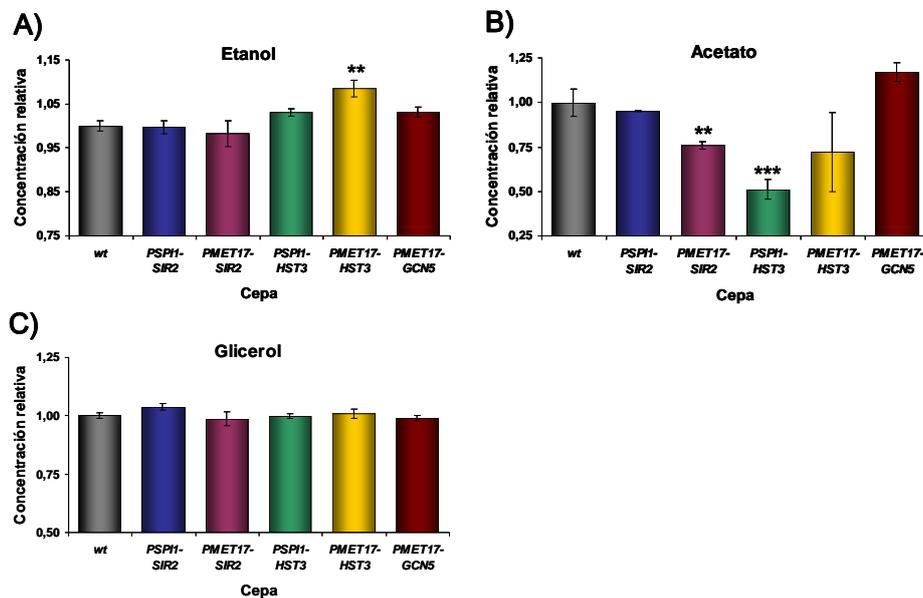


Figura 4.34. Determinación de etanol (A), acetato (B) y glicerol (C) al final del proceso de vinificación en mosto bobal de la cepa wt y de los mutantes sobreexpresantes de *SIR2*, *HST3* y *GCN5* en la cepa L2056. Se indica con asteriscos la diferencia estadísticamente significativa de la media entre la cepa wt y los mutantes (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$).

En el mutante *sir2*Δ se había observado una mayor producción de este metabolito (Figura 4.7 A), por lo que, de nuevo, los efectos de la sobreexpresión y de la delección de *SIR2* no son contrarios. Sin embargo, las cepas sobreexpresantes de Hst3p (*P_{SPI1}-HST3* y *P_{MET17}-HST3*) producen mayor cantidad que la cepa parental, siendo muy significativa la diferencia en el mutante con el promotor de *MET17* (en torno a 1 g/L más que el silvestre). Este resultado es el opuesto al observado con el mutante de delección *hst3*Δ, el cual producía significativamente menos etanol (Figura 4.7 A), de modo que se dispone de una cepa que produce una cantidad de etanol considerablemente superior a la parental. Además, este comportamiento antagónico en la producción de etanol entre el mutante sobreexpresante y el de delección, sugiere que el papel de la sirtuina Hst3p en el metabolismo del etanol es determinante. La cepa sobreexpresante de *GCN5* no muestra ningún cambio significativo con respecto a la concentración de este metabolito, al igual que se observó en el mutante de delección (Figura 4.7 A).

En cuanto a la producción de acetato, se observa una disminución en su concentración en la cepa sobreexpresante *P_{MET17}-SIR2* (Figura 4.34 B), al igual que ocurría con el mutante de delección (Figura 4.7 C). De nuevo, las cepas sobreexpresantes y de delección del gen *SIR2* se comportan de manera similar. En las cepas sobreexpresantes de *HST3* la concentración de acetato se ve significativamente disminuida, sobretodo en el mutante *P_{SPI1}-HST3*, que disminuye a la mitad (Figura 4.34 B). Este resultado también es contrario al que se observó en el mutante *hst3*Δ (Figura 4.7 C), que produce una concentración notablemente superior al del parental, por lo que Hst3p también tiene una función importante en la regulación de la producción de acetato. Cuando se estudió el papel de Hst3p en la regulación enzimática de proteínas clave del metabolismo, se comprobó que esta proteína está implicada en la regulación de las Adh, ya que el mutante presentó un importante incremento en la actividad a t5 días (Figura 4.13 D). Esta regulación de la actividad Adh por parte de Hst3p podría ser suficiente para que la concentración de etanol y de acetato se vean afectadas. La sobreexpresión de *GCN5* no provoca cambios importantes en la

concentración de acetato, sin embargo el mutante de delección presentaba un gran incremento en su producción (Figura 4.7 C). Esto tiene sentido dado la posible implicación de Gcn5p en la degradación de Ald6p por autofagia. Si la ruta de autofagia tiene un mecanismo de regulación basado en la activación/desactivación, y Gcn5p está implicada en la activación, su sobreexpresión no causaría una mayor activación de la ruta, indicando que no es el factor limitante en ese proceso.

La producción de glicerol no se vio afectada en ninguna cepa sobreexpresante (Figura 4.34 E y F), lo cual también se observó con los mutantes de delección, excepto en la cepa sobreexpresante de *P_{SPI1}-SIR2*, donde aumenta ligeramente, pero no de forma significativa.

Ya que la mayor producción de etanol de las cepas sobreexpresantes de *HST3* resulta muy interesante, se procedió a comprobar si este efecto es independiente del medio de cultivo. Se realizaron microvinificaciones en mosto sintético con ambos mutantes, obteniéndose resultados similares a los obtenidos con mosto bobal natural (Figura 4.35), debido a que en ambos se logra aumentar la concentración de etanol, siendo en este caso más elevado el aumento observado en el mutante *P_{SPI1}-HST3*.

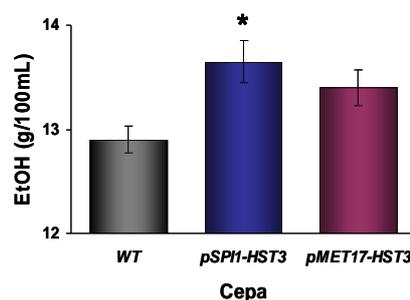


Figura 4.35 Determinación de etanol al final del proceso de vinificación en mosto sintético de la cepa wt y de los mutantes sobreexpresantes de *HST3* en la cepa L2056. Se indica con asteriscos la diferencia estadísticamente significativa de la media entre la cepa wt y los mutantes (* $p < 0.05$).

Puesto que los mutantes que sobreexpresan el gen *HST3* producen más etanol, se procedió a determinar si estos mutantes también son más resistentes a este metabolito. Para ello se realizó un experimento de resistencia a etanol a una concentración del 10 % (v/v) durante 1 hora con células procedentes de un cultivo en medio rico YPD en estado estacionario (48 horas tras el inóculo). Tras realizar el estrés, las células se sembraron en medio rico y se estudió la supervivencia mediante un recuento en placa. Como puede observarse en la Figura 4.36, los dos mutantes sobreexpresantes del gen *HST3* son significativamente más resistentes a esta concentración de etanol, lo cual se relacionaría con su mayor producción. Sin embargo, el mutante *hst3Δ* no presenta diferencias con respecto al silvestre. Los experimentos de resistencia a estrés por etanol fueron realizados con los diversos mutantes de sirtuinas y acetiltransferasas utilizados en este trabajo, no encontrándose diferencias en cuanto a su resistencia.

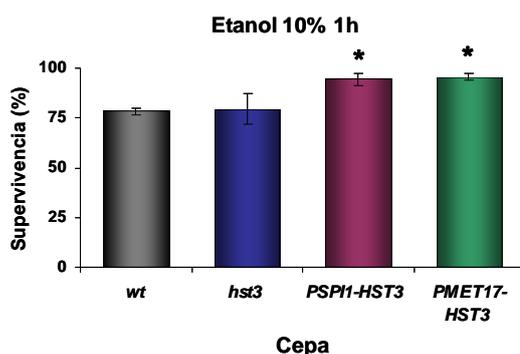


Figura 4.36. Determinación de la resistencia a estrés por etanol al 10 % (p/v) durante 1 hora en la cepa silvestre y en los mutantes sobreexpresantes de *HST3* en la cepa L2056, de células procedentes de un cultivo en estado estacionario en medio rico YPD. Se indica con asteriscos la diferencia estadísticamente significativa de la media entre la cepa wt y los mutantes (* $p < 0.05$).

Aunque sería necesario analizar otras propiedades organolépticas que no se han estudiado en este trabajo para asegurar que la calidad del

producto no se ve afectada, los resultados obtenidos con el control de la expresión del gen *HST3* podrían representar un gran interés biotecnológico, ya que demuestran que variaciones de su expresión pueden generar cepas de levaduras vínicas productoras de vinos con diferentes concentraciones de etanol y de acetato.

4.8- Extendiendo la exploración de genes implicados en la longevidad de las levaduras a otras familias de proteínas

Además del estudio de la función las acetiltransferasa y desacetilasas en el metabolismo y su efecto en la longevidad cronológica, también se ha comenzado con el estudio de otras proteínas con diferente papel en la célula y cuya función se ha relacionado con la longevidad. En el estudio global de Powers *et al.* (2006), donde se analiza globalmente la LC en condiciones de laboratorio, se observa la presencia de mutantes en las proteínas de unión a mRNA Puf3p y Pub1p entre las cepas mutantes más longevas. La proteína de unión a RNA Uth4p (Puf5p o Mpt5p) es otro miembro de la familia de proteínas con dominios homólogos a la proteína de *Drosophila* Pumilio, como Puf3p, y que fue uno de los primeros factores asociados con longevidad en levadura (Kennedy *et al.*, 1997). Por ello, se ha continuado con el estudio de la función en la longevidad de levaduras vínicas de esas tres proteínas relacionadas con el metabolismo del mRNA: Puf3p, Pub1p y Uth4p. También se ha estudiado el efecto en la longevidad de las proteínas similares a flavodoxinas homólogas Ycp4p y Rfs1p, ya que se ha descrito en el laboratorio que estas proteínas tienen un importante papel en la expresión génica de genes relacionados con la adaptación celular a la fase estacionaria (Cardona *et al.*, 2009) y podrían tener una función en la regulación de la LC.

El mutante *ycp4Δrfs1Δ* estaba disponible en el laboratorio, y deriva de la cepa BY4742. Respecto a las proteínas de unión a RNA se construyeron los mutantes de delección de estos genes en la cepa vínica haploide C9

En primer lugar, se realizaron experimentos de LC en condiciones de laboratorio (Figura 4.37). Los experimentos de LC con los mutantes de proteínas de unión a RNA mostraron que los mutantes *puf3Δ* y *uth4Δ* son menos longevos que la cepa parental, sin embargo el mutante *pub1Δ* presenta una LC aumentada (Figura 4.37 A). Respecto a la LC del doble mutante *ycp4Δrfs1Δ* se observó que este mutante muestra una pérdida de supervivencia más lenta al principio de la cinética, pero a tiempos largos este mutante es ligeramente menos longevo (Figura 4.37 B), sugiriendo que estas proteínas poseen un papel en la adaptación a la fase estacionaria debido a su capacidad para modular la expresión génica en fases tardías del crecimiento (Cardona et al., 2011).

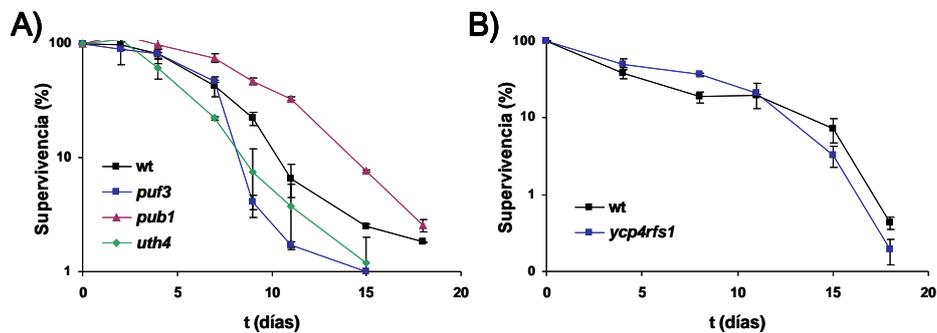


Figura 4.37. Experimentos de LC en los mutantes de proteínas de unión a mRNA *puf3Δ*, *pub1Δ* y *uth4Δ* y en el wt de la cepa vínica C9 (A) y en el mutante *ycp4Δrfs1Δ* y en el wt de la cepa de laboratorio BY4742 (B). Se determinó el número de células viables (cfu/mL) por recuento en placa a distintos tiempos del experimento de envejecimiento. Los experimentos se realizaron como mínimo por triplicado y las barras de error muestran la desviación típica (DT).

En el estudio realizado por Powers *et al.* (2006), los mutantes *puf3Δ* y *pub1Δ* presentan una longevidad notablemente aumentada, sin embargo, en nuestras condiciones el efecto de la delección de *PUF3* es el contrario, ya que presenta una LC bastante disminuida. Como se ha discutido anteriormente en este trabajo, este comportamiento distinto en cuanto a la LC entre las cepas

de laboratorio y las vnicas podría no ser contradictorio, ya que en la regulación de la longevidad de las cepas vnicas podrían haberse producido mecanismos de adaptación a su medio natural, que como se ha descrito previamente, es mucho más complejo en cuanto a su composición. En cuanto al comportamiento del mutante *uth4Δ*, los resultados estarían de acuerdo con lo descrito para cepas de laboratorio, ya que en estas condiciones la delección de *UTH4* provoca defectos en la adaptación a condiciones de restricción calórica y disminuye la longevidad replicativa (Kennedy *et al.*, 1997).

Debido al mayor efecto en la longevidad en condiciones de laboratorio de las cepas mutantes en genes de unión a RNA, se prosiguió su caracterización en condiciones industriales. Para ello se realizaron microvinificaciones en mosto bobal con estos mutantes, y como puede observarse en la Figura 4.38 A, no se dan diferencias significativas en cuanto a la densidad celular alcanzada por los mutantes con respecto a la cepa silvestre, incluso podría decirse que tienen una velocidad inicial de crecimiento mayor. En cuanto a la velocidad de muerte, el mutante *uth4Δ* presenta una cinética más rápida, lo que se traduce en un descenso en su longevidad (Figura 4.38 B), tal y como se había observado en medio de laboratorio (Figura 4.37 A). El comportamiento del mutante *pub1Δ* coincide parcialmente con lo observado en medio de laboratorio, ya que en condiciones de vinificación también es más longevo que la cepa parental al inicio de la fermentación, aunque a tiempos más largos se iguala con la cepa control. Sin embargo, el mutante *puf3Δ* muestra una longevidad aumentada, de manera contraria a lo que se había observado en medio de laboratorio (Figura 4.37 A), pero coincidiendo con lo descrito en el estudio global realizado con cepas de laboratorio (Powers *et al.*, 2006).

En cuanto a la velocidad de consumo de azúcares no se observaron diferencias significativas entre los mutantes y la cepa silvestre (Figura 4.38 C), por lo que los efectos observados en longevidad de los mutantes parecen independientes de la tasa metabólica.

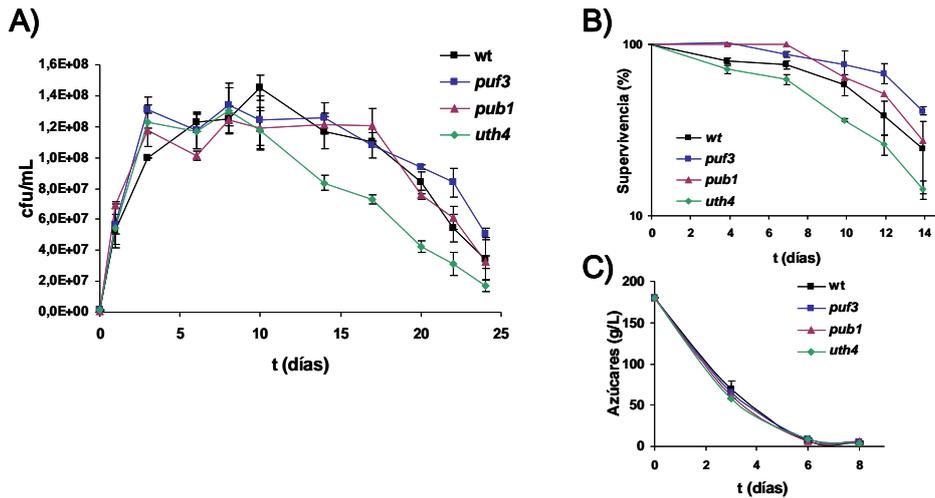


Figura 4.38. Curvas de crecimiento y muerte celular (A), CLS (B) y determinación de azúcares reductores (C) en los mutantes *puf3* Δ *pub1* Δ y *uth4* Δ y en el wt de la cepa C9 durante el proceso de vinificación en mosto bobal. Se determinó el número de células viables (cfu/mL) por recuento en placa a distintos tiempos de vinificación. Los experimentos se realizaron como mínimo por triplicado y las barras de error muestran la desviación típica (DT).

Posteriormente, se determinó la concentración de etanol, glicerol, acetato y acetaldehído al final de cada una de las fermentaciones vínicas realizadas con nuestros mutantes. En la Figura 4.39 se muestran las concentraciones relativas producidas por los mutantes con respecto a la cepa silvestre. Todos los mutantes producen alrededor del 10-12 % (p/v) de etanol, aunque se observa algunas diferencias entre ellos (Figura 4.39 A), ya que el mutante *pub1* Δ produce menor cantidad (unos 3 g/L menos) y el mutante *uth4* Δ produce una mayor concentración (unos 5 g/L más), aunque estas diferencias no han resultado ser significativas. En cuanto al glicerol, la cepa parental produce alrededor de 6 g/L y no se observa variación en la producción de este metabolito en los mutantes *puf3* y *uth4* Δ (Figura 4.39 B). Sin embargo, en el mutante *pub1* Δ se produce una mayor cantidad (en torno a 0.45 g/L más). Este aumento del contenido en glicerol en el mutante podría ser una de las causas del aumento de su longevidad. Los mutantes *puf3* y

pub1 Δ producen mayor cantidad de acetato, siendo muy significativo el aumento observado en el mutante *pub1* Δ , ya que produce más del doble (2.25 veces más) (Figura 4.39 C). Este resultado es similar al obtenido para el mutante *gcn5* Δ , que producía 2.5 veces más acetato que la cepa parental y sin embargo mostraba una longevidad notablemente aumentada, por lo que de nuevo estaría indicando que el acetato no tiene un papel clave en el control de la LC durante la vinificación, en un medio tamponado.

En la producción de acetaldehído no se observaron diferencias significativas entre los mutantes.

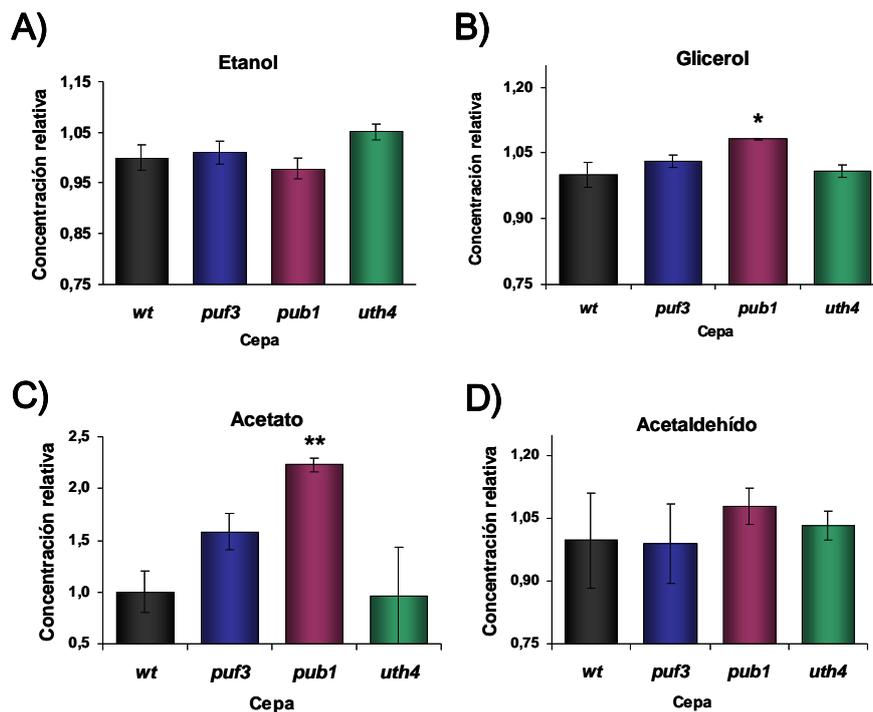


Figura 4.39. Determinación de la concentración relativa de metabolitos al final del proceso de vinificación en mosto bobal en el wt y en los mutantes *puf3* Δ , *pub1* Δ y *uth4* Δ en la cepa C9. (A) Determinación de etanol, (B) Determinación de glicerol, (C) Determinación de acetato, (D) Determinación de acetaldehído. Se indican con asteriscos las diferencias estadísticamente significativas de las medias de los mutantes con respecto a la cepa wt (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Estos resultados indican que las proteínas Puf3p y Uth4p tendrían un papel en la regulación de la LC en levaduras vínicas, aunque dicho papel parece independiente de un efecto en el metabolismo fermentativo. Posiblemente los cambios de longevidad observados en los mutantes de estas proteínas se deban a su importante función en el metabolismo del mRNA de genes con relevancia en longevidad.

Sin embargo, la proteína Pub1p sí que posee un impacto en la regulación del metabolismo que podría justificar su efecto en la longevidad. Para estudiar si este efecto se produce de manera independiente al fondo genético, se comprobó si el efecto de la disrupción de este gen en la cepa industrial poco longeva EC1118 es similar al observado para C9. Se delecionaron las dos copias del gen *PUB1* presentes en esta cepa y se realizaron microvinificaciones en mosto bobal. El comportamiento de

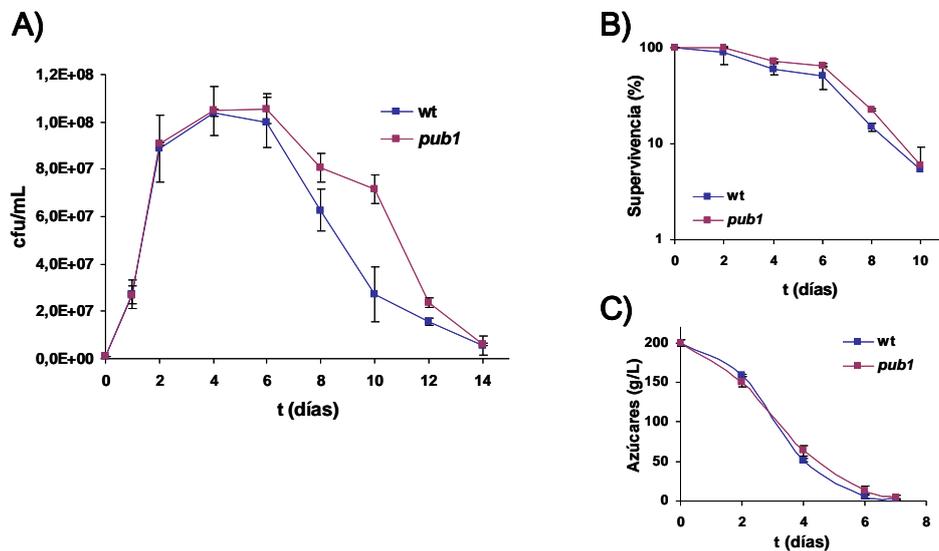


Figura 4.40. Curvas de crecimiento y muerte celular (A), CLS (B) y determinación de azúcares reductores (C) en el mutante *pub1Δ* y en el wt de la cepa EC1118 durante el proceso de vinificación en mosto bobal. Los experimentos se realizaron de forma equivalente a la Figura 4.37.

crecimiento y de muerte celular observado para el mutante en esta cepa (Figura 4.40) es muy similar al observado en la cepa C9 (Figura 4.38), ya que el mutante *pub1* Δ ve ligeramente aumentada su longevidad a tiempos iniciales.

A continuación, se determinó la producción de metabolitos al final de la vinificación (Figura 4.41). La producción de etanol también es menor en el mutante *pub1* Δ en la cepa EC1118, aunque tampoco se logró obtener un resultado estadísticamente significativo. En cuanto a la producción de

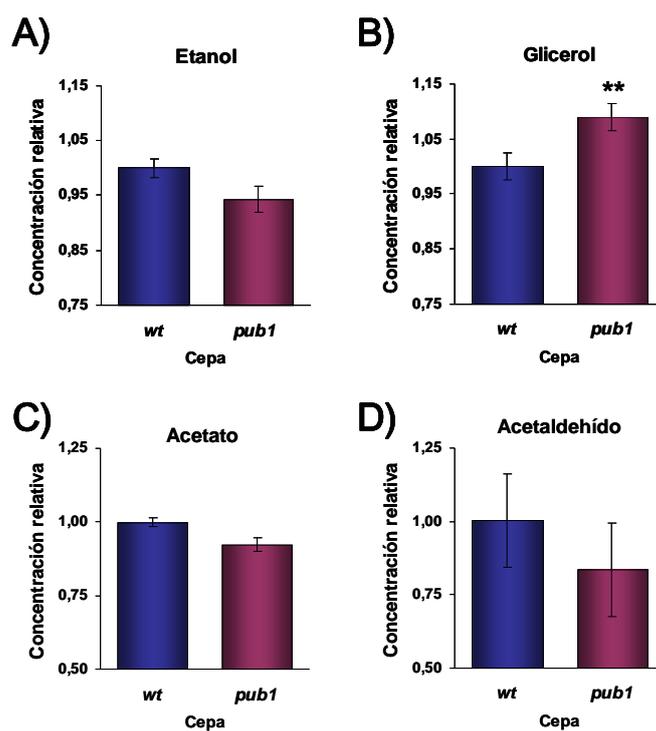


Figura 4.41. Determinación de la concentración relativa de metabolitos al final del proceso de vinificación en mosto bobal en el wt y en el mutante *pub1* Δ de la cepa EC1118. (A) Determinación de etanol, (B) Determinación de glicerol, (C) Determinación de acetato, (D) Determinación de acetaldehído. Se indica con asteriscos las diferencias estadísticamente significativas de las medias de los mutantes con respecto a la cepa wt (** $p < 0.01$).

glicerol, el mutante produce mayor cantidad que la cepa silvestre y en este caso la diferencia es ligeramente mayor que la observada para la cepa C9 (Figura 4.39 B). Sin embargo, la producción de acetato no varía con respecto al silvestre, al contrario de lo que se observó en la cepa C9 donde el mutante producía considerablemente más cantidad de este metabolito.

Estos resultados obtenidos en la cepa EC1118 resultan interesantes de cara a una posible mejora biotecnológica en la producción de vino, ya que el mutante *pub1*Δ produce menos etanol, más glicerol y no varía su concentración de acetato y acetaldehído, metabolitos de consideración negativa en la industria vinícola.

Como se ha podido comprobar en este apartado, la determinación de la longevidad cronológica es un aspecto muy complicado desde el punto de vista de la implicación de los mecanismos celulares que intervienen en su regulación. Mecanismos que regulan rutas muy alejadas en cuanto a su función en la célula, tales como la maquinaria de acetilación/desacetilación que controlan la transcripción o las proteínas implicadas en la regulación de la traducción de los RNA mensajeros, pueden converger en la regulación de un mismo aspecto, la longevidad. Esto hace muy complicado el estudio de la caracterización de los factores que regulan el envejecimiento, de cara a poder actuar sobre ellos para intentar modularlo, pero sin duda, esta complejidad parece necesaria debido a la vital importancia que tiene.

Conclusiones

Las conclusiones generales que se deducen de este trabajo se describen a continuación:

- 1- Las condiciones ambientales ejercen un importante efecto en la longevidad cronológica (LC) de las levaduras vínicas, como demuestra la disminución de la LC provocada por el aumento de la acidez y de la temperatura, por la acumulación de compuestos de dos carbonos durante la fermentación o por la presencia de los polifenoles resveratrol y quercetina. El efecto pro-oxidante del resveratrol y la inhibición de los enzimas alcohol y aldehído deshidrogenasa por la quercetina, pueden relacionarse con la disminución de la LC, mientras que es la primera vez que se describe un efecto inductor del envejecimiento por parte del acetaldehído.
- 2- El análisis de la LC de levaduras vínicas comerciales en condiciones de laboratorio demuestra la existencia de una gran variabilidad natural de longevidad, existiendo una correlación positiva con la resistencia a estrés en fase estacionaria, especialmente al estrés oxidativo.
- 3- Los análisis globales de expresión génica en cepas de larga y corta LC permiten establecer una correlación entre menor LC y una mayor tasa de expresión de genes implicados en el metabolismo. Esto podría deberse a una mayor actividad de la proteína quinasa A causada por la expresión incrementada del gen de la adenilato ciclasa *CYR1*. La proteína mitocondrial Rdl2p, de función antioxidante, es determinante para la LC a corto plazo durante la vinificación.
- 4- En condiciones de vinificación la autofagia posee un efecto negativo en la LC, contrariamente a lo observado en condiciones de laboratorio y posiblemente debido a las diferencias fisiológicas de las células en unas condiciones y otras. La acetiltransferasa Gcn5p

controla la degradación por autofagia de la aldehído deshidrogenasa Ald6p en condiciones de ayuno de nitrógeno, provocando una acumulación de ácido acético en el medio. En condiciones de vinificación, el ácido acético no tiene un efecto negativo en la LC, de manera contraria a lo que ocurre en condiciones de laboratorio.

- 5- La maquinaria de acetilación/desacetilación ejerce un importante efecto en la determinación de la LC. Dependiendo de las condiciones de crecimiento este efecto puede ser positivo o negativo, ya que el papel de las sirtuinas Sir2p y Hst2p y de las acetiltransferasas Sas2p, Gcn5p y Spt10p durante el envejecimiento en condiciones de vinificación es el contrario al causado en condiciones de laboratorio.
- 6- La manipulación química o genética de la actividad de determinados enzimas que componen la maquinaria de acetilación/desacetilación o las rutas de señalización por nutrientes, es una forma eficaz de alterar la producción de metabolitos en la fermentación alcohólica. Por ejemplo, la delección de *SIR2* disminuye la producción de ácido acético, la delección de *GCN5* aumenta la producción de glicerol, la sobreexpresión de *HST3* aumenta la producción de etanol y la inhibición química de TOR incrementa la concentración de glicerol producido tras la fermentación.
- 7- La delección de los genes *SIR2*, *GCN5* y *SPT10* inhibe la capacidad de las levaduras vínicas de formar biofilm. En el caso de *SIR2*, el efecto se basa en la regulación de la expresión del gen de la floculina Flo11p.
- 8- Durante la vinificación, la restricción dietaria causada por la disminución de nitrógeno asimilable aumenta la LC. El bloqueo parcial de TOR mediante la inhibición de la glutamina sintetasa contribuye también a la extensión de la LC, proceso que ocurre de manera dependiente de la actividad de Gcn5p.

Bibliografía

- Abeliovich, H. and Gonzalez, R. (2009). Autophagy in food biotechnology. *Autophagy* **5**, 925-9.
- Adams, A., Kaiser, C. and Cold Spring Harbor Laboratory. (1998). *Methods in yeast genetics : a Cold Spring Harbor Laboratory course manual*, 1997 edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Plainview, N.Y.
- Alexandre, H., Ansanay-Galeote, V., Dequin, S. and Blondin, B. (2001). Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **498**, 98-103.
- Alexandre, H., Costello, P. J., Remize, F., Guzzo, J. and Guilloux-Benatier, M. (2004). *Saccharomyces cerevisiae*-*Oenococcus oeni* interactions in wine: current knowledge and perspectives. *Int J Food Microbiol* **93**, 141-54.
- Alvers, A. L., Fishwick, L. K., Wood, M. S., Hu, D., Chung, H. S., Dunn, W. A., Jr. and Aris, J. P. (2009). Autophagy and amino acid homeostasis are required for chronological longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell* **8**, 353-69.
- Aranda, A., Querol, A. and del Olmo, M. (2002). Correlation between acetaldehyde and ethanol resistance and expression of HSP genes in yeast strains isolated during the biological aging of sherry wines. *Arch Microbiol* **177**, 304-12.
- Aranda, A. and del Olmo MI, M. (2003). Response to acetaldehyde stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* involves a strain-dependent regulation of several ALD genes and is mediated by the general stress response pathway. *Yeast* **20**, 747-59.
- Aranda, A. and del Olmo, M. L. (2004). Exposure of *Saccharomyces cerevisiae* to acetaldehyde induces sulfur amino acid metabolism and polyamine transporter genes, which depend on Met4p and Haa1p transcription factors, respectively. *Appl Environ Microbiol* **70**, 1913-22.
- Aranda, A., Matallana, E., del Olmo, M. (2011). *Saccharomyces* Yeast I: Primary fermentation en *Molecular wine microbiology*. Amsterdam ; Boston: Academic Press.

- Ashrafi, K., Sinclair, D., Gordon, J. I. and Guarente, L. (1999). Passage through stationary phase advances replicative aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9100-5.
- Bakalinsky, A. T. and Snow, R. (1990). The chromosomal constitution of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **6**, 367-82.
- Bauer, F. F., Govender, P. and Bester, M. C. (2010). Yeast flocculation and its biotechnological relevance. *Appl Microbiol Biotechnol* **88**, 31-9.
- Baur, J. A., Chen, D., Chini, E. N., Chua, K., Cohen, H. Y., de Cabo, R., Deng, C., Dimmeler, S., Gius, D., Guarente, L. P., Helfand, S. L., Imai, S., Itoh, H., Kadowaki, T., Koya, D., Leeuwenburgh, C., McBurney, M., Nabeshima, Y., Neri, C., Oberdoerffer, P., Pestell, R. G., Rogina, B., Sadoshima, J., Sartorelli, V., Serrano, M., Sinclair, D. A., Steegborn, C., Tatar, M., Tissenbaum, H. A., Tong, Q., Tsubota, K., Vaquero, A. and Verdin, E. (2010). Dietary restriction: standing up for sirtuins. *Science* **329**, 1012-3; author reply 1013-4.
- Belinha, I., Amorim, M. A., Rodrigues, P., de Freitas, V., Moradas-Ferreira, P., Mateus, N. and Costa, V. (2007). Quercetin increases oxidative stress resistance and longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem* **55**, 2446-51.
- Bell, S. J., Henschke, P.A. (2005) Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Aust J Grape Wine Res* **11**:242–295
- Beltran, G., Novo, M., Leberre, V., Sokol, S., Labourdette, D., Guillamon, J. M., Mas, A., Francois, J. and Rozes, N. (2006). Integration of transcriptomic and metabolic analyses for understanding the global responses of low-temperature winemaking fermentations. *FEMS Yeast Res* **6**, 1167-83.
- Benda, I. (1982). Wine and brandy, pp. 292-402. En Reed, G. (ed). Prescott and Dunn's industrial microbiology. AVI Technical Books, Westport, Conn.
- Benitez, T., Codon, A. C. (2011). Yeast used in biologically aged wines en *Molecular wine microbiology*. Amsterdam ; Boston: Academic Press.

- Bisson, L. F., Karpel, J. E., Ramakrishnan, V. and Joseph, L. (2007). Functional genomics of wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv Food Nutr Res* **53**, 65-121.
- Bitterman, K. J., Anderson, R. M., Cohen, H. Y., Latorre-Esteves, M. and Sinclair, D. A. (2002). Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1. *J Biol Chem* **277**, 45099-107.
- Blagosklonny, M. V. (2008). Aging: ROS or TOR. *Cell Cycle* **7**, 3344-54.
- Boulton RB, Singleton VL, Bisson LF, Kunkel RE (1996). En *Principles and practices of winemaking*. Chapman, 102-192.
- Bradbury, J. E., Richards, K. D., Niederer, H. A., Lee, S. A., Rod Dunbar, P. and Gardner, R. C. (2006). A homozygous diploid subset of commercial wine yeast strains. *Antonie Van Leeuwenhoek* **89**, 27-37.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Bruckner, S. and Mosch, H. U. (2011). Choosing the right lifestyle: adhesion and development in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.*
- Burhans, W. C. and Weinberger, M. (2009). Acetic acid effects on aging in budding yeast: are they relevant to aging in higher eukaryotes? *Cell Cycle* **8**, 2300-2.
- Burnett, C., Valentini, S., Cabreiro, F., Goss, M., Somogyvari, M., Piper, M. D., Hoddinott, M., Sutphin, G. L., Leko, V., McElwee, J. J., Vazquez-Manrique, R. P., Orfila, A. M., Ackerman, D., Au, C., Vinti, G., Riesen, M., Howard, K., Neri, C., Bedalov, A., Kaeberlein, M., Soti, C., Partridge, L. and Gems, D. (2011). Absence of effects of Sir2 overexpression on lifespan in *C. elegans* and *Drosophila*. *Nature* **477**, 482-5.
- Burtner, C. R., Murakami, C. J., Kennedy, B. K. and Kaeberlein, M. (2009). A molecular mechanism of chronological aging in yeast. *Cell Cycle* **8**, 1256-70.

- Cardona, F., Carrasco, P., Perez-Ortin, J. E., del Olmo, M. and Aranda, A. (2007). A novel approach for the improvement of stress resistance in wine yeasts. *Int J Food Microbiol* **114**, 83-91.
- Cardona, F., Orozco, H., Friant, S., Aranda, A. and del Olmo, M. (2011). The *Saccharomyces cerevisiae* flavodoxin-like proteins Ycp4 and Rfs1 play a role in stress response and in the regulation of genes related to metabolism. *Arch Microbiol* **193**, 515-25.
- Carnes, B. A. (2011). What is lifespan regulation and why does it exist? *Biogerontology* **12**, 367-74.
- Carrascosa, A.V., Muñoz, R. and González, R. (2011). *Molecular wine microbiology*, 1. ed. Academic Press: Amsterdam ; Boston.
- Carrascosa, A.V., Martinez-Rodriguez, A. J., Cebollero, E., Gonzalez, R. (2011). *Saccharomyces* Yeast II: Secondary fermentation en *Molecular wine microbiology*. Amsterdam ; Boston: Academic Press.
- Castor, J. G. (1953). The B-complex vitamins of musts and wines as microbial growth factors. *Appl Microbiol* **1**, 97-102.
- Cebollero, E., Martinez-Rodriguez, A., Carrascosa, A. V. and Gonzalez, R. (2005). Overexpression of csc1-1. A plausible strategy to obtain wine yeast strains undergoing accelerated autolysis. *FEMS Microbiol Lett* **246**, 1-9.
- Cebollero, E. and Gonzalez, R. (2006). Induction of autophagy by second-fermentation yeasts during elaboration of sparkling wines. *Appl Environ Microbiol* **72**, 4121-7.
- Cebollero, E., Rejas, M. T. and Gonzalez, R. (2008). Autophagy in wine making. *Methods Enzymol* **451**, 163-75.
- Cereda, A., Carpen, A., Picariello, G., Tedeschi, G. and Pagani, S. (2009). The lack of rhodanese RhdA affects the sensitivity of *Azotobacter vinelandii* to oxidative events. *Biochem J* **418**, 135-43.
- Codon, A. C., Gasent-Ramirez, J. M. and Benitez, T. (1995). Factors which affect the frequency of sporulation and tetrad formation in *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeasts. *Appl Environ Microbiol* **61**, 630-8.

- Crespo, J.L., Powers, T., Fowler, B., and Hall, M.N. (2002). The TOR-controlled transcription activators GLN3, RTG1, and RTG3 are regulated in response to intracellular levels of glutamine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 6784-6789.
- Dang, W., Steffen, K. K., Perry, R., Dorsey, J. A., Johnson, F. B., Shilatifard, A., Kaeberlein, M., Kennedy, B. K. and Berger, S. L. (2009). Histone H4 lysine 16 acetylation regulates cellular lifespan. *Nature* **459**, 802-7.
- de Vuyst, L. D., Neysens, P. (2005). The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends Food Sci Technol.* **16**:43-56.
- de Smidt, O., du Preez, J. C. and Albertyn, J. (2008). The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: a comprehensive review. *FEMS Yeast Res* **8**, 967-78.
- Debré, P. (1998). Louis Pasteur. Johns Hopkins University Press: Baltimore.
- Degré, R. (1993). Selection and comercial cultivation of wine yeast and bacteria, pp 421-447. En Fleet GH (ed). *Wine microbiology and biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.
- Delaney, J. R., Murakami, C. J., Olsen, B., Kennedy, B. K. and Kaeberlein, M. (2011). Quantitative evidence for early life fitness defects from 32 longevity-associated alleles in yeast. *Cell Cycle* **10**, 156-65.
- Delneri, D., Tomlin, G. C., Wixon, J. L., Hutter, A., Sefton, M., Louis, E. J. and Oliver, S. G. (2000). Exploring redundancy in the yeast genome: an improved strategy for use of the cre-loxP system. *Gene* **252**, 127-35.
- del Pozo, L., Abarca, D., Claros, M. G. and Jimenez, A. (1991). Cycloheximide resistance as a yeast cloning marker. *Curr Genet* **19**, 353-8.
- Dietvorst, J. and Brandt, A. (2010). Histone modifying proteins Gcn5 and Hda1 affect flocculation in *Saccharomyces cerevisiae* during high-gravity fermentation. *Curr Genet* **56**, 75-85.
- Eisenberg, T., Knauer, H., Schauer, A., Buttner, S., Ruckstuhl, C., Carmona-Gutierrez, D., Ring, J., Schroeder, S., Magnes, C.,

- Antonacci, L., Fussi, H., Deszcz, L., Hartl, R., Schraml, E., Criollo, A., Megalou, E., Weiskopf, D., Laun, P., Heeren, G., Breitenbach, M., Grubeck-Loebenstein, B., Herker, E., Fahrenkrog, B., Frohlich, K. U., Sinner, F., Tavernarakis, N., Minois, N., Kroemer, G. and Madeo, F. (2009). Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat Cell Biol* **11**, 1305-14.
- Erjavec, N., Larsson, L., Grantham, J. and Nystrom, T. (2007). Accelerated aging and failure to segregate damaged proteins in Sir2 mutants can be suppressed by overproducing the protein aggregation-remodeling factor Hsp104p. *Genes Dev* **21**, 2410-21.
- Esteve-Zarzoso, B., Fernandez-Espinar, M. T. and Querol, A. (2004). Authentication and identification of *Saccharomyces cerevisiae* 'flor' yeast races involved in sherry ageing. *Antonie Van Leeuwenhoek* **85**, 151-8.
- Fabrizio, P., Pozza, F., Pletcher, S. D., Gendron, C. M. and Longo, V. D. (2001). Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science* **292**, 288-90.
- Fabrizio, P. and Longo, V. D. (2003). The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell* **2**, 73-81.
- Fabrizio, P., Liou, L. L., Moy, V. N., Diaspro, A., Valentine, J. S., Gralla, E. B. and Longo, V. D. (2003). SOD2 functions downstream of Sch9 to extend longevity in yeast. *Genetics* **163**, 35-46.
- Fabrizio, P., Battistella, L., Vardavas, R., Gattazzo, C., Liou, L. L., Diaspro, A., Dossen, J. W., Gralla, E. B. and Longo, V. D. (2004a). Superoxide is a mediator of an altruistic aging program in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **166**, 1055-67.
- Fabrizio, P., Pletcher, S. D., Minois, N., Vaupel, J. W. and Longo, V. D. (2004b). Chronological aging-independent replicative life span regulation by Msn2/Msn4 and Sod2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **557**, 136-42.

- Fabrizio, P., Gattazzo, C., Battistella, L., Wei, M., Cheng, C., McGrew, K. and Longo, V. D. (2005). Sir2 blocks extreme life-span extension. *Cell* **123**, 655-67.
- Fabrizio, P. and Longo, V. D. (2008). Chronological aging-induced apoptosis in yeast. *Biochim Biophys Acta* **1783**, 1280-5.
- Fernandez-Espinar, M. T., Lopez, V., Ramon, D., Bartra, E. and Querol, A. (2001). Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *Int J Food Microbiol* **70**, 1-10.
- Fidalgo, M., Barrales, R. R., Ibeas, J. I. and Jimenez, J. (2006). Adaptive evolution by mutations in the FLO11 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 11228-33.
- Fleet, G. H. (1993). *Wine microbiology and biotechnology*. Harwood Academic Publishers: Chur ; Philadelphia, Pa.
- Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *Int J Food Microbiol* **86**, 11-22.
- Fontana, L., Partridge, L. and Longo, V. D. (2010). Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science* **328**, 321-6.
- Foster, M. W., Forrester, M. T. and Stamler, J. S. (2009). A protein microarray-based analysis of S-nitrosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 18948-53.
- Franca, M. B., Panek, A. D. and Eleutherio, E. C. (2007). Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **146**, 621-31.
- Fugelsang, KC (1996). En *Wine Microbiology*. Chapman and Hall, New York, USA.
- Fujita, K., Matsuyama, A., Kobayashi, Y. and Iwahashi, H. (2006). The genome-wide screening of yeast deletion mutants to identify the genes required for tolerance to ethanol and other alcohols. *FEMS Yeast Res* **6**, 744-50.
- Gambutì, A., Strollo, D., Ugliano, M., Lecce, L. and Moio, L. (2004). trans-Resveratrol, quercetin, (+)-catechin, and (-)-epicatechin content in south Italian monovarietal wines: relationship with maceration time

- and marc pressing during winemaking. *J Agric Food Chem* **52**, 5747-51.
- Garre, E., Raginel, F., Palacios, A., Julien, A. and Matallana, E. (2010). Oxidative stress responses and lipid peroxidation damage are induced during dehydration in the production of dry active wine yeasts. *Int J Food Microbiol* **136**, 295-303.
- Gietz, R. D. and Woods, R. A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* **350**, 87-96.
- Gomez-Pastor, R., Perez-Torrado, R., Cabisco, E. and Matallana, E. (2010a). Transcriptomic and proteomic insights of the wine yeast biomass propagation process. *FEMS Yeast Res* **10**, 870-84.
- Gomez-Pastor, R., Perez-Torrado, R., Cabisco, E., Ros, J. and Matallana, E. (2010b). Reduction of oxidative cellular damage by overexpression of the thioredoxin TRX2 gene improves yield and quality of wine yeast dry active biomass. *Microb Cell Fact* **9**, 9.
- Goossens, A., de La Fuente, N., Forment, J., Serrano, R. and Portillo, F. (2000). Regulation of yeast H(+)-ATPase by protein kinases belonging to a family dedicated to activation of plasma membrane transporters. *Mol Cell Biol* **20**, 7654-61.
- Graef, M. and Nunnari, J. (2011). A role for mitochondria in autophagy regulation. *Autophagy* **7**.
- Guldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J. and Hegemann, J. H. (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* **24**, 2519-24.
- Hadfield, C., Jordan, B. E., Mount, R. C., Pretorius, G. H. and Burak, E. (1990). G418-resistance as a dominant marker and reporter for gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **18**, 303-13.
- Halme, A., Bumgarner, S., Styles, C. and Fink, G. R. (2004). Genetic and epigenetic regulation of the FLO gene family generates cell-surface variation in yeast. *Cell* **116**, 405-15.

- Heard GM, Fleet GH (1988). The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *J. Appl. Bact.* **65**:23-28.
- Henschke, P. A. y Jiranek, V. (1992) Yeast: Metabolism of nitrogen compounds en *Wine Microbiology and Biotechnology*; Fleet, G.H., Ed.; Harwood Academic Publishers: Switzerland.
- Herker, E., Jungwirth, H., Lehmann, K. A., Maldener, C., Frohlich, K. U., Wissing, S., Buttner, S., Fehr, M., Sigrist, S. and Madeo, F. (2004). Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *J Cell Biol* **164**, 501-7.
- Hoffman, C. S. and Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**, 267-72.
- Howitz, K. T., Bitterman, K. J., Cohen, H. Y., Lamming, D. W., Lavu, S., Wood, J. G., Zipkin, R. E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L. L., Scherer, B. and Sinclair, D. A. (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* **425**, 191-6.
- Huang, W. P. and Klionsky, D. J. (2002). Autophagy in yeast: a review of the molecular machinery. *Cell Struct Funct* **27**, 409-20.
- Ishigami, M., Nakagawa, Y., Hayakawa, M. and Imura, Y. (2004). FLO11 is essential for flor formation caused by the C-terminal deletion of NRG1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* **237**, 425-30.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**, 163-8.
- Jackson, R. S. (2000). *Wine science : principles, practice, perception*, 2nd edn. Academic Press: San Diego.
- Kaeberlein, M., Kirkland, K. T., Fields, S. and Kennedy, B. K. (2004). Sir2-independent life span extension by calorie restriction in yeast. *PLoS Biol* **2**, E296.
- Kaeberlein, M., Powers, R. W., 3rd, Steffen, K. K., Westman, E. A., Hu, D., Dang, N., Kerr, E. O., Kirkland, K. T., Fields, S. and Kennedy, B. K.

- (2005). Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science* **310**, 1193-6.
- Kaeberlein, M., Burtner, C. R. and Kennedy, B. K. (2007). Recent developments in yeast aging. *PLoS Genet* **3**, e84.
- Kaeberlein, M. (2010). Lessons on longevity from budding yeast. *Nature* **464**, 513-9.
- Kaeberlein, M. and Kennedy, B. K. (2011). Hot topics in aging research: protein translation and TOR signaling, 2010. *Aging Cell* **10**, 185-90.
- Karunanithi, S., Vadaie, N., Chavel, C. A., Birkaya, B., Joshi, J., Grell, L. and Cullen, P. J. (2010). Shedding of the mucin-like flocculin Flo11p reveals a new aspect of fungal adhesion regulation. *Curr Biol* **20**, 1389-95.
- Kennedy BK, Austriaco NR, Jr. , Guarente L (1994). Daughter cells of *Saccharomyces cerevisiae* from old mothers display a reduced life span. *The Journal of cell biology*. **127**, 1985-1993.
- Kiel, J. A. (2010). Autophagy in unicellular eukaryotes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **365**, 819-30.
- Kim, S., Ohkuni, K., Couplan, E. and Jazwinski, S. M. (2004). The histone acetyltransferase GCN5 modulates the retrograde response and genome stability determining yeast longevity. *Biogerontology* **5**, 305-16.
- Kitson, T. M., Kitson, K. E. and Moore, S. A. (2001). Interaction of sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase with quercetin, resveratrol and diethylstilbestrol. *Chem Biol Interact* **130-132**, 57-69.
- Krebs, J. E. (2007). Moving marks: dynamic histone modifications in yeast. *Mol Biosyst* **3**, 590-7.
- Kumar, G. R., Goyashiki, R., Ramakrishnan, V., Karpel, J. E., Bisson, L. F. (2008). Genes required for ethanol tolerance and utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Am. J. Enol. Vitic.* **59**: 401-411.
- Kurtzman, C. P. and Fell, J. W. (2006). Yeast systematics and phylogeny – implications of molecular identification methods for studies in ecology.

- En *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Rosa CA, Peter G (eds) Springer pp. 11-30.
- Halme, A., Bumgarner, S., Styles, C. and Fink, G. R. (2004). Genetic and epigenetic regulation of the FLO gene family generates cell-surface variation in yeast. *Cell* **116**, 405-15.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-80.
- Hoffman, C. S. and Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**, 267-72.
- Huh, W. K., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S. and O'Shea, E. K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**, 686-91.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**, 163-8.
- Lafon-Lafourcade, S. (1982). Wine and brandy, pp. 81-163. En Reed, G. (ed). *Biotechnology*. Verlag-Chemie. Heidelberg.
- Lai, C. Y., Jaruga, E., Borghouts, C. and Jazwinski, S. M. (2002). A mutation in the ATP2 gene abrogates the age asymmetry between mother and daughter cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **162**, 73-87.
- Lamming, D. W., Latorre-Esteves, M., Medvedik, O., Wong, S. N., Tsang, F. A., Wang, C., Lin, S. J. and Sinclair, D. A. (2005). HST2 mediates SIR2-independent life-span extension by calorie restriction. *Science* **309**, 1861-4.
- Landry, C. R., Townsend, J. P., Hartl, D. L. and Cavalieri, D. (2006). Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Ecol* **15**, 575-91.
- Laschober, G. T., Ruli, D., Hofer, E., Muck, C., Carmona-Gutierrez, D., Ring, J., Hutter, E., Ruckenstuhl, C., Micutkova, L., Brunauer, R., Jamnig, A., Trimmel, D., Herndler-Brandstetter, D., Brunner, S., Zenzmaier, C., Sampson, N., Breitenbach, M., Frohlich, K. U., Grubeck-

- Loebenstein, B., Berger, P., Wieser, M., Grillari-Voglauer, R., Thallinger, G. G., Grillari, J., Trajanoski, Z., Madeo, F., Lepperdinger, G. and Jansen-Durr, P. (2010). Identification of evolutionarily conserved genetic regulators of cellular aging. *Aging Cell* **9**, 1084-97.
- Leadsham, J. E. and Gourlay, C. W. (2010). cAMP/PKA signaling balances respiratory activity with mitochondria dependent apoptosis via transcriptional regulation. *BMC Cell Biol* **11**, 92.
- Lee, I. H. and Finkel, T. (2009). Regulation of autophagy by the p300 acetyltransferase. *J Biol Chem* **284**, 6322-8.
- Lin, S. J., Defossez, P. A. and Guarente, L. (2000). Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **289**, 2126-8.
- Lin, S. J. and Guarente, L. (2003). Nicotinamide adenine dinucleotide, a metabolic regulator of transcription, longevity and disease. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 241-6.
- Lin, Y. Y., Lu, J. Y., Zhang, J., Walter, W., Dang, W., Wan, J., Tao, S. C., Qian, J., Zhao, Y., Boeke, J. D., Berger, S. L. and Zhu, H. (2009). Protein acetylation microarray reveals that NuA4 controls key metabolic target regulating gluconeogenesis. *Cell* **136**, 1073-84.
- Longtine, M. S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P. and Pringle, J. R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 953-61.
- Martinez-Rodriguez, A. J., Carrascosa, A. V. and Polo, M. C. (2001). Release of nitrogen compounds to the extracellular medium by three strains of *Saccharomyces cerevisiae* during induced autolysis in a model wine system. *Int J Food Microbiol* **68**, 155-60.
- Martorell, P., Forment, J. V., de Llanos, R., Monton, F., Llopis, S., Gonzalez, N., Genoves, S., Cienfuegos, E., Monzo, H. and Ramon, D. (2011). Use of *Saccharomyces cerevisiae* and *Caenorhabditis elegans* as model organisms to study the effect of cocoa polyphenols in the resistance to oxidative stress. *J Agric Food Chem* **59**, 2077-85.

- Matecic, M., Smith, D. L., Pan, X., Maqani, N., Bekiranov, S., Boeke, J. D. and Smith, J. S. (2010). A microarray-based genetic screen for yeast chronological aging factors. *PLoS Genet* **6**, e1000921.
- Mathew, R., Kongara, S., Beaudoin, B., Karp, C. M., Bray, K., Degenhardt, K., Chen, G., Jin, S. and White, E. (2007). Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev* **21**, 1367-81.
- Millar, C. B. and Grunstein, M. (2006). Genome-wide patterns of histone modifications in yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 657-66.
- Miura, T., Muraoka, S. and Fujimoto, Y. (2002). Inactivation of creatine kinase induced by stilbene derivatives. *Pharmacol Toxicol* **90**, 66-72.
- Mortimer, R. K. and Johnston, J. R. (1959). Life span of individual yeast cells. *Nature* **183**, 1751-2.
- Murakami, C. J., Burtner, C. R., Kennedy, B. K. and Kaerberlein, M. (2008). A method for high-throughput quantitative analysis of yeast chronological life span. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **63**, 113-21.
- Nabais, R. C., Sa-Correia, I., Viegas, C. A. and Novais, J. M. (1988). Influence of Calcium Ion on Ethanol Tolerance of *Saccharomyces bayanus* and Alcoholic Fermentation by Yeasts. *Appl Environ Microbiol* **54**, 2439-46.
- Nagalakshmi, U., Wang, Z., Waern, K., Shou, C., Raha, D., Gerstein, M. and Snyder, M. (2008). The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science* **320**, 1344-9.
- Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y. and Ohsumi, Y. (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 458-67.
- Nandi, D. L., Horowitz, P. M. and Westley, J. (2000). Rhodanese as a thioredoxin oxidase. *Int J Biochem Cell Biol* **32**, 465-73.
- Neufeld, T. P. (2010). TOR-dependent control of autophagy: biting the hand that feeds. *Curr Opin Cell Biol* **22**, 157-68.
- Norvell, A. and McMahon, S. B. (2010). Cell biology. Rise of the rival. *Science* **327**, 964-5.

- Novo, M., Beltran, G., Rozes, N., Guillamon, J. M., Sokol, S., Leberre, V., Francois, J. and Mas, A. (2007). Early transcriptional response of wine yeast after rehydration: osmotic shock and metabolic activation. *FEMS Yeast Res* **7**, 304-16.
- Novo, M., Bigey, F., Beyne, E., Galeote, V., Gavory, F., Mallet, S., Cambon, B., Legras, J. L., Wincker, P., Casaregola, S. and Dequin, S. (2009). Eukaryote-to-eukaryote gene transfer events revealed by the genome sequence of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 16333-8.
- Oberdoerffer, P., Michan, S., McVay, M., Mostoslavsky, R., Vann, J., Park, S. K., Hartlerode, A., Stegmuller, J., Hafner, A., Loerch, P., Wright, S. M., Mills, K. D., Bonni, A., Yankner, B. A., Scully, R., Prolla, T. A., Alt, F. W. and Sinclair, D. A. (2008). SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. *Cell* **135**, 907-18.
- Onodera, J. and Ohsumi, Y. (2004). Ald6p is a preferred target for autophagy in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **279**, 16071-6.
- Orlic, S., Arroyo-Lopez, F. N., Huic-Babic, K., Lucilla, I., Querol, A. and Barrio, E. (2010). A comparative study of the wine fermentation performance of *Saccharomyces paradoxus* under different nitrogen concentrations and glucose/fructose ratios. *J Appl Microbiol* **108**, 73-80.
- Pacholec, M., Bleasdale, J. E., Chrunyk, B., Cunningham, D., Flynn, D., Garofalo, R. S., Griffith, D., Griffor, M., Loulakis, P., Pabst, B., Qiu, X., Stockman, B., Thanabal, V., Varghese, A., Ward, J., Withka, J. and Ahn, K. (2010). SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1. *J Biol Chem* **285**, 8340-51.
- Palecek, S. P., Parikh, A. S. and Kron, S. J. (2000). Genetic analysis reveals that FLO11 upregulation and cell polarization independently regulate invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **156**, 1005-23.
- Perez-Torrado, R., Bruno-Barcena, J. M. and Matallana, E. (2005). Monitoring stress-related genes during the process of biomass propagation of

- Saccharomyces cerevisiae* strains used for wine making. *Appl Environ Microbiol* **71**, 6831-7.
- Perez-Torrado, R., Carrasco, P., Aranda, A., Gimeno-Alcaniz, J., Perez-Ortin, J. E., Matallana, E. and del Olmo, M. L. (2002a). Study of the first hours of microvinification by the use of osmotic stress-response genes as probes. *Syst Appl Microbiol* **25**, 153-61.
- Perez-Torrado, R., Gimeno-Alcaniz, J. V. and Matallana, E. (2002b). Wine yeast strains engineered for glycogen overproduction display enhanced viability under glucose deprivation conditions. *Appl Environ Microbiol* **68**, 3339-44.
- Postma, E., Verduyn, C., Scheffers, W. A. and Van Dijken, J. P. (1989). Enzymic analysis of the crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **55**, 468-77.
- Powers, R. W., 3rd, Kaeberlein, M., Caldwell, S. D., Kennedy, B. K. and Fields, S. (2006). Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling. *Genes Dev* **20**, 174-84.
- Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* **16**, 675-729.
- Puig, S. and Perez-Ortin, J. E. (2000). Stress response and expression patterns in wine fermentations of yeast genes induced at the diauxic shift. *Yeast* **16**, 139-48.
- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T. and Ramon, D. (1992). Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl Environ Microbiol* **58**, 2948-53.
- Rachidi, N., Barre, P. and Blondin, B. (1999). Multiple Ty-mediated chromosomal translocations lead to karyotype changes in a wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **261**, 841-50.
- Ramon, D. and Gonzalez, R. (2011). Improvement of wine yeast by genetic engineering en *Molecular wine microbiology*. Amsterdam ; Boston: Academic Press.

- Reverter-Branchat, G., Cabiscol, E., Tamarit, J., Sorolla, M. A., Angeles de la Torre, M. and Ros, J. (2007). Chronological and replicative life-span extension in *Saccharomyces cerevisiae* by increased dosage of alcohol dehydrogenase 1. *Microbiology* **153**, 3667-76.
- Reynolds, T. B. and Fink, G. R. (2001). Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* **291**, 878-81.
- Reynolds, T. B., Jansen, A., Peng, X. and Fink, G. R. (2008). Mat formation in *Saccharomyces cerevisiae* requires nutrient and pH gradients. *Eukaryot Cell* **7**, 122-30.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D. and Donèche, B. (2006). *Handbook of enology*, 2nd edn. John Wiley: Chichester, West Sussex, England ; Hoboken, NJ.
- Riou, C., Nicaud, J. M., Barre, P. and Gaillardin, C. (1997). Stationary-phase gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Yeast* **13**, 903-15.
- Robert, T., Vanoli, F., Chiolo, I., Shubassi, G., Bernstein, K. A., Rothstein, R., Botrugno, O. A., Parazzoli, D., Oldani, A., Minucci, S. and Foiani, M. (2011). HDACs link the DNA damage response, processing of double-strand breaks and autophagy. *Nature* **471**, 74-9.
- Robynt, J. F. and Whelan, W. J. (1972). Reducing value methods for maltodextrins. I. Chain-length dependence of alkaline 3,5-dinitrosalicylate and chain-length independence of alkaline copper. *Anal Biochem* **45**, 510-6.
- Rodriguez-Navarro, S. (2009). Insights into SAGA function during gene expression. *EMBO Rep* **10**, 843-50.
- Rossignol, T., Dulau, L., Julien, A. and Blondin, B. (2003). Genome-wide monitoring of wine yeast gene expression during alcoholic fermentation. *Yeast* **20**, 1369-85.
- Riou, C., Nicaud, J. M., Barre, P. and Gaillardin, C. (1997). Stationary-phase gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Yeast* **13**, 903-15.

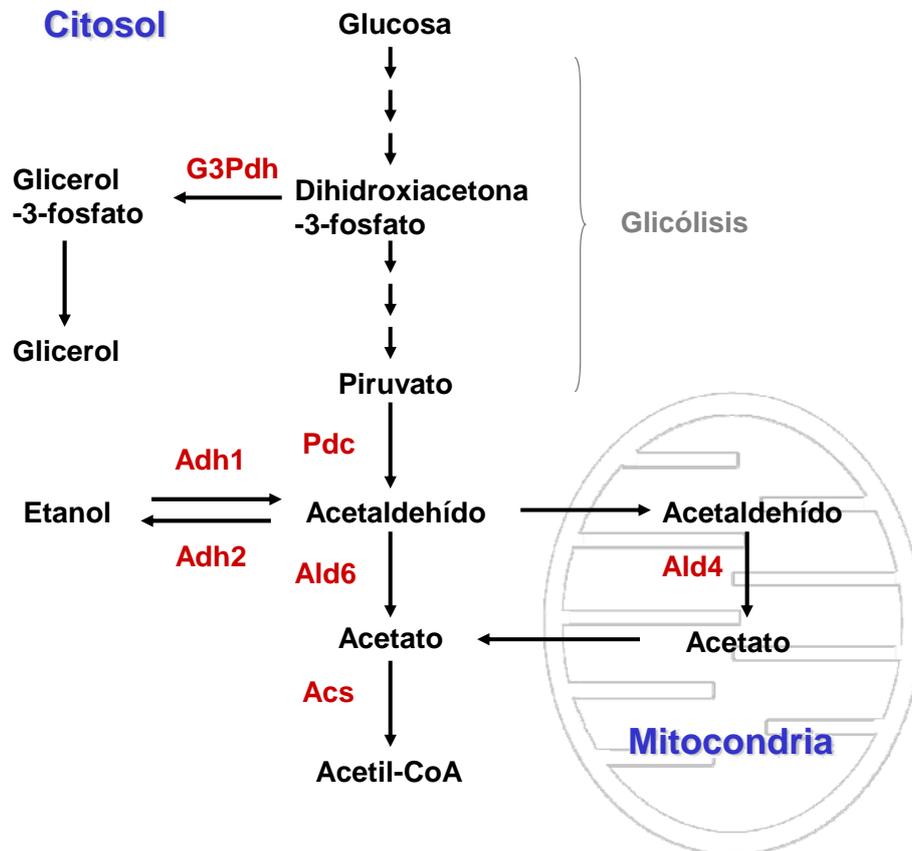
- Rubinsztein, D. C., Marino, G. and Kroemer, G. (2011). Autophagy and aging. *Cell* **146**, 682-95.
- Salmon, J. M. (1997). Enological fermentation kinetics of an isogenic ploidy series derived from an industrial strain. *J. Ferment. Bioeng.* 83:253-260.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning : a laboratory manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sampaio-Marques, B., Felgueiras, C., Silva, A., Rodrigues, F. and Ludovico, P. (2011). Yeast chronological lifespan and proteotoxic stress: is autophagy good or bad? *Biochem Soc Trans* **39**, 1466-70.
- Sauve, A. A., Wolberger, C., Schramm, V. L. and Boeke, J. D. (2006). The biochemistry of sirtuins. *Annu Rev Biochem* **75**, 435-65.
- Shahbazian, M. D. and Grunstein, M. (2007). Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem* **76**, 75-100.
- Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H. E., Schonfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., Rehling, P., Pfanner, N. and Meisinger, C. (2003). The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13207-12.
- Sinclair, D. A. and Guarente, L. (1997). Extrachromosomal rDNA circles--a cause of aging in yeast. *Cell* **91**, 1033-42.
- Singh, J., Kumar, D., Ramakrishnan, N., Singhal, V., Jervis, J., Garst, J. F., Slaughter, S. M., DeSantis, A. M., Potts, M. and Helm, R. F. (2005). Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to desiccation and rehydration. *Appl Environ Microbiol* **71**, 8752-63.
- Smets, B., Ghillebert, R., De Snijder, P., Binda, M., Swinnen, E., De Virgilio, C. and Winderickx, J. (2010). Life in the midst of scarcity: adaptations to nutrient availability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **56**, 1-32.

- Smith, D. L., Jr., McClure, J. M., Matecic, M. and Smith, J. S. (2007). Calorie restriction extends the chronological lifespan of *Saccharomyces cerevisiae* independently of the Sirtuins. *Aging Cell* **6**, 649-62.
- Stanfel, M. N., Shamieh, L. S., Kaeberlein, M. and Kennedy, B. K. (2009). The TOR pathway comes of age. *Biochim Biophys Acta* **1790**, 1067-74.
- Stanley GA, Douglas NG, Every EJ, Tzanatos T, Pamment NB (1993). Inhibition and stimulation of yeast growth by acetaldehyde. *Biotechnol. Lett.* **15**:1199-1204.
- Starai, V. J., Takahashi, H., Boeke, J. D. and Escalante-Semerena, J. C. (2004). A link between transcription and intermediary metabolism: a role for Sir2 in the control of acetyl-coenzyme A synthetase. *Curr Opin Microbiol* **7**, 115-9.
- Steinkraus, K. A., Kaeberlein, M. and Kennedy, B. K. (2008). Replicative aging in yeast: the means to the end. *Annu Rev Cell Dev Biol* **24**, 29-54.
- Suka, N., Luo, K. and Grunstein, M. (2002). Sir2p and Sas2p opposingly regulate acetylation of yeast histone H4 lysine16 and spreading of heterochromatin. *Nat Genet* **32**, 378-83.
- Suzuki, S. W., Onodera, J. and Ohsumi, Y. (2011). Starvation induced cell death in autophagy-defective yeast mutants is caused by mitochondria dysfunction. *PLoS One* **6**, e17412.
- Tabera, L., Munoz, R. and Gonzalez, R. (2006). Deletion of BCY1 from the *Saccharomyces cerevisiae* genome is semidominant and induces autolytic phenotypes suitable for improvement of sparkling wines. *Appl Environ Microbiol* **72**, 2351-8.
- Thornton, R. J. and Eschenbruch, R. (1976). Homothallism in wine yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek* **42**, 503-9.
- Torija, M. J., Beltran, G., Novo, M., Poblet, M., Guillamon, J. M., Mas, A. and Rozes, N. (2003). Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. *Int J Food Microbiol* **85**, 127-36.

- Trotter, E. W. and Grant, C. M. (2005). Overlapping roles of the cytoplasmic and mitochondrial redox regulatory systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **4**, 392-400.
- Tsuchiya, M., Dang, N., Kerr, E. O., Hu, D., Steffen, K. K., Oakes, J. A., Kennedy, B. K. and Kaerberlein, M. (2006). Sirtuin-independent effects of nicotinamide on lifespan extension from calorie restriction in yeast. *Aging Cell* **5**, 505-14.
- Valero, E., Cambon, B., Schuller, D., Casal, M. and Dequin, S. (2007). Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts. *FEMS Yeast Res* **7**, 317-29.
- Verbelen, P. J., De Schutter, D. P., Delvaux, F., Verstrepen, K. J. and Delvaux, F. R. (2006). Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. *Biotechnol Lett* **28**, 1515-25.
- Wei, M., Fabrizio, P., Hu, J., Ge, H., Cheng, C., Li, L. and Longo, V. D. (2008). Life span extension by calorie restriction depends on Rim15 and transcription factors downstream of Ras/PKA, Tor, and Sch9. *PLoS Genet* **4**, e13.
- Wei, M., Fabrizio, P., Madia, F., Hu, J., Ge, H., Li, L. M. and Longo, V. D. (2009). Tor1/Sch9-regulated carbon source substitution is as effective as calorie restriction in life span extension. *PLoS Genet* **5**, e1000467.
- Williamson, V. M., Bennetzen, J., Young, E. T., Nasmyth, K. and Hall, B. D. (1980). Isolation of the structural gene for alcohol dehydrogenase by genetic complementation in yeast. *Nature* **283**, 214-6.
- Wilson, M. A., Koutelou, E., Hirsch, C., Akdemir, K., Schibler, A., Barton, M. C. and Dent, S. Y. (2011). Ubp8 and SAGA regulate Snf1 AMP kinase activity. *Mol Cell Biol* **31**, 3126-35.
- Wissing, S., Ludovico, P., Herker, E., Buttner, S., Engelhardt, S. M., Decker, T., Link, A., Proksch, A., Rodrigues, F., Corte-Real, M., Frohlich, K. U., Manns, J., Cande, C., Sigrist, S. J., Kroemer, G. and Madeo, F. (2004). An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast. *J Cell Biol* **166**, 969-74.

- Yi, H., Li, X. H., Yi, B., Zheng, J., Zhu, G., Li, C., Li, M. Y., Zhang, P. F., Li, J. L., Chen, Z. C. and Xiao, Z. Q. (2010). Identification of Rack1, EF-Tu and Rhodanese as aging-related proteins in human colonic epithelium by proteomic analysis. *J Proteome Res* **9**, 1416-23.
- Yorimitsu, T., Zaman, S., Broach, J. R. and Klionsky, D. J. (2007). Protein kinase A and Sch9 cooperatively regulate induction of autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **18**, 4180-9.
- Yu, L., Alva, A., Su, H., Dutt, P., Freundt, E., Welsh, S., Baehrecke, E. H. and Lenardo, M. J. (2004). Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science* **304**, 1500-2.
- Zahedi, R. P., Sickmann, A., Boehm, A. M., Winkler, C., Zufall, N., Schonfisch, B., Guiard, B., Pfanner, N. and Meisinger, C. (2006). Proteomic analysis of the yeast mitochondrial outer membrane reveals accumulation of a subclass of preproteins. *Mol Biol Cell* **17**, 1436-50.
- Zaman, S., Lippman, S. I., Zhao, X. and Broach, J. R. (2008). How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annu Rev Genet* **42**, 27-81.
- Zott, K., Miot-Sertier, C., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A. and Masneuf-Pomarede, I. (2008). Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. *Int J Food Microbiol* **125**, 197-203.
- Zuzuarregui, A. and del Olmo, M. L. (2004). Expression of stress response genes in wine strains with different fermentative behavior. *FEMS Yeast Res* **4**, 699-710.

Anexo 1: reacciones metabólicas relevantes para este trabajo



G3Pdh: glicerol-3-fosfato deshidrogenasa

Pdc: piruvato descarboxilasa

Adh: alcohol deshidrogenasa

Ald: aldehído deshidrogenasa

Acs: acetil-CoA sintetasa